



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

**Programa de Estudios de Posgrado**

**TEMPERATURA Y MONOAMINAS EN LA  
ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA  
MANO DE LEÓN  
(*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835)**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**José Armando López Sánchez**

**La Paz, Baja California Sur, Septiembre del 2009**

## ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 14 del Mes de Septiembre del 2009, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

### TEMPERATURA Y MONOAMINAS EN LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835)

Presentada por el alumno:

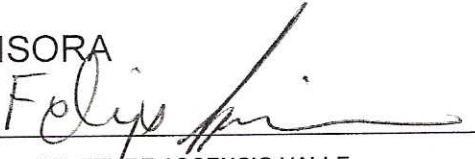
M. en C. José Armando López Sánchez

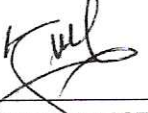
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuacultura

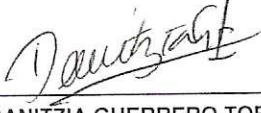
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

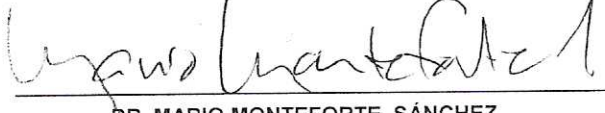
#### LA COMISION REVISORA

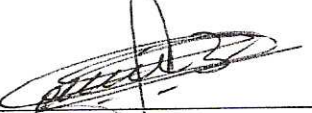
  
DR. ALFONSO N. MAEDA-MARTINEZ  
DIRECTOR DE TESIS

  
DR. FELIPE ASCENCIO VALLE  
CO-TUTOR DE TESIS

  
DR. PEDRO SAUCEDO LASTRA  
CO-TUTOR DE TESIS

  
DRA. DANITZIA GUERRERO TORTOLERO  
CO-TUTORA DE TESIS

  
DR. MARIO MONTEFORTE SÁNCHEZ  
CO-TUTOR DE TESIS

  
DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Esta tesis fue dirigida por:**

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez

**Comité Tutorial:**

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez  
Dra. Danitzia Guerrero Tortolero  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Pedro Saucedo Lastra  
Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez †  
Dr. Mario Monteforte Sánchez

**Comité Revisor:**

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez  
Dra. Danitzia Guerrero Tortolero  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Pedro Saucedo Lastra  
Dr. Mario Monteforte Sánchez

**Comité de Sinodales:**

Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez  
Dra. Danitzia Guerrero Tortolero  
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Dr. Pedro Saucedo Lastra  
Dr. Mario Monteforte Sánchez  
Dra. María Teresa Sicard González

## RESUMEN:

### Temperatura y monoaminas en la actividad reproductiva de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835)

La almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* es un pectínido que es explotado en el Noroeste de México y que presenta alto valor y aceptación en el mercado nacional e internacional. Gracias a su rápido crecimiento y gran talla con respecto a otros pectínidos, actualmente se cultiva a nivel comercial y además, existe gran interés en optimizar su tecnología de reproducción en laboratorio, en la cual, uno de los principales problemas es la maduración de reproductores. Generalmente se reporta que la temperatura y alimento son los principales factores exógenos que estimulan la madurez sexual en estos organismos y la mayoría de los métodos empleados en su maduración reproductiva, han sido realizados bajo condiciones de temperatura estable y algunos otros han obtenido éxito bajo condiciones de temperatura ascendente. Sin embargo, existe controversia sobre que tipo de patrones térmicos emplear debido a que se tiene poco conocimiento sobre la influencia de la temperatura variable sobre varios aspectos de su actividad reproductiva. Por otra parte, se conoce que el proceso reproductivo es regulado por factores endógenos, de los cuales, en los grupos de moluscos más primitivos como los bivalvos no se han encontrado órganos endocrinos diferenciados que regulen este proceso, por tanto, se postula que el sistema nervioso es el coordinador químico mediante neurosecreciones que pueden ser de naturaleza monoamínica principalmente. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre este tema que contribuyen en el conocimiento de la regulación neuroendocrina de la reproducción en estos bivalvos. Por tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto de la temperatura estable y variable, sobre algunos aspectos de la actividad reproductiva de la almeja mano de león y determinar la relación de las monoaminas con el ciclo gametogénico de la especie.

El presente trabajo constó de cuatro experimentos principales. En el primero se comparó el desarrollo reproductivo de *N. subnodosus* bajo 6 diferentes regímenes térmicos, con muestreos de organismos a los 1, 15 y 30 días experimentales, a los cuales se les realizó biometrías e histología de gónada. Los resultados mostraron que los tratamientos térmicos estables en alta temperatura provocaron pérdida del peso corporal, rápido crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico asincrónico, alta producción de ovocitos pero con bajo crecimiento de los mismos. Los tratamientos térmicos con oscilaciones térmicas de baja amplitud contribuyeron al incremento del peso húmedo, lento crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico con sincronía, baja producción de ovocitos pero con alto crecimiento de los mismos. Las oscilaciones térmicas de alta amplitud fueron en las que los organismos presentaron los menores valores de calidad en el desarrollo reproductivo. La estabilidad térmica de baja temperatura contribuyó a largo plazo en altos valores de calidad en el desarrollo reproductivo, mientras que el tratamiento combinado de estabilidad y oscilación térmica contribuyó a corto plazo.

El segundo experimento se centró en el estudio de factores de neurosecreción, en donde se cuantificaron niveles de monoaminas como serotonina (5-HT), dopamina (DA), norepinefrina (NE) e isoproterenol-L (ISP-L) en diversos tejidos de *Nodipecten subnodosus* y en diferentes estados de desarrollo reproductivo. Las monoaminas fueron

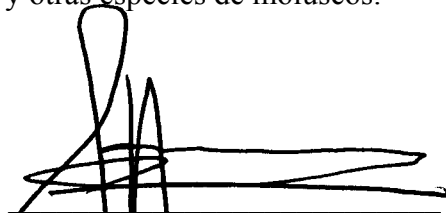
detectadas y cuantificadas mediante la técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con detección electro-química. La NE fue detectable en mayor cantidad con respecto a las otras monoaminas. Se observó en todos los tejidos y en todos los estados reproductivos. La 5-HT se observó en menor cantidad con respecto a la NE y DA, y estuvo presente en alta cantidad en tejido de gónada masculina. La DA estuvo presente en mayor cantidad en tejido de branquias y hepatopáncreas. El ISP-L estuvo presente casi exclusivamente en tejido de gónada femenina. Las monoaminas en la mayoría de los órganos, presentaron una dinámica similar con respecto a los estados reproductivos, en donde, los niveles se incrementaron durante los estados gametogénicos y posteriormente sufrieron una caída durante los estados de desove. Los resultados, al igual que la literatura reciente, sugieren que las monoaminas pueden estar implicadas en el control de una amplia gama de actividades fisiológicas dentro de diversos órganos (e.g. movilización de reservas de nutrientes, actividad ciliar, respiración, alimentación), y esta actividad puede contribuir al proceso gametogénico.

El tercer experimento se enfocó a la identificación de monoaminas en *N. subnodosus* bajo condiciones de temperatura oscilante y estable. Con esto se observó el efecto de la oscilación térmica en los niveles de monoaminas en diversos tejidos de la especie. Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyeron a reforzar lo observado en el experimento anterior y a observar que las concentraciones de monoaminas en los organismos sometidos a temperaturas oscilantes de baja amplitud, no presentaron grandes diferencias en cantidad y tendencia, con respecto a las observadas en los organismos sometidos a regímenes térmicos estables, posiblemente debido a una adaptación térmica.

En el cuarto experimento se determinó el efecto de inyecciones de monoaminas y con factores mecánicos sobre la inducción al desove. Debido a que no se encontraron reproductores maduros de *N. subnodosus*, el experimento fue realizado con la almeja catarina *Argopecten ventricosus* por su relación filogenética cercana con esta especie. El método combinado de la inyección de 0.4 mL de 5-HT al 1mM en gónada, seguida por una exposición aérea de los organismos por un periodo de 30 a 60 min arrojó mejores resultados en la expulsión de espermatozoides.

En el presente trabajo se aporta información sobre la influencia de la temperatura sobre la fisiología de *N. subnodosus* en su acondicionamiento para la reproducción, así como, sobre la fisiología interna involucrada en la regulación de este proceso, por tanto, con esta información es posible mejorar las técnicas actuales de acondicionamiento de ésta y otras especies de moluscos.

