



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL
DESARROLLO Y COMPOSICIÓN GONADAL
EN LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (GOULD
1951) EN CONDICIONES CONTROLADAS DE
LABORATORIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

ECOL. MAR. ANDRÉS GRANADOS AMORES

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 12 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO Y COMPOSICIÓN GONADAL EN LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (GOULD 1951) EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO"

Presentada por el alumno:

GRANADOS

Apellido paterno

AMORES

materno

ANDRÉS

nombre(s)

Con registro:

B	1	0	1	4	1	0
---	---	---	---	---	---	---

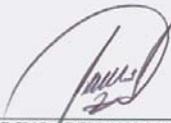
Aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis



DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ
Director de Tesis



DR. PEDRO ENRIQUE SAUCEDO LASTRA
2º. Director de Tesis



DR. LEONARDO ANDRÉS BETITIA CÁRDENAS



DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ



MC. MARÍA DEL CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 29 del mes Noviembre del año 2012
el (la) que suscribe ECOL. MAR. ANDRÉS GRANADOS AMORES alumno(a) del
Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS
con número de registro B101410 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ y DR. PEDRO ENRIQUE SAUCEDO LASTRA
y cede los derechos del trabajo titulado:

"EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL DESARROLLO Y COMPOSICIÓN GONADAL EN
LA CONCHA NÁCAR *Pteria sterna* (GOULD 1951) EN CONDICIONES CONTROLADAS DE LABORATORIO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: amores_ag87@hotmail.com - marellam@ipn.mx - psaucedo04@cibnor.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ECOL. MAR. ANDRÉS GRANADOS AMORES

nombre y firma

DEDICATORIA

A mis padres Adelina y Andrés, por el apoyo incondicional que me han brindado durante todos estos años de vida y por motivarme a seguir estudiando y darme esos empujoncitos que sin ellos no estaría alcanzando una nueva meta, este nuevo logro se los dedico a ustedes par de viejitos, ustedes que se han partido el lomo trabajando para poderme brindar una buena educación y poder superarme, GRACIAS.

A mi padre Andrés por esa fuerza bruta prestada, con la cual pude soportar los peores momentos durante estos tres años y medio fuera de casa.

A mi madre Adelina por sus cariños a distancia que me consolaron y animaron en los momentos de tristeza por no tener a la familia junta.

A mi hermana Pera por escucharme cuando no más lo necesitaba.

A mi hermana Jas por su compañía y cariño incondicional y por abrirme las puertas de tu casa y por soportarme todo este tiempo, nunca te dejo descansar siempre pegado a ti. Jas y Pera Gracias por aceptarme tal y como soy.

Y por ultimo, pero no menos importante a mi negrita (Jaseli) por todos los momentos bonitos que compartimos juntos y por permitirme verte crecer y estar a tu lado.

Mi familia este trabajo es para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme pertenecer a las filas del programa del posgrado y poder continuar mi formación como profesionista. A CONACYT y PIFI, por la beca otorgada, así como al programa de beca tesis del IPN sin el cual no me hubiese sido posible culminar este proyecto.

A mis directores de tesis, el Dr. Pedro Saucedo y el Dr. Marcial Arellano, por su ayuda y orientación en este trabajo de tesis, por aguantar la carrera junto a mí durante estos dos años y medio de posgrado. Así como por brindarme su experiencia en el campo académico, que me servirán en mi vida profesional. Gracias por todo.

Agradezco a mi comité revisor: M.C. Carmen Rodríguez Jaramillo, Dra. Patricia Ceballos, Dr. Andrés Abitia y Dr. Agustín Hernández, por tomarse el tiempo y brindarme su ayuda en la mejora de mi escrito de tesis, gracias por sus atinados comentarios y sugerencias y sobre todo por compartir su conocimiento como investigadores con mi persona.

Agradezco al Laboratorio de Histología, a la M.C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo por el apoyo infinito brindado a nivel académico y personal, ya que se tomó el tiempo de preguntar cómo me sentía y si estaba bien de salud, a pesar de tener una carga laboral pesada. Muchas gracias maestra Carmen no tengo como pagarle todo lo que hizo por mí y toda las contribuciones que hizo en este trabajo de tesis. A la Sra. María Eulalia Meza, por su gran apoyo técnico durante la realización de este trabajo y por su amistad. Gracias por brindarme un espacio cálido y de confianza, donde puede trabajar con mucha alegría y ánimos.

Agradezco a Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por el entrenamiento brindado y apoyo en el procesamiento de muestras. Así también al Laboratorio de Ecofisiología, a los técnicos Rosa Linda Salgado García, Gilberto González Soriano y Julio Egren Félix Domínguez por su ayuda en el manejo del programa de SITMA, así como al cuidado de mis

animales, y un agradecimiento especial a la Dra. Teresa Sicard por permitirme realizar el desarrollo de mi experimento en el laboratorio de Ecofisiología el cual se encuentra a su cargo y brindarme todo el material necesario para el mismo.

Al C.P. Humberto Seceña Amador y Cesar Servando Casas Núñez por su amable ayuda en todos los trámites escolares que realice en mi estancia de posgrado. A Lucia Susana Cárdenas Chávez y a José Roberto Aguilera Angulo, por todo el apoyo brindado en el centro de cómputo y por su ayuda en el proceso de impresión de la tesis.

Agradezco a mi cardumen el cual siempre me brindo su ayuda y ánimos en todo momento, sin importar que tal mal estuviera la situación siempre estaban para brindar una mano, Moni y Fabián ustedes representan la guía, los que siempre ayudaban a seguir por el buen camino, Joao, Lavi y mi buen amigo Ivan, ustedes fueron la primera mano de amistad en este camino jajaja y los compañeros de modelaje en las fotos playeras en la fea playa del conchalito jajaja, Marce, Chio, Lalo y Jat ustedes son la alegría del cardumen los que le pusieron esa chispa rara a este cardumen, y al Isma que mas que amigo es el Sr. Cura de las confesiones jajaja, a la joven Cristal por aguantarme durante casi dos años de convivencia y por abrir las puertas de su casa en un momento crucial de mi vida y por ultimo al joven Gabo por aguantarme en mis momentos de histeria creo que te toco la parte más fea a ti, tener que lidiar con todas mis broncas monetarias, de salud y anímicas. También agradezco a todos mis amigos que tuve la fortuna de conocer durante esta estancia de dos años y medio Gracias.

CONTENIDO

GLOSARIO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Biología reproductiva de ostras perleras	5
2.2. Relación de la temperatura con los ciclos reproductivos	8
3. HIPÓTESIS	12
4. JUSTIFICACIÓN	12
5. OBJETIVOS	12
5.1. Objetivo general	12
5.2. Objetivos particulares	12
6. METODOLOGÍA	13
6.1. Recolección y aclimatación de organismos	13
6.2. Diseño experimental	14
6.3. Muestreo	15
6.4. Determinación de la condición general de los organismos	16
6.5. Análisis histológicos	17
6.6. Análisis histoquímicos	18
6.7. Análisis bioquímicos	20
6.8. Análisis estadísticos	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Análisis inicial de tallas de los organismos	22
7.2. Condición general de los organismos	22

7.3. Análisis histológico y digital de imágenes	25
7.3.1 Proporción sexual y desarrollo gonádico	25
7.3.2. Índice de tejido gonádico	30
7.4. Análisis bioquímico	32
7.4.1. Gónada	32
7.4.2. Glándula digestiva	35
7.4.3. Músculo	38
7.5. Análisis histoquímicos	41
7.5.1. Índice lipídico e índice glucídico	41
7.5.1.1. Gónada	41
7.5.1.2. Glándula digestiva	44
7.5.1.3. Tejido conjuntivo laxo	47
7.5.1.4. Tejido conjuntivo adipogranular	50
7.5.2. Índice de lipofucsinas.....	53
7.5.2.1. Glándula digestiva	53
7.5.2.2. Tejido conjuntivo laxo	56
8. DISCUSIÓN	59
8.1. Diseño experimental	59
8.2. Efecto de la temperatura en los índices de condición y análisis histológicos, histoquímicos y bioquímicos	62
9. CONCLUSIONES	73
10. REFERENCIAS.....	74
11. ANEXOS	92
I. Simulador Térmico Marino (SITMA).	92
II. Técnica de inclusión en parafina	93
III. Técnica de tinción hematoxilina-eosina (de Harris).	93
IV. Estadios de desarrollo gonádico.....	95
V. Técnica de tinción de ácido periódico SCHIFF	97
VI. Técnica de tinción de Sudán Negro B	97
VII. Técnica de tinción de Carbol Fucsina Kinyoun	98

VIII. Determinación de proteínas bajo el protocolo de ácido bicinconínico (BCA).	
98	
IX. Determinación de carbohidratos (Roe, 1955)	99
X. Determinación de lípidos (Barnes y Blackstock, 1973).....	99

GLOSARIO

Atresia: Ovocito que ha detenido su desarrollo y que se encuentra en reabsorción.

Ciclo gametogénico: Evento repetitivo dentro de las gónadas que conducen a la formación de gametos. Etapas involucradas: 1) acumulación de tejidos nutritivos para ser utilizados durante la gametogénesis; 2) proliferación y diferenciación de células sexuales; 3) maduración de gametos maduros; 4) desove y 5) periodo de reposo y reabsorción de gametos reiduales.

Espermatozoide: Gameto masculino maduro, caracterizado por su movilidad.

Fagocito: Célula ameboide perteneciente al sistema de defensa del organismo, especializada en englobar y digerir cuerpos extraños no reconocidos por el organismo.

Folículo: Estructura en forma de sacos redondeados de tejido conjuntivo. Sus paredes están formadas por células germinales, que son pequeñas células eosinofilas con un nucleo central, que a medida que madura forman los gametos masculinos o femeninos (Zúñiga-Pacheco, 1998), por lo que este término suele ser utilizado indistintamente tanto en machos como en hembras.

Gametogénesis: Proceso que tiene como resultado la formación de gametos, se inicia con células germinales (ovogonias y espermatogonias).

Gónada: Órgano en el que tiene lugar el desarrollo de gametos masculinos o femeninos. Está compuesta por tejido conjuntivo, folículos, hematocitos y algunas fibras musculares. Cuando la gónada está desarrollada, envuelve a la glándula digestiva y forman un sistema funcional (Pérez-Estrada, 2000).

Gonocorismo: Condición de una especie que posee sexos separados ya sea machos o hembras durante todo su ciclo vital.

Hemocito: Células circulantes presentes en la hemolinfa, capaces de circular y migrar a otros tejidos del organismo animal (Bachère *et al.*, 2004), las cuales son

capaces de generar cambios de forma por la emisión de pseudopodios, actividad fagocítica, citotoxicidad y encapsulación de partículas de gran tamaño (Roch, 1999).

Hermafrodita: Tipo de reproducción sexual en la cual el organismo poseen a la vez órganos reproductivos usualmente asociados a los dos sexos: macho y hembra y que presenta la capacidad de producir gametos masculinos y femeninos.

Hermafrodita funcional simultáneo: Tipo de reproducción sexual en la cual los individuos de una población pueden funcionar como macho y hembra al mismo tiempo.

Hermafroditismo protándrico: Tipo de reproducción sexual en la cual algunos individuos de la población maduran por primera vez como machos y posteriormente se transforman en hembras a una cierta talla o edad, produciendo inicialmente espermatozoides y sucesivamente en el tiempo ovocitos.

Hermafroditismo protogínico: Tipo de reproducción sexual en la cual algunos individuos de la población maduran por primera vez como hembras y posteriormente se transforman en machos a una cierta talla o edad, produciendo inicialmente ovocitos y sucesivamente en el tiempo espermatozoides.

Histoquímica: Métodos que tienen por objeto localizar sustancias químicas conocidas, basadas en tinciones de células de origen gonádico o somático de los organismos.

Índice de condición: Valor numérico utilizado para comparar la condición física de los organismos, basado en el peso húmedo total del organismo y el peso húmedo de la masa visceral.

Índice de rendimiento muscular: Valor numérico utilizado para comparar el rendimiento del músculo abductor como indicador de la condición física de los organismos, basado en el peso húmedo de la masa visceral y el peso húmedo del músculo abductor.

Índice lipídico: Indicador cuantitativo del contenido de triglicéridos o fosfolípidos en tejido gonádico y somático de los organismos, basado en técnicas histoquímicas y apoyados con análisis digitales de imágenes.

Índice glucídico: Indicador cuantitativo del contenido de carbohidratos y mucinas en tejido gonádico y somático de los organismos, basado en técnicas histoquímicas y apoyados con análisis digitales de imágenes.

Lipofucsinas: Grupo numeroso de pigmentos granulosos pardo-amarillentos, formados por lipoproteínas, que se acumulan en las células como resultado de procesos fagocíticos derivados de la defensa del organismo o incluso por casos de estrés o enfermedad (Lynch *et al.*, 1972).

Ovocito: Gameto o célula sexual femenina en desarrollo que se diferencia durante la ovogénesis.

Tejido conjuntivo ó conectivo: Tejido que se encuentra dentro y fuera de los folículos; provee de soporte, transporte de nutrientes y sustrato para la diferenciación del tejido gonádico (Morse y Zardus, 1997), así como presencia de células del tejido vesicular conectivo encargadas de almacenar nutrientes (Saucedo *et al.*, 2002b).

Tinción: Proceso histológico que tiene como propósito resaltar ciertas estructuras celulares por medio de colorantes naturales o artificiales, que permiten una clara apreciación al microscopio.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Localización del área de recolecta de reproductores de *P. sterna*, Bahía de La Paz, BCS..... 13
- Figura 2. Unidades experimentales SITMA para reproductores de *P. sterna*. 15
- Figura 3. Biometría (A) y disección (B) de organismos experimentales de *P. sterna*, para obtener muestras de tejidos para histología, histoquímica y análisis bioquímico..... 16
- Figura 4. Microfotografías de cortes histológicos de gónada de *P. sterna*: A) tejido gonádico; B) la zona roja indica el tejido gonádico selección utilizada para el cálculo del índice de tejido gonádico (ITG). 18
- Figura 5. Microfotografías de cortes histológicos (20X) de *P. sterna*: A) secciones de tejidos utilizadas para realizar los análisis histoquímicos (TCL= Tejido conjuntivo laxo; TCG= Tejido conjuntivo adipogranular); B) tinción Azul Alciano PAS para identificación de carbohidratos en glándula digestiva; C) tinción Sudan Negro B para identificación de lípidos en glándula digestiva y D) tinción Carbol fucsina para identificación de lipofucsinas en tejido conjuntivo..... 20
- Figura 6. Variaciones del Índice de Condición (IC) de organismos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C 23
- Figura 7. Variaciones del Índice de Rendimiento Muscular (IRM) de organismos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C 24

Figura 8. Proporción de sexos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. 26

Figura 9. Estadios de desarrollo gonádico de hembras y machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. DES= Desarrollo; MAD= Madurez; DP= Desove parcial; PD= Posdesove. 28

Figura 10. Microfotografías de unas gónadas (20X) de *P. sterna* teñida con hematoxilina-eosina en la cual se observa hermafroditismo: A) Desove de macho y desarrollo de hembra; B) Desarrollo de macho y desarrollo inicial de hembra. El corte corresponde a un organismo de la muestra inicial. E= Espermatozoide; ER= Espermatozoide residual; OVA= Ovocitos vitelogénicos atresico; OPRA= Ovocito previtelogénico atresico y OPR= Ovocito previtelogénico. 30

Figura 11. Variaciones temporales en el Índice de Tejido Gonádico (ITG) de hembras y Machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 31

Figura 12. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la gónada de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se

muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 34

Figura 13. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la glándula digestiva de machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 37

Figura 14. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de él músculo de machos reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 40

Figura 15. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico de la gónada de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 43

Figura 16. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se

muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 46

Figura 17. Variaciones en el Índice Lípidico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo laxo de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 49

Figura 18. Variaciones en el Índice Lípidico e Índice Glucídico de él tejido conjuntivo adipogranular de machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 52

Figura 19. Variaciones en el Índice de Lipofucsinas de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 55

Figura 20. Variaciones en el Índice de Lipofucsinas del tejido conjuntivo de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm

error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.	58
Figura 21. Esquema representativo del Simulador Térmico Marino Automatizado (SITMA).....	92
Figura 22. Microfotografías de gónadas femeninas (20X y 10X) de <i>P. sterna</i> teñidas con hematoxilina-eosina, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: A)= Organismo en fase de indiferenciación sexual; B)= Hembra en desarrollo; C)= Hembra en madurez; D)= Hembra en desove parcial y E)= Hembra en reabsorción. OV= Ovocitos vitelogénicos; OPR= Ovocito previtelogénico; OPS= Ovocitos posvitelogenico; OR= Ovocitos residuales; OA= Ovocitos atrésicos; NC= Nucléolo; N= Núcleo; TJL= Tejido conjuntivo laxo y TJG=Tejido conjuntivo adipogranular.	95
Figura 23. Microfotografías de gónadas masculinas (20X) de <i>P. sterna</i> teñidas con hematoxilina-eosina, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: A)= Macho en desarrollo; B)= Macho en madurez; C)= Macho en desove parcial y D)= Macho en reabsorción. E= Espermatozoide; ER= Espermatozoide residual; EG= Espermatogonia y ET= Espermatocito	96

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Promedio de tallas (altura y longitud de la concha) y peso de los organismos de *P. sterna* sometidos a experimentación, así como muestra inicial. Des. Est.= Desviación estándar; K-S= Kolmogorov-Smirnov. 22
- Tabla 2. Variación de la composición bioquímica de la gónada de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 33
- Tabla 3. Variaciones de la composición bioquímica de la glándula digestiva en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 36
- Tabla 4. Variación de la composición bioquímica del músculo en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis. 39
- Tabla 5. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico de la gónada de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C=

Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 42

Tabla 6. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico de la glándula digestiva de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 45

Tabla 7. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo laxo de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 48

Tabla 8. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo adipogranular de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 51

Tabla 9. Variación del Índice de Lipofucsinas de la glándula digestiva de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C=

Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 54

Tabla 10. Variación del Índice de Lipofuscinas del tejido conjuntivo laxo de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 \pm 1; O2 =Oscilante 22 \pm 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis..... 57

RESUMEN

En *Pteria sterna*, el proceso reproductivo se encuentra regulado por una compleja interacción de factores ambientales, siendo la temperatura uno de los de mayor importancia. Se evaluó el efecto de diversos regímenes térmicos sobre el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos relacionados con la gametogénesis de *P. sterna* en el laboratorio. Se recolectaron 132 organismos (85 ± 5 mm de altura) en la Bahía de La Paz, los cuales fueron sometidos a cinco regímenes térmicos: constante ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$), ascendente (19 a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$), descendente (27 a $19\text{ }^{\circ}\text{C}$) y dos temperaturas oscilantes ($21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los tratamientos se manejaron por duplicado durante 34 días experimentales. La alimentación fue continua con *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* y *Chaetoceros gracilis* en proporción 1:1:1. Se realizaron biometrías, así como toma de muestras de gónada y tejidos somáticos (días 0, 17 y 34), mediante las cuales se obtuvieron los índices de condición (IC) y de rendimiento muscular (IRM), estadios de desarrollo gonádico, perfiles bioquímicos (carbohidratos, proteínas y lípidos), índice de tejido gonádico (ITG), índice lipídico (IL), índice glucídico (IG) e índice de fucsinas (ILF). Ni el IRM e IC variaron significativamente ($P > 0.05$) entre tratamientos al concluir el experimento. El ICG mostró valores $>30\%$ tanto para machos como para hembras en la mayoría de los tratamientos. En la gónada masculina se observaron las mayores concentraciones de carbohidratos en el tratamiento descendente ($P < 0.05$), en tanto que las hembras incrementaron la concentración de lípidos y proteínas en los tratamientos oscilante (O1) y constante. La glándula digestiva presentó una disminución de lípidos, proteínas y carbohidratos en los tratamientos constante y ascendente ($P < 0.05$). El músculo presentó un decremento de carbohidratos y un aumento de lípidos en los tratamientos constante y ascendente ($P < 0.05$). También se observó un incremento del IL en gónada de machos en el tratamiento ascendente ($P < 0.05$), un decremento del IG en la glándula digestiva ($P < 0.05$) y un incremento del IF en todos los tratamientos, tanto en glándula digestiva como en tejido conjuntivo.

ABSTRACT

In *Pteria sterna*, the reproductive process is regulated by a complex interaction of environmental factors, being temperature one of the most important. We evaluated the effect of different thermal regimes on the development and composition of the gonad and somatic tissues involved in gametogenesis in *P. sterna* at the laboratory. A total of 132 organisms were collected (85 ± 5 mm shell height) in Bahia de La Paz and subjected to five thermal regimes: constant ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$), ascendant ($19\text{-}27\text{ }^{\circ}\text{C}$), descendant ($27\text{ to }19\text{ }^{\circ}\text{C}$) and two oscillating temperatures ($21\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Treatments were run in duplicate for 34 days. The organisms were fed continuously with *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* and *Chaetoceros gracilis*, at a 1:1:1 ratio. Measurements were taken and samples of gonad and somatic tissues were collected (days 0, 17 and 34) to determine a condition index (CI), muscle performance index (MPI), stages of gonad development, biochemical profiles (carbohydrates, proteins and lipids), gonadal coverage ratio (ICG), lipid index (IL), carbohydrate index (GI) and fucine index (FI). Neither the MPI nor the CI varied significantly ($P > 0.05$) between treatments at the end of the trial. The ICG showed values $>30\%$ in males and females in most of the treatments. Male gonads yielded higher carbohydrate concentrations in the descendant treatment ($P < 0.05$), while females increased the lipid and protein concentration in the oscillating (O1) and constant treatments. In the digestive gland, lipids, proteins, and carbohydrates decreased in the constant and ascendant treatments ($P < 0.05$). The muscle showed a decrease in the carbohydrate content and an increase in the lipid content in the constant and ascendant treatments ($P < 0.05$). There was also an increase in the IL in male gonads in the ascendant treatment ($P < 0.05$) and a decrease in the IG in the digestive gland ($P < 0.05$), while the FI increased in all treatments in the digestive gland and connective tissue.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la acuicultura se ha transformado en una de las actividades productivas con mayor crecimiento, tanto en el mundo entero, como en nuestro país. Ello como resultado de la reducción progresiva de los recursos bióticos por la sobre explotación de las poblaciones naturales de una gran variedad de especies acuáticas, así como por el surgimiento de nuevas y eficientes técnicas de cultivo y el avance e innovación tecnológica y científica. Todo ello han convertido esta actividad en una alternativa de producción para varios sectores, entre los que destaca el pesquero (FAO, 2011).

Considerando los últimos registros de anuario de la FAO (2011) en el 2009, la producción mundial de peces, crustáceos y moluscos fue de 88 918 040 t. Dentro de estas cifras, México incursiona como el número 25 de la lista de productores, representando el 1.8% con 1 611 106 t, lo que equivale aproximadamente a \$USD 531,449 000.00 anuales. La producción por acuicultura en México generó en el 2009 aproximadamente 156 957 t de peces, crustáceos y moluscos cultivados, aportando \$USD 477 500.00.

Dentro de la acuicultura, la perlicultura (cultivo de perlas) representa la actividad acuícola de mayor rentabilidad y potencial en todo el mundo, con cerca de \$USD200,000,000 anuales (Taylor y Strack, 2008). De acuerdo con la FAO (2011), para el cultivo de ostras perleras y de perlas, se reporta una producción de 21,579 t en 2008, que generó \$USD 115,659.00 en países como China, Islas Fiji, Polinesia Francesa, Indonesia y Papúa Nueva Guinea. En estas cifras se incluyen perlas y conchas, destacando las especies del género *Pinctada* (*P. fucata*, *P. margaritifera* y *P. maxima*) y recientemente del género *Pteria* (*P. penguin* y en menor grado *P. sterna* en México). Esto debido a que las ostras perleras son susceptibles de ser aprovechadas integralmente, ya que además de la producción de perlas, que les confiere su principal atractivo, se aprovecha también la concha para trabajos de ornato. Igualmente, el nácar es utilizado en la industria cosmética y farmacéutica para la elaboración de cremas de belleza y para la regeneración de

defectos óseas en el campo de la biomedicina; el músculo abductor puede destinarse para consumo humano en diferentes presentaciones y el resto del cuerpo para la alimentación y engorda de animales de importancia comercial (Monteforte, 1990; Saucedo, 2001). Por ello, el cultivo de ostras perleras (nacaricultura) y cultivo de perlas (perlicultura) generan aportaciones importantes al producto interno bruto de diversos países asiáticos o del Pacífico Sur, como Japón, Polinesia Francesa, Islas Cook, Islas Marshall, Fiji, Australia, etc. De hecho, algunos de estos países, como Polinesia Francesa, Islas Cook, Islas Marshall, Tonga, Kiribati y otros del sudeste asiático, son considerados tradicionalmente perleros, ya que familias enteras se benefician de la nacaricultura y perlicultura, y basan casi en su totalidad su economía en ambas actividades (Gervis y Sims, 1992; Monteforte, 1996; Fassler, 1991).

En México el desarrollo de la perlicultura es incipiente, aunque las costas mexicanas albergan cuatro especies productoras de perlas representantes de los géneros *Pinctada* y *Pteria*, pertenecientes a la familia Pteriidae. En la costa del Caribe mexicano se distribuye *P. radiata* y *P. colymbus* y dos especies más se distribuyen en el Pacífico mexicano y Golfo de California, localmente conocidas como madreperla (*P. mazatlanica*) y ostra arcoíris o concha nácar (*P. sterna*). Estas dos últimas presentan gran importancia, ya que en el Noroeste del país se utilizan para sustentar las operaciones de granjas perleras, siendo *P. sterna* la de mayor importancia. Ello debido a que esta especie se utiliza mayormente para la producción de perlas en las empresas Perlas Únicas, S.A. de C.V. (antes Perlas del Mar del Cortés S.A. de C.V) en el área de la Bahía de Bacoichampo, Guaymas, Sonora) y Perlas del Cortés S. de R.L. M.I. empresa ubicada en la Bahía de La Paz, B.C.S. En ambas localidades, las dos especies producen perlas de alta calidad y poseen reconocimiento internacional (Kiefert *et al.*, 2004).

Por todo lo anterior, el recurso biológico constituido por las ostras perleras, particularmente *P. sterna*, posee un gran potencial de aprovechamiento. Sin embargo, para impulsar y fortalecer el desarrollo de la perlicultura en México, se requiere generar nuevo conocimiento sobre aspectos claves de la biología y

ecología de la especie que permitan un manejo adecuado de los organismos. Dentro de estos aspectos, la fase reproductiva constituye uno de los pilares o cimientos del proceso productivo, ya que permite la propagación controlada de la especie, y con ello una producción continua y basta de semilla en condiciones controladas de laboratorio.

Para las ostras perleras, el proceso reproductivo se rige, al igual que para muchas otras especie de moluscos subtropicales o templados, por una compleja combinación de factores exógenos (profundidad, periodos lunares, temperatura, disponibilidad de alimento y fotoperiodo) y endógenos (genéticos, hormonales, neuroendocrinos), los cuales condicionan el inicio y detenimiento de la gametogénesis, la maduración y desove de los gametos y la reabsorción de los mismos para el reciclamiento de los nutrientes (Bayne, 1976; Gease y Pearse, 1974, 1979; Lubet, 1981; Mackie, 1984; Baber y Blake, 1991; Lucas, 1992; Chavez-Villalba, 2001; Román *et al.*, 2002; Saucedo y Southgate, 2008). Sin embargo la temperatura y la disponibilidad de alimento son los factores exógenos, que parecen ejercer mayor efecto sobre el ciclo reproductivo de los bivalvos (Gosling, 2003), incluidas las ostras perleras (Saucedo y Southgate, 2008).