**Aprobado por:**



**Dr. Alfonso N. Maeda Martínez**

**Director de Tesis**

## ABSTRACT:

### **Temperature and monoamines and their relationship with reproductive activity in the lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835)**

The lion paw scallop *Nodipecten subnodosus* is a commercially important species in Northwest Mexico. This species reaches high commercial value and high demand in the national and international markets. This species is very attractive for the aquaculture industry due to its fast growth rates and the large size of its adductor muscle. There is great interest in optimizing culture methods for this species, in particular hatchery and captive breeding, the main bottlenecks to achieve successful commercial production. It is generally acknowledged that water temperature and food supply are the main external factors influencing gonad development in bivalves. Water temperature is a factor that has been used to induce gonad conditioning outside of the natural breeding season in a number of bivalves. Different water temperature treatments to induce gonad development in bivalve species have been studied over the years. These treatments include constant water temperatures above, at, or below the optimum water temperature for a given species. Other protocols include steady increases or decreases in water temperatures to simulate natural changes in water temperatures experienced by different bivalve species. There still exists controversy on the application of these different treatments to achieve successful gonad conditioning. On the other hand, internal factors also influence reproduction. Little is known about the intrinsic factors regulating this process. In marine bivalve molluscs, few if any differentiated endocrine organs have been found and it is postulated that the nervous system has an effect on the endocrine regulation through monoamine neurosecretions. Few investigations have addressed this subject. The main objective of the present work was to determine the effect of the water temperature regime (constant or variable) on reproductive development of *N. subnodosus* and also to determine the relation of monoamines and the reproductive cycle of this species.

The present work includes four main experiments. The first experiment compared reproductive development of *N. subnodosus* under six different water temperature regimes. Samples were obtained before the experiment started and at days 15 and 30. Gonadosomatic Index (GI) increased in all water temperature treatments during the 30 days of experiment. At day 15, between 40 to 60 % of scallops from all treatments except treatment O-4, showed maturing and mature gonads and a similar percentage of partially and fully spent gonads. At day 30, 80 % of scallops from treatment C-22 and 20 to 40 % of the remaining treatments, showed maturing and mature gonads. Partial and fully spent gonads were found in 40 % of scallops of all treatments except in treatment C-22 which only showed partial spawning in 20 % of the gonads. The hatchery protocol for maturation of *N. subnodosus* broodstock would be different depending on the gonad stage of the scallops at the time of collection. For example, broodstock at initial gonad stages, may need to be kept at optimum water temperature (22 °C) to allow oogonia to develop into previtellogenic and postvitellogenic oocytes for at least 30 days. On the other hand, if broodstock were collected in Stage III, higher stable and low amplitude oscillating temperature could be applied to shorten the conditioning process.

The second experiment focused on neurosecretion factors. Norepinephrine (NE), dopamine (DA), and serotonin (5-HT) concentrations were determined in different organs (female and male gonad, digestive gland, adductor muscle, gill, mantle, and foot) of *N. subnodosus*, at 6 reproductive stages (resting, initial, maturing, mature, partially spent and fully spent). Monoamine concentrations were determined by HPLC fitted with an electrochemical detector. Results indicated that monoamine concentrations increased during maturing stage, peaked at mature stage and declined after spawning. NE concentrations were higher than the rest of monoamines followed by DA, and 5-HT. NE was present in all organs at all reproductive stages. DA concentrations were higher in gill and digestive gland during all stages. 5-HT was only detectable in the male gonadic portion at all stages except at spent stage. NE was the most abundant neurotransmitter found in the female gonad of *N. subnodosus*, while 5-HT was the most abundant neurotransmitter found in the male gonad. Furthermore, these two neurotransmitters accumulated in the respective gonad tissues during the initial reproductive stages I to IV and then declined after spawning (stages V and VI). This suggests that this species utilized different neurotransmitters specific for each gender and that this utilization was clearly related to the reproductive cycle.

The third experiment focused on the identification of monoamines in different tissues of *N. subnodosus* maintained under different regimes of water temperature (constant and variable). Monoamines in scallops maintained under low amplitude oscillating water temperature did not show significant differences in concentration with those maintained under high amplitude oscillating water temperature.

The fourth experiment determined the effect of the injection of monoamines and mechanical factors (handling during transport and aerial exposure) on spawning induction. As mature *N. subnodosus* broodstock were not available, this experiment was conducted with an alternate species closely related: the catarina scallop *Argopecten ventricosus*. Injections of 5-HT in the gonad followed by 30 or 60 min of exposition to air successfully induced spawning of male gametes.

The present work contributes with information on the effect of water temperature on scallop physiology, in particular on gonad development and internal regulation of neurosecretions. Hatchery protocols for the gonad conditioning of *N. subnodosus* in laboratory can be improved by applying the recommendations of this work.

**Approved by:**



---

**Dr. Alfonso N. Maeda Martinez**  
Thesis director

## **DEDICATORIA**

A mi Dios, por todas las bendiciones.

Con cariño:

A mi madre María Isabel por sus consejos y paciencia.

A mi esposa Jesica Esmeralda, por su hermosa compañía en mi andar.

A mis hermanos, familiares y amigos por todo el apoyo brindado  
incondicionalmente.

Y en memoria a quienes hoy son mis gratos recuerdos y me acompañan siempre.



## AGRADECIMIENTOS

Un cordial agradecimiento para el Dr. Alfonso N. Maeda-Martínez, por la dirección de esta tesis y en mis estudios superiores.

A mi comité tutorial, Dra. Danitzia A. Guerrero, Dr. Pedro Saucedo, Dr. Felipe de Jesús Ascencio, Dr. Mario Monteforte y Dra. Ma Teresa Sicard, por su paciencia y apoyo en la elaboración del presente documento y a la memoria del Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez<sup>†</sup>.

Con profundo agradecimiento, admiración y respeto al Dr. Roger Croll de la Universidad de Halifax, Nova Scotia, Canadá; por su gran enseñanza y amistad brindados, así como a todo su equipo de trabajo.

Para el Dr. Raúl Canino de la Universidad Autónoma de Baja California, por apoyo incondicional en el uso de sus instalaciones y equipos para el análisis de muestras, así como por la ayuda y amistad de su equipo de trabajo; Gaby Caloca, Nathaly, Alfredo, Aurora y Shely.

Para Carmen Rodríguez, Eulalia Meza, Lilia Ibarra, René Rebollar, Oscar Palomeque, Esteban Moreno, Efraín Castillejos, Diana Carreño, Roberto Hernández, Armando Monge, Alonso Fabela, Philippe Danigo, Adán Ceja, Alejandro Reyes, Abigail, Margarita Cañar, Eva Medina y Ernesto León, por su valiosa ayuda en el desarrollo de los experimentos y por la gran amistad que me brindaron.

A compañeros que laboran en este centro; Damas de posgrado, Sala de computo, Dirección general, Administración, Limpieza, Biblioteca, Talleres de mantenimiento, Conmutador, Laboratorios, Comedor, entre otros, quienes más de una vez me brindaron su ayuda con una sonrisa.

Con especial atención al Dr. Héctor Acosta por su valiosa asesoría y ayuda para la confección del presente documento.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y su director el Dr. Sergio Hernández Vázquez, por permitirme concluir mi estudio de doctorado en este centro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por favorecerme con una beca crédito (número 166307) para realizar este posgrado.

## CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Antecedentes de la especie.....	4
2.2 Algunos aspectos de la fisiología reproductiva de pectínidos.....	5
2.3 Ciclos reproductivos en pectínidos y sus principales métodos de estudio..	6
2.4 Aspectos reproductivos de <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	7
2.5 Factores exógenos que influyen en la reproducción.....	8
2.6 Factores endógenos que influyen en la reproducción.....	10
2.7 Inducción al desove.....	15
III. PROBLEMÁTICA Y JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
VI. METODOLOGÍA GENERAL.....	20
6.1 Sitios de recolecta de organismos experimentales.....	20
6.2 Métodos de transporte de organismos.....	21
6.2.1 Método seco tipo Sandwich.....	21
6.2.2 Método húmedo tipo Rosario.....	22
6.3 Regulación de temperatura con el Simulador Térmico Marino (SITMA)...	23
6.4 Análisis biométricos (Índice de Condición General y Gonadosomático)...	24
6.5 Análisis histológicos.....	24
6.5.1 Estadios de desarrollo gametogénico.....	24
6.5.2 Diámetro teórico y cantidad de ovocitos.....	25
6.6 Análisis de monoaminas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica (HPLC-ED).....	25
6.6.1 Extracción de monoaminas.....	25
6.6.2 Químicos usados para HPLC-ED.....	25
6.6.3 Equipo cromatográfico.....	26
6.6.4 Nota importante del estudio cromatográfico.....	26
VII. EFECTO DE DIFERENTES REGÍMENES TÉRMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN <i>NODIPECTEN SUBNODOSUS</i> .....	28
7.1 Introducción.....	28
7.2 Objetivo.....	29
7.3 Material y métodos.....	29
7.3.1 Diseño experimental.....	30
7.3.2 Análisis de resultados .....	31
7.4 Resultados.....	32
7.4.1 Índice de Condición General.....	32
7.4.2 Índice Gonadosomático.....	33
7.4.3 Estadios de desarrollo gametogénico .....	34

7.4.4 Fases de desarrollo gametogénico en tratamientos térmicos.....	37
7.4.5 Producción de ovocitos.....	38
7.4.6 Diámetro teórico de ovocitos vitelogénicos.....	39
7.5 Discusión.....	41
7.6 Conclusiones.....	44
VIII. NIVELES DE MONOAMINAS EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN <i>NODIPECTEN SUBNODOSUS</i> BAJO DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO REPRODUCTIVO.....	45
8.1 Introducción.....	45
8.2 Objetivo.....	46
8.3 Materiales y métodos.....	46
8.3.1 Diseño experimental.....	46
8.3.2 Análisis de resultados .....	47
8.4 Resultados.....	48
8.5 Discusión.....	52
8.6 Conclusiones.....	57
IX. IDENTIFICACIÓN DE MONOAMINAS EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN <i>NODIPECTEN SUBNODOSUS</i> A TEMPERATURA OSCILANTE Y ESTABLE.....	58
9.1 Introducción.....	58
9.2 Objetivo.....	59
9.3 Materiales y métodos.....	59
9.3.1 Organismos experimentales.....	59
9.3.2 Diseño experimental. ....	60
9.4 Resultados .....	62
9.4.1. Índice de condición general y gonadosomático de <i>Nodipecten subnodosus</i> , bajo dos tratamientos térmicos.....	62
9.4.2. Concentraciones de monoaminas en diversos tejidos <i>Nodipecten subnodosus</i> , bajo dos diferentes tratamientos térmicos.....	63
9.4.3 Monoaminas; perspectiva general por órgano estudiado.....	66
9.5 Discusión.....	68
9.6 Conclusiones.....	72
X. INDUCCIÓN AL DESOVE DE LA ALMEJA CATARINA <i>ARGOPECTEN VENTRICOSUS</i> MEDIANTE DIFERENTES MONOAMINAS.....	73
10.1 Introducción.....	73
10.2 Objetivo.....	73
10.3 Materiales y métodos.....	74
10.3.1 Diseño experimental.....	74
10.4 Resultados.....	78
10.5 Discusión.....	85
10.6 Conclusiones.....	88
XI. DISCUSIÓN GENERAL.....	89
XII. CONCLUSIONES GENERALES.....	95

ANEXO I. Estadíos de maduración macroscópica del desarrollo gonadal de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* Reportado por Ramírez-Castillo (2003).

ANEXO II. Técnicas histológicas usadas en el laboratorio de histología del CIBNOR

ANEXO III. Artículo publicado.

López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Croll, R.P. and Acosta-Salmón, H., 2009. Monoamine fluctuations during the reproductive cycle of the Pacific lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*.154, 425–428.

ANEXO IV. Artículo sometido.

López-Sánchez, J.A., Maeda-Martínez, A.N., Acosta-Salmón, H., Rodríguez-Jaramillo, C., Sicard, M.T. and Monge-Quevedo, A. Effect of water temperature regimes on reproductive activity of the Pacific lion paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835). *Aquaculture*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Valvas izquierda (A) y derecha (B) de la almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	4
2. Ubicación de los sitios de recolecta de los organismos experimentales: Laguna Manuela B.C. (28° 20' N; 114° 06' W), Laguna Guerrero Negro B.C.S. (28° 01' N; 114° 11' W), Estero San Buto, B.C.S. (24° 47' N; 112° 02' W) y Estero Rancho Bueno B.C.S. (24° 32' N; 111° 42' W).....	20
3. Esquema representativo del método de transporte de organismos tipo <i>sandwich</i> .....	21
4. Esquema representativo del método de transporte de organismos tipo <i>rosario</i> .....	22
5. Esquema representativo del Simulador Térmico Marino Automatizado (SITMA). El dibujo superior derecho distinguido por la letra A, representa a una de las gráficas generadas por simulación térmica en laboratorio.....	23
6. Cromatograma resultante de la inyección de una mezcla estándar de monoaminas a concentración de 120 ng/mL. NE, DA, 5-HT e ISP.....	27
7. Regímenes térmicos experimentales, utilizados para estudiar su efecto sobre la actividad reproductiva de <i>Nodipecten subnodosus</i> . A-F representa la posición en que los tratamientos térmicos están descritos en la metodología.....	31
8. Índice de Condición General de <i>Nodipecten subnodosus</i> en tiempos pre-transporte, post-transporte y post-aclimatación. Los resultados son la media $\pm$ DS. <i>n</i> es el número de organismos empleados para el análisis.....	32
9. Índice de Condición General de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos a 6 tratamientos térmicos con 3 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media $\pm$ DS ( <i>n</i> = 5). ANOVA a los 15 ( $F_{5,29} = 2.819$ ; $P < 0.05$ ) y 30 días ( $F_{5,29} = 3.405$ ; $P < 0.05$ ).....	33
10. Índice Gonadosomático de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos a 6 tratamientos térmicos con 3 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media $\pm$ DS ( <i>n</i> = 5).....	34

11. Estadios ovogénicos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. I.-Indiferenciado, II.- Inicial, III.- Crecimiento, IV.- Madurez, V.- Desove parcial y VI.- Desove total y reabsorción. Claves: Tc; tejido conjuntivo, Fc; folículo, Og; ovogonia, Op; ovocito primario, Ov; Ovocito vitelogénico, Opv; Ovocito postvitelogénico. La barra equivale a 50 micras..... 36
12. Frecuencia (%) de los estadios de desarrollo ovogénico de *Nodipecten subnodosus* en seis tratamientos térmicos y en 30 días experimentales. La letra mayúscula dentro de cada gráfico representa la clave de la descripción del tratamiento térmico descrito en la metodología..... 37
13. Cantidad de ovocitos producidos en 1 mm<sup>2</sup> de gónada en fases de crecimiento y madurez gametogénica de *Nodipecten subnodosus*, bajo 6 tratamientos térmicos a los 15 y 30 días experimentales. Los datos son la media ± DS y ANOVA del día 15 ( $F_{5,41} = 35.249$ ;  $P < 0.001$ )..... 39
14. Diámetro teórico de ovocitos vitelogénicos *Nodipecten subnodosus* bajo 6 tratamientos térmicos en 15 y 30 días experimentales. Los puntos son la media ± DS y ANOVA para día 15 (superíndices con letra;  $F_{5,649} = 449.3$ ;  $P < 0.001$ ) y día 30 (superíndices con número;  $F_{5,599} = 8.309$ ;  $P < 0.001$ )..... 40
15. Concentraciones de monoaminas en gónada femenina (GF); gónada masculina (GM); pie (PI); branquia (BR); manto (MA); músculo abductor estriado (MU) y hepatopáncreas (HP), de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* bajo diferentes estadios gametogénicos: I = indiferenciado, II = inicial, III = crecimiento, IV = madurez, V = desove parcial y VI = desove total. Las barras indican la media ± DS.  $n = 6$ . Las letras diferentes (a, b ó c) indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre diferentes estadios reproductivos..... 49
16. Regímenes térmicos experimentales utilizados para determinar los niveles de monoaminas en diversos tejidos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. A) Temperatura estable de 22 °C, B) Temperatura oscilante de baja amplitud ( $20 \pm 2$  °C) con frecuencia de 1 ciclo por día;  $f(x) = 20 + 2.5 \text{ Sin}(2\pi/\text{día})$ ..... 60
17. Índice de Condición General (A) y Gonadosomático (B) de *Nodipecten subnodosus* expuestos a dos tratamientos térmicos con 4 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media ± DS. ( $n = 6$ )..... 62