Se han realizado estudios que abordan la respuesta reproductiva de las ostras perleras, en particular *P. sterna*, en donde se han descrito los ciclos reproductivos anuales (Hernández-Díaz y Buckle-Ramírez, 1996; Saucedo y Monteforte, 1997; Hernández-Olalde *et al.*, 2007), fecundación *in vitro* de gametos (Harris *et al.*, 2002), análisis de los ciclos de almacenamiento de energía (Vite-García y Saucedo, 2008) y estudio del esfuerzo reproductivo (Cáceres-Puig *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de la generación de estos conocimientos, existe un vacío significativo de información sobre la respuesta de los organismos mantenidos en condiciones controladas de laboratorio. Esto es particularmente claro con respecto al efecto de ciertas variables importantes, como la temperatura, que juegan un papel decisivo para inducir la maduración en laboratorio y asegurar la calidad de gametos y el éxito en el cultivo de las larvas y la producción suficiente y consistente de semilla. Por ello, la presente tesis está dirigida a

evaluar la respuesta y condición de reproductores de *P. sterna* sometidos a diferentes regímenes térmicos en el laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biología reproductiva de ostras perleras

El estudio de la reproducción de la familia Pteriidae ha permitido caracterizar la biología reproductiva de las principales especies comerciales o con potencial de explotación en la industria perlera. Entre las cuales destacan especies como *P. máxima* (Rose *et al.*, 1991), *P. funcata* (Desai, *et al.*, 1979; Chellam, 1987; Behzadi *et al.*, 1997; Jamili *et al.*, 1999), *P. sterna* (Arizmendi-Castillo, 1996; Hernández-Díaz y Buckle-Ramírez, 1996; Saucedo y Monteforte, 1997; Hernández-Olalde *et al.*, 2007), *P. mazatlanica* (Sevilla, 1969; García-Domínguez, 1996; Torres y Cruz, 2002) *P. albina* (Tranter, 1958) *P. margaritifera* (Thielley *et al.*, 1993; Pouvreau *et al.*, 2000; Acosta y Southgate, 2005). Dichas investigaciones se enfocan principalmente en describir ciclos reproductivos, así como características morfológicas de los órganos reproductores y las principales células germinales participantes en el proceso reproductivo (Thielley *et al.*, 1993). En el caso particular del género *Pinctada*, algunos aspectos del proceso reproductivo son comunes para todos los miembros de dicho género, ya que presentan ciclos reproductivos continuos y sincronía a lo largo del año, así como variables periodos de actividad reproductiva y picos de desove (Tranter, 1958; Chellam, 1987; Jamili *et al.*, 1999; Pouvreau *et al.*, 2000; Torres y Cruz, 2002).

Las principales diferencias se centran en la temporalidad con la que ocurren los eventos de desove, mismos que dependen de la distribución geográfica latitudinal de cada especie (Saucedo y Southgate, 2008). Se ha reportado que algunas especies de ostras pueden presentar hasta dos picos máximos de desoves, como es el caso de *P. albina* (Tranter, 1958) y *P. funcata* (Desai *et al.*, 1979; Jamili *et al.*, 1999). Sin embargo, *P. mazatlanica* (Saucedo y Monteforte, 1997; Torres y Cruz, 2002) y *P. margaritifera* (Acosta y Southgate, 2005) presentan únicamente un pico de desove de mayor intensidad en los meses cálidos del año cuando la temperatura oscila entre los 23 y los 30 °C.

Por otro lado, se ha reportado que los desoves de *P. sterna*, perteneciente al género *Pteria*, se encuentran ligados a los periodos fríos del año, y que al igual que las especies del género *Pinctada*, presentan desoves de menor intensidad de forma continua durante todo el año, con uno o dos desoves de mayor intensidad. En Bahía de los Ángeles los desoves ocurren en los meses de diciembre, febrero y agosto (Hernández-Díaz y Buckle-Ramírez, 1996), mientras que en las cercanías a Guaymas, Sonora, se presenta un solo periodo de desove de marzo a mayo, cuando la temperatura del agua varía de 19 a 22 °C (Arizmendi-Castillo, 1996). Por otro lado, en Bahía de la Paz los desoves se presentan durante enero-febrero, con temperaturas de 20-22°C, no obstante, ocurre un segundo periodo de desove en mayo, con temperaturas entre 23-25 °C (Saucedo y Monteforte, 1997). En la laguna Ojo de Liebre Hernández-Olalde *et al.*, (2007) reportaron la ocurrencia de desove de junio a septiembre, cuando la temperatura estuvo entre los 23 y 25 °C, lo cual coincide con las temperaturas de desoves de esta especie en la Bahía de La Paz (Saucedo y Monteforte, 1997).

Otra característica típica es el gonocórismo de las especies, lo cual significa la presencia de sexos separados, así como el hermafroditismo protándrico, que implica que la primera madurez sexual sea del sexo masculino, cambiando posteriormente al sexo femenino a una cierta talla/edad, en función de los parámetros ambientales. Esta condición ha sido reportada para *P. sterna*, el cual ocurre a partir de los 50 mm de altura (Saucedo y Monteforte, 1997). Los autores mencionan que en dicho cambio se pueden observar gametos femeninos como masculinos en la misma gónada, los primeros en desarrollo y los segundos en regresión o atrofia. Sin embargo, en caso de condiciones de estrés fisiológico, dadas por altas densidades de cultivo o por re-direccionamiento de energía destinada al proceso reproductivo, podría presentarse un evento de protógina, es decir, una reversión de sexo de femenino a masculino, aunque es poco común (Tranter, 1958; Saucedo *et al.*, 2002). En este sentido, existen excepciones a las condiciones de hermafroditismo antes mencionada, por ejemplo *P. máxima* presenta un hermafroditismo de tipo funcional ya que se ha reportado que ambos

sexos maduran de manera simultánea, con porcentajes similares de gametos maduros (Rose *et al.*, 1990), mientras que *P. funcata* presenta una dominancia de sexo femenino durante el ciclo gametogénico (Chellam, 1987).

El tiempo de madurez sexual varía entre cada especie y depende del tiempo de vida y la talla de cada una. Se ha reportado que la ostra *P. margaritifera*, cultivada en la laguna Takapoto, ubicado en las Polinesias francesas, presenta maduración sexual tardía al alcanzar la madurez sexual al final del primer año de vida, a una talla de altura de la concha de ~40 mm, caso similar se puede observar en *P. máxima* la cual ocurre al superar los 110 mm de altura de la concha (Rose *et al.*, 1990; Pouvreau *et al.*, 2000). La madurez sexual en algunas especies puede superar el año como en el caso particular de *P. sterna* la cual se inicia a partir de los 17 meses de vida, cuando alcanza una talla de 39 mm de altura de la concha. Otras especies pueden presentar madurez temprana, como es el caso de *P. albina* y *P. funcata*, las cuales maduran sexualmente entre los 4 y 8 meses de vida, siendo unas de las representantes más pequeña del género *Pinctada* (Tranter, 1958; Dasai, 1987).

Los ciclos reproductivos se encuentran estrechamente ligados con los ciclos de almacenamiento y utilización de energía de los diferentes tejidos, los cuales ayudan a sostener la gametogénesis cuando la disponibilidad de alimento en el medio es baja. Estos varían de acuerdo a la influencia de diverso factores exógenos y endógenos entre especies e incluso entre poblaciones de la misma especie (Epp *et al.*, 1988, Barber y Blake, 1991). En este sentido tanto la concha nácar (*P. sterna*) como la madre perla (*P. mazatlanica*) presentan incrementos en las reservas de proteínas y lípidos almacenados en el tejido conjuntivo durante el proceso gametogénico, a la par con esto se ha demostrado que existen un decremento en las concentraciones de proteínas en músculo de ambas especies y únicamente en *P. sterna* se ha observado que existe un decremento también en la glándula digestiva indicando una posible movilización para cubrir necesidades energéticas durante el desarrollo gonádico. También, se ha demostrado que la cantidad de energía de los tejidos somáticos (músculo, manto y glándula digestiva)

decrece cuando la temperatura disminuye, presumiblemente debido a que las temperaturas bajas (~ 21 °C) estimulan un movimiento de energía hacia la gónada, mientras que las temperaturas elevadas (~ 28.8 °C) muestran un evento de acumulación en tejidos somáticos, así como los mínimos de energía en la gónada (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009).

En lo que respecta a la experimentación bajo condiciones controladas de laboratorio, se han realizado trabajos de inducción a la maduración de reproductores de *P. sterna* implementando diferentes tipos de dietas artificiales elaboradas a base de cereales, en los cuales se han reportado hasta un 40 % de desoves exitosos en machos alimentados con fécula de maíz (harina de germen). Sin embargo, al integrar harinas de arroz y fécula de maíz se ha logrado obtener hasta un 100 % de desoves (Avilés-Quevedo y Mazón-Suástegui, 1989). Experiencias similares ocurrieron con *P. martensii*, al implementar dietas artificiales basadas en un alto contenido de carbohidratos, como es el caso de las harinas (Kuwatani y Nishii, 1968). Se ha demostrado que la implementación de ácidos grasos altamente saturados (microencapsulados de DHA) como complemento de una dieta mixta de las microalgas *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* y *Pavloba salina*, proporción 1:1:1, incrementan el desarrollo gonádico, alcanzado hasta un 50% de organismos la fase de posdesoves y un 40% la fase de madurez (Hernández-López, 2012).

2.2. Relación de la temperatura con los ciclos reproductivos

En los moluscos bivalvos, particularmente los que presentan distribución templada o subtropical, las fluctuaciones térmicas anuales del medio ambiente se consideran uno de los principales detonantes de una serie de eventos reproductivos involucrados en el inicio e interrupción de la gametogénesis, maduración y liberación de gametos y reabsorción de nutrientes (Gosling, 2003). En la Laguna Ojo de Liebre (Baja California Sur) se ha observado que la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*), presenta su máxima actividad de la gametogénesis y periodo de desove, cuando las temperaturas del agua son las

más altas, las cuales corresponden a los meses de agosto a octubre, posteriormente, durante los meses fríos (noviembre a mayo) la gónada entra en una fase de recuperación (Ramírez-Castillo, 2003; Arellano-Martínez, 2004a). Así mismo, la temperatura puede influir en el transporte de reservas, como se ha reportado para la almeja *Argopecten ventricosus*, donde la disminución de la temperatura favorece al transporte de reservas desde el músculo abductor a la gónada (Villalejo-Fuerte y Ceballos-Vázquez, 1996).

En *Crassostrea gigas* las temperaturas altas (19°C) de verano en la Bahía de Marennes Oléron (Francia) regulan el tiempo y velocidad de los eventos reproductivos de los machos, dando como resultado un rápido desarrollo gametogénico y más de un desove al año. (Pardo-Fernández *et al.*, 2002, Enríquez-Díaz *et al.*, 2009). Para esta misma especie se evaluó en condiciones controladas el ciclo reproductivo en un periodo anual, sugiriendo el efecto de la temperatura como un acelerador en la proliferación de gonias y obtención de organismos maduros al realizar simulaciones invernales (8-11 °C) (Fabioux *et al.*, 2005). Este resultado se obtuvo sin importar el estado fisiológico inicial de las ostras en experimentación, y permitió asegurar la producción de gametos durante un año completo, incluso en el periodo de descanso natural de la especie en otoño.

Otros trabajos realizados en laboratorio han logrado obtener maduración gonádica de moluscos en condiciones controladas de laboratorio, manteniendo temperaturas estables y suministrando una dieta de alimento adecuada. La idea de maduración de organismos a temperatura estable, se basa en el supuesto de evitar que parte de la energía destinada a la reproducción se desvíe a procesos de compensaciones fisiológicas, lo cual sucede cuando la temperatura es variable o desfavorable. La almeja *N. subnodosus* ha sido sometida a temperaturas constantes de 24 °C y un suministro continuo de microalgas, con lo cual se ha obtenido madurez gonádica (Villavicencio, 1997). También, se han obtenido organismos reproductivamente maduros e incluso con desoves prematuros al emplear dichas temperaturas estables (Sicard-González *et al.*, 2006). Sin

embargo, se ha reportado que dichos tratamientos térmicos estables aunque generan un rápido crecimiento gonádico y un rápido desarrollo gametogénico asincrónico, también provocan una pérdida de peso corporal y una alta producción de ovocitos pero con bajo crecimiento (López-Sánchez, *et al.*, 2009). Contrario a esto, en *Atrina maura* se ha observado que a una temperatura constante de 20 °C genera un aumento de talla de los ovocitos, así como una mayor cantidad de triglicéridos almacenados en tanto que temperaturas constantes de 25 y 30 °C, propician una gran número de ovocitos atrésicos (Rodríguez-Jaramillo, 2004)

Las fluctuaciones térmicas han sido consideradas dentro de los trabajos experimentales, con el fin de igualar las condiciones ambientales naturales, de manera que incrementos graduales u oscilantes han generado resultados satisfactorios en la maduración de moluscos bivalvos, tal es el caso de *N. subnodosus* (Gutiérrez-Villaseñor y Chi-Barragán, 1997; Robles-Mungaray, 2001; Villegas-Carrasco, 2004; Sicard-González *et al.*, 2006; López-Sánchez, *et al.*, 2009), *P. mazatlanica* (Saucedo *et al.*, 2001), *C. gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2002) *A. purpuratus* (Martínez y Pérez, 2003). En la almeja *N. subnodosus* se observó que las temperaturas crecientes (de 17 a 21 °C) en un periodo de 20 días, con una alimentación de 8.0×10^4 cel/mL de *I. galbana*, *C. gracilis*, *C. calcitrans* y *Dunaliella tertiolecta*, pueden estimular la maduración gonádica (Robles-Mungaray, 2001). También se ha observado que ejemplares de esta especie con gónadas en fase inicial de madurez y mantenidos a temperaturas oscilantes en laboratorio (23 ± 5 °C en 24 h), desovaron masivamente a los 16 días de iniciado el experimento, mientras que otros mantenidos a temperatura estable (23 °C) no muestran el mismo efecto (Maeda-Martínez, 2003).

Por lo anterior, han surgido trabajos comparativos usando temperaturas estables ascendentes y oscilantes para la maduración gonádica, los cuales han demostrado resultados variables, dadas las exigencias de cada especie en el proceso reproductivo. Para *P. mazatlanica* se realizaron simulaciones entre temperaturas constantes (20, 24 y 28 °C) y ascendentes (de 20 a 29 °C), con fines de acondicionamiento reproductivo, dando como resultado que tanto el régimen de

temperaturas constantes (24 °C) como el ascendente, favorecen una mayor proporción de organismos maduros, un mayor número y tamaño de ovocitos postvitelogénicos, así como mayores índices gonádicos (Saucedo *et al.*, 2001). En contraste, se ha reportado que la almeja *A. purpuratus* en condiciones de temperatura estable (15°C), muestra un mayor porcentaje de organismos en etapa de desove y los más altos valores del índice gonadosomático, mientras que los organismos sometidos a temperatura ascendente (de 15 a 19 °C) y descendente (de 19 a 15 °C), mostraron una mayor variabilidad en la madurez ovocitaria de la especie (Martínez y Pérez, 2003). La exposición a temperaturas oscilantes puede potenciar el crecimiento de la almeja mano de león (Sicard-González *et al.*, 2006), mientras que los tratamientos de oscilaciones térmicas de baja amplitud contribuyen a un incremento del peso húmedo, a un lento crecimiento gonádico, así como a un rápido desarrollo gametogénico con sincronía y una baja producción de ovocitos pero con alto crecimiento de los mismos (López-Sánchez, *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESIS

Dada la importancia de la temperatura del agua como factor regulador de la reproducción de los moluscos bivalvos marinos, se espera entonces que al aplicar diferentes regímenes térmicos (ascendente, descendente, oscilante y constante), la condición de los organismos, así como el grado de desarrollo y composición bioquímica de la gónada y tejidos somáticos variarán significativamente entre tratamientos.

4. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas en la maduración de la ostra perlera *P. sterna* en condiciones de laboratorio es la limitada información acerca de las variables ambientales a controlar, principalmente la temperatura y calidad de alimento. La importancia de dichas variables radica en el efecto directo que tienen en los procesos fisiológicos de almacenamiento y utilización de reservas energéticas durante la maduración de los organismos.

Por lo tanto, resulta indispensable definir los requerimientos fundamentales en el acondicionamiento de reproductores de *P. sterna* en condiciones de laboratorio. En este sentido, en el presente estudio se pretende establecer un régimen térmico adecuado para lograr una maduración exitosa de reproductores de *P. sterna* y de esta manera establecer las bases en el desarrollo e innovación de zootecnias eficientes para el acondicionamiento gonádico de reproductores (maduración) y con esto poder garantizar en un futuro la producción continua de semillas (juveniles) que abastezca la demanda en la industria perlera en México.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto de diversos regímenes térmicos sobre el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos relacionados con la gametogénesis de la concha nácar *P. sterna* en el laboratorio.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar el grado de desarrollo de la gónada de *P. sterna* por medio de análisis histológicos y su relación con las variaciones de los índices de condición e índice de tejido gonadal, en función al efecto de los diferentes regímenes térmicos aplicados.
- Evaluar el proceso de almacenamiento de reservas energéticas de *P. sterna*, por medio de análisis histoquímicos y bioquímicos de la gónada y tejidos somáticos, en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados.
- Evaluar el posible estrés fisiológico de los organismos debido a la termorregulación.

6. METODOLOGÍA

6.1. Recolección y aclimatación de organismos

Se recolectaron de las instalaciones de cultivo submarino del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) ubicada en la Caleta El Merito, Bahía de La Paz, B.C.S. ($24^{\circ} 16'N$ y $110^{\circ} 19'W$) (Fig. 1) un total de 132 organismos adultos de *P. sterna*. La recolecta de los organismos se realizó en el mes de junio del 2008, considerando que los organismos se encontraban fuera de la temporada reproductiva (Saucedo y Monteforte, 1997). Los ejemplares se trasladaron al Laboratorio de Ecofisiología del CIBNOR para su aclimatación, para lo cual fueron colocados en contenedores de plástico de 70L, provistos de agua de mar filtrada a $1 \mu m$ y esterilizada por luz UV, así como de aireación a una temperatura de $24 \pm 1^{\circ}C$ y fotoperiodo a 12h:12 h de luz y oscuridad durante dos semanas. Se utilizaron 10 contenedores, y en cada uno se colocaron 12 organismos, los cuales fueron alimentados con un flujo constante de una mezcla de microalgas *Isochrysis galbana*, *Pavlova salina* y *Chaetoceros gracilis* en proporción 1:1:1 en cuanto a número de células.

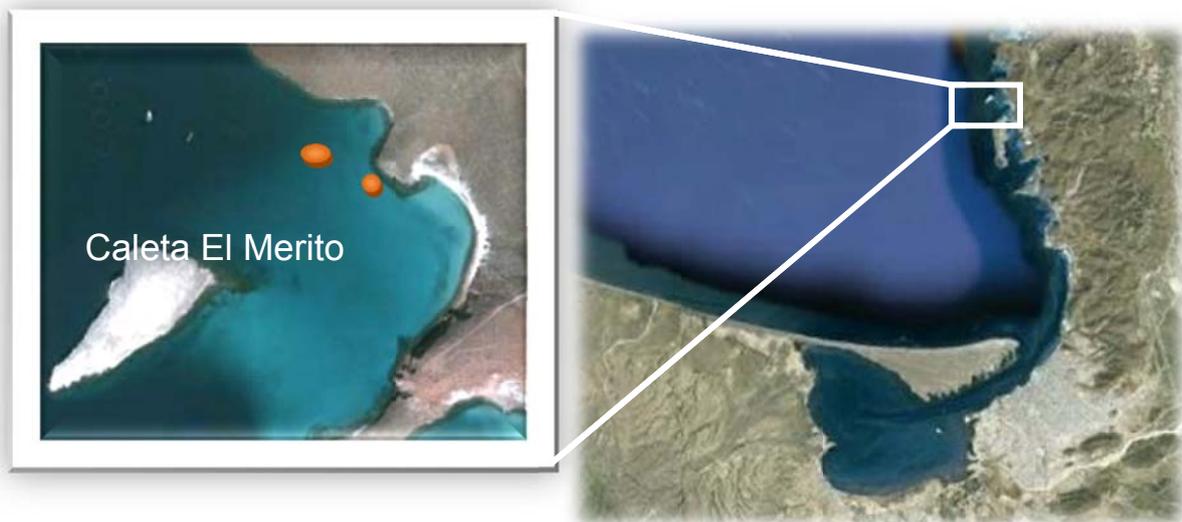


Figura 1. Localización del área de recolecta de reproductores de *P. sterna*, Bahía de La Paz, BCS.

6.2. Diseño experimental

Una vez concluida la fase de aclimatación, los organismos fueron sometidos a cinco tratamientos térmicos en los que se simularon diferentes tipos de regímenes térmicos como se menciona a continuación. En cada tratamiento se conservaron las mismas características de la aclimatación previamente descritas.

Los regímenes térmicos experimentales a evaluar fueron:

- 1) Temperatura constante (C): a razón de 22°C por 34 días– Grupo control.
- 2) Temperatura ascendente (A): se incrementó gradualmente de 19 a 27°C a razón de 2°C cada semana durante 34 días.
- 3) Temperatura descendente (D): se disminuyó gradualmente de 27 a 19°C a razón de 2°C cada semana durante 34 días.
- 4) Temperatura oscilante (O1): variaciones de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ (2 ciclos/12h) durante 34 días.
- 5) Temperatura oscilante (O2): variaciones de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (1 ciclo/24h) durante 34 días.

Cada régimen térmico se aplicó por duplicado. Los regímenes térmicos iniciales (1, 2 y 3) se controlaron con calentadores sumergibles de 300 W. Para regular los regímenes térmicos oscilantes (4 y 5) se utilizó el Simulador Térmico Marino Automatizado (SITMA) (Fig. 2), cuyo funcionamiento se describe en el Anexo I.

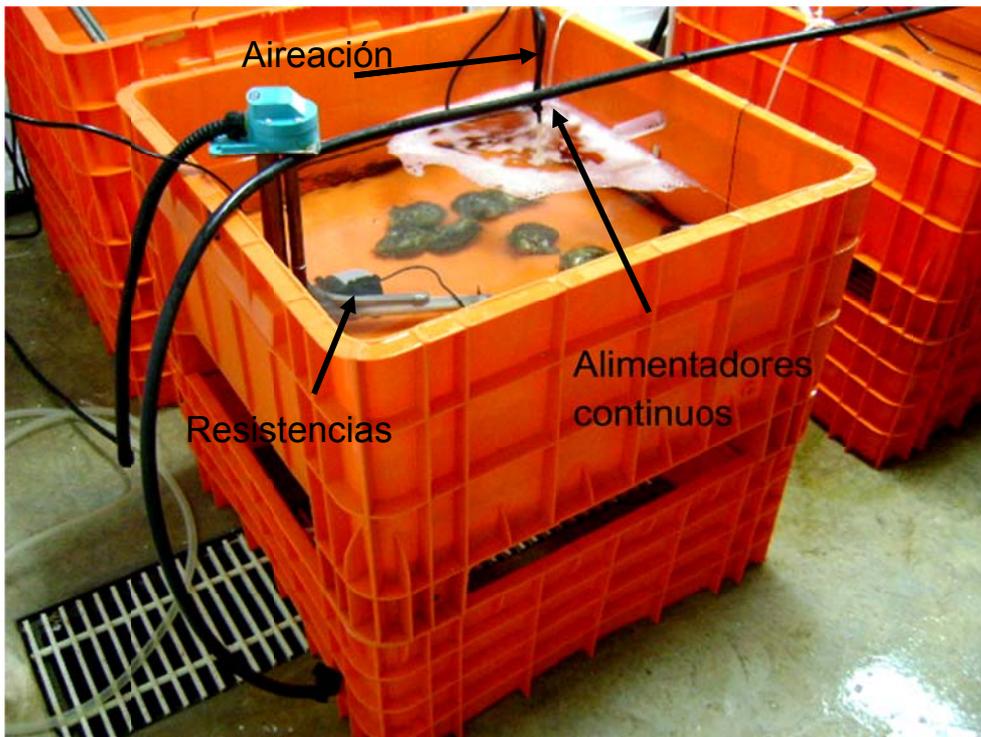


Figura 2. Unidades experimentales SITMA para reproductores de *P. sterna*.

6.3. Muestreo

Al inicio del experimento (T_0) se tomó una muestra representativa de 12 ostras, las cuales sirvieron como control. Estas fueron medidas para registrar la altura y longitud de la concha (precisión 0.1 mm), así como el peso húmedo total con concha, peso total sin concha y peso del músculo aductor (precisión 0.01 g). Ello con el fin de poder determinar el índice de condición (IC) e índice de rendimiento muscular (IRM) (ver sección 5.4.) (Fig. 3A). A su vez, se recolectaron muestras de gónada, glándula digestiva y músculo (Fig. 3B), de las cuales, una muestra del tejido gonádico se fijó en solución Davidson por 48 h para su posterior análisis histológico e histoquímico (ver sección 5.5 y 5.6) y muestras adicionales de la gónada y tejidos restantes se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para los análisis bioquímicos (ver sección 5.7). Posteriormente, se realizaron otros dos muestreos para la recolecta de tejidos, uno a los 17 días (T_1) y otro a los 34 días (T_2), siguiendo la misma metodología antes mencionada. En ambos casos, se recolectaron seis ostras por réplica de cada tratamiento experimental.

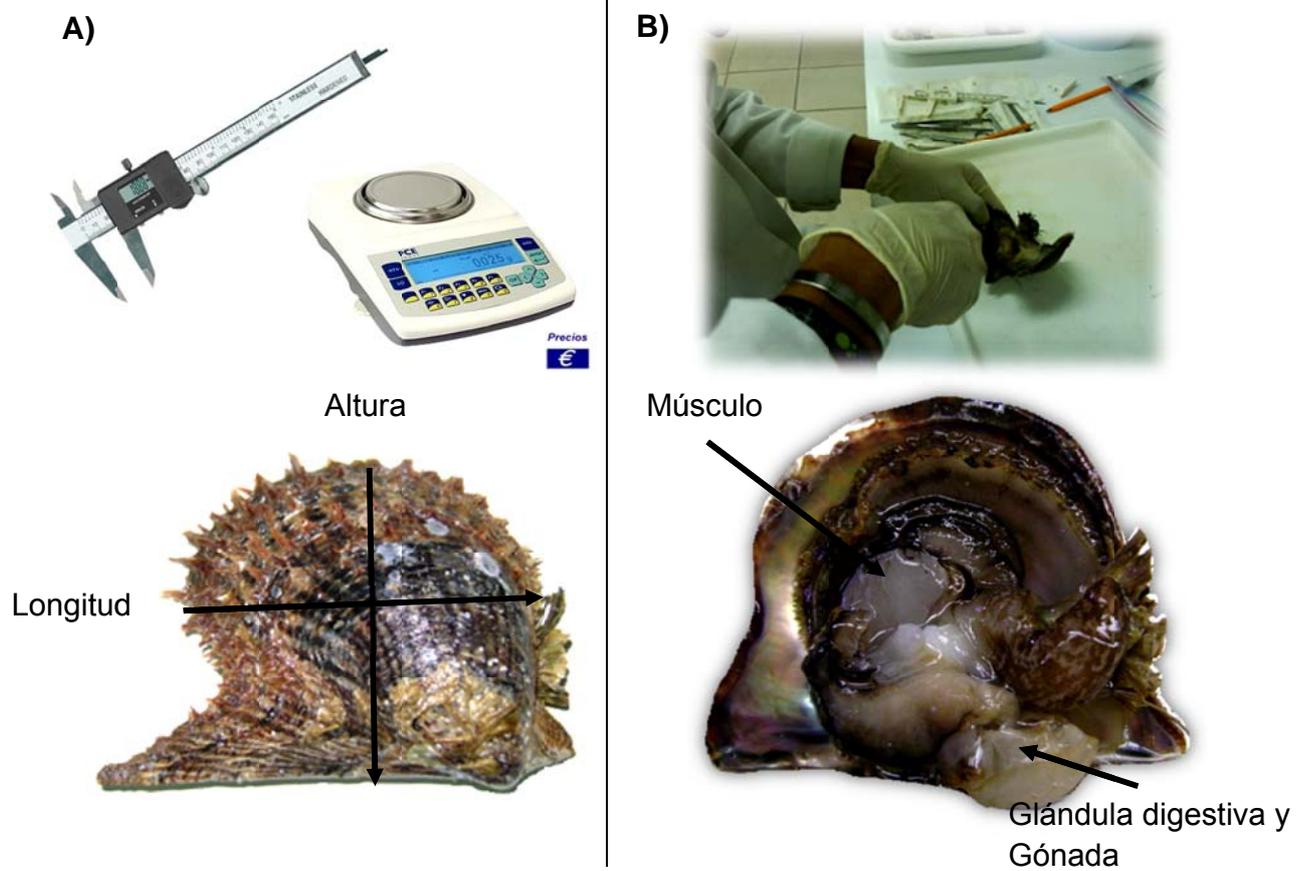


Figura 3. Biometría (A) y disección (B) de organismos experimentales de *P. sterna*, para obtener muestras de tejidos para histología, histoquímica y análisis bioquímico.

6.4. Determinación de la condición general de los organismos

Los datos biométricos previamente obtenidos en cada tiempo de muestreo (0, 17 y 34 días) se utilizaron para realizar el cálculo del Índice de Condición (IC) e Índice de Rendimiento Muscular (IRM) (Villalejo-Fuerte y Ceballos-Vázquez, 1996) de la siguiente forma:

$$IC = \frac{PMV}{PC} \times 100 \quad \quad IRM = \frac{PM}{PSC} \times 100$$

Donde:

PMV=Peso de la masa visceral (g); *PM*=Peso de músculo aductor (g); *PC*=Peso del organismos con concha (g) y *PSC*=Peso del organismos sin concha (g).