18. Concentraciones de monoaminas en gónada femenina (GF); gónada masculina (GM); pie (PI); branquia (BR); manto (MA); músculo abductor estriado (MU) y hepatopáncreas (HP), de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* bajo dos diferentes regímenes térmicos (temperatura estable y oscilante), con muestreos a los días: 1, 10, 20 30. Las barras indican la media  $\pm$  DS..... 65
19. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove *in situ* de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, con 6 métodos de inducción: NE, DA, ISP, 5-HT, 5-HT+ISP en músculo abductor (5-HT+ISP en MU) y 5-HT+ISP en ambas porciones de la gónada (5-HT+ISP en Gon). Además de 2 métodos control usando AMDF en músculo abductor y gónada (Contro Mu y Control Gon respectivamente). La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermatozoides..... 79
20. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* bajo condición de estrés post-transporte, con 4 métodos de inducción: NE, DA, ISP, 5-HT y AMDF (CONTROL). La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermatozoides..... 80
21. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* con inyecciones de ISP y 5-HT en 3 diferentes órganos: Músculo abductor (MU), Gónada femenina (GH) y Gónada masculina (GM). Se ejecutaron 3 controles (con AMDF) para cada uno de los órganos. La sección A, corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermatozoides..... 82
22. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, inducidos mediante 6 diferentes métodos, en los cuales, se usa ISP y la 5-HT en combinación con factores estresantes. La descripción de cada denominación se encuentra en la metodología. La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermatozoides..... 84

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

De las 400 especies de pectínidos conocidos en el mundo, 28 de ellas se encuentran en el Pacífico Mexicano y de éstas, solo tres son de importancia comercial, las cuales son; la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*), la almeja voladora (*Pecten vogdesi*) y la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) (Keen y Coan, 1974). Esta última, es una de las especies de pectínidos más grandes del continente americano, los adultos pueden alcanzar los 22 cm de altura, un peso húmedo total de 1900 g y un músculo abductor o callo de hasta 250 g (Maeda-Martínez *et al.*, 2001). Ha sido explotada en el Noroeste de México durante los últimos 13 años en distintas lagunas de la península de Baja California, manteniendo una pesquería que en 1999 superó las 150 toneladas métricas de músculos (Maeda-Martínez *et al.*, 2001).

Gracias al sabor y tamaño de su músculo, esta especie tiene alto valor y gran aceptación comercial en el mercado nacional e internacional y representa a una de las especies de mayor importancia económica para esta región. Además, debido a su rápido crecimiento y gran talla, actualmente existen cultivos acuícolas produciendo adultos de almeja mano de león a nivel comercial en Laguna Manuela y Laguna Guerrero Negro, Baja California Sur, pero esta actividad aún requiere ser reforzada con más investigación científica sobre su biología y su tecnología de cultivo para lograr resolver uno de los principales problemas, el cual es, el abastecimiento continuo de juveniles. Por tanto, existe mucho interés por parte del sector de productores acuícolas del noroeste mexicano en optimizar la tecnología de producción de juveniles en laboratorio.

En estos aspectos se han obtenido importantes avances y se ha reportado que en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) de La Paz, B.C.S. (Villegas-Carrasco, 2004) y en el laboratorio de la empresa Marimex S.A. de C.V., en Bahía Kino, Sonora (Maeda-Martínez, 2003), se han alcanzado producciones de hasta 2 millones de juveniles en cada uno y en un ciclo anual. Sin embargo, en el laboratorio Marimex, la maduración de reproductores constituye el mayor problema a resolver, debido a que el proceso de maduración se interrumpe por ocurrencia de desoves no controlados. Maeda-Martínez (2003) menciona que la mayor parte de estos desoves ocurre por las tardes y es necesario relacionarlos con las fluctuaciones de temperatura y del alimento, actividad de los técnicos y actividad mecánica, entre otros. Actualmente se desconocen las variables ambientales óptimas para inducir la maduración de esta



---

especie así como las causas que provocan los desoves espontáneos en laboratorio, por tanto, es necesario tener mayor conocimiento de los factores que intervienen en el ciclo reproductivo de la especie para una mejor manipulación y control de su reproducción.

El control del proceso reproductivo en organismos marinos, implica la sincronización y complementación de factores endógenos y exógenos (Sastry, 1979). La mayoría de las técnicas de maduración reproductiva de moluscos en laboratorio se realizan controlando el alimento y la temperatura en forma estable. Además, la mayoría de los estudios sobre el efecto de la temperatura en moluscos, especialmente en pectínidos, se han realizado a temperaturas estables y en consecuencia, estos resultados posiblemente no reflejan la situación real a la que están sujetos los organismos bajo cultivo (Sicard *et al.*, 1999). Los sitios donde se cultiva *N. subnodosus* en la península de Baja California, presentan gran variabilidad de temperatura, tanto anual, mensual y diaria. Por ejemplo, En Laguna Manuela, B.C. se han obtenido registros de temperatura de manera continua por medio de un termógrafo digital a partir de diciembre del 2001 y se han observado que en las artes de cultivo donde mantienen a los organismos de almeja mano de león las variaciones de temperatura son de hasta 7 °C en un ciclo diurno-nocturno. Por otra parte, en el estero Rancho Bueno en Bahía Magdalena B.C.S., los promedios mensuales varían entre 19.1 °C y 28.7 °C con valores extremos de 16 °C y 33 °C, así como variaciones de hasta 8 °C en 24 h (Hernández *et al.*, 1992). Bajo condiciones de laboratorio, González-Estrada (2003) realizó un estudio de las temperaturas letales y óptimas de *N. subnodosus* y determinó que 22 °C es la temperatura óptima para el mantenimiento de la especie.

Por otra parte, en las últimas tres décadas se han realizado numerosos estudios para analizar los factores endógenos que intervienen en la reproducción de moluscos. Sin embargo dentro del grupo de los moluscos bivalvos no se han encontrado órganos endocrino diferenciados, dichos estudios, se han centrado en el conocimiento del sistema nervioso como coordinador principal de las actividades involucradas en el proceso reproductivo y en los efectos de diferentes moléculas de origen neural involucrados en este proceso.

Existen pocos trabajos que expliquen las respuestas reproductivas de los organismos ante condiciones variables de temperatura y tampoco se han realizado estudios sobre factores endógenos, del tipo neuroendocrino, que contribuyan en

incrementar el conocimiento sobre los aspectos reproductivos de la especie, todo esto, para una mayor optimización de la producción de juveniles bajo condiciones de laboratorio.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Antecedentes de la especie

La almeja mano de león *N. subnodosus*, pertenece a la familia de los pectínidos, los cuales se caracterizan por poseer grandes branquias adaptadas para la filtroalimentación, un solo músculo abductor, pie reducido, hermafroditismo, sifones ausentes y habilidad de natación, la cual, es una característica que no poseen otros bivalvos. La especie se caracteriza entre su familia por poseer conchas (Figura 1) grandes, fuertes, gruesas, convexas, bastante comprimidas y sólidas. Es equivalva y la ornamentación externa está formada por costillas radiales anchas en forma redondeada-rectangular, uniformemente espaciadas, con 9 costillas en la valva izquierda donde tienen, alternativamente, una o más series de nódulos o jorobas vacías, mientras que la valva derecha posee de 9 a 10 costillas que carecen de nódulos (Peña, 2001). Es un organismo epibentónico que habita en lagunas, bahías y canales profundos de más de 6 m, donde ocurren fuertes corrientes de mareas (Maeda-Martínez *et al.*, 2001). Se distribuye desde Laguna Ojo de Liebre, península de Baja California, México, hasta las costas de Perú (Keen, 1971).

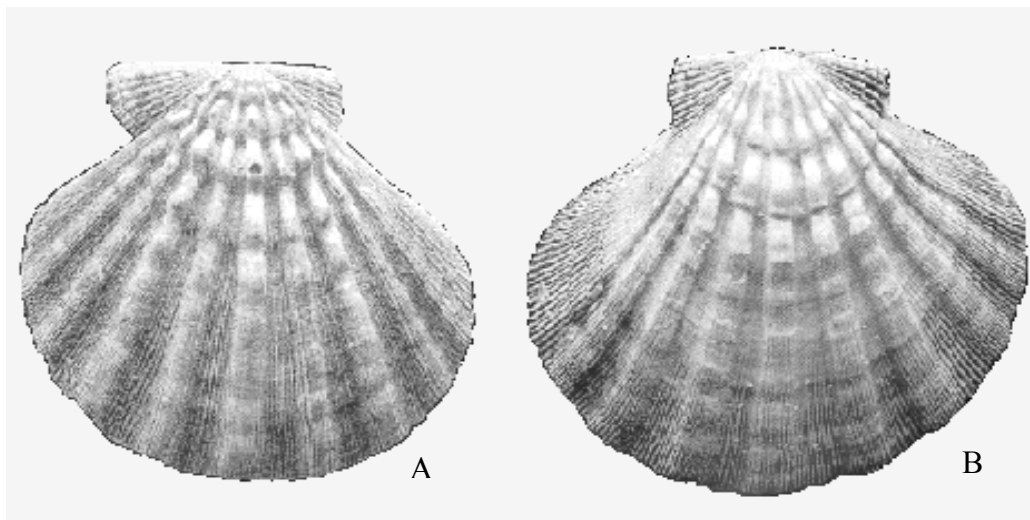


Figura 1. Valvas izquierda (A) y derecha (B) de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

La siguiente posición sistemática de la especie fue descrita por Peña (2001), basado en Boss (1982) y en Morse y Zardus (1997) desde el phylum hasta familia:

Phylum.....**Mollusca**

Clase.....**Bivalvia**

Subclase.....**Pteriomorpha**

Superorden.....**Eupteriomorpha**

Orden.....**Ostreoida**

Suborden.....**Pectinina**

Superfamilia.....**Pectinacea** (Rafinesque, 1815)

Familia..... **Pectinidae** (Rafinesque, 1815)

Genero..... *Nodipecten* (Dall, 1898)

Especie..... *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835)

## 2.2 Algunos aspectos de la fisiología reproductiva de pectínidos

En general, los pectínidos alcanzan su primera madurez sexual al año de edad (Román *et al.*, 2001). La gónada de estas especies es una glándula acinosa, en donde, la parte masculina es de color blanquecino y la femenina es anaranjada y esta última, contiene las células madre que se encuentran en las inmediaciones de las paredes foliculares (Beninger y Le Penneç, 1991; Román *et al.*, 2001) los folículos tienen forma de bulbos y en ellos se encuentran las células germinales primarias, células sexuales en diferentes estadios de desarrollo y también hemocitos que tienen función de limpieza y reabsorción (macrófagos). Dichos folículos se abren al exterior mediante los gonoductos que conducen a los riñones y posteriormente desemboca en el poro urogenital, por el cual, los gametos salen hacia la cavidad paleal que tiene contacto con el medio exterior (Coe, 1945; Lucas, 1965; Beninger y Le Penneç, 1991).

La ovogénesis de los pectínidos ha sido descrita por Román *et al.* (2001) basado en Dorange (1989) y Beninger y Le Penneç (1991), la cual es dividida en tres estadios principales: 1) Premeiótico: en este estadio las células madre dan origen a las ovogonias primarias que presentan alta relación núcleo/citoplasma y éstas por mitosis, dan origen a ovogonias secundarias de iguales características que las progenitoras. 2) Previtelogénico: en este estadio las ovogonias secundarias entran en la primera profase

de la meiosis, dando origen a los ovocitos previtelogénicos, los cuales aumentan de tamaño. Células auxiliares emigran desde la periferia de los folículos para enlazar a los ovocitos. 3) Vitelogénico: los ovocitos bloqueados en el estadio diploteno de la primera profase meiótica, entran en vitelogénesis (maduración) aumentando considerablemente su talla, almacenando en el citoplasma una serie de inclusiones que Dorange (1989) los clasifica en; a) granos de secreción o inclusiones tipo I (formados por proteínas básicas), b) inclusiones tipo II (de naturaleza lipídica, tanto lípidos neutros como fosfolípidos), c) inclusiones tipo III (de naturaleza glucoprotéica) y d) inclusiones de tipo IV (partículas de glucógeno). Por último, cuando los ovocitos son desovados, se reactiva la meiosis y se lleva a cabo la primera división meiótica y posteriormente, la segunda división se inicia con la fertilización y se completa en el medio marino (Longo, 1983).

### **2.3 Ciclos reproductivos en pectínidos y sus principales métodos de estudio**

En todos los moluscos existen aspectos fisiológicos diferenciales en un ciclo reproductivo, los cuales, involucran fases de actividad gametogénica, desove y reposo reproductivo, las cuales, se encuentran muy correlacionadas a las variaciones ambientales y en especial con la temperatura. Para fines de estudio, dichas diferencias pueden ser observadas bajo diferentes métodos, por ejemplo, mediante el seguimiento de la variación de la biomasa reproductiva (índice gonádico) a través del tiempo, otra forma se basa en la observación de las diferencias en talla, forma y color de gónada (escala reproductiva morfocromática o macroscópica) y otra en la descripción microscópica de los cambios gametogénicos y estructura interna de gónada (ciclo gametogénico).

De acuerdo con lo anterior, uno de los métodos más frecuentes es el empleo de índices gonádicos, que se basa en el seguimiento de las variaciones en peso de gónada a través del tiempo. Éstos expresan la proporción del peso de la gónada con respecto al peso total del organismo ( $\text{peso de gónada} * 100 / \text{peso total de los tejidos blandos}$ ) denominado como índice gonadosomático, o bien que pretenden estimar el grado de ocupación de gónada ( $\text{peso de gónada} / \text{peso de concha}$ ) (Román *et al.*, 2001). Otra forma de calcular los índices es a partir del peso seco de algún órgano, reportado al peso seco de concha (Paulet, 1990; Saout, 2000; Ramírez-Castillo, 2003). Este método tiene

la ventaja excluir el factor de humedad de los tejidos, relacionando el peso del cuerpo blando con el cuerpo duro que es la concha, cuyo peso no oscila sino que evoluciona siempre en el mismo sentido. Luna-González (1997), considera que los índices gonadosomáticos no son completamente fiables debido a que el porcentaje de agua en los tejidos no siempre es el mismo. Sin embargo los índices gonadosomáticos siguen siendo muy utilizados por su facilidad comparativa con otros estudios anteriores.

También el estudio del ciclo reproductivo se puede realizar mediante el método de inspección visual de la apariencia externa de la gónada, conocido como escala reproductiva morfocromática o macroscópica, en donde se toma en cuenta el tamaño de gónada, su color y grosor. Ramírez-Castillo (2003) describió 6 estadios macroscópicos de desarrollo gonádico en la almeja mano de león. Esta escala suele ser muy utilizada en laboratorios de reproducción de pectínidos por su rapidez y practicidad en la estimación del grado de desarrollo reproductivo de los organismos, sin embargo, se menciona que para fines de análisis de estudios reproductivos, este método es de baja resolución y puede conducir a estimaciones subjetivas.

Otro método utilizado es mediante el uso de escalas reproductivas microscópicas, construidas a partir de técnicas histológicas que describen las características más representativas del tejido de gónada y morfometría de los ovocitos en los diferentes estadios del ciclo gametogénico. Este método es uno de los más aceptados para fines de investigación; incluye periodos de reposo de la actividad reproductiva (periodos vegetativos), periodos de diferenciación celular, de crecimiento citoplasmático, de vitelogénesis (maduración), de liberación de gametos al medio ambiente (desove) y de reabsorción de gametos que no fueron liberados en el desove (Barber y Blake, 1991).

#### **2.4 Aspectos reproductivos de *Nodipecten subnodosus***

La almeja mano de león, al igual que la mayoría de los pectínidos, es una especie hermafrodita funcional, que primeramente libera espermatozoides y posteriormente ovocitos en forma alternada, como una estrategia enfocada a evitar la autofecundación (Reinecke-Reyes, 1996). Se reporta que la talla de primera madurez de la especie, es de 135 mm de altura de concha, sin embargo, algunos ejemplares pueden iniciar el desarrollo gonádico a los 51 mm (Arellano-Martínez, 2005).