6.5. Análisis histológicos

Las muestras de gónadas previamente fijadas en solución Davidson, se procesaron siguiendo las técnicas histológicas propuestas por Howard y Smith (1983). Estas consisten en deshidratar los tejidos en alcoholes de concentración ascendente (70 a 100%), y posteriormente incluirlas en Paraplast-TX® y cortarlas a 4 µm en un micrótopo de rotación (Leica RM 2155) (ver, anexo II). Los cortes histológicos fueron teñidos por contraste con la técnica de hematoxilina-eosina (H-E) (Humason, 1979) (ver, anexo III). Las laminillas previamente teñidas se digitalizaron en tres campos visuales en alta resolución (3600 dpi; 3465×5184 pixeles) tomados al azar en aumentos de 10x y 20X, empleando un sistema de análisis digital de imágenes, el cual está integrado por un microscopio compuesto (Olympus BX50), una cámara digital (Coolsnap-Pro) y una computadora Pentium III que contenía el programa Image Pro Plus® (versión 6.0, Media Cybernetics, E.U.A.).

Los estadios de desarrollo gonádico se designaron siguiendo la clasificación para ostras perleras propuesta por Tranter (1958a, b), con modificaciones propuestas por Saucedo y Monteforte (1997) y Saucedo *et al.* (2002) en cuanto al número de estadios. Los estadios de desarrollo gonadal considerados fueron: 1) indiferenciado, 2) desarrollo, 3) madurez, 4) desove parcial y 5) post-desove o reabsorción de gametos (ver anexo IV).

Las imágenes digitales de las gónadas fueron utilizadas para calcular el Índice de tejido gonádico (ITG), propuesto por Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2006), el cual sirve para estimar el grado de cobertura de la gónada con respecto al tejido somático (Fig. 4). El procesamiento de las imágenes se realizó también con el programa Image Pro Plus. En este caso utilizando el cursor de la computadora

para realizar la selección de las áreas correspondientes al tejido gonádico y posteriormente se aplicó la siguiente fórmula:

$$ITG = \frac{ACG}{ATI} \times 100$$

Donde:

ACG= área de cobertura de la gónada (μm^2) y ATI= área total de la imagen (μm^2)

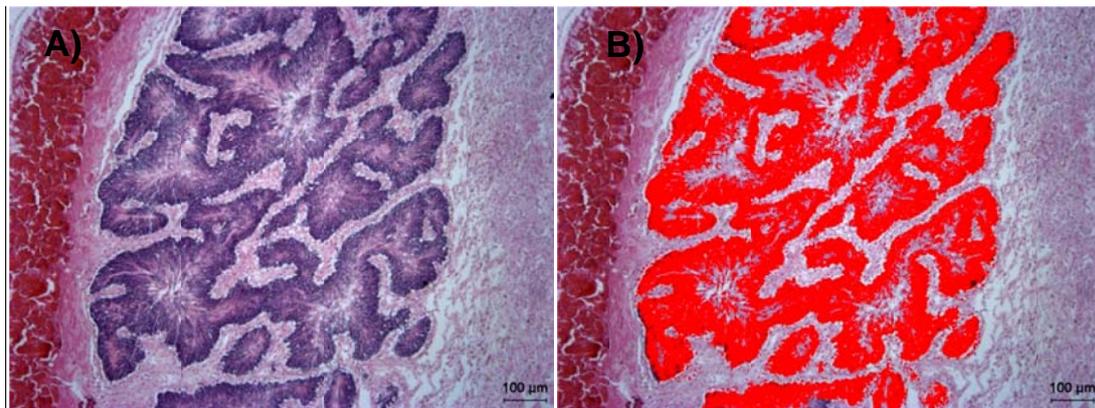


Figura 4. Microfotografías de cortes histológicos de gónada de *P. sterna*: A) tejido gonádico; B) la zona roja indica el tejido gonádico selección utilizada para el cálculo del índice de tejido gonádico (ITG).

6.6. Análisis histoquímicos

Para los análisis histoquímicos, las muestras de gónada-glándula digestiva fueron teñidas con tres colorantes específicos sensibles a carbohidratos y mucinas (Azul Alciano Pas, ver anexo V), lípidos (Sudan Negro B, ver anexo VI) y lipofuscinas (Carbol fucsina, ver anexo VII). Las laminillas previamente teñidas se digitalizaron en tres campos visuales tomados al azar, considerando tres tipos de tejidos (gónada, glándula digestiva y tejido conjuntivo) (Fig. 5A), cada uno fue digitalizado en alta resolución (3600 dpi; 3465×5184 pixeles) (20X) con el sistema de análisis digital de imágenes antes descrito.

Las imágenes fueron segmentadas de manera manual eligiendo los pixeles en tonalidades de colores de acuerdo a la tinción realizada, para la cuantificación de carbohidratos y mucinas (Azul Alciano Pas) (Fig. 5B). La

segmentación se realizó en los colores que varían entre azul, magenta y azul oscuro, es decir, en las tonalidades de pixeles de tonos magenta-rosa. En el caso de los lípidos (Sudan Negro B) (Fig. 5C), los tonos de las imágenes variaron entre gris, azul oscuro y negro, y para realizar la cuantificación se segmentaron los pixeles más oscuros entre tonalidades de negro-azul. Para la tinción de lipofuscinas (Carbol fucsina) (Fig. 5D) las tonalidades obtenidas fueron amarillo y rojo-pardo, siendo este último color el seleccionado para cuantificar lipofuscinas.

Una vez finalizada la segmentación de las tonalidades correspondiente a cada tinción, el programa generó el cálculo del área de los pixeles seleccionados en cada fotografía (μm^2), y posteriormente se realizó el cálculo de una media de los tres campos visuales tomados al azar para cada fotografía. Los datos obtenidos se utilizaron para la determinación del índice glucídico (IG), índice lipídico (IL) e índice de lipofuscinas (ILF). Para ello, se utilizaron las fórmulas estandarizadas por Rodríguez-Jaramillo (2004, 2008):

$$IG = \frac{ACC}{ATI} \times 100$$

$$IL = \frac{ACL}{ATI} \times 100 \quad ILF = \frac{ACLF}{ATI} \times 100$$

Donde:

ACC= área de cobertura de carbohidratos (μm^2); ACL= área de cobertura de lípidos (μm^2); ACLF=área de cobertura de lipofuscinas (μm^2) y ATI= área total de la imagen (μm^2).

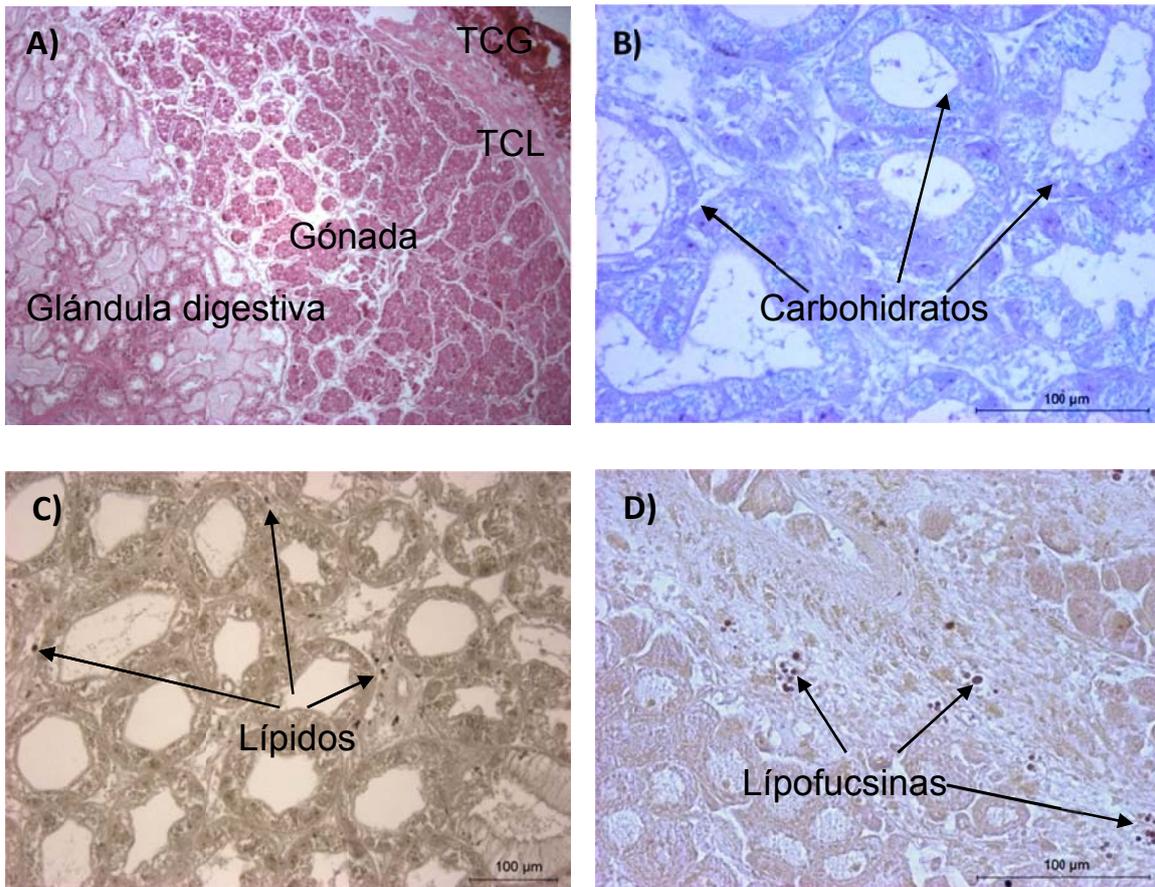


Figura 5. Microfotografías de cortes histológicos (20X) de *P. sterna*: A) secciones de tejidos utilizadas para realizar los análisis histoquímicos (TCL= Tejido conjuntivo laxo; TCG= Tejido conjuntivo adipogranular); B) tinción Azul Alciano PAS para identificación de carbohidratos en glándula digestiva; C) tinción Sudan Negro B para identificación de lípidos en glándula digestiva y D) tinción Carbol fucsina para identificación de lipofuscinas en tejido conjuntivo.

6.7. Análisis bioquímicos

Las muestras de tejidos preservadas inicialmente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (gónada, músculo y glándula digestiva) fueron pesadas (0.1 g de precisión) y liofilizadas para obtener su peso seco. Posteriormente se rehidrataron en 1.0 mL de solución salina (NaCl 35 %), para realizar el homogenado de la muestra y la obtención del extracto crudo de cada tejido. Los extractos fueron utilizados para la determinación de la concentración de carbohidratos totales utilizando la técnica de Van Handel (1965) (ver anexo VIII), proteínas totales por el método BCA (ácido bicinónico) (ver anexo IX) y determinación de lípidos totales con la técnica de la

sulfofosfovainillina (Barnes y Blacktock, 1973) (ver anexo X). Todas las técnicas fueron adaptadas a lectura en microplaca para utilizar cantidades pequeñas y posteriormente, fueron leídas en un espectrofotómetro de microplacas a 620 nm, 595 nm y 560 nm, para carbohidratos, proteínas y lípidos, respectivamente.

6.8. Análisis estadísticos

Para inferir la normalidad de los datos (altura y longitud, así como el peso húmedo total de la concha de los organismos), en cada muestreo se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnof y de homogeneidad de varianzas de Levene. A pesar de que las pruebas confirmaron la normalidad de los datos (ver resultados sección 8.1), se procedió a realizar una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) (Sokal y Rohlf, 1982), debido a que el tamaño de muestra utilizado por tratamiento fue pequeño ($n= 6$ organismos/tratamiento/réplica). Esto se realizó con el propósito de detectar diferencias significativas en los índices de condición y de rendimiento muscular de los organismos (IC, IRM), composición bioquímica de los tejidos (carbohidratos, proteínas, lípidos) e índices histoquímicos (IL, IG, ILF) en función de los regímenes térmicos evaluados. Dichos análisis se realizaron por separado para cada tiempo de muestreo (17 días y 34 días). En caso necesario, se aplicaron pruebas de comparación múltiple de medias de rangos para jerarquizar dichas diferencias. Los análisis antes mencionados fueron aplicados exclusivamente en machos, ya que en hembras el número limitado de organismos no permitió la realización de ningún tipo de prueba estadística. Los datos fueron analizados con el programa STATISTICA 7 (StatSoft Inc., E.U.A.). En todos los casos el nivel de significancia se fijó en $P \leq 0.05$. Para la elaboración de los gráficos se utilizó el programa Slide Write (Versión 5.0-Bit, E.U.A.).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis inicial de tallas de los organismos

Se observó que los organismos sometidos a experimentación así como la muestra inicial (t_0) presentaron una distribución normal de tallas (altura y longitud de la concha) y peso húmedo total (Tabla 1).

Tabla 1. Promedio de tallas (altura y longitud de la concha) y peso de los organismos de *P. sterna* sometidos a experimentación, así como muestra inicial. Des. Est.= Desviación estándar; K-S= Kolmogorov-Smirnov.

Variable	Media	Des. Est.	K-S	Levene
Altura	84.88	5.87	P > 0.20	P > 0.20
Longitud	81.86	9.82	P > 0.20	P > 0.20
Peso húmedo total	135.65	29.02	P > 0.20	P > 0.20

7.2. Condición general de los organismos

Los resultados derivados del análisis de la variación del IC entre tratamientos muestran un patrón ascendente a la mitad del experimento con respecto al valor inicial (24%) (Figura 6). El valor más alto se registró en el tratamiento O2 (38.22%), seguido del tratamiento C o grupo control (36.63%) o grupo control, mientras que el tratamiento con menor incremento del CI fue el O1 (33.61%). Al finalizar el experimento los valores del IC no tuvieron variación con respecto a lo registrado a la mitad del experimento, siendo los tratamientos D y O2 los que presentaron mayores valores de IC (38.33% y 37.38%, respectivamente). Por el contrario, el tratamiento O1 presentó el menor valor de IC (35.3%). Dichas variaciones no fueron significativas entre tratamientos a la mitad ($H=5.79$, $p=0.214$) y final del experimento ($H=6.41$, $p=0.170$).

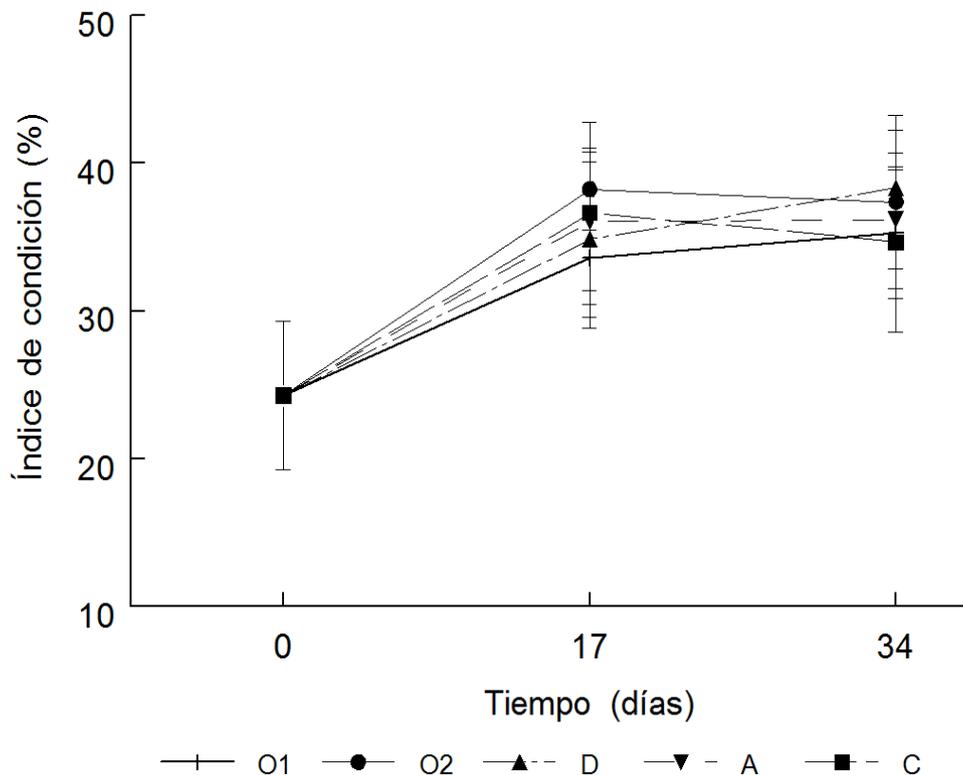


Figura 6. Variaciones del Índice de Condición (IC) de organismos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C .

Los resultados del IRM (Fig. 7) muestran un decremento en los valores a la mitad del experimento en relación al valor inicial (6.35%). Los tratamientos O2 y A (5.58% y 5.01%, respectivamente) presentaron el mayor valor de IRM a mitad del experimento, en tanto que el tratamiento D presentó los valores más bajos (3.79%). Dichos variaciones fueron significativas entre tratamientos ($H=9.37$, $p=0.052$) a la mitad del experimento. Al finalizar el mismo los tratamientos con valores más altos del IRM fueron el C y D (4.61% y 4.33% respectivamente) y el tratamiento con menor valor fue el O2 (3.73%), que mostró un descenso con respecto a valor medio del experimento. En este caso las diferencias en el IRM no fueron significativas entre tratamientos ($H=3.58$, $p=0.464$).

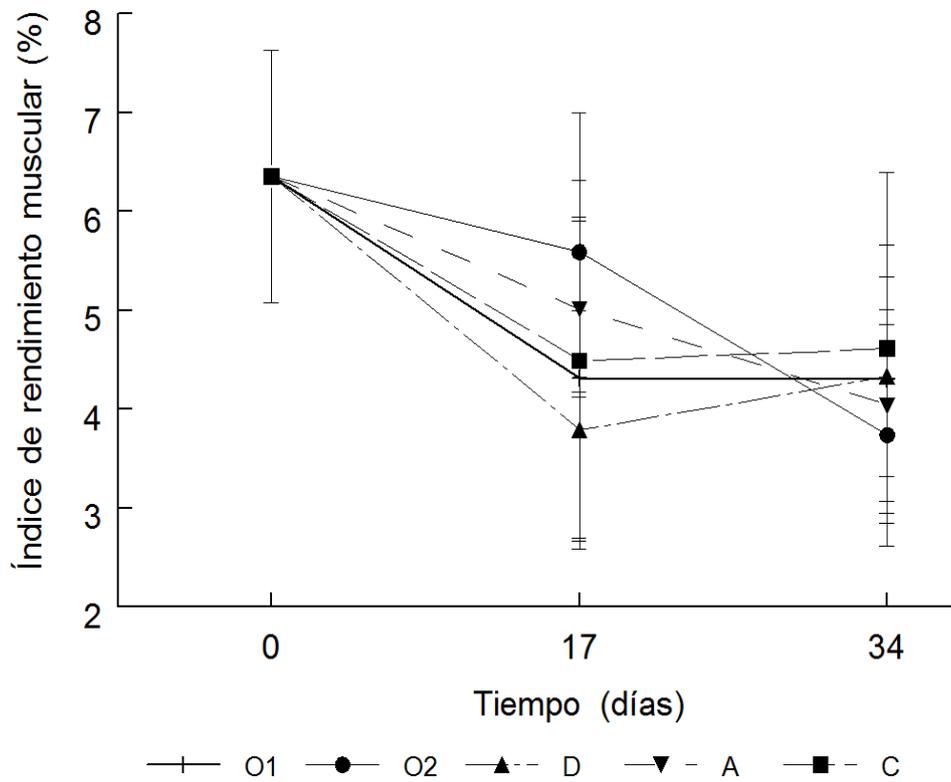


Figura 7. Variaciones del Índice de Rendimiento Muscular (IRM) de organismos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C .

7.3. Análisis histológico y digital de imágenes

7.3.1 Proporción sexual y desarrollo gonádico de los organismos

La proporción sexual en la muestra inicial del experimento indicó que más del 50.5% eran machos, 22.2% hembras y 22.2% organismos indiferenciados (Fig. 8). A la mitad del experimento, se observó un mayor porcentaje de machos en la mayoría de los tratamientos, particularmente el O2 (75%), seguido de organismos indiferenciados (tratamiento O2 con un 54%). Sin embargo, hubo una ausencia total de hembras en dos tratamientos (O2 y A) y porcentajes bajos en el tratamiento D (9%). Al final del experimento nuevamente hubo una mayor presencia de machos, particularmente en los tratamientos O2, D y A (mayor de 60%), en tanto que el porcentaje de organismos indiferenciados al final del experimento fue mayor al 30% (O1, O2, D y C). El porcentaje de hembras fue del 16% en los tratamientos O1 y A, así mismo se encontró ausencia de hembras en los tratamientos O2 y D.

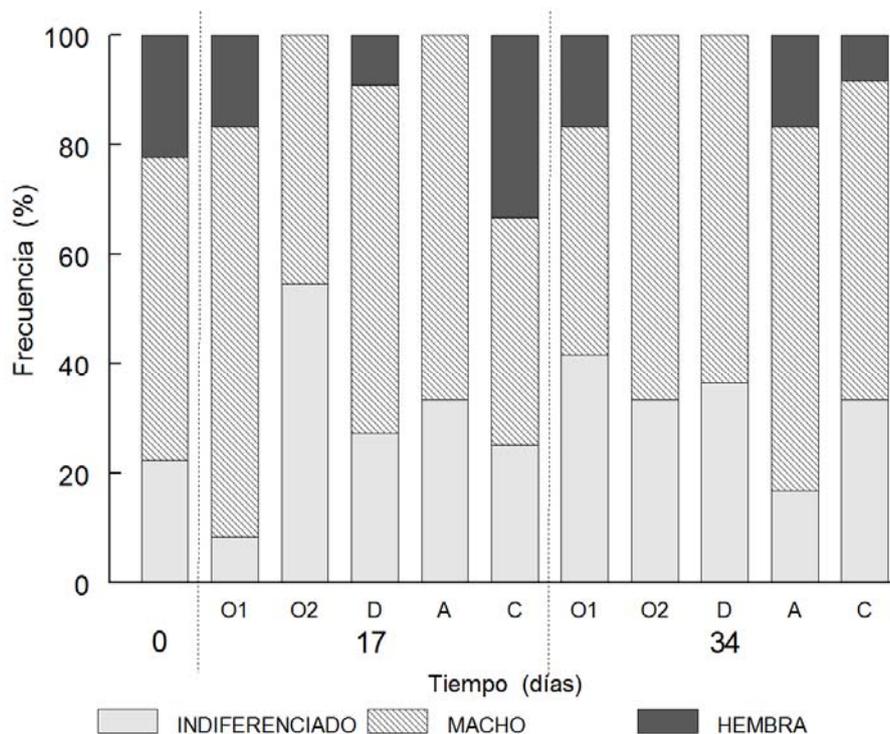


Figura 8. Proporción de sexos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C .

Al iniciar el experimento el 100% de las hembras estaban en estadio de desarrollo (Fig. 9). A la mitad del experimento, el tratamiento D presentó un 100% de hembras en madurez y el tratamiento O1 un 50% de organismos en estadio de desarrollo y el otro 50% en madurez. Hubo una ausencia de hembras en los tratamientos O2 y A. Al final del experimento, en el tratamiento A predominaron los organismos en desoves parciales (100%), en tanto que en el tratamiento C se presentó un 100% de organismo en estadio de madurez. Una descripción detallada de los cambios citológicos de las gónadas femeninas se presentan en el Anexo IV (Fig. 22).

En el caso de los machos, al iniciar el experimento el 100% de organismos se encontraban en estadio de desarrollo (Fig. 9). A la mitad del experimento se observó un porcentaje $<50\%$ de organismos en estadio de madurez en los tratamientos O1 y O2, con una frecuencia de desoves parciales y posdesoves

<30%. Al final del experimento se encontraron organismos en desove parcial y posdesove en todos los tratamientos, particularmente en el tratamiento A (~33% y ~66%, respectivamente). Los tratamientos O1 y A presentaron un desarrollo similar (33% en posdesove y 50% de desove parcial). Una descripción detallada de los cambios citológicos de las gónadas masculinas se presentan en el Anexo D (Fig. 23).

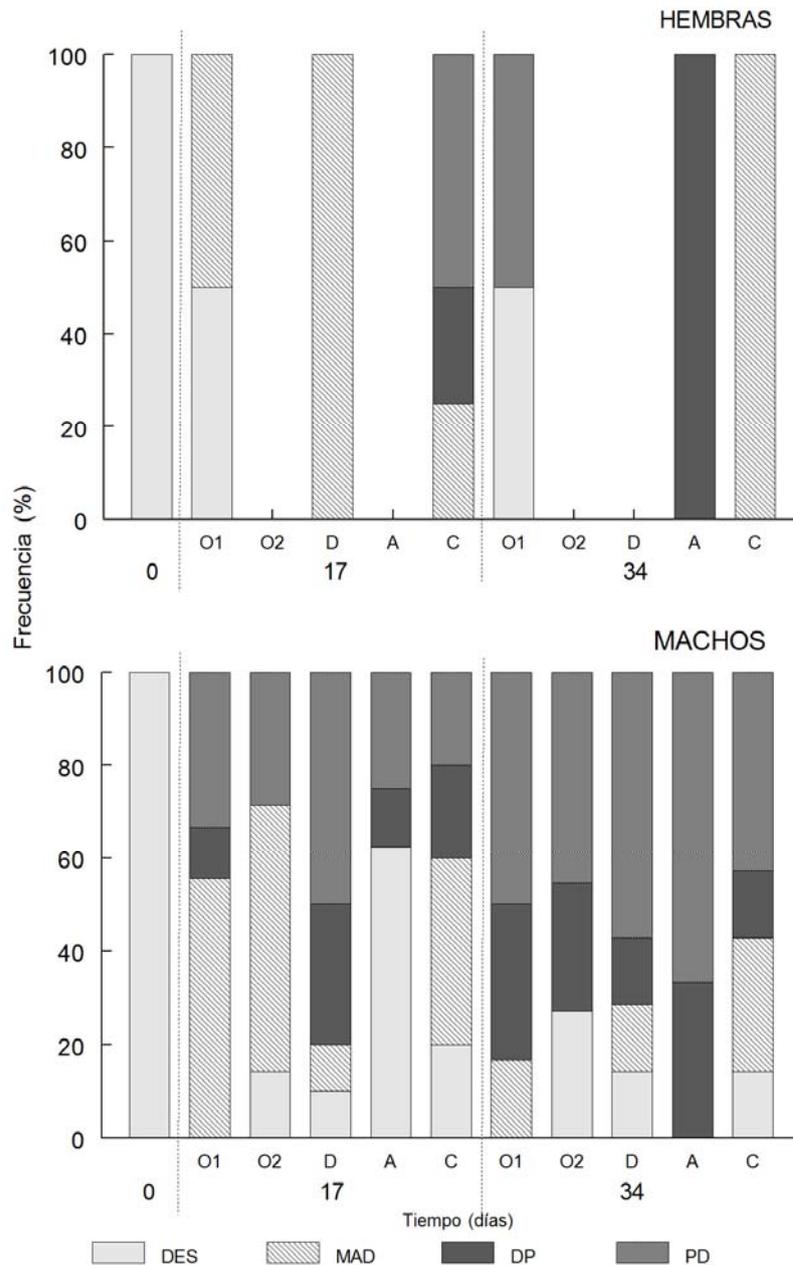
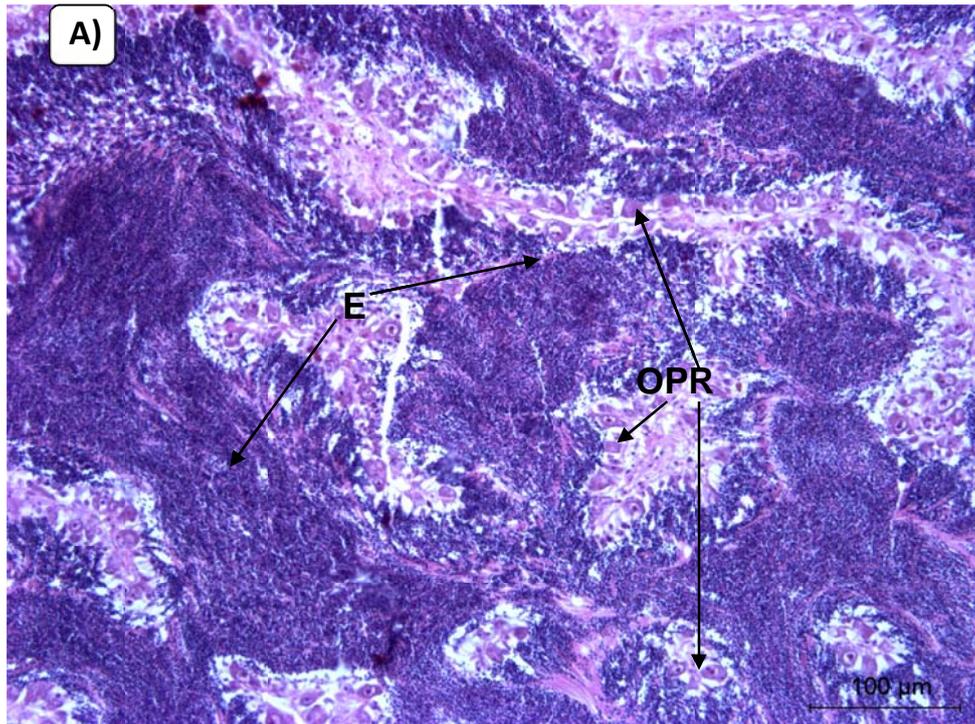


Figura 9. Estadios de desarrollo gonádico de hembras y machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . DES= Desarrollo; MAD= Madurez; DP= Desove parcial; PD= Posdesove.

La observación de laminillas histológicas reveló la presencia de dos individuos hermafroditas en el tratamiento inicial; en el primer caso (Fig. 10A) se aprecia que el sexo en regresión es el femenino, y el que está en desarrollo es el

masculino, lo que indica que se trata de un hermafroditismo secuencial, es decir, un segundo cambio de sexo de hembra a macho. En el segundo caso (Fig. 10B), el sexo en regresión es el masculino, mientras que el femenino se encontraba en desarrollo, dado que los espermatozoides residuales llenan el lumen y los ovocitos en nutrición están adheridos a la pared folicular y en estado atrésico.



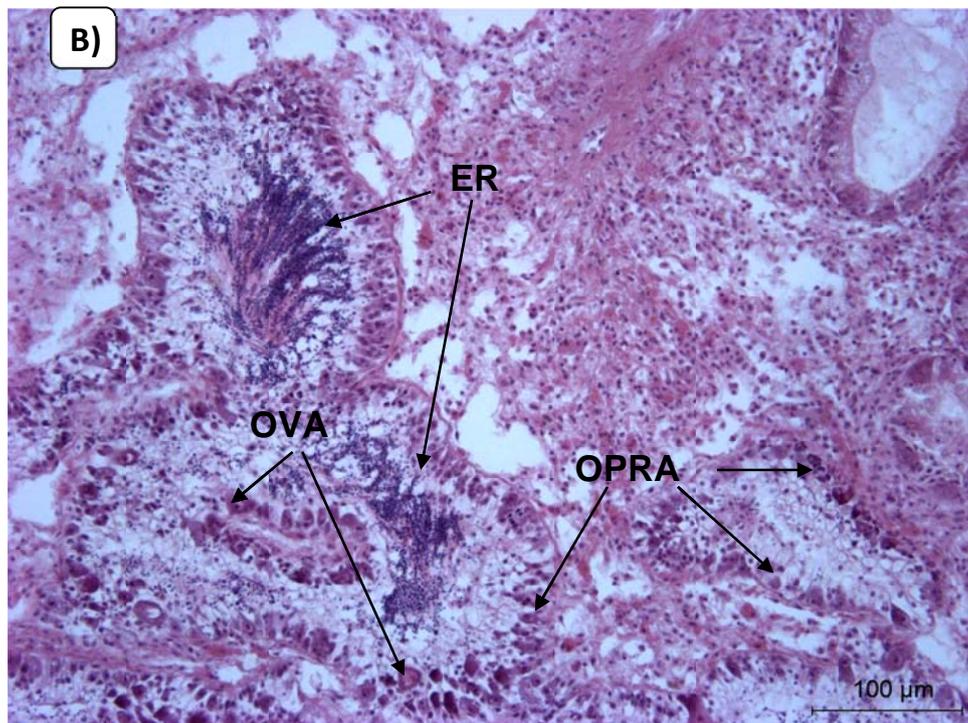


Figura 10. Microfotografías de unas gónadas (20X) de *P. sterna* teñida con hematoxilina-eosina en la cual se observa hermafroditismo: A) Desove de macho y desarrollo de hembra; B) Desarrollo de macho y desarrollo inicial de hembra. El corte corresponde a un organismo de la muestra inicial. E= Espermatozoide; ER= Espermatozoide residual; OVA= Ovocitos vitelogénicos atresico; OPRA= Ovocito previtelogénico atresico y OPR= Ovocito previtelogénico.

7.3.2. Índice de tejido gonádico

En las hembras, se observaron valores que superan el 55% de cobertura gonádica al inicio del experimento (Fig. 11). A mediados del experimento los valores del ITG disminuyeron en la mayoría de los tratamientos experimentales, siendo el tratamiento D el único que presentó un valor superior al inicial (<57.4%). Al final, los valores del ITG fueron >32% en todos los tratamientos, particularmente el A (~17%). Los valores del ITG para machos inicialmente fueron superiores al 40%, aunque a la mitad estos disminuyeron con excepción del tratamiento O2 que mostró un incremento <40%. Al final del experimento el mayor valor se encontró en el tratamiento O2 (~33%) y el valor más bajo en el tratamiento A (~11%). Dichas variaciones no fueron significativas entre tratamientos a mediados ($H=6.22$, $p=0.183$), ni al final del experimento ($H=4.70$, $p=0.318$).

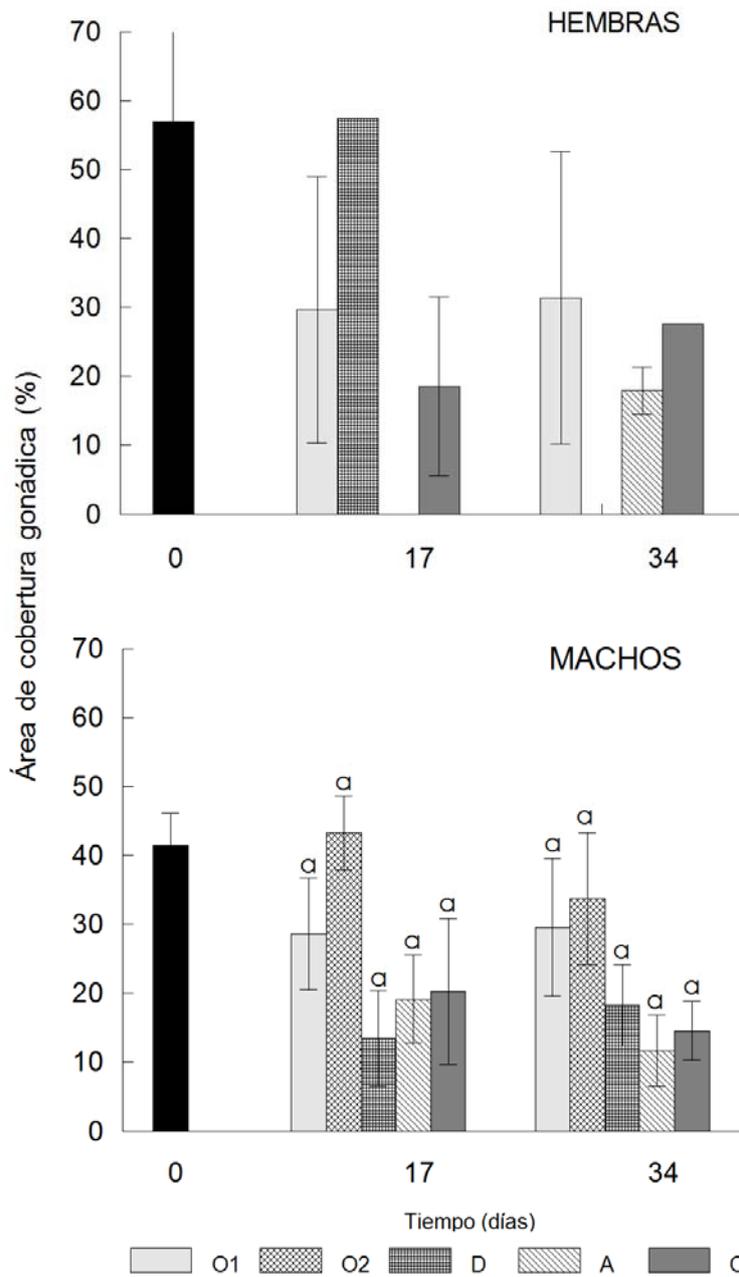


Figura 11. Variaciones temporales en el Índice de Tejido Gonádico (ITG) de hembras y Machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

7.4. Análisis bioquímico

7.4.1. Gónada

En la Tabla 2 se observa que las concentraciones de carbohidratos de la gónada de machos disminuyeron significativamente en todos los tratamientos con respecto al valor inicial ($\sim 23.46 \pm 4.53 \text{ mg g}^{-1}$) ($H=8.11$, $p=0.01$), en tanto que las variaciones en las concentraciones de proteínas y lípidos no fueron significativas en ningún tratamiento con respecto al tiempo ($H=1.19$, $p=0.55$; $H=1.53$, $p=0.46$, respectivamente). También se observaron diferencias significativa entre las concentraciones de carbohidratos entre tratamientos a la mitad ($H=11.67$, $p=0.00$) y al final del experimento ($H=12.42$, $p=0.01$). El tratamiento A presentó el valor máximo ($\sim 10.82 \pm 1.44 \text{ mg g}^{-1}$) a la mitad del experimento, mientras que el tratamiento D ($\sim 18.48 \pm 3.69 \text{ mg g}^{-1}$) al concluir el experimento (Fig. 12). Por el contrario, las variaciones en la concentración de lípidos y proteínas no fueron significativas entre tratamientos, ni a la mitad ($H=3.44$, $p=0.4859$; $H=3.92$, $p=0.416$, respectivamente) y al final del experimento ($H=8.12$, $p=0.087$; $H=3.51$, $p=0.476$, respectivamente).

En las hembras, el valor inicial de carbohidratos de la gónada ($\sim 15.9 \pm 1.94 \text{ mg g}^{-1}$) fue menor al encontrado para los machos. Los lípidos y proteínas, por el contrario, fueron mayores en las hembras que los observados en machos, con un valor inicial de $\sim 57.34 \pm 17.55 \text{ mg g}^{-1}$ y $\sim 404.93 \pm 80.75 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente, el tratamiento D alcanzó el valor máximo de lípidos a la mitad del experimento ($\sim 78.71 \text{ mg g}^{-1}$). Al final las concentraciones de lípidos se incrementaron, particularmente en los tratamientos O1 y C ($\sim 151.1 \pm 14.34 \text{ mg g}^{-1}$, $\sim 147.30 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente), en tanto que en el tratamiento C se presentó el valor más alto de proteínas a la mitad y al final del experimento ($\sim 541.42 \pm 106.09 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 643.07 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente) (Fig. 12).

Tabla 2. Variación de la composición bioquímica de la gónada de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas
			mg g ⁻¹		
Gónada	O1	T ₀	23.46±4.53 ^b	50.61±7.06 ^a	504.15±66.38 ^a
		T ₁	10.8±1.94 ^a	50.96±13.7 ^a	578.87±54.55 ^a
		T ₂	12.18±2.89 ^{ab}	39.17±4.34 ^a	617.93±59.54 ^a
	O2	T ₀	23.46±4.53 ^b	50.61±7.06 ^a	504.15±66.38 ^a
		T ₁	6.87±0.74 ^a	34.52±4.02 ^a	585.06±44.8 ^a
		T ₂	12.63±2.44 ^a	43.38±2.67 ^a	504.17±47.92 ^a
	D	T ₀	23.46±4.53 ^b	50.61±7.06 ^a	504.15±66.38 ^a
		T ₁	10.07±0.87 ^a	39.62±5.29 ^a	506.35±44.2 ^a
		T ₂	18.48±3.7 ^{ab}	31.39±3.35 ^a	502.88±61.89 ^a
	A	T ₀	23.46±4.53 ^b	50.61±7.06 ^a	504.15±66.38 ^a
		T ₁	10.82±1.44 ^a	36.93±3.3 ^a	629.55±30.84 ^a
		T ₂	16.81±1.46 ^{ab}	41.71±5.92 ^a	508.82±61.43 ^a
	C	T ₀	23.46±4.53 ^b	50.61±7.06 ^a	504.15±66.38 ^a
		T ₁	9.09±0.8 ^a	47.60±5.5 ^a	553.26±64.88 ^a
		T ₂	8.53±1.03 ^a	53.51±7.12 ^a	513.6±64.12 ^a

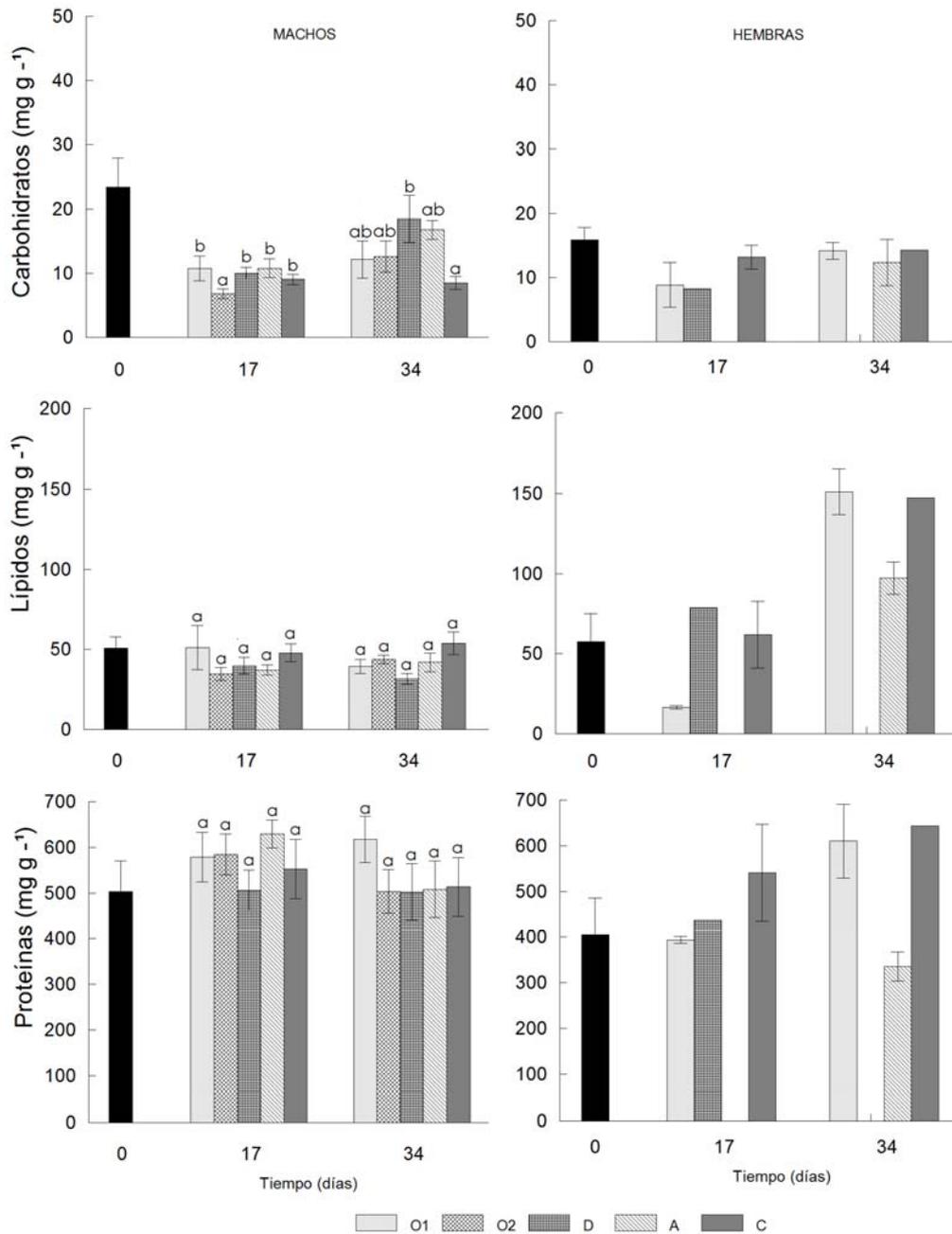


Figura 12. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la gónada de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

7.4.2. Glándula digestiva

La concentración de carbohidratos encontrada en la glándula digestiva de machos presentó una disminución significativa en los tratamientos A y C con respecto al valor inicial ($\sim 63.28 \pm 3.69 \text{ mg g}^{-1}$) ($H=13.41$, $p=0.00$). En cuanto al contenido de lípidos se observó una disminución significativa en los tratamientos A y O1 ($H=6.59$, $p=0.03$; $H=8.01$, $p=0.01$, respectivamente). El contenido de proteínas fue significativamente diferente únicamente en el tratamiento O1 con respecto al muestreo inicial ($\sim 279.19 \pm 7.67 \text{ mg g}^{-1}$) ($H=8.10$, $p=0.01$) (Tabla 3). Al realizar la comparación entre tratamientos, se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbohidratos a la mitad del experimento ($H=21.75$, $p=0.00$), más no al finalizar ($H=17.26$, $p=0.00$). El tratamiento O1 generó valor más alto a la mitad del experimento ($\sim 56.66 \pm 3.24 \text{ mg g}^{-1}$), en tanto que el tratamiento C el valor mínimo de carbohidratos ($\sim 38.48 \pm 2.23 \text{ mg g}^{-1}$). Por otro lado, la concentración de lípidos no fue significativamente diferente entre tratamientos ni a la mitad ($H=7.99$, $p=0.091$), ni al final del experimento ($H=3.18$, $p=0.527$), en tanto que en la concentración de proteínas varío significativamente en los dos periodos de muestreo ($H=18.25$, $p=0.00$; $H=17.61$, $p=0.00$, respectivamente) (Fig. 13), siendo el tratamiento O2 el que presentó el valor máximo de proteínas ($\sim 333.67 \pm 23.79 \text{ mg g}^{-1}$) a la mitad del experimento, y el tratamiento O2 al concluir el mismo ($\sim 330.33 \pm 23.21 \text{ mg g}^{-1}$). En ambos casos el tratamiento A presentó la mínima concentración de proteínas ($\sim 255.43 \pm 8.64 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 233.93 \pm 17.08 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente)

Las hembras mostraron valores iniciales mínimos de carbohidratos ($\sim 61.75 \pm 1.77 \text{ mg g}^{-1}$) con respecto a los reportados para machos. En contraste, las concentraciones iniciales de lípidos y proteínas ($\sim 404 \pm 28 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 281.41 \pm 10.41 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente) fueron superiores a las reportadas para los machos. A la mitad del experimento los valores de carbohidratos, lípidos y proteínas se incrementaron, siendo el tratamiento D el que presentó el valor máximo para carbohidratos ($\sim 74.82 \text{ mg g}^{-1}$) a la mitad del experimento, en tanto

que al finalizar, el tratamiento O1 fue el que presentó el valor más alto ($\sim 52.35 \pm 1.44 \text{ mg g}^{-1}$). De igual manera el tratamiento O1 presentó los valores máximos de lípidos y proteínas en glándula digestiva a la mitad del experimento ($\sim 488.76 \pm 134.39 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 332.41 \pm 4.41 \text{ mg g}^{-1}$ respectivamente), pero al final las concentraciones de proteínas disminuyeron en todos los tratamientos, aquí, el tratamiento O1 presentó el máximo valor de proteínas ($\sim 298.60 \pm 4.62 \text{ mg g}^{-1}$).

Tabla 3. Variaciones de la composición bioquímica de la glándula digestiva en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^\circ\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas
			mg g ⁻¹		
Glándula digestiva	O1	T ₀	63.28 \pm 3.59 ^a	275.37 \pm 38.44 ^a	279.19 \pm 7.67 ^a
		T ₁	56.67 \pm 3.24 ^a	289.49 \pm 21.03 ^a	321.97 \pm 11.24 ^b
		T ₂	51.07 \pm 3.42 ^a	246.05 \pm 41.87 ^a	330.34 \pm 23.21 ^b
	O2	T ₀	63.28 \pm 3.59 ^a	275.37 \pm 38.44 ^a	279.19 \pm 7.67 ^a
		T ₁	54.36 \pm 3.36 ^a	319.97 \pm 37.35 ^a	333.64 \pm 23.79 ^a
		T ₂	58.64 \pm 4.06 ^a	310.56 \pm 37.86 ^a	320.1 \pm 29.75 ^a
	D	T ₀	63.28 \pm 3.59 ^a	275.37 \pm 38.44 ^a	279.19 \pm 7.67 ^a
		T ₁	54.91 \pm 3.92 ^a	225.20 \pm 35.53 ^a	297.56 \pm 14.86 ^a
		T ₂	55.77 \pm 2.69 ^a	191.09 \pm 29.43 ^a	277.47 \pm 12.6 ^a
	A	T ₀	63.28 \pm 3.59 ^b	275.37 \pm 38.44 ^{ab}	279.19 \pm 7.67 ^b
		T ₁	41.28 \pm 3.1 ^a	292.10 \pm 27.32 ^b	255.43 \pm 8.65 ^{ab}
		T ₂	43.41 \pm 2.67 ^a	166.31 \pm 33.36 ^a	231.43 \pm 12.13 ^a
	C	T ₀	63.28 \pm 3.59 ^b	275.37 \pm 38.44 ^a	279.19 \pm 7.67 ^a
		T ₁	38.48 \pm 2.23 ^a	280.13 \pm 54.38 ^a	266.59 \pm 8.62 ^a
		T ₂	42.45 \pm 2.84 ^a	216.63 \pm 45.80 ^a	233.93 \pm 17.08 ^a

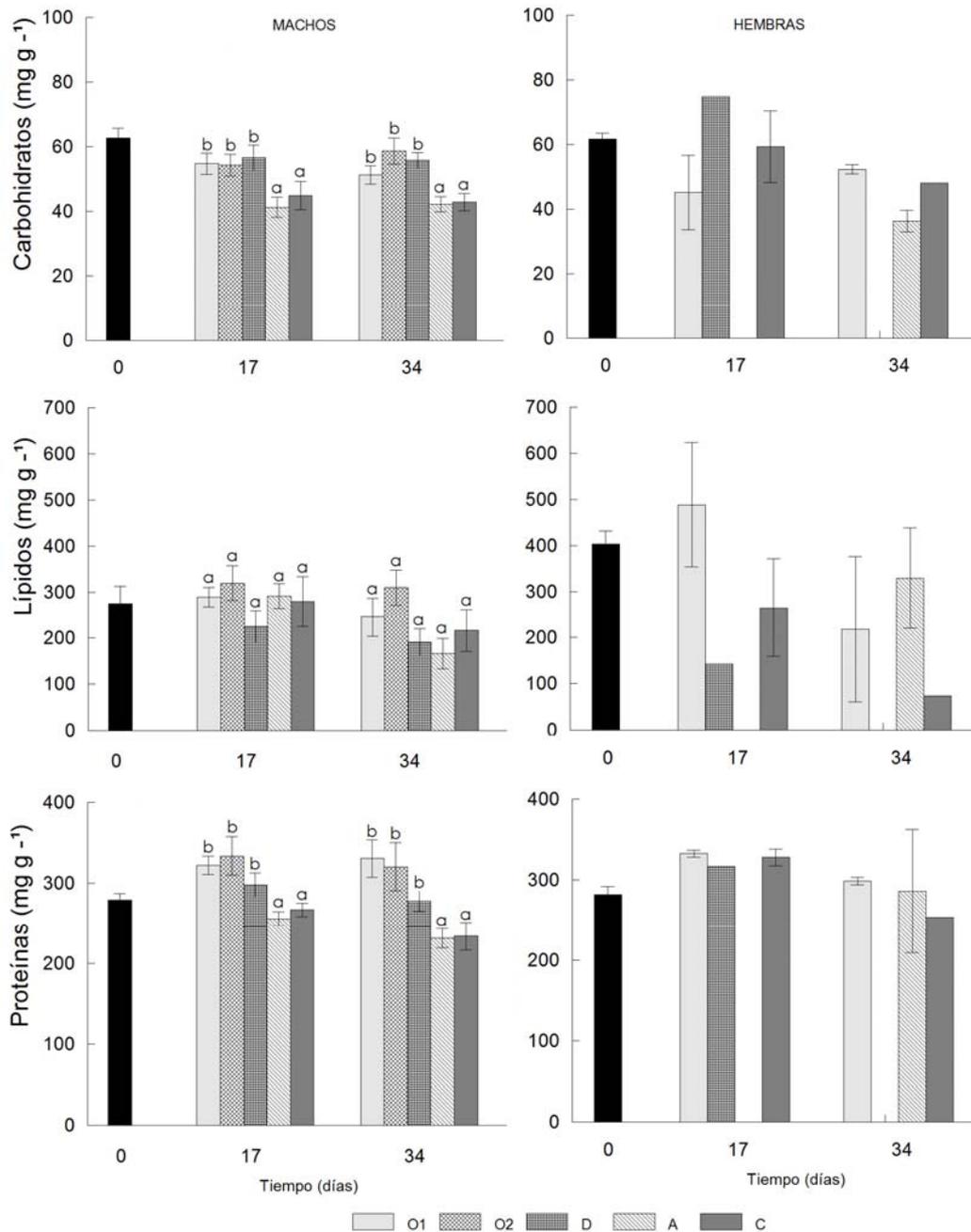


Figura 13. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de la glándula digestiva de machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

7.4.3. Músculo

En la Tabla 4 se observa que las concentraciones de carbohidratos y proteínas en el músculo decrecieron significativamente en todos los tratamientos, mostrando valores más bajos que los obtenidos al inicio ($\sim 179.31 \pm 9.16 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 179.31 \pm 9.16 \text{ mg g}^{-1}$ y $H=7.79$, $p=0.02$; $H=17.61$, $p=0.001$, respectivamente). El tratamiento C fue el único que presentó un aumento significativo en las concentraciones de proteínas ($H=7.85$, $p=0.01$). Sin embargo, las concentraciones de lípidos aumentaron significativamente en la mayoría de los tratamientos, con respecto a los valores iniciales ($\sim 29.61 \pm 1.73 \text{ mg g}^{-1}$) ($H=10.44$, $p=0.00$).

La comparación entre tratamientos mostró diferencias significativas ($H=8.73$, $p=0.068$) en las concentraciones de carbohidratos al finalizar el experimento, siendo el tratamiento D ($\sim 171.42 \pm 16.75 \text{ mg g}^{-1}$) en el que se registró el valor más alto. A mediados del experimento no se observaron diferencias significativas ($H=14.08$, $p=0.007$) en ningún combustible metabólico en ningún tratamiento. En cuanto al contenido de lípidos los tratamientos que mostraron diferencias significativas a la mitad ($H=11.55$, $p=0.0021$) y al final del experimento ($H=19.89$, $p=0.000$), fueron el O1 y C con valores máximos de lípidos a mitad y al final del experimento ($\sim 28.82 \pm 2.11 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 33.31 \pm 2.54 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente). En contraste, las variaciones en la concentración de proteínas entre tratamientos fue significativa ($H=29.71$, $p=0.000$) a mediados del experimento, pero no al finalizarlo ($H=8.58$, $p=0.072$) (Fig. 14). En el tratamiento O1 se encontró el valor más alto de proteínas ($\sim 384.78 \pm 23.71 \text{ mg g}^{-1}$) a la mitad del experimento.

Las concentraciones de carbohidratos en hembras fueron menores en todos los tratamientos que los observados para machos. En contraste los valores de lípidos y proteínas en hembras fueron mayores a los observados en machos durante todo el experimento, mostrando valores iniciales de $\sim 31.44 \pm 7.99 \text{ mg g}^{-1}$ y $\sim 244.19 \pm 7.38 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente (Fig. 14). El tratamiento O1 presentó la máxima concentración de carbohidratos, lípidos y proteínas a mitad del

experimento ($\sim 177.9 \pm 31.81 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 28.33 \pm 2.83 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 365.17 \pm 54.38 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente). Al concluir el experimento, el tratamiento A presentó las máximas concentraciones de carbohidratos ($\sim 131.81 \pm 36.14 \text{ mg g}^{-1}$), en tanto que el tratamiento C presentó las máximas concentraciones de lípidos y proteínas ($\sim 33.96 \text{ mg g}^{-1}$; $\sim 349.09 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente).