Su ciclo reproductivo ha sido estudiado por Ramírez-Castillo (2003) en la Laguna Guerrero Negro B.C.S. y por Arellano-Martínez (2004) en Laguna Manuela B.C. Estos autores concuerdan en que el ciclo presenta 4 periodos principales; el primero corresponde al periodo de reposo que se presenta de diciembre a marzo con temperaturas ambientales de 16 a 17.5 °C. El segundo corresponde al periodo de actividad reproductiva inicial, presente de abril a mayo, iniciando cuando la temperatura ambiental alcanza los 18 °C. El tercero corresponde a la máxima madurez, de junio a septiembre, con temperaturas de alrededor de los 24 °C y el cuarto periodo, corresponde al desove, desde septiembre a noviembre cuando las temperaturas inician su descenso. Arellano-Martínez (2004) menciona que esta especie se comporta como una especie conservadora de regiones subtempladas, sin embargo, también indica, que la especie puede presentar uno o más desoves facultativos bajo condiciones ambientales favorables. Por otra parte, Racotta *et al.* (2003) observaron que la madurez de la gónada de la misma especie en Laguna Magdalena B.C.S. la obtuvo principalmente de julio a septiembre del primer año de estudio e inició nuevamente en abril del segundo año, sin embargo se comporta como una especie oportunista que aprovecha la disponibilidad del alimento para el desarrollo gametogénico, presentando dos picos reproductivos anuales, uno de bajo porcentaje de primavera y otro a principios de otoño.

Las diferentes escalas utilizadas para describir su ciclo gametogénico en la almeja mano de león, han sido elaboradas por Reinecke-Reyes (1996) con 5 estadios gametogénicos, por Ramírez-Castillo (2003) con 6 estadios macroscópicos de gónada, correlacionada con algunas características microscópicas y por último, una de las más actuales descripciones realizada por Arellano-Martínez (2005) con 7 estadios gametogénicos denominados; indiferenciado, inicio de desarrollo, desarrollo avanzado, madurez, parcialmente desovada, postdesove y reabsorción. Cada una de las descripciones de cada autor posee sus particularidades sobre la definición de los estadios y brindan beneficio de acuerdo a los estudios que con ellas se realizaron.

## **2.5 Factores exógenos que influyen en la reproducción**

El ciclo reproductivo es afectado por factores tanto exógenos (e.g. temperatura, periodicidad lunar, profundidad, factores mecánicos, abundancia y disponibilidad de alimento, intensidad de luz) como endógenos (e.g. genéticos, hormonales,

neuroendocrinos) (Mackie, 1984). De los factores exógenos, aparentemente la temperatura y disponibilidad de alimento son los factores que más afectan al ciclo reproductor de los bivalvos (Gosling, 2003), por tanto, comúnmente el ciclo reproductivo de estas especies es relacionado con las fluctuaciones térmicas anuales del ambiente. Como se mencionó anteriormente, en la almeja mano de león se ha observado que la actividad máxima de la gametogénesis y desove se presenta en los meses de agosto a octubre, en los cuales, se registran las temperaturas más altas del año; posteriormente, la especie entra en fase de recuperación desde noviembre a mayo que corresponden a los meses fríos (Ramírez-Castillo, 2003; Arellano-Martínez, 2005). Otro ejemplo de la influencia de la temperatura sobre el ciclo gametogénico es reportado por Villalejo-Fuerte y Cevallos-Vázquez (1996), quienes mencionan que su disminución favorece al transporte de sustancias de reserva desde el músculo abductor a la gónada de *Argopecten ventricosus*.

Las técnicas más difundidas para lograr la maduración reproductiva de moluscos en condiciones de laboratorio, consisten en mantener la temperatura estable y suministrar una dieta de alimento adecuada. Por ejemplo, Maeda-Martínez (2003), menciona que la empresa Marimex S.A. de C.V. realiza la maduración reproductiva de *N. subnodosus* a temperatura estable de 18 °C y con alimentación basada en microalgas a una concentración de 167,000 cél/mL. También en estudios sobre maduración reproductiva, Villavicencio (1997) concluyó que se puede obtener la madurez gonadal de esta misma especie a temperatura estable de 24 °C con suministro continuo de microalgas. Métodos similares en otras especies de moluscos se reportan en Sastry (1979), Bayne (1979), Shumway (1991) y Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2004). La estrategia de maduración de organismos a temperatura estable, surge del supuesto de evitar que parte de la energía destinada a la reproducción se desvíe a procesos de compensaciones fisiológicas si la temperatura fuese variable. En otras investigaciones (Gutiérrez-Villaseñor y Chi-Barragán, 1997; Villegas-Carrasco, 2004) se ha encontrado que la maduración reproductiva se acelera con incrementos graduales de temperatura. Robles-Mungaray (2001) menciona que en *N. subnodosus*, la maduración reproductiva se puede obtener con un incremento de temperatura (de 17 a 21 °C) en 20 días, con alimentación de  $8.0 \times 10^4$  cél/mL de *I. galbana*, *C. gracilis*, *C. calcitrans* y *D. tertiolecta*.



Otros estudios comparativos entre temperaturas estables y ascendentes, han mostrado resultados variables, por ejemplo, Saucedo-Lastra (2001) estudió el efecto de temperaturas constantes (20, 24 y 28 °C) y ascendente (de 20 a 29 °C) sobre el acondicionamiento reproductivo de *Pinctada mazatlanica*. Encontró que la temperatura de 24 °C y el régimen de temperatura ascendente, favorecieron en una mayor proporción de organismos maduros, mayor número y tamaño de ovocitos postvitelogénicos, así como los mayores índices gonádicos. En contraste, Martínez y Pérez (2003) estudiaron el efecto de temperaturas estables (15 °C), ascendente (de 15 a 19 °C) y descendente (de 19 a 15 °C) en el desarrollo reproductivo de *A. purpuratus*. Ellos encontraron que los organismos mantenidos a temperaturas estables mostraron mayor porcentaje de desove y los más altos valores del índice gonadosomático, mientras que el grupo que se sometió a temperatura creciente, mostró mayor variabilidad de los factores estudiados en la madurez reproductiva de la especie.

Maeda-Martínez (2003) hace referencia al efecto de temperatura oscilante sobre la reproducción de *N. subnodosus*. Menciona que ejemplares de esta especie con gónadas en fase inicial de madurez, sujetos a temperaturas oscilantes en laboratorio ( $23 \pm 5$  °C en 24 h), desovaron masivamente a los 16 días de iniciado el experimento, mientras que otros mantenidos a temperatura estable (23 °C) no mostraron este efecto. Por otra parte, Sicard-Gonzalez (2006) estudió el efecto de temperatura oscilante y estable sobre la fisiología de la almeja mano de león, y mencionó que la energía potencial de crecimiento fue tres veces mayor en los organismos expuestos a temperaturas oscilantes; además, estos organismos maduraron reproductivamente y desovaron prematuramente que a temperaturas estables, lo que repercutió en una menor condición en los tratamientos oscilantes.

## **2.6 Factores endógenos que influyen en la reproducción**

Actualmente, el control endocrino de la reproducción de moluscos es conocido con mayor detalle en gasterópodos y cefalópodos. Scharrer (1935) fue el primero en sugerir la presencia de hormonas en moluscos al identificar neuronas secretoras en caracoles Opisthobranchios. Posteriormente, Lever (1957 y 1958) encontró en pulmonados del género *Ferrisima sp.*, un grupo especializado de células neurosecretoras que denominó como cuerpos dorsales (DB's por sus sigas en inglés).