Tabla 4. Variación de la composición bioquímica del músculo en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^\circ\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , 2°C/c semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , 2°C/c semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Carbohidratos	Lípidos	Proteínas
			mg g ⁻¹		
Músculo	O1	T ₀	179.31 \pm 9.16 ^a	29.61 \pm 1.74 ^b	234.78 \pm 18.99 ^a
		T ₁	153.15 \pm 16.55 ^a	28.83 \pm 2.11 ^b	384.78 \pm 23.71 ^b
		T ₂	151.21 \pm 28.9 ^a	15.26 \pm 3.15 ^a	273.48 \pm 17.36 ^a
	O2	T ₀	179.31 \pm 9.16 ^b	29.61 \pm 1.74 ^b	234.78 \pm 18.99 ^a
		T ₁	184.13 \pm 12.29 ^b	23.44 \pm 2.5 ^{ab}	304.04 \pm 13.15 ^b
		T ₂	131.84 \pm 15.33 ^a	18.12 \pm 2.79 ^a	313.87 \pm 11.68 ^b
	D	T ₀	179.31 \pm 9.16 ^b	29.61 \pm 1.74 ^b	234.78 \pm 18.99 ^a
		T ₁	92.16 \pm 22.85 ^a	23.76 \pm 1.76 ^{ab}	348.38 \pm 25.83 ^b
		T ₂	171.42 \pm 16.75 ^b	19.51 \pm 3.24 ^a	294.29 \pm 14.59 ^b
	A	T ₀	179.31 \pm 9.16 ^b	29.61 \pm 1.74 ^b	234.78 \pm 18.99 ^a
		T ₁	196.62 \pm 16.18 ^b	21.87 \pm 1.06 ^a	242.78 \pm 10.39 ^a
		T ₂	100.97 \pm 15.32 ^a	27.66 \pm 2.73 ^{ab}	250.63 \pm 16.94 ^a
	C	T ₀	179.31 \pm 9.16 ^b	29.61 \pm 1.74 ^b	234.78 \pm 18.99 ^a
		T ₁	174.0 \pm 23.89 ^b	18.17 \pm 2.29 ^a	261.99 \pm 10.47 ^{ab}
		T ₂	102.89 \pm 17.27 ^a	33.31 \pm 2.54 ^b	296.86 \pm 15.6 ^b

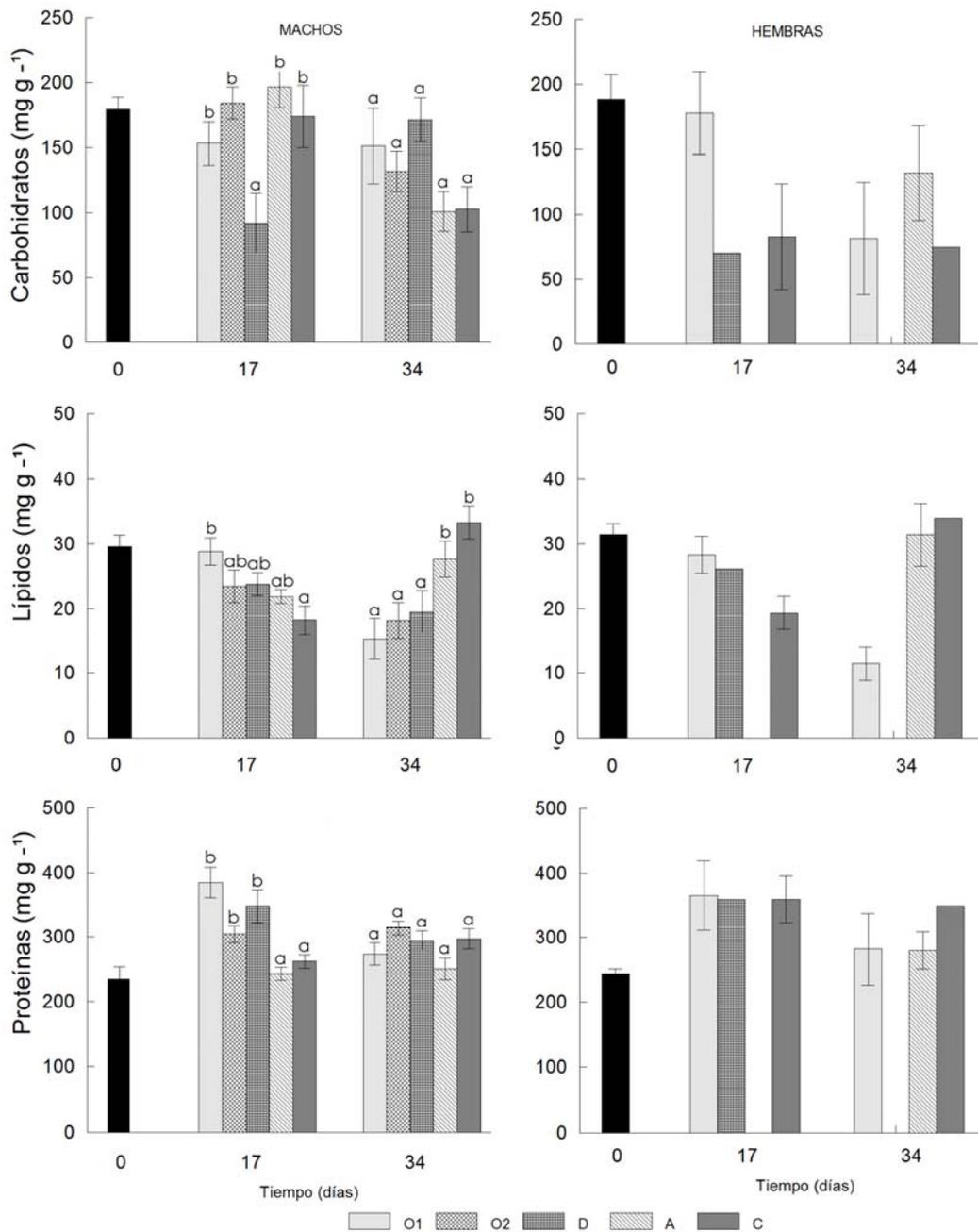


Figura 14. Variaciones en el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas de él músculo de machos reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

7.5. Análisis histoquímicos

7.5.1. Índice lipídico e índice glucídico

7.5.1.1. Gónada

En los machos, los valores del IL no mostraron diferencias significativas en ningún tratamiento en función al tiempo ($H=3.69$, $P=0.15$), en tanto que el IG mostro un decremento significativo en todos los tratamientos con respecto al valor inicial (4.59%) ($H=8.02$, $P=0.01$) (Tabla 5). Igualmente se encontraron diferencias significativas en el IL a la mitad y al final del experimento ($H=11.43$, $p=0.02$; $H=19.79$, $p=0.00$), siendo el tratamiento D (7.88%) el que presentó el valor más alto a la mitad del experimento, en tanto que el tratamiento O1 el más bajo (2.60%). Al finalizar el experimento el tratamiento A presentó el máximo valor del IL (13.11%). Las variaciones en el IG entre tratamientos no fueron significativas a la mitad ($H=6.92$, $p=0.139$) y al final del experimento ($H=6.85$, $p=0.143$).

En cuanto a las hembras, se observó un decremento en el IL a la mitad del experimento con respecto al valor inicial (11.80%), siendo el tratamientos C el único que mantuvo valores similares (11.75%). Al final se observó nuevamente un decremento en todos los valores del IL, siendo el tratamiento A el único que superó a los valores iniciales (12.62%). El IG inicial para hembras fue mayor (0.70%) que el reportado para machos, donde el tratamiento O1 reflejo el valor más alto (0.69%) y el tratamiento C el más bajo (18%). Al finalizar el experimento, los valores decrecieron, y nuevamente en el tratamiento O1 se obtuvo el valor más alto (0.61%) (Fig. 15).

Tabla 5. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico de la gónada de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice Lipídico	Índice Glucídico
			%	
Gónada	O1	T ₀	4.59±1.47 ^a	0.49±0.15 ^b
		T ₁	2.60±0.93 ^a	0.10±0.03 ^a
		T ₂	4.40±0.85 ^a	0.19±0.04 ^a
	O2	T ₀	4.59±1.47 ^a	0.49±0.15 ^b
		T ₁	2.92±1.17 ^a	0.28±0.07 ^{ab}
		T ₂	5.32±1.13 ^a	0.13±0.03 ^a
	D	T ₀	4.59±1.47 ^a	0.49±0.15 ^b
		T ₁	6.22±1.32 ^a	0.11±0.03 ^a
		T ₂	7.88±1.65 ^a	0.15±0.04 ^a
	A	T ₀	4.59±1.47 ^a	0.49±0.15 ^b
		T ₁	7.00±1.35 ^a	0.17±0.06 ^a
		T ₂	13.11±1.55 ^b	0.04±0.01 ^a
	C	T ₀	4.59±1.47 ^a	0.49±0.15 ^b
		T ₁	7.73±1.84 ^a	0.09±0.02 ^a
		T ₂	7.26±1.52 ^a	0.15±0.06 ^a

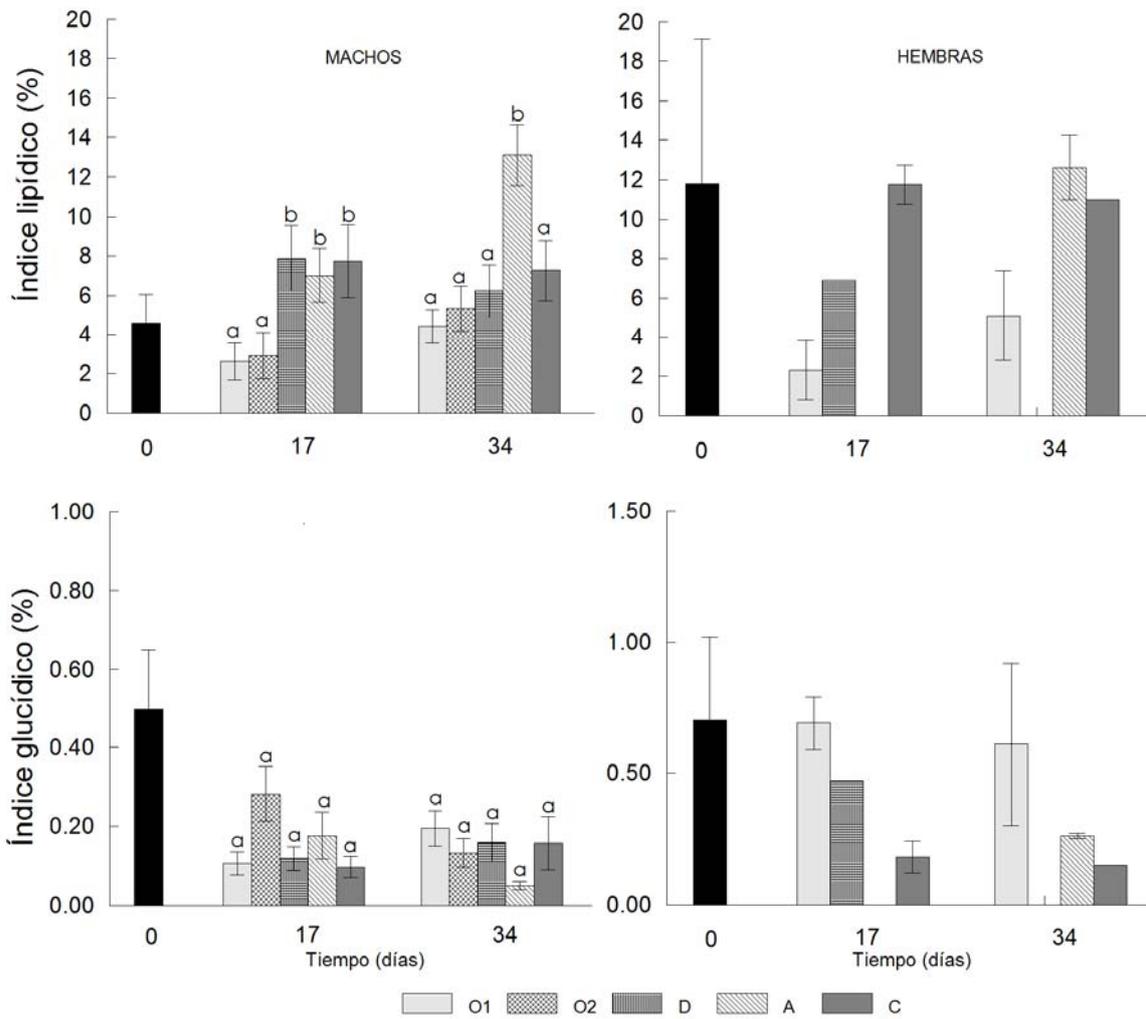


Figura 15. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico de la gónada de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

7.5.1.2. Glándula digestiva

El tratamiento O1 fue el único que presentó diferencias significativas en el valor del IL en la glándula digestiva de machos con respecto al tiempo ($H=6.33$, $p=0.04$), donde el IL disminuyó con respecto al valor inicial (10.21%). En contraste, el IG no varió significativamente en ningún tratamiento en el tiempo ($H=2.25$, $p=0.32$) (Tabla 6). A su vez, los valores del IL variaron significativamente entre tratamientos a la mitad y al final del experimento ($H=17.95$, $p=0.001$; $H=24.51$, $p=0.0001$, respectivamente), siendo el tratamiento A el más alto (11.86%) y el tratamiento O1 el más bajo (3.91%). Al final del experimento el valor máximo de IL (17.22%) se observó en el tratamiento A. El IG también mostró diferencias significativas entre tratamientos a la mitad ($H=11.62$, $p=0.020$) y final del experimento ($H=12.21$, $p=0.015$); aquí el tratamiento O2 presentó el valor máximo a mitad del estudio (0.66%), mientras que el valor más bajo ocurrió en el tratamiento C (0.28%). Los tratamientos D y O1 presentaron los valores más altos al concluir el experimento (0.69%, 0.66%, respectivamente); por el contrario el valor más bajo ocurrió en el tratamiento A (0.40%) (Fig. 16).

En el caso de las hembras, se observó un decremento del IL a mitad del experimento con respecto al valor inicial (24.18%). En el tratamiento D se presentó el valor más alto (16.39%). Al final, el tratamiento A presentó el valor más alto (11.36%), sin embargo se observó un decremento progresivo en comparación a los valores iniciales. Contrariamente, el IG se incrementó en el tratamiento O1 (0.91%) con respecto al valor inicial (0.70%), pero al final el tratamiento O1 nuevamente presentó el valor más alto del IG (0.88%).

Tabla 6. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico de la glándula digestiva de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice Lipídico	Índice Glucídico
			%	
Glándula digestiva	O1	T ₀	10.21±3.93 ^b	0.74±0.22 ^a
		T ₁	3.91±0.99 ^a	0.37±0.07 ^a
		T ₂	7.79±1.38 ^{ab}	0.65±0.06 ^a
	O2	T ₀	10.21±3.93 ^a	0.74±0.22 ^a
		T ₁	5.97±1.29 ^a	0.66±0.09 ^a
		T ₂	7.11±0.94 ^a	0.62±0.05 ^a
	D	T ₀	10.21±3.93 ^a	0.74±0.22 ^a
		T ₁	8.70±1.03 ^a	0.46±0.05 ^a
		T ₂	11.10±1.0 ^a	0.68±0.10 ^a
	A	T ₀	10.21±3.93 ^a	0.74±0.22 ^a
		T ₁	11.86±1.67 ^a	0.57±0.10 ^a
		T ₂	17.22±1.43 ^a	0.40±0.05 ^a
	C	T ₀	10.21±3.93 ^a	0.74±0.22 ^a
		T ₁	11.48±1.84 ^a	0.28±0.03 ^a
		T ₂	12.73±2.38 ^a	0.41±0.05 ^a

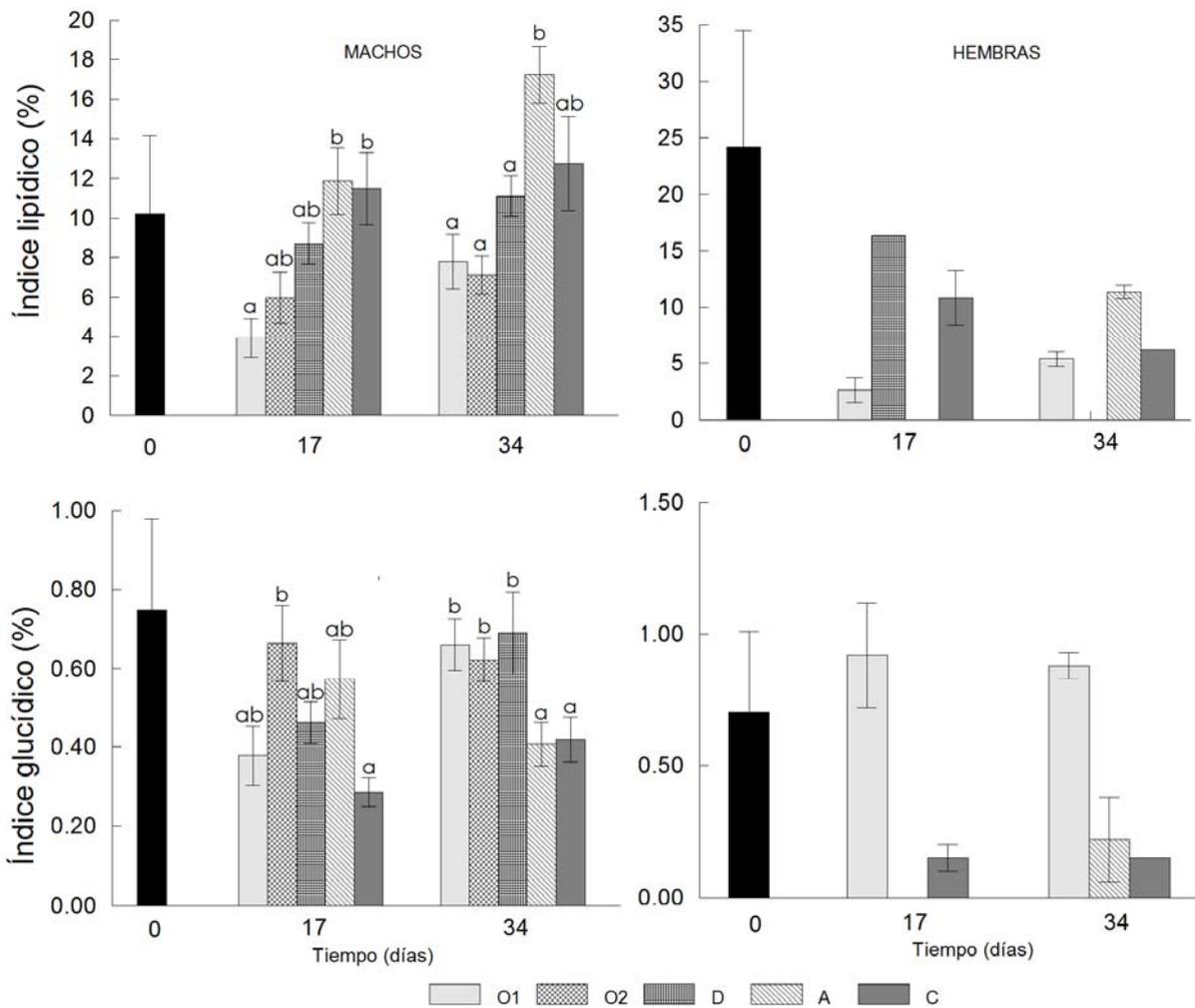


Figura 16. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

7.5.1.3. Tejido conjuntivo laxo

Las variaciones del IL e IG del tejido conjuntivo laxo de machos no fueron significativas con respecto al tiempo ($H=2.10$, $p=0.34$; $H=1.9$, $p=0.38$, respectivamente) (Tabla 7). Al evaluar las variaciones del IL e IG entre tratamientos no se observaron diferencias significativas a mediados del experimento ($H=7.45$, $p=0.11$; $H=8.29$, $p=0.08$, respectivamente), pero si al final ($H=14.28$, $p=0.00$; $H=16.34$, $p=0.00$, respectivamente). Al concluir el experimento los tratamientos A y D presentaron los mayores valores de IL (5.64% y 4.64%, respectivamente), en tanto que el tratamiento O1 presentó el valor más alto del IG (0.21%) y el tratamiento A el más bajo (0.06%).

Las hembras presentaron valores del IL ligeramente menores (3.57%) que los machos. A mediados del experimento el tratamiento D presentó el valor más alto (3.61%), en tanto que al concluir el valor más alto se registró en el tratamiento C (4.89%). El valor inicial del IG registrado en hembras (0.32%) fue superior al obtenido en machos; dicho valor se incrementó hacia la mitad del experimento, siendo los tratamientos O1 y D los mayores (0.59%, 0.47%, respectivamente). Por el contrario, el tratamiento C presentó el valor más bajo de IG (0.06%). Al finalizar el experimento se observó un decremento en comparación a los obtenidos al inicio y mitad del experimento, siendo el tratamiento A el más alto (0.27%) (Fig. 17).

Tabla 7. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo laxo de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice Lipídico	Índice Glucídico
			%	
Tejido conjuntivo laxo	O1	T ₀	2.36±0.31 ^a	0.16±0.07 ^a
		T ₁	2.54±0.39 ^a	0.13±0.05 ^a
		T ₂	2.43±0.33 ^a	0.21±0.06 ^a
	O2	T ₀	2.36±0.31 ^a	0.16±0.07 ^a
		T ₁	2.16±0.44 ^a	0.23±0.05 ^a
		T ₂	3.27±0.54 ^a	0.15±0.03 ^a
	D	T ₀	2.36±0.31 ^a	0.16±0.07 ^a
		T ₁	4.64±0.55 ^a	0.15±0.03 ^a
		T ₂	4.69±0.76 ^a	0.16±0.01 ^a
	A	T ₀	2.36±0.31 ^a	0.16±0.07 ^a
		T ₁	3.05±0.83 ^a	0.07±0.01 ^a
		T ₂	5.64±0.63 ^b	0.06±0.01 ^a
	C	T ₀	2.36±0.31 ^a	0.16±0.07 ^a
		T ₁	3.38±0.67 ^a	0.08±0.03 ^a
		T ₂	3.88±0.74 ^a	0.06±0.01 ^a

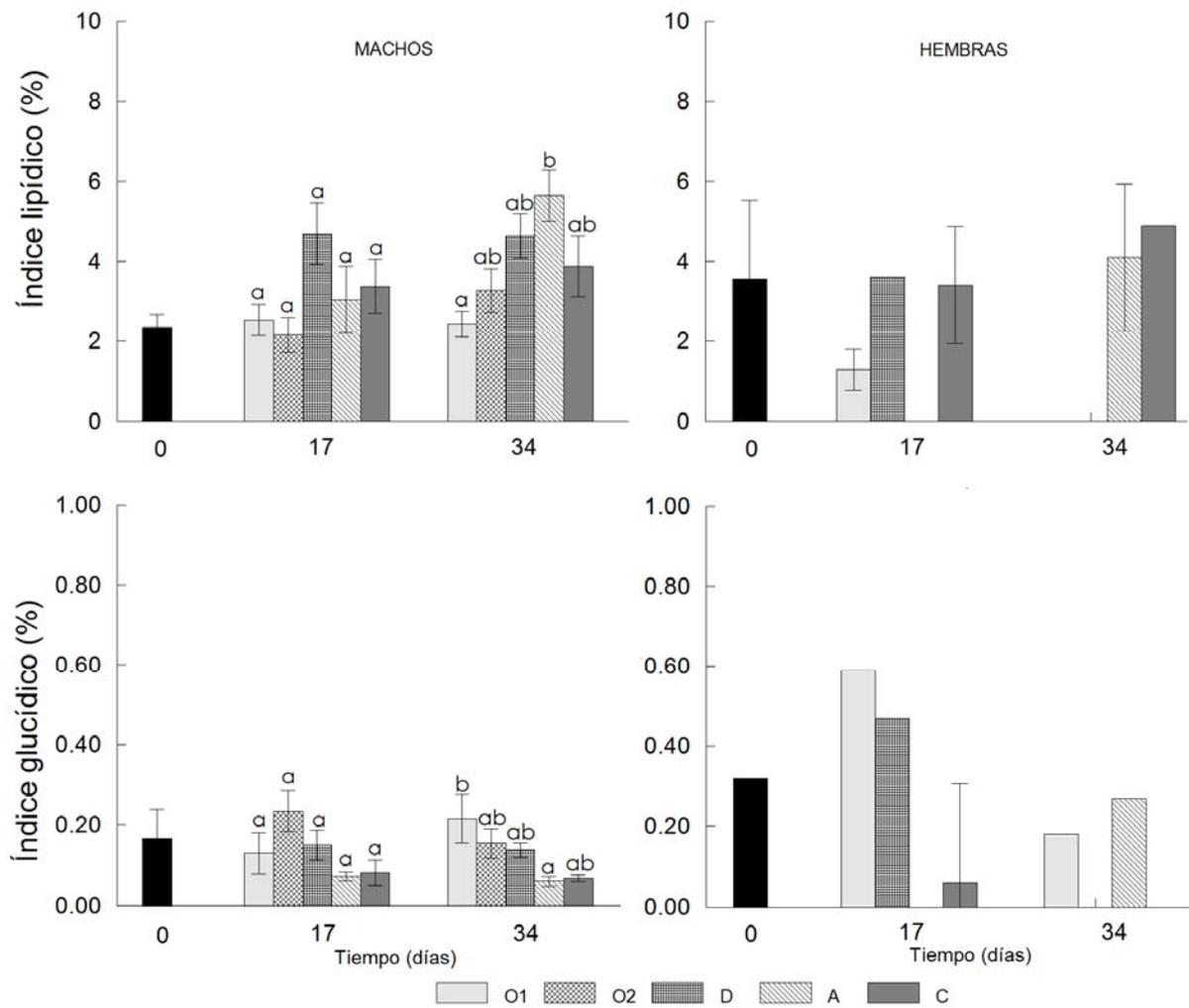


Figura 17. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo laxo de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

7.5.1.4. Tejido conjuntivo adipogranular

Los valores del IL e IG en el tejido conjuntivo adipogranular en machos no presentaron diferencias significativas a la mitad ($H=0.76$, $p=0.68$) y final ($H=1.95$, $p=0.15$) del experimento, como se puede observar en la Tabla 8. Sin embargo, las variaciones del IL entre tratamientos fueron significativas tanto a la mitad ($H=10.48$, $p=0.03$) como al final del experimento ($H=11.88$, $p=0.01$), siendo el tratamiento A el valor más alto (9.46%), en tanto que la mayoría de los tratamientos decrecieron. Al concluir el experimento los valores más altos del IL se obtuvieron en el tratamiento D (10.94%). En cuanto a las variaciones del IG entre tratamientos, estas solo fueron significativas en el periodo intermedio ($H=9.50$, $p=0.049$), mas no al concluir el experimento ($H=6.57$, $p=0.160$). El tratamiento O2 presentó el máximo valor a la mitad del experimento (0.63%) (Fig. 18).

Tabla 8. Variación del Índice Lipídico e Índice Glucídico del tejido conjuntivo adipogranular de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice Lipídico	Índice Glucídico
			%	
Tejido conjuntivo adipogranular	O1	T ₀	7.72±3.75 ^a	0.77±0.35 ^a
		T ₁	1.71±0.93 ^a	0.27±0.05 ^a
		T ₂	2.72±0.74 ^a	0.82±0.33 ^a
	O2	T ₀	7.72±3.75 ^a	0.77±0.35 ^a
		T ₁	2.41±0.57 ^a	0.63±0.10 ^a
		T ₂	1.91±0.30 ^a	0.40±0.05 ^a
	D	T ₀	7.72±3.75 ^a	0.77±0.35 ^a
		T ₁	3.51±1.83 ^a	0.59±0.11 ^a
		T ₂	10.94±3.95 ^a	0.52±0.10 ^a
	A	T ₀	7.72±3.75 ^a	0.77±0.35 ^a
		T ₁	9.46±2.43 ^a	0.56±0.10 ^a
		T ₂	9.65±2.08 ^a	0.37±0.11 ^a
	C	T ₀	7.72±3.75 ^a	0.77±0.35 ^a
		T ₁	7.92±1.71 ^a	0.28 ^a
		T ₂	8.10±2.05 ^a	0.23±0.06 ^a

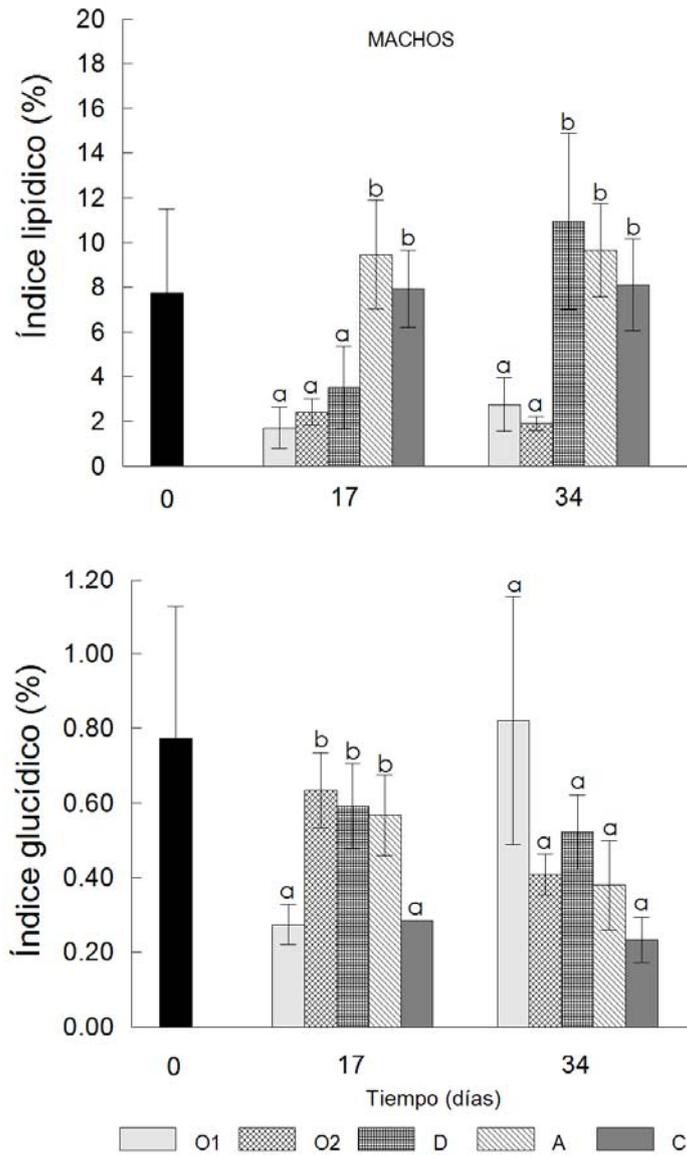


Figura 18. Variaciones en el Índice Lipídico e Índice Glucídico de él tejido conjuntivo adipogranular de machos de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1 ; O2 =Oscilante $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; D= Descendente 27°C a 19°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; A= Ascendente 20°C a 28°C , $2^{\circ}\text{C}/\text{c}$ semana; C= Grupo control: Constante 22°C . Se muestran las medias \pm error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

7.5.2. Índice de lipofucsinas

7.5.2.1. Glándula digestiva

Los valores del ILF para machos mostraron un incremento durante todo el experimento y su variación fue significativa en el tiempo en todos los tratamientos ($H=10.83$, $p=0.00$) (Tabla 9). Sin embargo, al realizar la comparación entre tratamientos, se encontró que no existen diferencias en el periodo intermedio de muestreo ($H=2.39$, $p=0.66$), pero si al concluir el mismo ($H=12.38$, $p=0.01$), siendo el tratamiento O1 el que presentó el valor máximo al final y los tratamientos A y C los más bajos (3.73% y 3.40%, respectivamente) (Fig. 19).

En las hembras, el valor inicial del ILF fue de 1.47%, pero éste se incremento a la mitad del experimento en la mayoría de los tratamientos, donde el tratamiento O1 presentó el mayor valor (4.52%). Al concluir el experimento, los valores se incrementaron nuevamente en el tratamiento O1, siendo este el valor más alto (6.59%).

Tabla 9. Variación del Índice de Lipofuscinas de la glándula digestiva de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice de Lipofuscinas
			%
Glándula digestiva	O1	T ₀	1.28±0.50 ^a
		T ₁	5.46±0.95 ^b
		T ₂	5.55±0.74 ^b
	O2	T ₀	1.28±0.50 ^a
		T ₁	4.95±0.52 ^b
		T ₂	5.39±0.42 ^b
	D	T ₀	1.28±0.50 ^a
		T ₁	4.67±0.48 ^b
		T ₂	5.50±0.69 ^b
	A	T ₀	1.28±0.50 ^a
		T ₁	5.59±0.88 ^b
		T ₂	3.73±0.41 ^{ab}
	C	T ₀	1.28±0.50 ^a
		T ₁	3.88±0.73 ^b
		T ₂	3.40±0.63 ^{ab}

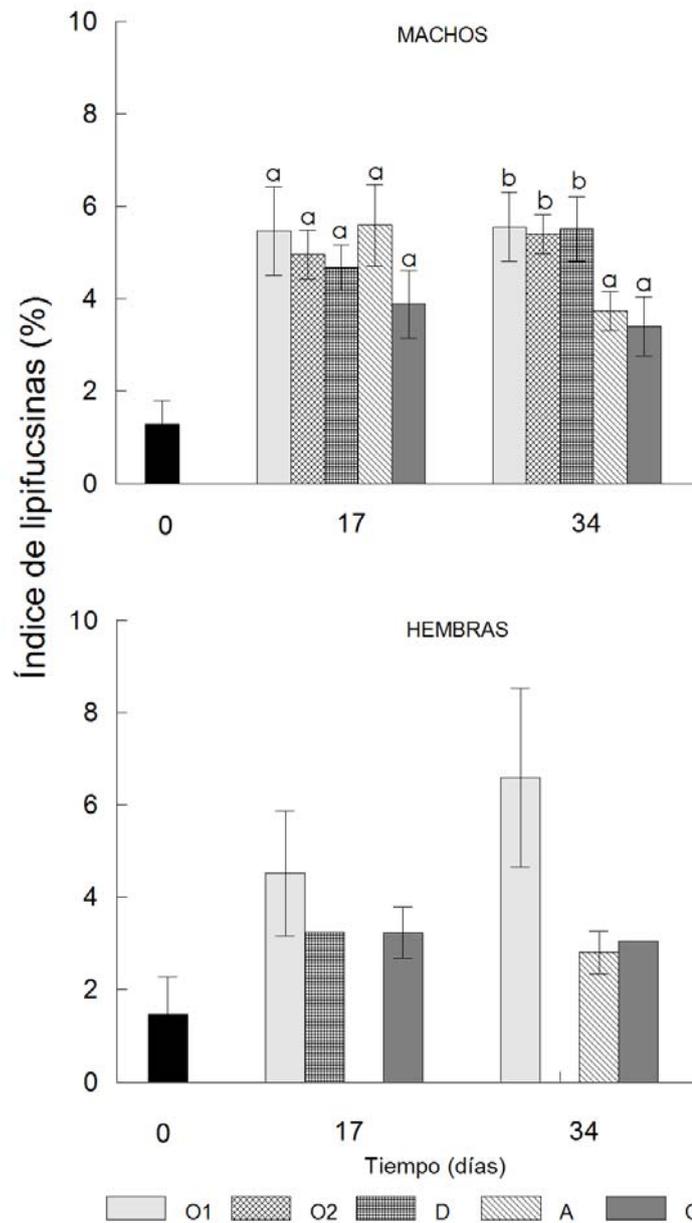


Figura 19. Variaciones en el Índice de Lipofuscinas de la glándula digestiva de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

7.5.2.2. Tejido conjuntivo laxo

En la Tabla 10 se observan las variaciones del ILF en el tejido conjuntivo laxo de los machos. No se encontraron diferencias significativas en la mayoría de los tratamientos en función del tiempo ($H=2.79$, $p=0.24$), y solo el tratamiento O1 presentó un aumento significativo en el tiempo ($H=6.63$, $p=0.03$). A su vez, no existen diferencias significativas en el ILF entre tratamientos a la mitad del muestreo ($H=5.34$, $p=0.25$), pero sí al final ($H=15.97$, $p=0.003$); aquí el tratamiento O1 generó el valor máximo (1.68%), mientras que los valores en el resto de los tratamientos descendieron y alcanzaron su punto más bajo en el tratamiento C (0.80%).

En las hembras la cobertura inicial del ILF (0.85%) se incrementó únicamente en el tratamiento O1 a la mitad del experimento (2.04%), mientras que el menor valor ocurrió en el tratamiento D (0.49%). Al final del experimento, el tratamiento C fue el que presentó el mayor valor del ILF (2.38%), mientras que el tratamiento A el menor (0.74%) (Fig. 20).

Tabla 10. Variación del Índice de Lipofuscinas del tejido conjuntivo laxo de machos en función al tiempo de exposición de cada tratamiento térmico aplicado. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤ 0.05) después de Kruskal-Wallis.

Tejido	Tratamientos	Tiempo	Índice de Lipofuscinas
			%
Tejido conjuntivo laxo	O1	T ₀	0.91±0.14 ^a
		T ₁	1.48±0.13 ^{ab}
		T ₂	1.68±0.18 ^b
	O2	T ₀	0.91±0.14 ^a
		T ₁	1.27±0.19 ^a
		T ₂	1.26±0.10 ^a
	D	T ₀	0.91±0.14 ^a
		T ₁	1.67±0.24 ^a
		T ₂	1.19±0.17 ^a
	A	T ₀	0.91±0.14 ^a
		T ₁	1.08±0.14 ^a
		T ₂	0.96±0.12 ^a
	C	T ₀	0.91±0.14 ^a
		T ₁	1.13±0.24 ^a
		T ₂	0.80±0.12 ^a

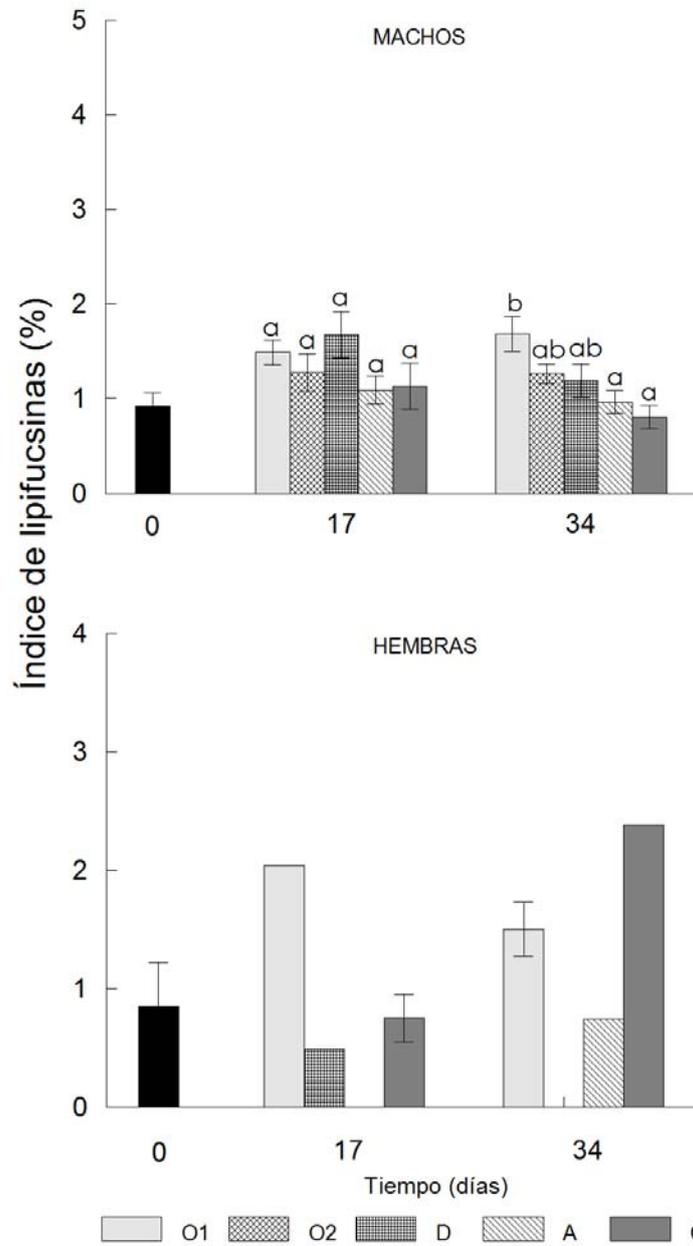


Figura 20. Variaciones en el Índice de Lipofuscinas del tejido conjuntivo de reproductores de *P. sterna* en función de los diferentes regímenes térmicos aplicados en laboratorio. Tratamientos: O1= Oscilante 21 ± 1; O2 =Oscilante 22 ± 2°C; D= Descendente 27 °C a 19 °C, 2 °C/c semana; A= Ascendente 20 °C a 28 °C, 2 °C/c semana; C= Grupo control: Constante 22 °C. Se muestran las medias ± error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) después de Kruskal-Wallis.

8. DISCUSIÓN

8.1. Diseño experimental

El objetivo del presente estudio estuvo dirigido a evaluar el efecto de la temperatura en el desarrollo gonádico y composición bioquímica de la gónada y tejidos somáticos relacionados con el proceso reproductivo, así como los posibles efectos de estrés ocasionados por dichas variaciones térmicas. Esto considerando que la temperatura es uno de los factores exógenos que más impacto ejerce sobre la fisiología reproductiva de los organismos marinos, particularmente porque controla el inicio o término de los principales eventos reproductivos, como la diferenciación de células germinales, maduración y liberación de gametos y reabsorción de nutrientes (Giese y Pearse, 1974; Sastry, 1979; Freitas *et al.*, 2010). Además, debido a que la temperatura es un factor que varía cíclicamente, sirve como indicador estacional de la respuesta reproductiva de los organismos. Para el planteamiento del diseño de los regímenes térmicos se consideraron otros dos aspectos importantes: Primero, los rangos de temperatura registrados en trabajos previos sobre ciclos reproductivos de *P. sterna* en Bahía de La Paz, los cuales reportan variaciones de 19 a 29 °C entre invierno y verano respectivamente (Saucedo y Monteforte, 1997). Segundo, las microvariaciones de temperatura que se presentan de forma normal a lo largo de un día en un ambiente subtropical como Bahía de La Paz (Sicard *et al.*, 2006), que no solo pueden oscilar entre 0.5 a 8 °C, sino que también influyen en el curso de la gametogénesis de la especie. En otras zonas de distribución sub-tropical o templada, la respuesta reproductiva a las variaciones de temperatura será diferente para cada especie, poblaciones de la misma especie, e incluso sexo (Loosanoff y Davis, 1963; Epp *et al.*, 1988; Barber y Blake, 1991).

Para muchas especies de bivalvos, el inicio del desove se da cuando la temperatura excede ciertos niveles críticos característicos de cada taxón (umbrales de respuesta), y la maduración de los gametos está regulada por las fluctuaciones anuales de temperatura, de tal suerte que algunas especies desovan

cuando la temperatura aumenta, otras cuando esta alcanza su máximo y otras cuando va en descenso (Mackie, 1984). Esto ha sido descrito para un gran número de especies pertenecientes a la clase Bivalvia (Bayne, 1976), particularmente en las familias Mytilidae (Seed, 1976), Ostreidae (Andrews, 1979), Veneridae (Mackie, 1984), Pectinidae (Román *et al.*, 2002; Barber y Blake, 2006), y Pteriidae (Saucedo y Southgate, 2001, 2008; Castillo-Durán *et al.*, 2010).

A pesar de lo anterior, se sabe que la temperatura no es el único factor importante en la regulación del ciclo reproductivo, pues existen otros: como el estado fisiológico de los individuos, la abundancia, calidad y disponibilidad de alimento (Sastry 1968), la duración del fotoperiodo (Fabioux *et al.*, 2005) y la periodicidad lunar (Giese y Pearse 1974, Mackie 1984).

De igual manera la disponibilidad de alimento, la cual se mantuvo en este experimento a razón de saciedad con una mezcla de las microalgas *I. galbana*, *P. salina* y *C. calcitrans*, la cuales se han reportado como adecuadas para la alimentación de moluscos bivalvos en condiciones de cultivo experimental piloto o comercial, ya que presentan un efecto complementario entre diferentes especies de flagelados y diatomeas, con diferente calidad nutricional (Ojeda *et al.*, 2008; González-Jiménez, 2012).

El periodo de experimentación considerado para este estudio fue de 34 días, considerando que fue un tiempo suficiente para detectar cambios en la condición fisiológica de *P. sterna*, así como el cambio en el desarrollo y composición bioquímica de la gónada y tejidos somáticos relacionados en los procesos de almacenamiento y movilización de energía. Trabajos similares han demostrado que es posible inducir el desarrollo de gónadas y alcanzar estadios de madurez en periodos cortos de experimentación, similares a los adoptados en este trabajo. Esto es cierto para *A. purpuratus* (Avendaño y Le Penneec 1996, 1997), *A. ventricosus* (Luna-González 1997), *C. gigas* (Baltazar *et al.*, 1999) y *M. galloprovincialis* (Fearman *et al.*, 2009). Anteriormente, Mazon-Suástegui (1988) y Avilés-Quevedo y Mazon-Suástegui (1989) acondicionaron reproductores de *P.*

sterna, estableciendo diversos tiempos experimentales que variaron entre los 60, 90, 110 y 120 días, obteniendo desoves con una eficiencia del 40 al 100%. Esto se hizo considerando el número de individuos desovados de ambos sexos independiente del mes de experimentación (abril, septiembre, octubre y noviembre).

En este estudio, hubo ausencia de hembras en algunos de los tratamientos y muestreos realizados. Aunque se utilizó un rango de tallas entre los 8.6 cm de altura de la concha y 8.2 cm de longitud con el fin de tener mayor representatividad de hembras, puesto que el cambio de sexo macho-hembra se presenta a partir de los 50 cm (Saucedo y Monteforte, 1997), esto no fue del todo posible. Para la misma especie cultivada en la Bahía de Acapulco, la talla de primera madurez para hembras es de 5.6 cm de altura de la concha (Serna-Gallo, 2011). Aunque para la mayoría de las especies de bivalvos marinos silvestres la proporción sexual hembra:macho es cercana a 1:1 conforme se incrementa la talla y edad de los organismos (Gervis y Sims, 1992), esta condición no siempre se cumple en organismos cultivados. Esto ha sido demostrado para adultos de *P. mazatlanica* y *P. sterna* obtenidos del mismo sitio de cultivo de los de este trabajo, donde la proporción sexual hembra:macho fue de 0.38:1, 0.4:1 (Saucedo y Monteforte, 1997; Gómez-Robles, 2008) y 0.43:1 (Vite-García y Saucedo, 2008), respectivamente. Al parecer, mientras más se incrementa la densidad de siembra en el cultivo, el estrés también lo hace, lo que propicia, como una estrategia de supervivencia, el desarrollo del sexo energéticamente menos costoso de producir, es decir, el masculino (Acosta-Salmón y Southgate, 2005). También para *P. sterna* en condiciones de cultivo, Serna-Gallo (2011) reportó una proporción hembra:macho de 0.60:1. Otras especies en cultivo en las que se ha observado un mayor número de machos, incluyen a *P. fucata* de la India (Chellam, 1987), *P. mazatlanica* de Costa Rica (Solano-López *et al.*, 1997), *P. albina sugillata* (O'onnor, 2002) y *P. imbricata* (O'onnor y Lawler, 2004) de Australia y Caribe colombiano (Hernández-Rondón *et al.*, 2000) y *P. penguin* de Tailandia (Arjarasirikoon *et al.*, 2004).

8.2. Efecto de la temperatura en los índices de condición y análisis histológicos, histoquímicos y bioquímicos

Varios autores reconocen la importancia de medir el IC para evaluar el estado nutricional de los bivalvos, su calidad comercial, y para determinar la presencia de diferentes contaminantes o enfermedades (Crosby y Gale 1990, Mason y Nell 1995, Baghurst y Michell 2002). Boscolo *et al.* (2003) concluyen que las variaciones en el IC se originan de las interacciones complejas de muchos factores exógenos y endógenos, y de la cual se puede inferir la condición fisiológica de un organismo, así como predecir de forma indirecta la actividad reproductiva que origina la principal variación en la biomasa del animal (Lucas y Beninger, 1985). En el presente estudio, el IC aumentó en el transcurso del tiempo (particularmente a los 17 días) y en algunos de los tratamientos este incremento continuó hasta el final del experimento (34 días). Por tanto, el IC no presenta una relación clara con el régimen térmico aplicado, por lo que no refleja una tendencia directa con el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de *P. sterna*. Al respecto, se plantea que el comportamiento del IC no se encuentra ligado al efecto directo de la temperatura, sino más bien a las variaciones en la disponibilidad del alimento, la cual se considera la segunda causa de influencia en las tendencias del IC, particularmente como una adaptación de los moluscos a condiciones cambiantes o inusuales de alimentación (Lucas y Beninger, 1985; Pirini *et al.*, 2007). A su vez, estas variaciones en la disponibilidad alimenticia obligan a los organismos a adoptar alguna de las estrategias reproductivas reportadas para bivalvos, ya sea conservadoras u oportunistas (Bayne, 1976). En este sentido, es bien sabido que los bivalvos que sustentan la gametogénesis en base a las reservas energéticas previamente almacenadas en tejidos somáticos cuando es alta la disponibilidad de alimento, utilizan una estrategia de tipo conservadora, mientras que aquellas especies que dependen del alimento disponible en el medio para cubrir las necesidades reproductivas siguen una estrategia oportunista. Vite-García y Saucedo (2008) y Cáceres-Puig *et al.* (2009) confirman que *P. sterna* utiliza las dos estrategias, comportándose como

oportunista en el periodo de invierno, cuando la temperatura es baja (20-21 °C), la disponibilidad alimenticia alta, y la movilización de energía a tejidos somáticos es mínima, mientras que en primavera la especie adopta una estrategia conservadora cuando la energía del seston disminuye y se tiene necesidad de movilizar la energía de la glándula digestiva o el músculo. Por tanto, se podría catalogar a *P. sterna* como una especie que presenta gran plasticidad de selección de estrategia de acuerdo al mejor escenario que asegure su éxito reproductivo.

Por otro lado, el IRM mostró una tendencia decreciente en el tiempo, independiente del tratamiento experimental y el muestreo particular realizado. Del Río Portilla *et al.* (1992) reportaron que el IC e IRM en *P. sterna* sigue una tendencia errática e imprecisa en organismos mantenidos bajo diferentes temperaturas constantes (20, 25 y 30°C) y alimentados con *Chaetoceros* sp. en proporciones del 2, 4 y 8% del peso seco de la masa visceral. Los autores concluyeron que las variaciones en ambos índices podrían estar ligadas a algún esfuerzo biológico por consumo de energía bajo condiciones desfavorables, a la existencia de algún proceso patológico, e incluso a la producción precoz de gametos. Por otra parte, Ángel-Pérez *et al.* (2007) relacionaron las variaciones en el IRM con los estadios de desarrollo de reproductores de *A. maura*, y encontraron una relación inversa entre ambos aspectos. Por tanto, parece que la relación costo energético/producción de gametos está subsidiada por el músculo abductor, dado que este órgano es considerado el mayor sitio de reserva energética, principalmente glucógeno, en la mayoría de los moluscos bivalvos como los pectinidos (Bayne, 1976; Barber y Blake, 1991; Chantler, 2006).

La evidencia histológica, evaluada primeramente a través del ITG, permitió cuantificar el área porcentual que refleja la relación directa entre el espacio ocupado por la gónada con respecto al tejido conjuntivo y glándula digestiva. Si bien es sabido que el índice gonadosomático es un estimador confiable del desarrollo gonádico de los organismos, su variación no permite estimar el grado

de madurez de los gametos. En este sentido, una gónada puede alcanzar un valor del índice máximo sin que esto implique que sus gametos alcancen la madurez estructural y fisiológica, mientras que el índice de cobertura de gónada, proporciona una idea más clara, en términos porcentuales, del grado de expansión de los gametos en cada estadio de desarrollo, mismos que evolucionan paralelamente con relación al porcentaje de aparición de ovocitos maduros. Esto ya ha sido determinado en *Ruditapes decussatus* (Delgado y Pérez-Camacho, 2002) y *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). En el presente estudio se observó que los valores del ITG de hembras presentaron inicialmente un valor por arriba del 50%, los cuales se encuentran ligados al estadio de desarrollo de los ovocitos y correspondieron a estadios de desarrollo. Este resultado no explica de manera amplia el patrón de este indicador por el efecto de la temperatura, dado que el número de hembras fue pequeño, o en caso particular de algunos tratamientos fue nulo. Sin embargo, cabe señalar que los porcentajes del ITG fueron superiores en las hembras que en los machos durante todo el experimento. A su vez, se observó que el valor del ITG decreció en proporción al grado de desarrollo de la gónada, como un reflejo claro de la ocurrencia de desoves parciales y posdesoves. Ello es claro, ya que como se menciono antes, ciertos puntos críticos en la tolerancia de la temperatura (e.g. umbrales térmicos) propician la activación o inactivación de los diferentes estadios de desarrollo, como se tiene descrito para un gran número de especies de ostras perleras, como *P. imbricata* (Hernández-Rondón *et al.*, 2000), *P. albina* (Tranter, 1958), *P. fucata* (Dasai, 1987; Behzadi *et al.*, 1997; Jamili *et al.*, 1999), *P. margaritifera* (Pouvreau *et al.*, 2000), *P. máxima* (Rose *et al.*, 1990), *P. mazatlanica* (Saucedo y Monteforte 1997; Torres y Cruz, 2002), *P. sterna* (Arizmendi-Castillo, 1996; Hernández-Díaz y Buckle-Ramírez, 1996; Saucedo y Monteforte 1997; Hernández-Olalde *et al.*, 2007).

En el caso de los machos, un 100% de los organismos se encontraron en estadio de desarrollo al iniciar el experimento, y solo los tratamientos oscilantes favorecieron más de un 50% la madurez gonádica de los organismos, los cuales

se proponen como estimuladores de la gametogénesis. Además, en estos tratamientos oscilantes más del 30% de los organismos pasaron a la etapa de desove y posdesove, llegando incluso al posdesoves un 60% al concluir el experimento. Sin embargo, Hernández-López (2012) reportó un 50% de organismos en posdesove y un 40% en madurez de organismos de la misma especie mantenidos a una temperatura constante de 23 °C y alimentados con una mezcla de microalgas y microcápsulas ricas en Omega-3. Dichos resultados, se encuentran relacionados con la plasticidad que cada especie puede proporcionar al establecer los límites críticos de respuesta en función a su condición o historial térmico de vida. Por ejemplo Saucedo *et al.* (2001) mencionan que *P. mazatlanica* es estimulada a madurar más rápidamente y con mayor número de ovocitos post-vitelogénicos con el suministro de una temperatura constante (24 °C) y/o un incremento gradual de 20 a 29 °C en un periodo de 15 días. Igualmente, en *A. purpuratus* las temperaturas estables fueron las que estimularon un mayor porcentaje de desoves, mientras que las ascendentes no presentaron tal respuesta. Para otras especies de bivalvos como *N. subnodosus*, se reporta que las temperaturas oscilaciones térmicas de baja frecuencia estimulan un rápido desarrollo gametogénico en sincronía, baja producción de ovocitos, pero un rápido crecimiento de los mismos (López-Sánchez, 2009). También se ha reportado para esta especie que los ciclos oscilantes de alta frecuencia, aplicadas a organismos en estadios incipientes de desarrollo gonadal, pueden favorecer desoves masivos a los 16 días de exposición (Maeda-Martínez, 2003). A diferencia de las temperaturas oscilantes, en este estudio los regímenes constantes pudieron ocasionar que no se alcanzara el umbral de respuesta necesario para detonar las reacciones del proceso reproductivo, llámense diferenciación de las células germinales, multiplicación, crecimiento o el mismo proceso de reabsorción de gametos residuales.

Bioquímicamente, el glucógeno es considerado como el principal metabolito de reserva en los moluscos bivalvos, el cual puede seguir diferentes vías durante la reproducción: (1) uso directo como fuente de energía para el

sustento de la gametogénesis, (2) conversión metabólica en lípidos por un proceso llamado lipogénesis que permitirá su uso posterior para otros procesos reproductivos o de crecimiento, o (3) almacenamiento en células especializadas o tejidos somáticos (Gabbott, 1975; Barber y Blake, 1991; Racotta *et al.*, 1998). En este estudio, el análisis de carbohidratos totales se realizó considerando que su principal componente es el glucógeno en muchos moluscos (Barber y Blake 1983), y en ostras perleras como *P. mazatlanica* en particular (Saucedo *et al.*, 2001). No observamos diferencias en la concentración de carbohidratos en la gónada de machos y hembras. De hecho, dicha concentración en machos se incrementó al final del experimento en los tratamientos descendente y ascendente, aunque nunca superando los valores iniciales. El contenido de carbohidratos en la glándula digestiva y en el músculo fue superior que en la gónada, sobre todo los del músculo como principal reservorio de carbohidratos. En *P. sterna* y *P. mazatlanica*, no parece existir una acumulación importante de carbohidratos en la gónada en relación a la condición reproductiva, lo que sugiere que estas especies utilizan el glucógeno rápidamente en el proceso reproductivo, evitando el almacenamiento en la gónada (Vite-García, 2005). Sin embargo, en el presente estudio el régimen de temperatura descendente favoreció la acumulación de carbohidratos al finalizar el experimento, mientras que la temperatura ascendente generó un descenso de este metabolito en el músculo aductor, y un incremento en la glándula digestiva y gónada.

A su vez, las concentraciones de lípidos en machos fueron similares entre tratamientos, aunque sus variaciones fueron menores a las observadas para hembras. Los tratamientos constante y ascendente mostraron mayores concentraciones de lípidos, particularmente durante los momentos en los que se alcanzaron grados avanzados de desarrollo y madurez gonádica. Por otro lado, las concentraciones registradas en la glándula digestiva fueron mayores que las de la gónada. Se puede observar que existe un descenso en las concentraciones de lípidos en la glándula digestiva al finalizar el experimento, el cual concuerda con su incremento en la gónada. Este resultado, además de sugerir que la glándula

digestiva movilizó reservas lipídicas a la gónada para el sustento de la gametogénesis, lo hizo durante momentos cortos que coinciden con los estadios de desarrollo y madurez gonádica. Lo anterior concuerda también con lo propuesto por diversos autores quienes señalan que la glándula digestiva actúa como un tejido de almacenamiento a corto plazo de lípidos que se transfieren después hacia la gónada (Gabbott, 1976; Barber y Blake, 1991; Lodeiros *et al.*, 2001; Saucedo *et al.*, 2002; Arellano-Martínez *et al.*, 2004b; Vite-García y Saucedo, 2008).