Dichos DB's han sido localizados en la superficie dorsal del ganglio cerebral de todos los gasterópodos pulmonados hasta ahora estudiados. Producen una hormona (DBH) gonadotrópica que estimula la madurez sexual femenina, la vitelogénesis de ovocitos (crecimiento y maduración) y la actividad de los órganos sexuales femeninos (Joosse, 1988). Los DB's son inervados por axones originarios de las comisuras del ganglio cerebral (Kahlmann, 1966; Nolte, 1983) recibiendo el control directo del sistema nervioso. Simpson (1969) reportan que posiblemente los gránulos que contienen la hormona de los cuerpos dorsales es secretada a la circulación de la hemolinfa por medio de exocitosis. La naturaleza química de la DBH aun es desconocida, sin embargo Krusch *et al.* (1979) sugieren que tienen naturaleza esteroidea. En *Lymnaea stagnalis* los cuerpos dorsales mostraron cambios en forma y talla (histológicos) en relación a la estación temporal, reflejando la máxima actividad justo antes de la estación de desove (Joosse, 1988). En la orden de los Basommatophoras, que incluye a pulmonados de agua dulce, también se han encontrado células llamadas caudo-dorsales que consisten en grupos pareados de neuronas que producen múltiples péptidos involucrados en el control integrado de la ovulación, formación de gónada y desove. Mientras que en babosas terrestres (orden Stylommatophora) han observado que los tentáculos ópticos producen una sustancia androgénica (masculinizante) que ayuda en la reversión sexual de hembras.

Las subclases de Opisthobranchios y Prosobranchios son representados por organismos marinos, en ellos se han reportado la presencia de unos órganos denominados; juxtaganglionares, que parecen ser los homólogos de los cuerpos dorsales de gasterópodos pulmonados y se sugiere que son órganos endocrinos en estos organismos. En *Gibbula umbilicalis* y *Haliotis rufecens* estos órganos están localizados en la capa conectiva que rodea al ganglio cerebral (Miller *et al.*, 1973; Herbert, 1982). Las células tienen apariencia glandular y no hay evidencia de inervación o neurosecreción sobre estos órganos, sin embargo es posible que la secreción provenga del tejido nervioso adyacente. También se reporta que en algunos prosobranchios como *Crepidula fornicata*, el ganglio cerebral secreta un factor feminizante que induce a la reversión sexual de las gónadas para formar organismos hembras.

En los moluscos bivalvos no se ha demostrado la existencia de órganos endocrinos diferenciados y se propone que el sistema nervioso participa inicialmente en

dicha regulación (Takeda, 1989; Román *et al.*, 2001). Algunos de los primeros trabajos para entender ligeramente la regulación endógena de la reproducción en bivalvos, fueron a partir de lo observado por Lubet (1956) al encontrar que era necesaria la integridad del ganglio cerebral para poder completar la gametogénesis en *M. edulis*. Blake (1972), Sastry (1975) y Blake y Sastry (1979) investigaron la relación entre el ciclo neurosecretorio y el ciclo gametogénico de *Argopecten irradians*, realizando identificaciones histológicas de las variaciones cíclicas de tamaño, textura y vascularización de neuronas en los ganglios. Ellos reportaron la actividad de 5 estadios neuroendocrinos, de los cuales, en el estadio I, el pectínido secreta agentes neuroendocrinos que permiten la acumulación de nutrientes. Los estadios II y III, actúan como mecanismos de activación y desactivación que controlan la transferencia de nutrientes a la gónada dependiendo de las condiciones de temperatura y alimento. El estadio IV coincide con la vitelogénesis hasta la madurez y el estadio V corresponde al desove. Osanai (1975) realizó una revisión histológica de las células nerviosas en *Patinopecten yessoensis* y concluyó que los neuroproductos que aceleran el desarrollo de la gónada y la gametogénesis son secretados por células grandes del lóbulo inferior del ganglio cerebral. Mathieu *et al.*, (1988) demostraron que el extracto del ganglio cerebro-pleural estimula la mitosis *in vitro* en la gónada de *M. edulis*, donde el factor activo solo fue identificado como un péptido con peso molecular < 5000 Da. Sato *et al.*, (1985) y Lubet (1982) reportaron un factor que controla la maduración de ovocitos en la almeja *Spisula sp.* pero tampoco la pudieron identificar.

Generalmente es aceptado que los factores ambientales estimulan los receptores sensoriales de estos organismos los cuales transmiten señales a los ganglios del sistema nervioso central afectando al sistema neuroendocrino (Shumway, 1991; Román *et al.*, 2001). Las células neurosecretoras encontradas en los ganglios del sistema nervioso secretan neurohormonas o neurotransmisores que regulan los cambios fisiológicos de varios órganos (Smith, 1987, Barber y Blake, 1981). Las neurosecreciones en bivalvos son de naturaleza monoaminérgica y peptidérgica principalmente (Lubet *et al.*, 1987; Takeda, 1989). Los roles exactos de monoaminas, péptidos y esteroides en la reproducción de bivalvos no es bien conocida pero hay evidencia de su participación. Las monoaminas constituyen el grupo principal de neurotransmisores del sistema nervioso y han sido los factores más estudiados en bivalvos. Éstas. La característica

diferencial de estas sustancias es la presencia de un grupo amino (-NH<sub>2</sub>). Proceden de aminoácidos precursores y forman dos grupos: las catecolaminas derivadas de la fenilalanina y las indolaminas derivadas de triptófano; las catecolaminas más relevantes son; DA, noradrenalina (norepinefrina: NE) y la adrenalina (epinefrina), en tanto que la indolamina más relevante es la 5-HT. Estas monoaminas no presentan una actividad biológica directa, pero actúan como primeros mensajeros para causar una respuesta postsináptica de un segundo mensajero (Bradford, 1988; Gómez-Jarabo, 1997; Siegel *et al.*, 1993).

Numerosos estudios tipo exploratorios se han realizado para observar la presencia de monoaminas en diversos tejidos de moluscos bivalvos. Cada uno de ellos muestra que las monoaminas están involucradas en muchos otros procesos como lo es el control cardioexitatorio (Greenbeg, 1960), modulación de la contracción del músculo liso (Twarong y Muneoka, 1972) transporte iónico (Horohov *et al.*, 1992), excreción del riñón (Croll *et al.*, 1995), producción del bizo (Benninger y Le Penec, 1991), contracción muscular del pie (Twarong y Muneoka, 1972), actividad ciliar branquias para respiración y filtración (Stefano y Aiello, 1975; Stefano *et al.*, 1977; Jonhs y Richar, 1993; Smith y Croll, 1998), inducción al desove (Matsutani y Nomura, 1982; Gibbons y Castagna, 1984; Martínez *et al.*, 1996).

Estos resultados indican que las catecolaminas pueden jugar diferentes roles en los procesos fisiológicos de este organismo (Smith y Croll, 1998). Se conoce que las monoaminas tienen cierta relación con el proceso reproductivo de los bivalvos debido a que han sido encontradas en el tejido de gónada en muchos ejemplares como; *P. yessoensis* (Matsutani y Nomura, 1984; Osada y Nomura, 1989a), *Mytilus edulis* (Stefano, 1990), *Pecten maximus* (Paulet *et al.*, 1993), *A. purpuratus* (Martínez y Rivera, 1994), *Placopecten magellanicus* (Smith *et al.*, 1998), *Venus verrucosa* (Siniscalchi *et al.*, 2004).

Dentro de las investigaciones orientadas en conocer la relación de las monoaminas con el ciclo reproductivo de bivalvos, se han encontrado similitudes y discrepancias, por ejemplo; en el estudio de los niveles de 5-HT en el sistema nervioso central, Stefano y Catapane (1977) encontraron que en *M. edulis* son más altos durante el verano correspondiente al tiempo de desove y decrecen durante el invierno que corresponde al proceso de gametogénesis, esto mismo fue observado por (Paulet *et al.*,

1993) en *P. maximus*. Sin embargo (Martínez y Rivera, 1994) no observó cambios significativos de esta monoamina en este tejido después del desove, solo observó altos valores un día antes del nuevo desove. En lo que respecta a DA en el sistema nervioso central; Stefano y Catapane (1977) observaron altos niveles durante el desove y menores durante la gametogénesis en tanto que (Osada y Nomura, 1989) no observaron cambios de DA en todo el año. (Paulet *et al.*, 1993) por el contrario encontraron que los niveles de DA se incrementaron durante la gametogénesis.

En estudios de 5-HT y DA en tejido de gónada se han observado que los niveles de las catecolaminas decrecen durante el desove y se incrementan a través de la gametogénesis esto fue observado en *P. yessoensis* (Osada y Nomura, 1989a), *C. gigas* (Osada y Nomura, 1989b) y en *A. purpuratus* (Martinez y Rivera, 1994). Por el contrario Masseur *et al.*, (2002) observaron que la 5-HT en la gónada de *Spisula solidissima* presentó altas concentraciones al tiempo reproductivo inicial, posteriormente sufrió decremento de la concentración conforme avanzó la gametogénesis obteniendo el menor valor durante el estadio de máxima madurez, para volverse a incrementar posterior al desove.