El efecto de la temperatura no mostró ninguna tendencia en la variación de proteínas entre los tratamientos térmicos en gónadas de machos, en tanto que en hembras las concentraciones se incrementaron ligeramente en los tratamientos oscilante y constante, respecto a las concentraciones iniciales. En *C. gigas*, se observó una influencia directa de la temperatura en el contenido de proteínas en el tejido gonádico, ya que este varió estacionalmente, mientras que las temperaturas bajas propiciaron un decremento en este metabolito, sugiriendo su posible uso para el crecimiento somático y/o las funciones relacionadas con el metabolismo (Ren *et al.*, 2003). Las concentraciones de proteínas en la glándula digestiva se incrementaron en los tratamientos oscilante y descendente, como influencia directa de la temperatura. En *P. mazatlanica*, se reportó que el músculo aductor desempeña un rol importante en el almacenamiento y suministro de energía y elementos de importancia en el proceso reproductivo (Vite-García, 2005; Vite-García y Saucedo, 2008). En el presente trabajo se observó que el músculo presentó un aumento gradual en la concentración de proteínas de machos y hembras, lo que indica cualquiera de dos opciones: (1) que este tejido no tiene una relación directa con el desarrollo gametogénico y el principal reservorio de proteínas pudiera ser la glándula digestiva, o (2) que el sustento de la gametogénesis podría generarse a partir de los carbohidratos del músculo, tal como se ha reportado previamente para otras especies (Barber y Blake, 1981, 1985; Saucedo *et al.*, 2002). De hecho, las reservas de proteínas se utilizan únicamente para satisfacer costos energéticos derivados de la maduración y el

desove de los organismos (Brokordt *et al.* 2000). Sin embargo, Harvey *et al.* (1993) y McLachlan *et al.* (1996) proponen que algunas especies de bivalvos inhiben el crecimiento somático durante el proceso de gametogénesis para hacer más eficiente el uso de reservas energéticas, siendo este un patrón típico de especies de zonas subtropicales y templadas sujetas a fuertes variaciones en los parámetros ambientales, como temperatura y alimento.

Los análisis histoquímicos permitieron determinar las variaciones en el contenido de gránulos de carbohidratos y gotas de lípidos en los tejidos que participan en el proceso reproductivo (glándula digestiva, células especializadas del tejido conjuntivo y gónada). En este estudio se encontró que el contenido de lípidos fue dependiente del estadio de desarrollo gametogénico, tanto en machos como en hembras. En lo que respecta a la gónada de los machos, los tratamientos ascendente, constante y descendente mostraron un incremento en los valores del IL por arriba del 7%, con respecto a los valores iniciales (<5%), el cual podría estar relacionado con el estadio de desarrollo que se presentó al final del ensayo (madurez y desoves parciales). Los valores registrados para hembras fueron superiores a los obtenidos para machos, lo que tiene una relación estrecha con el crecimiento de ovocitos durante la vitelogénesis, la cual trae consigo una acumulación importante de lípidos en el ovoplasma. Esto ya se ha reportado para otros bivalvos como *P. mazatlanica* (Saucedo *et al.*, 2002) y *C. corteziensis* (Rodríguez-Jaramillo, 2004; Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008), en los cuales las hembras presentan mayor cantidad de lípidos y triglicéridos en las gónadas en etapas de posvitelogénesis y menores porcentajes de lípidos en las etapas de inmadurez, desove y reposo. En caso contrario, los valores de IG de la gónada decrecieron durante todo el experimento, lo cual podría estar ligado a la presencia de diversos estadios de madurez, desove y posdesove en todos los tratamientos. En *C. corteziensis*, el contenido de carbohidratos en las gónadas femeninas y masculinas es más alto en organismos inmaduros o que se encuentran en gametogénesis temprana, y menor en organismos en estadios de desarrollo, madurez o desoves parciales (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). Este patrón de

acumulación de carbohidratos difiere de lo reportado para otras especies de bivalvos (Barber y Blake, 1985; Dridi *et al.*, 2007), y con lo observado en el presente estudio, donde el contenido de glucógeno es máximo durante la proliferación de gametos y mínimo posterior al desove.

El tejido conjuntivo laxo es considerado una matriz de sostén de los acinos en desarrollo durante la gametogénesis y de ciertos tipos de células especializadas en el almacenamiento de reservas energéticas, como las células vesiculares del tejido conjuntivo (células VCT) y células adipogranulares (células ADG). A su vez, el tejido conjuntivo participa en la comunicación con la glándula digestiva, por lo que en la mayoría de los moluscos juega un papel importante en el proceso reproductivo. Aunque el IL en el tejido conjuntivo laxo en machos se mantuvo por debajo de lo registrado en la glándula digestiva, se puede sugerir una posible movilización de energía hacia la glándula digestiva y la gónada. Ello debido a que se observó un incremento en el IL al finalizar el experimento, tanto en el tejido conjuntivo como en la glándula y en la gónada. En este sentido, Hernández-López (2012) reportó un patrón similar en *P. sterna*, a pesar de que los reproductores no desarrollaron tan activamente la gónada, sino más bien almacenaron lípidos en el tejido conjuntivo laxo y en la glándula digestiva. Por otro lado, aunque los valores del IL fueron similares en hembras y machos, el IG fue mayor en las primeras. En muchas especies de bivalvos parece ocurrir una proliferación de glucógeno en el tejido conectivo cerca de la gónada, con fines de almacenamiento a expensas de la reducción de la función hepática (Eble, 1969). Un caso similar se reportó en *C. angulata*, en donde la glándula digestiva no presentó glucógeno, debido a su posible movilización hacia el tejido conjuntivo, donde se almacena junto con mucopolisacaridos y glicoproteínas neutras o ácidas de las membranas basales y el epitelio (Rodríguez de la Rúa *et al.*, 2002). Ojea *et al.* (2004) pusieron de manifiesto la variación de la composición en glucógeno a lo largo del ciclo gametogénico de la almeja *R. decussatus*, observando los valores más bajos durante la fase de reposo gonádico, y valores altos durante la fase de maduración. La ausencia de glucógeno en la glándula digestiva podría entonces

estar relacionada con la movilización de este metabolito hacia células especializadas del tejido conjuntivo para su posterior utilización (Bayne *et al.*, 1976), transformándose el glucógeno acumulado en lípidos (principalmente triglicéridos) mediante lipogénesis e incorporándose éstos, junto con determinadas lipo-proteínas (como la vitelina), a los ovocitos en desarrollo (Gabbot, 1976; Racotta *et al.*, 1998). En *P. sterna* el tejido conjuntivo laxo mostró una posible transferencia de glucógeno hacia la glándula digestiva, sobre todo en los tratamientos oscilantes y descendentes esto con el fin de ser usados en el proceso reproductivo.

El complejo gónada/glándula digestiva se encuentra recubierto por una capa gruesa de tejido conjuntivo adipogranular, la cual podría funcionar como una zona de reserva de energía. Los organismos sometidos a los tratamientos térmicos ascendente, descendente y constante mostraron valores altos de lípidos y carbohidratos en el tejido conjuntivo adipogranular, los cuales fueron similares o superiores a los observados en el tejido conjuntivo laxo y en la glándula digestiva. La presencia del tejido conjuntivo adipogranular se ha descrito en otros moluscos como en el gasterópodo *Polystira albina* (García-López *et al.*, 2007) y en los mitilidos *M. edulis* (Peek y Gabbott, 1989; Mathieu y Lubet, 1993) y *M. galloprovincialis* (Gimeno *et al.*, 1991; Mathieu y Lubet, 1993). Es precisamente en esta última especie en donde se reportó que el manto contiene gran cantidad de células granulares, las cuales presentan vacuolas (granos) identificadas como lipídicas que presentan negatividad al colorante PAS (Gimeno *et al.*, 1989). Sin embargo, algunos gránulos se tornan positivos a dicho colorante, demostrando la existencia de más de un tipo de grano, unos conteniendo glucógeno lábil y no lábil y otros de naturaleza glucoprotéica y/o glucolipídica (Peek *et al.*, 1989; Gimeno *et al.*, 1991). En *M. edulis* se observó que existe una disminución en el número de células adipogranulares del manto durante la gametogénesis ya que estas se someten a autólisis controlada en el que las reservas de glucógeno y proteínas son movilizadas para la formación de gametos (Bayne *et al.*, 1982; Peek *et al.*, 1989). Por ello, se podría esperar que el contenido de lípidos y carbohidratos en el

tejido conjuntivo adipogranular de *P. sterna*, se encuentre ligado a la presencia de más de un tipo de vacuola, las cuales estén fungiendo como almacén de energía para ayudar al proceso reproductivo. Esto se podría comprobar mediante estudios de aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de este tipo de células.

Los cambios de temperatura pueden llegar a generar estrés y con ello un trastorno fisiológico en algunos organismos, como se observó en *C. gigas*, donde las temperatura altas parecen generar estrés fisiológico, mientras que las temperaturas bajas resultan propicias para la gametogénesis (Castillo-Durán *et al.*, 2010). Por el contrario, especies como *C. corteziensis* presentan una capacidad de adaptación de sus funciones metabólicas en presencia de variaciones de temperatura, aunque sin mostrar variaciones en el crecimiento, ni en la condición física durante temporadas extremas (Castillo-Durán, *et al.*, 2010). Con base en lo anterior, se procedió a cuantificar gránulos de lipofuscinas presentes en el tejido conjuntivo laxo y en la glándula digestiva, dado que estos lipopigmentos (lípidos oxidados), permiten predecir el grado de salud y/o enfermedad del tejido. Esto se ha comprobado en algunos grupos de peces y crustáceos, donde estos compuestos se han empleado como un indicador de edad y/o enfermedad, debido al deterioro celular y exposición de los organismos a agentes estresantes (Nandy, 1985; Agius y Roberts, 2003; Bomnonato *et al.*, 2007, Maxwell *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la glándula digestiva mostró un aumento del 200% en los valores de lipofuscinas con respecto a las cifras iniciales, tanto en machos como en hembras. Contrariamente, el tejido conjuntivo no presentó dicha variación en los valores de lipofuscinas, no obstante los organismos sometidos a los tratamientos oscilante y descendente presentaron mayores contenidos de lipofuscinas. Aparentemente, los organismos mostraron cierta adaptabilidad a los cambios de temperatura en los tratamientos ascendente y constante, ya que los niveles de lipofuscinas fueron decreciendo con respecto al tiempo de exposición, tanto en glándula digestiva como en el tejido conjuntivo laxo. La cuantificación de lipofuscinas también permitió inferir el posible estado inmunológico del organismo, ya que estos lipopigmentos fueron detectados en células cafés y hemocitos, los

cuales se encuentran reportados en la gónada y en el tejido conjuntivo periférico a la gónada de *P. sterna* (Vite-Garcia, 2005), Aunque en este estudio este tipo de células no fueron cuantificadas directamente, la técnica utilizada permitió confirmar su presencia e incremento en células fagocitarias. Flye-Sainte-Marine *et al.* (2009) demostraron que *R. philippinarum* presenta variaciones en la concentración de hemocitos en la hemolinfa, en relación al aumento de la temperatura del agua. Otros trabajos de laboratorio confirman que la temperatura es el factor principal de la proliferación de hemocitos en la defensa del organismo (Liu *et al.*, 2004; Paillard *et al.*, 2004; Monari *et al.*, 2007), entendiendo que la reacción defensiva de este dependerá de su condición fisiológica (un organismo joven presenta mejor defensa que uno viejo).

A pesar de que la temperatura se considera un factor determinante en el ciclo gametogénico, existen limitantes en cuanto a los requerimientos idóneos de maduración de cada especie, o población de cada especie, en función de las condiciones donde habita (incluyendo el laboratorio). Si bien los resultados del presente estudio no fueron del todo concluyentes, y no permiten identificar con la factibilidad deseada el patrón térmico óptimo para la maduración de reproductores de *P. sterna*, sientan las bases para futuros trabajos de maduración gonádica con manipulación de la temperatura. Se sugiere evaluar otro tipo de indicadores de respuesta en la gametogénesis, como el perfil hemático completo, análisis moleculares de síntesis de vitelogenina, microscopía electrónica para identificar tipos celulares participantes en los eventos reproductivos, etc. A su vez, se recomienda medir algunos parámetros de estrés oxidativo ocasionado por termorregulación, que podrían llegar a ser nocivos para la salud de los gametos, como potencial redox, enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa) y digestivos (lisozima, hidrolasa), etc.

9. CONCLUSIONES

- Los índices fisiológicos de condición y rendimiento muscular no mostraron una relación directa con ningún régimen de temperatura aplicado, ya que no reflejaron un efecto directo con el desarrollo gonádico, ni con la composición bioquímica de la gónada y los tejidos somáticos que se encuentran relacionados con el desarrollo gametogénico.
- El régimen térmico descendente propició un claro transporte de carbohidratos desde el músculo hacia la gónada en machos, el cual se vio reflejado en la presencia de estadios de desarrollo gonádico avanzado, así como de desove y posdesove en un periodo más corto que el resto de los tratamientos (17 días).
- Los regímenes térmicos constante y oscilante (O1) estimularon la acumulación de lípidos en la gónada femenina como respuesta al desarrollo ovocitario.
- Los tratamientos constante, descendente y ascendente estimularon un posible transporte de lípidos y carbohidratos desde la glandula digestiva hacia la gónada, también como posible indicador de crecimiento de gametos.
- Todos los tratamientos térmicos generaron estrés fisiológico en los organismos de *P. sterna*, a excepción del tratamiento constante, en donde se generó género menor acumulación de lipofuscinas en la glándula digestiva y tejido conjuntivo.

10. REFERENCIAS

- Acosta-Salmón, H. & P.C. Southgate. 2005. Histological changes in the gonad of the blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* Linnaeus, 1758) during the reproductive season in north Queensland, Australia. Molluscan Res. 25: 71-74.
- Agius, C. & R.J. Roberts. 2003. Melano-macrophages centres and their role in fish pathology. J. of Fish Dis. 26: 499-509.
- Andrews, J.D. 1979. Pelecypoda: Ostreidae. En: Giese, C., Pearse, J.S. (Eds.), Reproduction of Marine Invertebrates. Academic Press, New York. 293-341 p.
- Ángel-Pérez, C., S.J. Serrano-Guzmán & M.A. Ahumada-Sempoal. 2007. Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. Rev. Biol. Trop. 55: 839–852.
- Arellano-Martínez, M., B.P. Ceballos-Vázquez, M., Villalejo-Fuerte, García F. Domínguez, J.F. Elorduy-Garay, A. Esliman-Salgado & I.S. Racotta. 2004a. Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia:Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. J. Shellfish Res. 23(3): 723-729.
- Arellano-Martínez, M., I.S. Racotta, B.P. Ceballos-Vázquez & J.F. Elourdy-Garay. 2004b. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the Lion's paw *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. J. Shellfish Res. 23:15-23.
- Arizmendi-Castillo, E. 1996. Ciclo reproductivo de las ostras perleras *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) y *Pteria sterna* (Gould, 1851) (Pteriidae), en el área de Guaymas, Sonora, México. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Nuevo León, México. 140 p.

- Arjarasirikoon, U., M. Kruatrachue, P. Sretarugsa, Y. Chitramvong & S. Jantataeme. 2004. Gametogenic processes in the pearl oyster, *Pteria penguin* (Roding, 1798) (Bivalvia, Mollusca). J. Shellfish Res., 23: 403-410.
- Avendaño, M. & M. Le Pennec. 1996. Contribución al conocimiento reproductivo de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), en dos poblaciones de la II Región-Chile. Estud. Oceanol., 15: 1-10.
- Avendaño, M. & M. Le Pennec. 1997. Intraspecific variation in gametogenesis in two populations of the Chilean mollusc bivalve, *Argopecten purpuratus* (Lamarck). Aquac. Res., 28: 175-183.
- Avilés-Quevedo, A. & J.M. Mazón-Suástegui, 1989. Acondicionamiento gonádico e inducción al desove de *Pteria sterna* (gould, 1851) con dietas artificiales. VII Simposio Int Biol. Mar., 1-5 de junio. 71-77 p.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier & B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol., 198: 149-168.
- Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier & B. Romestand. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol. Rev., 198: 149-168
- Baghurst, B.C. & J.G Mitchell. 2002. Sex-specific growth and condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquac., 33: 1253-1263.
- Baltazar, P., D. Bermúdez & W. Rivera. 1999. Cultivo de la ostra *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) en un vivero artesanal, la arena, Casma. Revista Peruana de Biología. 2(6). http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biologia/v06_n2/culti_ostra.htm.

- Barber, B. & N.J. Blake. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RO physiological indexes. Mar. Biol., 87: 13-18.
- Barber, B.J. & N.J. Blake. 1991. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E. (Ed) Scallops: Biology Ecology and Aquaculture. 1a Ed., Elsevier, Amsterdam, 378-428 p.
- Barber, B.J., & N.J. Blake. 2006. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds.) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier 2nd Edition, Amsterdam, The Netherlands, 357-416 p.
- Bayne, B.L. 1976. Aspects of reproduction in bivalve mollusks. En: Wiley, M. (Ed.) Estuarine Processes, Academic Press, Londres, (1): 432-448.
- Behzadi, S., Parivar & K., Roustaian, P., 1997. Gonadal cycle of pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould) in Northeast Persian Gulf, Iran. J. Shellfish Res., 16, 129- 135.
- Bombonato, M.T.S., S.S. Rochel & C.A. Vicentini. 2007. Morphological study of the hepatic tissue of *Leporinus macrocephalus*. Acta Scientiarum Biological Sciences, 29 (1): 81-85.
- Boscolo, R, M. Cornello & O. Giovanardi. 2003. Condition index and air survival time to compare three kinds of Manila clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve) farming systems. Aquac.. Int., 11: 243–254.
- Brokordt, K.B. & H.E. Guderley. 2004. Energetic requirements during gonad maturation and spawning in scallops: sex differences in *Chlamys islandica* (Müller, 1776). J. Shellfish Res., 23: 25-32.
- Cáceres-Puig J.I., C. Cáceres-Martínez, & P.E. Saucedo. 2009. Annual Reproductive Effort of Pacific Winged Pearl Oyster *Pteria sterna* and Its Relation with the Timing for Planning Pearl Seeding Operations. J. Res., 28(3): 471-476.

- Castillo-Durán, A., J. Chávez-Villalba, A. Arreola-Lizárraga & R. Barraza-Guardado. 2010. Comparative growth, condition, and survival of juvenile *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* oysters cultivated in summer and winter. Cienc. Mar., 36(1): 29-39.
- Chantler, P.D. 2006. Scallop adductor muscles: structure and function. En: Shumway, S.E. & G.J. Parsons, (Ed). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. 2a edición, Elsevier, Holanda, 229–316 p.
- Chávez-Villalba, J., A. Arreola-Lizárraga, S. Burrola-Sánchez, & F. Hoyos-Chairez. 2010. Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. Aquac., 300: 128-136.
- Chellam, A. 1987. Biology of pearl oyster. En: K. Alargawasami (Ed). Pearl culture. Bulletin 39, Central Marine Fisheries Research Institute, Cochin, India, 13-21 p.
- Crosby M.P. & L.D. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. J. Shellfish Res., 9: 233-237.
- Del Rio-Portilla M.A., A.D. Re-Araujo, & D. Voltolina. 1992. Growth of the pearl oyster *Pteria sterna* under different thermic and feeding conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser., 89: 221-227.
- Delgado, M., A. Pérez-Camacho & M. Albentosa. 2002. Balance energético en la almeja *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758); Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 18 (1-4): 301-306.
- Desai, K., G. Hirani & D. Nimavat. 1979. Studies on the pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould): Seasonal Biochemical Changes. Indian J. Mar. Sci., 8(1): 49-60.
- Dridi, S., M. S. Romdhane & M. Elcafsi. 2007. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation

- to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. Aquac., 263: 238-248.
- Eble, A.F. 1969. A histochemical demonstration of glycogen, phosphorylase and branching enzyme in the American oyster. Proc. Natl. Shellfish. Assoc., 59: 27-34.
- Enríquez-Díaz, M., S. Pouvreau, J. Chávez-Villalba & M. Le Penneç. 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. Aquac. Int., 17(5): 491-506.
- Epp, J., V.M. Bricelj & R.E. Malouf. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 121: 113-136.
- Fabioux, C., A. Huveta, P. Le Souchua, M. Le Penneç & S. Pouvreau. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. Aquac., 250(1-2): 458-470.
- Fassler, R.C. 1991. Farming jewels: the aquaculture of pearls. Aquac. Mag. (sep/oct): 34-52.
- Fearman, J.A., C.J.S. Bolchand & N.A. Moltschaniwskyj. 2009. Energy storage and reproduction in mussels, *Mytilus galloprovincialis*: the influence of diet quality. J. Shellfish Res., 28: 305-312.
- Flye-Sainte-Marie, J., P. Soudant, C. Lambert, N Le Goïc, & M. Goncalvez. 2009. Variability of the hemocyte parameters of an annual cycle *Ruditapes philippinarum* in the field during. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 377: 1-11
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2011. Yearbook. of Fishery and Aquaculture 2009. <http://www.fao.org/fishery/statistics/fr>, 78 p.

- Freites L., N. García, L. Troccoli, A.N. Maeda-Martínez & M.J. Fernández-Reiriz. 2010. Influence of environmental variables and reproduction on the gonadal fatty acid profile of tropical scallop *Nodipecten nodosus*. Comp. Biochem. Physiol., 157: 408-414.
- Gabbot, P. 1976. Energy metabolism. En: Marine mussels: their ecology and physiology. B. L. Bayne (Ed.):. Cambridge University Press. Cambridge, 293-356 p.
- Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: A hypothesis concerting the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. En. Barnes, H. (Ed.) Proceeding of the 9th European Marine Biology Symposium. Aberdeen University Press, 191–211 p.
- García-Dominguez, F., B. Cevallos-Vazquez, & A. Tripp. 1996. Spawing cycle of the pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), (Pteriidae) at Isla Espiritu Santo, Baja California Sur, México. J. Shellfish Res., 15 (2): 297-303.
- García-López, A.L., E.A. Uría-Galicia & E. Ortiz-Ordóñez. 2007. Estudio histológico de boca, esófago, estómago e intestino de *Polystira albida* (Gastropoda: Turridae). Int. J. Morphol., 25(4): 767-774.
- Gervis, M., Sims. 1992. Biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: Pteriidae). Overseas Development administration of the United Kingdom. Int. Cent. ;Liv. Aquat. Res. Manag., 21(49).
- Giese, A.C. & J.S. Pearse. 1974. Introduction. En A. C. Giese & J. S. Pearse (Eds.). Reproduction of marine invertebrates. Academic, Nueva york, Nueva York, EE.UU, 1–49 p.
- Gimeno, S., C. Sarasquete & M.L. González de Canales. 1991. El glucógeno de las células de almacenamiento del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. Demostración histoquímica. Sci. Mar., 55 (2): 453- 457.

- Gimeno, S., M.C. Sarasquete & M.L. Gonzales De Canales. 1989. Estudio preliminar de identificación de lípidos por métodos histoquímicos en la células adipogranulares y vesiculares del manto de *Mytilus galloprovincialis* (LMK.) Intenational Symposium on Mussel, Galicia., 6(10).
- Gómez-Robles, M.E. & P.E. Saucedo. 2008. Ultraestructure of tissues and cells of pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley 1856) associated with reproduction. En: int. Workshop phys., Reprod. And Nutr. In Molluscs., 6-9 Nov., La Paz, BCS, México. Pearl Oyster Inf. Bull., 18. 20 p.
- Goméz-Robles, M.E. 2008. Evaluación de indicadores cualitativos y cuantitativos de calidad de gónada y tejidos somáticos en la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) relacionados con la reproducción. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., 104 p.
- González-Jiménez, A. 2010. Efecto combinado de la temperatura y dieta en el crecimiento, composición bioquímica y respiración de juveniles de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Soweby, 1835). Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Oaxaca, 81 p.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology, and Culture. Fishing New Books, Blackwell Science, New York, 443 p.
- Gunter, G. 1957. Temperature. Geol. Soc. Am. Mem., 67:159-184.
- Gutiérrez-Villaseñor, C.E. & G. Chi-Barragán. 1997. Effect of the temperature and feeding ratio on the conditioning of *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835. 11th International Pectinid Workshop. La Paz, B.C.S., México, 73-75.
- Harris, C., S Fierro, A. Cerda, D. Domínguez, J.J.E.I. Ferreiro, K. Garay, B. García, J. González, J.C.G.R. Lara, A.C. López, J. Martínez, M. Montalvo, R.N.A.D. Ocegüera, C. Orozco, G. Sánchez, A.L. Torres, S.V.V. Vital, J.O. Zavala &

- M.C. Gould. 2002. Maduración y fecundación in vitro de los ovocitos de *Pteria sterna* (Gould, 1851 , Mollusca). Cienc. Mar., 28(2): 149-156.
- Helgpeth, J.W. & J.J. Gonor, 1969. Aspects of the potential effects of thermal alteration on marine and estuarine benthos. En P. A. Krenkel & F. L. Parker (Eds). Biological aspects of thermal pollution. Vanderbilt Univ., Tennessee, EE.UU, 80-118 p.
- Hernández López C. G. 2012. Efecto de la dieta en el desarrollo y composición de la gónada y tejidos somáticos de la concha nácar *Pteria sterna* (Gould, 1851). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México, 107 p.
- Hernández-Díaz, A. & L. F. Bückle-Ramírez. 1996. Gonadal cycle of *Pteria sterna* (Gould, 1852) (Mollusca: Bivalvia) in Baja California, México. Cienc. Mar., 22:495-509.
- Hernández-Olalde, L., F. García-Domínguez, M. Arellano-Martínez & B.P. Ceballos-Vázquez. 2007. Reproductive cycle of the pearl oyster *Pteria sterna* (Pteriidae) in the Ojo de Liebre Lagoon, B.C.S., Mexico. J. Shellfish Res., 26: 543-548.
- Hernández-Rondón, K.L. H. Gómez & A. Juan. 2000. Acondicionamiento e inducción al desove de reproductores de *Pinctada imbricata* Roding (1798) del Caribe colombiano. Sci., 15(1): 61-80.
- Howart, D.W. & C. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. U. S. dep. Comm., NOAA, Tech. Men. NMFS-F/NEC-25, 102 p.
- Humason, G. L. 1979. Animal tissue techniques. W. H. Freeman and Company, USA, 649 p.
- Jamili, S., G. Amini & S. Oryan. 1999. Gonad changes and serum steroid levels during the annual reproductive cycle of the pearl oyster *Pinctada fucata* Gould . Iran J. Fish. Sci., 1: 67-75.

- Kiefert, L., D. McLaurin-Moreno, E. Arizmendi-Castillo, H.A. Hänni & S. Elen. 2004. Cultured pearls from the Gulf of California, México. Gems & Gemology, 40: 26-38.
- Kinne, O. 1963. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals: 1. Temperature. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., 11: 301-340.
- Kinne, O. 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals: 2. Salinity and temperature-salinity relations. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., 22: 281-339.
- Kuwatani, Y., T. Nishi. 1968. On the rice powder as a diet of the pearl oyster. Bull. Of the Japanese Soc. of Scient. Fish., 34 (3): 191-203.
- Liu, S., X. Jiang, X. Hu, J. Gong, H. Hwang & K. Mai. 2004. Effects of temperature on nonspecific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). Aquac. Res., 35(7): 678-682.
- Lomovasky, V.L., G. Malanga & J. Calvo. 2004. Seasonal changes in biochemical composition of the clam, *Eurhomalea exalbida* (Bivalvia: Veneridae), from The Beagle Channel, Argentina. J. Shellfish Res., 23(1): 81-87.
- Loosanoff, V.L. & H.C. Davis. 1952. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. Biol. Bull. (Woods Hole), 98: 60-65.
- Loosanoff, V.L. & H.C. Davis. 1963. Rearing of bivalve mollusk.. En F.S. Rusell (Ed.) Advance in Marine Biology. I. Academic. Nueva York, Nueva York, EE.UU., 2-136 p.
- López-Sánchez, J.A., A.N. Maeda-Martínez, R.P. Croll & H. Acosta-Salmón. 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of scallop *Nodipecten subnodosus* the Pacific lion's paw. Comp. Biochem.Physiol., A, 154: 425-428.

- Lubet, P. 1981. Action de la temperature sur le cycle de reproduction des lamellibranches. Bull. Soc. Zool. France ,106: 283-292.
- Lucas, A. & P.G. Beninger. 1985. The use of physiological condition index in marine bivalve aquaculture. Aquac., 44: 187-200.
- Lucas, A. 1992. Bioenergetique des Animaux Aquatiques. 1st ed. France Masson Editorial, 179 p.
- Luna-González, A. 1997. Ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842), cultivada en la rada del Puerto de Pichiligüe, B.C.S., y su relación con el medio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur, México.
- Lynch, M., S. Raphael., L. Mellor, P. Spare & M. Inwood. 1972. Métodos de Laboratorio. (Ed.), Interamericana. México, 1522 p.
- Mackie, G.L. 1984. Bivalves. En: Wilburg, K.M. (Ed.), The Mollusca Reproduction. Academic Press. New York, 7: 351-417.
- Maeda-Martínez A.N. 2003. Evaluación de la infraestructura y operación del laboratorio de producción de semillas de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* de la empresa Marimex, S.A. de C.V. en Bahía Kino, Sonora. Informe técnico. CIBNOR, 39 p.
- Martínez G. & H. Pérez. 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. Aquac., 228: 153-167.
- Mason C.J. & Nell JA. 1995. Condition index and chemical composition of meats of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) at four sites in Port Stephens, NSW. J. Mar. Freshwat. Res., 46: 873-881.

- Mathieu, M. & P. Lubet. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves a brief review. Invert. Reprod. Dev., 23: 129-129.
- Mazón-Suástegui, J.M. 1988. Acondicionamiento y desove de cuatro especies de moluscos bivalvos alimentados con dietas artificiales. Rev. Latinoam. Acuic., 38: 4-12.
- McLachlan, A. J.E. Dugan, O. Defeo, A.D. Ansell, D.M. Hubbard, E. Jaramillo & P.E. Penchaszadeh. 1996: Beach clam fisheries. Oceanogr. Mar. Biol. Annu Rev. 34: 163–232.
- McWhinne, M.A. 1967. The heat responses of invertebrates. En A.H. Rose (Ed.) Thermobiology. Academic. Nueva York, Nueva York, EE.UU.
- Monari, M., V. Matozzo, J. Foschi, O. Cattani, G. Serrazanetti & M. Marin. 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. Fish & Shellfish Immun., 22(1-2): 98-114.
- Monteforte, M. 1990. Ostras perleras y perlicultura: situación actual en los principales países productores y perspectivas para México. Serie Cient. UABCS. (Núm. Esp. AMAC), 1: 13-18.
- Monteforte, M. 1996. Cultivo de ostras perleras y perlicultura En: Estudio de potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. FAO-UABCS-CIBNOR-CICIMAR-CRIP (Eds.), La Paz, Baja California Sur, México, 571-613
- Morse, M. P. & J. D. Zardus. 1997. Bivalvia. En Harrison, F. W. & A. J. Kohn. (Eds) Microscopic Anatomy of Invertebrates: Mollusca II. Vol. 6A. Cap. 2. A John Wiley & Sons, Inc, Publication, 7-118 p.
- Nandy, K. 1985. Lipofuscin as a marker of impaired homeostasis in aging organism. En: B.B. Davis and W.G. Wood (Eds). Homeostasis function and aging. Raven Press, New York, 139-148 p.

- Navarro, J.M., G.E. Leiva, G. Martínez & C. Aguilera. 2000. Interactive effects of diet and temperature on the scope for growth of the scallop *Argopecten purpuratus* during reproductive conditioning. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 247: 67-83.
- O' Connor, W. & N.F. Lawler. 2004. Reproductive condition of the pearl oyster, *Pinctada imbricata*, Roding, in Port Stephens, New South Wales, Australia. Aquat. Res., 35: 385-396.
- O' Connor, W. 2002. Latitudinal variation in reproductive behavior in the pearl oyster, *Pinctada albino sugillata*. Aquac., 209: 333-345.
- Ojea, J., A.J. Pazos, D. Martinez, S. Novoa, J.L. Sanchez & M. Abad. 2004. Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquac., 238 (1-4): 451-468.
- Ojeda-Ramírez J.J., J.I. Cáceres-Puig, J.M. Mazón-Suástegui & P.E. Saucedo. 2008. Nutritional value of *Pavlova spp.* (Prymnesiophyceae) for spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* during late-nursery culturing at the hatchery. Aquac. Res., 39: 18-23.
- Orton, J.H. 1920. Sea temperatura, breeding and distribution of marine animals. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 12: 339-366.
- Paillard, C., 2004a. A short-review of Brown Ring Disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquat. Living Resour., 17: 467-475.
- Pardo Fernández, P., A. Matus de la Parra & F. San Juan Serrano. 2002. Búsqueda de marcadores de madurez de los gametos durante el ciclo gametogénico de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 18 (1-4): 165-173.

- Paulet, Y.M., A. Donval & F. Bekhadra. 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. Invertebr. Reprod. Dev., 23: 89-94.
- Peek, K. & P.A. Gabbott. 1989. Adipogranular cells from the mantletissue of *Mytilus edulis* L. I. Isolation, purification and biochemical characteristics of dispersed cells. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 126: 203-216.
- Peek, K., P.A. Gabbott & N.W. Runham. 1989 . Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in the distribution of dispersed cells in a preformed Percoll density gradient. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 126: 217-230.
- Pérez-Estrada, C. 2000. Descripción anatómica e histológica de la concha nácar *Pteria sterna*, mollusca: Pteriidae. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 79 p.
- Pirini, M., M.P. Manuzzi, A. Pagliarani, F. Trombetti & A.R. Borgatti. 2007. Changes in fatty acid composition of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) fed on microalgal and wheat germ diets *Vittoria ventrella* Com. Biochem. Physiol., B. 147: 616-626.
- Pouvreau, S. & A. Bodoy , 2000. Dominique Buestel .In situ suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: combined effects of body size and weather-related seston composition. Aquac., 181: 91-113.
- Ramírez-Castillo E. 2003. Desarrollo reproductivo estacional de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 21. Bacum, Sonora, 49 p.
- Ren, J.S. I.D. Marsden, A.H. Ross. & D.R. Schiel. 2003. Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. New Zealand J. Mar. Freshwat. Res., 37: 171–182.

- Robles-Mungaray, M., J.M. Mazón-Suástegui, P. Monsalvo-Spencer, M. Osuna-García & F. Flores-Higuera. 2001. Antecedentes, estado actual y perspectivas del los Florianopolis, Brasil. Pectínidos gigantes del genero *Nodipecten*: problemas y perspectivas. California, México. En: Consulta técnica del proyecto II.6, Citado. Cultivo decultivo de *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus* en la península de Baja California, 34-35 p.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquac., 172: 125-145.
- Rodríguez de la Rúa, A., M.L. González de Canales y C. Sarasquete 2002. Estudio histomorfológico del aparato digestivo y distribución histoquímica de carbohidratos en el ostión *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). Bol. Inst. Esp. Oceanogr., 18 (1-4): 329-336.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, 74 p.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., A.N. Maeda-Martínez, M.E. Valdez, T. Reynoso-Granados, P. Monsalvo-Spencer, D. Prado-Ancona, F. Cardoza-Velasco, M. Robles-Mungaray & M.T. Sicard. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell. *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). J. Shellfish Res., 20(1): 39-47.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C., M.A. Hurtado, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano & E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an Annual reproductive cycle. J. Shellfish Res., 27(5): 1129-1141.
- Román, G., G. Martínez, O. García & L. Freites. 2002. Reproduction. En: Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa, México, 27-60 p.

- Rose, R., R. Dybdal & S. Harders. 1990. Reproductive cycle of the Western Australian Silverlip Pearl Oyster *Pinctada maxima* (Jameson) (Mollusca: Pteriidae). J. Shellfish Res., 9: 261-272.
- Sastry, A.N. 1970. Reproductive physiological variation in latitudinally separated populations of the bay scallop, *Aequipecten irradians*. Biological Bulletin, 138: 56-65.
- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (Excluding Ostreidae). En: Giese A.C. & J. S. Pearse (Ed). Reproduction of marine invertebrates. Molluscs: Pelecypods and lesser classes. Academic Press. USA, 5:113-265.
- Sastry, AN. 1968. The relationship among food, temperature, and gonad development of the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. Physiol. Zool., 41: 44-53.
- Saucedo, P., C. Rodríguez-Jaramillo & M. Monteforte. (2002) Microscopic anatomy of gonadal tissue and specialized storage cells associated with oogenesis and spermatogenesis in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). J. Shellfish Res. 21(1): 145-155.
- Saucedo, P.; C. Rodríguez-Jaramillo, C. Aldana-Avilés, P. Monsalvo-Spencer, T. Reynoso-Granados, H. Villarreal & M. Monteforte. 2001. Gonadic conditioning of the calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), under two temperature regimes. Aquac., 2: 103-119.
- Saucedo, P.E. & M. Monteforte. 1997. Breeding cycle of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* and *Pteria sterna* (Bivalvia:Pteriidae) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, México. J. Shellfish Res., 16: 103-110.
- Saucedo, P.E. & P.C. Southgate. 2008. Reproduction, Development, and growth. En: Southgate P.C., J.S. Lucas (Ed.). The Pearl Oyster: Biology and Culture. Cap. 5. Elsevier Science Publishers, Australia. Primera edición, 131-186 p.

- Saucedo, P.E., I. Racotta, H. Villarreal & M. Monteforte. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. J. Shellfish Res., 21: 127-135.
- Seed, R. 1976. Ecology. En: Bayne, B.L. (Ed.). Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, 13-65 p.
- Serna-Gallo, M.I. 2011. Crecimiento y ciclo reproductivo de la concha nácar *Pteria sterna* cultivada en la Bahía de Acapulco. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nayarit, 76 p.
- Sevilla, M.L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1845). Rev Soc. Mex. Hist. Nat., 30: 223-262.
- Shumway, S.E., 1991. Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier Science Publishers B.V, New York, 1095 p.
- Sicard, M.T., A.N. Maeda-Martínez, S.E. Lluch-Cota, C. Lodeiros-Seijo, L.M. Roldán-Carrilo & R. Mendoza-Alfaro. 2006. Frequent monitoring of temperature: an essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. Aquac. Res., 37: 1040-1049.
- Siniscalchi A., S. Cavallini, D. Sonetti, G. Sbrenna, S. Capuano, L. Barbin, E. Turolla & R. Rossi. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. Mar Biol., 144: 1205-1212.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1981. Biometry. W. H. Freeman, USA, 922 p.
- Solano-López, Y., J. Cabrera-Pena, J.A. Palacios & R.A. Cruz. 1997. Madurez sexual, índice de condición y rendimiento de *Pinctada mazatlanica* (Pterioida: Pteriidae), Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 45: 1049-1054.

- Stefano G.B. 1990. Neurobiology of *Mytilus edulis*. Manchester University Press. Manchester and New York, 311 p.
- Thielley, M. 1993. Etude cytologique de la gamétogenèse, de la sex-ratio et du cycle de reproduction chez l'huître perlière *Pinctada margaritifera* (L) var. *cummingi* (Jameson), (mollusques, bivalves). Comparaison avec le cycle de *Pinctada maculata* (Gould). Doctoral Thesis Université Française du Pacifique, French Polynesia, 233 p.
- Torres-Zepeda M.G. & M. Cruz-Pérez. 2002. Caracterización del ciclo reproductivo y épocas de desove de la Madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) en la Bahía de Acapulco (Guerrero, México), 409-421. <http://www.civa2002.org>.
- Tranter, D.J. 1958. Reproduction in Australian pearl oysters (Lamellibranchia). III. *Pinctada albino* (Lamarck): breeding season and sexuality. Aust. J. Mar. Freshwat. Res., 9(1): 144-158.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Anal. Biochem., 11(2): 256-265.
- Villalejo-Fuerte M. & B.P. Ceballos-Vázquez. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). Rev. Biol. Trop., 44: 591-594.
- Villegas-Carrasco, M. 2004. Evaluación de los cultivos larvarios de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) realizados en el laboratorio del CIBNOR de 1998-2003. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de B.C.S. La Paz, México, 106 p.
- Vite-García, M.N & P.E. Saucedo. 2008. Energy storage and allocation during reproduction of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* (Gould, 1851) at Bahía de La Paz, Baja California Sur, Mexico. J. Shellfish Res., 27: 375-383.

- Vite-García, M.N. 2005. Almacenamiento y utilización de reservas energeticas en relación con la reproducción de las ostras perleras *Pteria sterna* (gould, 1851) y *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., 95 p.
- Zuñiga-Pacheco, C. 1998. Descripción anatómica e histológica de la Madreperla *Pinctada mazatlanica* (hanley, 1856) (Mllusca: Pteriidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur, 78 p.

11. ANEXOS

I. Simulador Térmico Marino (SITMA).

El equipo de simulación térmica marina automatizado (SITMA), diseñado y fabricado en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), con el propósito de controlar variaciones térmicas del agua, la cual se emplea en diversos experimentos de laboratorio. Dicho equipo consiste en una computadora con un software y hardware que controlan los interruptores de encendido y apagado de 6 equipos de refrigeración, equipado con un serpentín de acero inoxidable y 6 calentadores de titanio de 1000 W sumergidos en 6 tanques de 70 L de agua marina. La computadora registra los datos programados para la simulación, lo cuales se reproducen en cada tanque experimental por medio de un termistor flotante, dichos datos son comparados con la simulación programada con anterioridad en la memoria de la computadora, la cual por medio del software controla los interruptores del equipo por medio de cambio de voltajes. El SITMA fue diseñado para controlar la temperatura en seis tanques simultáneamente por un tiempo indefinido, con una capacidad de variación de 5°C/h en 60 L de agua.

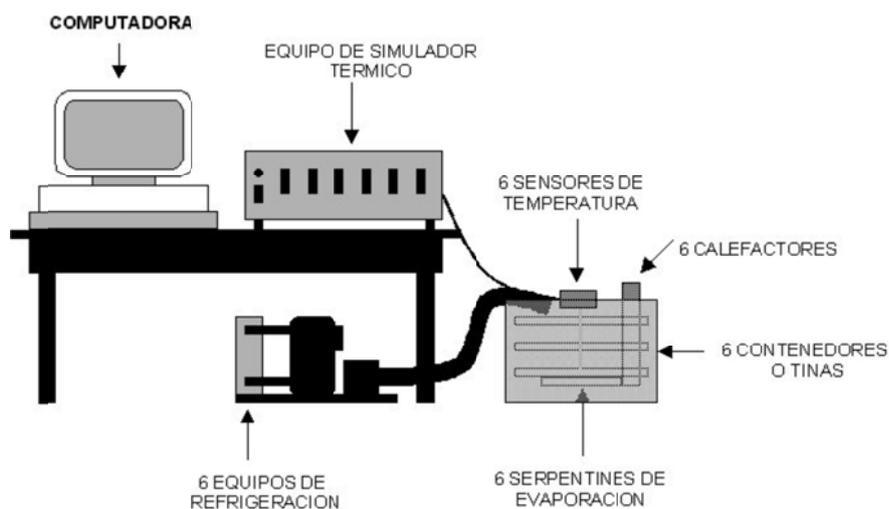


Figura 21. Esquema representativo del Simulador Térmico Marino Automatizado (SITMA).

II. Técnica de inclusión en parafina

Fijación

Los tejidos se fijaron en solución Davidson para organismos marinos, durante 48 horas.

Cambiar a alcohol etílico al 70%, al transcurrir 48hr.

Deshidratación

Alcohol etílico 70% I y II (Mínimo una hora c/u)

Alcohol etílico 80° (1 hora para tejidos grandes)

Alcohol etílico 90° (1 hora)

Alcohol etílico 96° (1 hora)

Alcohol etílico 100 I, II, III (1 hora c/u)

Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) (20 min. tiempo crítico)

Xilol absoluto (100 %) (5-10 min. tiempo crítico)

Infiltración en parafina

Parafina-xilol (1:1) (25 min. tiempo crítico)

Parafina (Paraplast) I (1 hora)

Parafina (Paraplast) II (1-2 horas)

Parafina (Paraplast) III (1-2 horas)

Parafina (Paraplast) IV (1-2 horas para tejidos grandes)

III. Técnica de tinción hematoxilina-eosina (de Harris).

Xilol I,II y III-(5-10 min. c/u).

Alcohol etílico 96% (2 min.).

Alcohol etílico 70% I y 70% II (2 min. c/u)

Agua destilada (5 min.).

Hematoxilina de Harris (4 min.)

Agua corriente (5 min) y agua destilada (5 min.).

Alcohol ácido (10-15 seg.) (1 L alcohol 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico)

Agua destilada (5 min.)

Agua amoniacal (10-15 seg.) (Hidróxido de amonio, 5 gotas por caja de tinción).

Agua destilada (5 min.).

Alcohol etílico 50% (2 min.).

Alcohol etílico al 70% (2 min.).

Eosina-Floxina alcohólica (3 min. dependiendo del tiempo del colorante)

Alcohol 96% I y II, (1-2 min. c/u)

Alcohol 100% I y II, (1 min. c/u)

Citrisolv I, II, III (5 min. c/u, sustituto de xileno ó Hemo-De).

Montar en resina sintética o Entellan.

IV. Estadios de desarrollo gonádico.

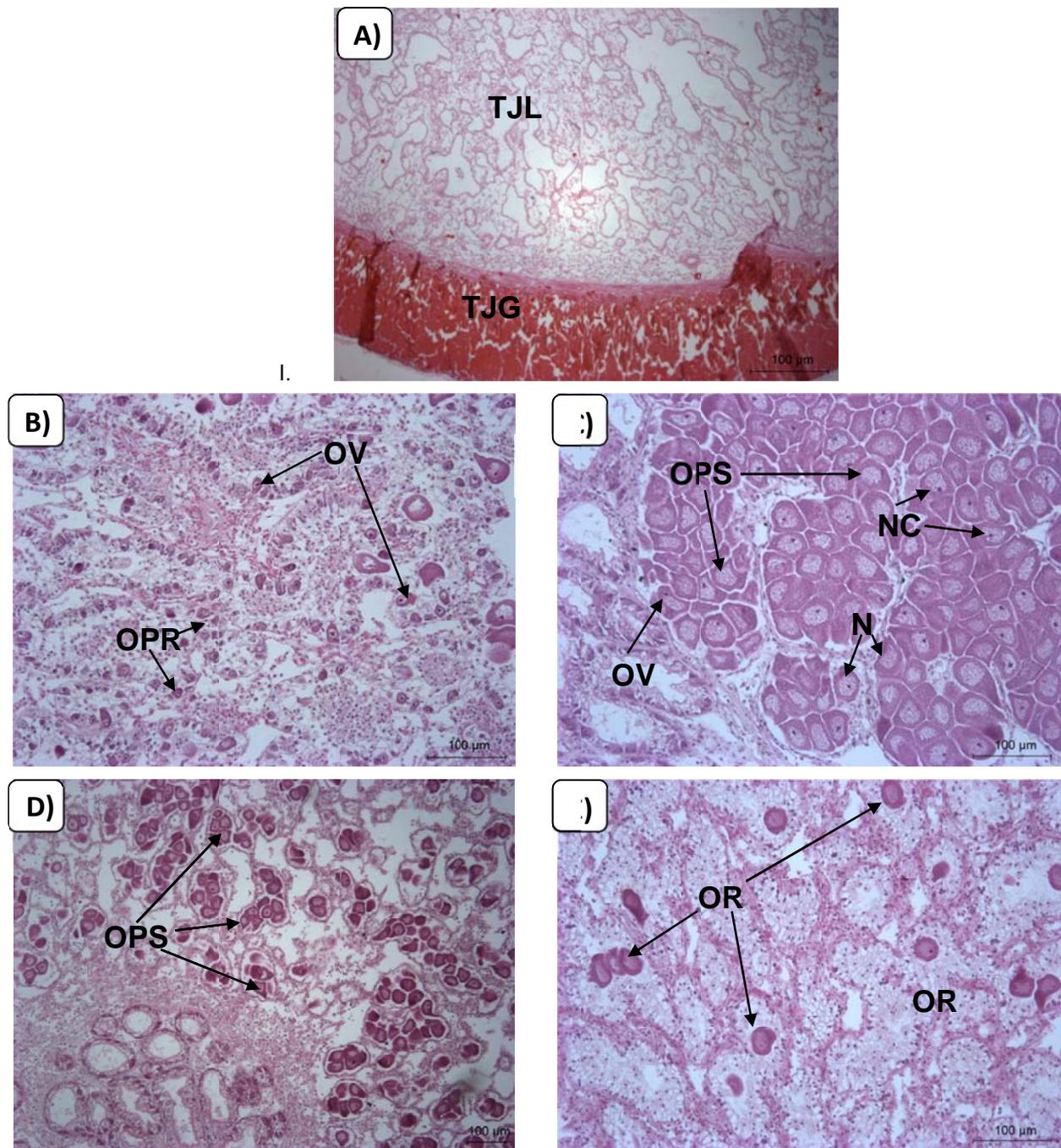


Figura 22. Microfotografías de gónadas femeninas (20X y 10X) de *P. sterna* teñidas con hematoxilina-eosina, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: A)= Organismo en fase de indiferenciación sexual; B)= Hembra en desarrollo; C)= Hembra en madurez; D)= Hembra en desove parcial y E)= Hembra en reabsorción. OV= Ovocitos vitelogénicos; OPR= Ovocito previtelogénico; OPS= Ovocitos postvitelogénico; OR= Ovocitos residuales; OA= Ovocitos

atrésicos; NC= Nucléolo; N= Núcleo; TJL= Tejido conjuntivo laxo y TJG=Tejido conjuntivo adipogranular.

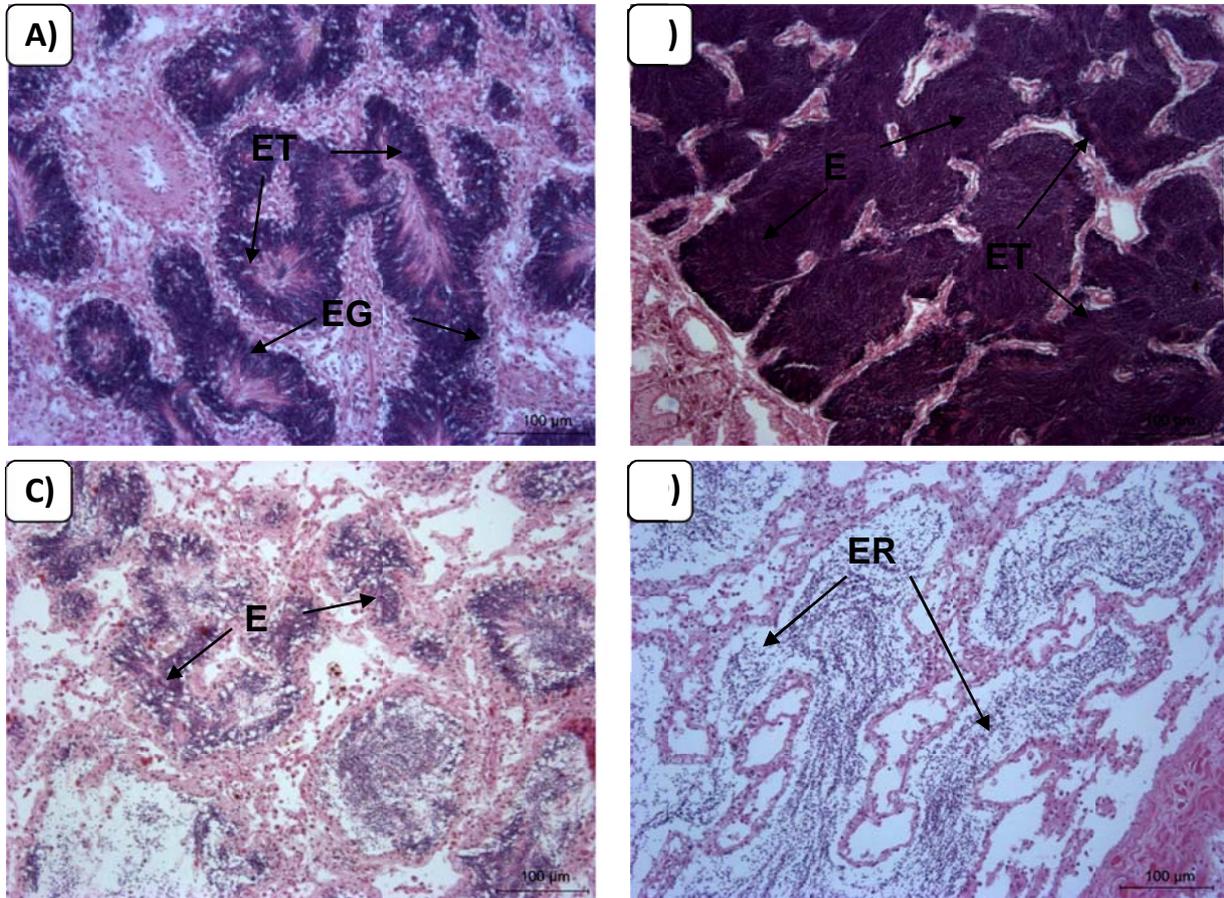


Figura 23. Microfotografías de gónadas masculinas (20X) de *P. sterna* teñidas con hematoxilina-eosina, donde se muestran diferentes estadios de desarrollo: A)= Macho en desarrollo; B)= Macho en madurez; C)= Macho en desove parcial y D)= Macho en reabsorción. E= Espermatozoide; ER= Espermatozoide residual; EG= Espermatogonia y ET= Espermatozocito

V. Técnica de tinción de ácido periódico SCHIFF

Desparafinar e hidratar en agua.

Oxidar en solución de ácido periódico (5 min.).

Enjuagar en agua destilada (5 min.).

Colocar en la solución de Schiff de Coleman (15 -30 min.).

Enjuagar en agua corriente (10 min.).

Contrateñir con hematoxilina de Mayer's (15 min.) o de Harris (6 min.)

Enjuagar en agua de la llave (15 minutos).

Deshidratar en 2 cambios de ROH 95% y ROH 100% (2 min. c/u).

Aclarar en Xileno o sustituto de xileno (2 min. c/u).

Montar en resina sintética o entellan

Resultados:

Glucógeno, mucinas de rojo a púrpura y algunas membranas basales

Núcleos de azul.

VI. Técnica de tinción de Sudán Negro B

Desparafinar e hidratar hasta agua destilada en caso de cortes en parafina.

Colocar los cortes en alcohol al 70%

Teñir en la solución de Sudán Negro (15 min. a 30 min.).

Diferenciar en alcohol al 70%.

Contrastar los núcleos con carmalum o rojo rápido nuclear o hematoxilina Harris.

Lavar bien en agua corriente.

Lavar en agua destilada.

Montar en gelatina glicerizada.

Resultados:

Esteres de colesterol azul a negro.

Triglicérido azul a negro.

Fosfolípidos gris.

Mielina bronce.

VII. Técnica de tinción de Carbol Fucsina Kinyoun

Desparafinar e hidratar las laminillas hasta agua destilada.

Teñir con solución Carbol Fucsina Kinyoun (1 hora).

Enjuagar en varios cambios de agua destilada.

Diferenciar en la solución de alcohol ácido, 5 a 6 gotas o hasta que las secciones se vean rosa pálido.

Enjuague en agua corriente (5 min.), y luego enjuague en agua destilada.

Contraste con la solución de ácido pícrico (1 min.).

Deshidrate en alcohol etílico al 96%, luego en alcohol etílico al 100 %.

Aclare en Xilol, 2 cambios (2 min. c/u).

Monte en resina sintética o Entellan.

Resultados

Lipofucsinas- rojas

Fondo, otros tejidos- amarillo

VIII. Determinación de proteínas bajo el protocolo de ácido bicinconínico (BCA).

Agregar 10µL de homogenizado (ver sección 7.4)

Digerir durante (2 horas).

Agitar

Recuperar 25µL en una en una microplaca

Agregar 200µL de reactivo colorimétrico BCA comercial (Sigma™)

Incubar a 60° (15 min.)

Leer a 562 nm

Nota: Se utiliza un patrón para realizar la curva tipo, para dicha curva se utiliza un suero de albúmina de bovino (Sigma™).

IX. Determinación de carbohidratos (Roe, 1955)

Agregar 100µL de homogeneizado y añadir 100µL de TCA al 20%.

Centrifugar 3600 rom. a 5°C (10 min.).

Recuperar 25µL de sobrenadante en un minitubo.

Agregar 250µL de antrona (0.001 g de antrona en 1mL de H₂SO₄ al 96%)

Calentar a 85°C (4 a 10 min.).

Enfriar en baño de hielo.

Sembrar 200µL en una microplaca.

Leer a 630nm.

X. Determinación de lípidos (Barnes y Blackstock, 1973).

Agregar 25µL de homogeneizado e un minitubo.

Agregar 250µL de H₂SO₄ concentrado

Agitar

Calentar a 90°C en baño maría (10 min.).

Enfriar en baño de hielo

Agitar

Poner 20µL en cada pozo de una microplaca

Agregar 200µL de reactivo (Vainillina)

Incubar durante (40 min.).

Leer a 540 nm.