Todas estas controversias pueden ser explicadas con diferentes hipótesis, por ejemplo; Smith y Croll (1997) mencionan puede ser que las monoaminas tengan un rol directo sobre la gametogénesis de bivalvos pero el mecanismo de acción de las monoaminas puede ser diferente para diferentes especies. Por otra parte Martínez y Ribera (1994) mencionan que las monoaminas pueden tener un efecto indirecto sobre la gametogénesis a través de la acción de otros sistemas metabólicos por ejemplo, éstos autores encontraron que la 5-HT y DA en branquias se incrementaron durante la gametogénesis y es conocido que estas monoaminas están involucradas en el control de la actividad ciliar de branquias y palpos labiales (Catapane, 1983; Benninger y Le Pennec, 1991; Stefano *et al.*, 1997). Quizá la alimentación es más intensa debido a la demanda de energía que se incrementa durante la gametogénesis. Esto implica que las monoaminas pueden afectar indirectamente por el simple aumento de la conducta alimenticia.

Una de las hipótesis más aceptada sobre el posible mecanismo de acción de las monoaminas durante la gametogénesis en bivalvos, ha sido realizada gracias a los trabajos de la Dra. Gloria Martínez de Chile con la especie *A. purpuratus*. Sus estudios

y los de otros investigadores el ramo, han sido resumidos y publicados en Román *et al.* (2001) de la siguiente manera: los organismos reciben señales del medio externo e/o interno que posiblemente son captados por el sistema nervioso central. Esas señales pueden traducirse en la liberación de otras señales (primeros mensajeros) que llegarán hasta el tejido cuya función será regulada. Estos primeros mensajeros puede tratarse de hormonas o neurotransmisores. El receptor del primer mensajero, es un componente macromolecular ubicado en la membrana plasmática de la célula blanco, es un elemento que actúa discriminando entre determinadas señales o mensajes. Al producirse la interacción con el receptor, éste sufre un cambio conformacional que inicia la respuesta celular posibilitando su unión a un elemento transductor. Este último es ahora capaz de transducir la información a un sistema enzimático que genera un segundo mensajero intracelular, el cual puede regular la actividad de las proteínas (enzimas u otras) y afectar así funciones celulares específicas. Los segundos mensajeros más estudiados en *A. purpuratus* son el AMP cíclico (cAMP), las prostaglandinas (PGs) y el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) los cuales, probablemente actúan regulando la movilización de sustratos que aportan energía para el desarrollo de los gametos, mediante la activación del catabolismo de carbohidratos por fosforilación, dependiente del cAMP, de las enzimas reguladoras de éste proceso y el consecuente incremento de aporte energético para el proceso de la gametogénesis (Román *et al.*, 2001).

## 2.7 Inducción al desove

El desove en moluscos, es correlacionado frecuentemente con gran variedad de factores ambientales, sin embargo, aún se desconocen los mecanismos endógenos que activan el proceso. Los métodos de inducción a desove más utilizados son físicos, químicos, mecánicos y combinación de ellos. Dentro de los estímulos físicos, la estimulación térmica es, quizá, el método más empleado en invertebrados y ha sido estudiado desde principios del siglo pasado por investigadores como Nelson (1928) en *Ostrea virginica*, Prytherch (1929) en *Ostrea (Crassostrea) gigas* y Young (1945) en *Mytilus californianus*. En pectínidos, dentro de los estímulos mecánicos, se encuentran la manipulación de los reproductores, exposición al aire antes del desove, incremento de partículas suspendidas (alimento) en el agua y por medio de choques eléctricos. En los estímulos químicos se encuentran; la adición en el agua de cloruro de potasio, peróxido

---

de hidrógeno y gametos de otro organismo de la misma especie, además están las inyecciones de monoaminas como: 5-HT, DA, NE, entre otras.

En el ámbito de la estimulación química, fueron probablemente, los primeros estudios reportados Lillie y Just (1913) quienes demostraron que los machos de *Nereis limbata* inmediatamente iniciaron la expulsión de espermias cuando fueron colocados en agua en donde habían permanecido hembras de la misma especie, y por otra parte, la presencia de espermias en el agua incitaba a las hembras al desove. Otros autores como Galtsoff (1938 y 1940) y Nelson y Allison (1940) también demostraron que los gametos desovados del ostión *Ostrea virginica* inducían el desove de otros organismos debido a la acción de feromonas diluidas en el agua, las cuales producen una retroalimentación positiva entre los organismos que repercute en un gran desove sincrónico de una población. Otro paso muy importante que contribuyó en un mayor conocimiento de la relación del sistema nervioso en la regulación de liberación de gametos, fue debido al trabajo de Lubet (1956), quien observó que la remoción del ganglio cerebral, en *Mytilus edulis*, aceleraba el desove del organismo y la ablación bilateral del ganglio detenía la gametogénesis en la fase temprana de desarrollo. También, otro paso importante fue cuando Kupfermann (1967) realizó un homogenizado con un grupo de neuronas de *Aplysia californica*, con el cual obtuvo un extracto que fue inyectado en otro organismo de la misma especie, resultando en la puesta inmediata de huevos. Posteriormente a esto, la 5-HT fue ampliamente reconocida como el agente inductor de desove más efectivo para la mayoría de invertebrados.

Se menciona que uno de los primeros ensayos de inducción al desove de pectínidos con 5-HT fue realizado por Matsutani y Nomura (1982) en *Patinopecten yessoensis*. A partir de éste, se han realizado muchas investigaciones en diferentes especies como *Argopecten irradians* (Gibbson y Castagna, 1984), *Euvola ziczac* (Vélez *et al.*, 1990), *A. ventricosus* (Monsalvo-Spencer *et al.*, 1997), entre otros. De manera general, en pectínidos se ha observado que la 5-HT es un buen inductor de gametos masculinos, pero es menos eficaz en la liberación de gametos femeninos. Se ha observado que en el desove de pectínidos gonocóricos se requieren de mayores dosis para liberar los gametos femeninos comparados con los masculinos (Matsutani y Nomura, 1990), mientras que en pectínidos hermafroditas funcionales solo induce la liberación de espermias pero no de ovocitos (Vélez *et al.*, 1990; Monsalvo-Spencer *et*

*al.*, 1997). Estos resultados en estas especies, han provocado que actualmente no se tenga el control total del desove (por lo menos en expulsión de gametos femeninos) en muchas especies de interés comercial. Al respecto, se han realizado numerosos estudios, en donde han utilizado diversos métodos y agentes inductores de desove, con el objetivo de tener mayor control y conocimiento de este proceso. Muchos de estos estudios han estado muy relacionados con las monoaminas, por su cercanía con la 5-HT (Ej. Martínez *et al.*, 1996a; Monsalvo-Spencer *et al.*, 1997; Velasco *et al.*, 2007). Además, se han realizado estudios exploratorios de las concentraciones de monoaminas durante el proceso del desove; por ejemplo en *Argopecten purpuratus* (Martínez y Rivera, 1994) observaron una disminución de 5-HT y DA en gónadas luego de un desove espontáneo y en el caso de desove inducido (Martínez *et al.*, 1996b) los valores de las catecolaminas (DA y NE) en gónada aumentaron mientras que los de 5-HT disminuyeron.



### **III. PROBLEMATICA Y JUSTIFICACIÓN**

La almeja mano de león se ha intentado madurar reproductivamente en laboratorio, obteniendo resultados medianamente satisfactorios. Es necesario optimizar este proceso reduciendo el período de maduración sin afectar negativamente la calidad de los ovocitos. Se ha observado experimentalmente que cuando se realiza la maduración reproductiva bajo condiciones de temperaturas variables (ascendentes, descendentes u oscilantes), los organismos pueden madurar más rápidamente que los mantenidos a temperaturas estables. Sin embargo, no existen trabajos dirigidos a comprobar estas observaciones ni a buscar las condiciones óptimas de maduración. Tampoco se han realizado estudios que expliquen este proceso desde el punto de vista neuroendocrino.

### **IV. HIPÓTESIS**

Mediante la manipulación de diferentes patrones térmicos se puede obtener una maduración de organismos más rápida y de mayor calidad de ovocitos con respecto a la temperatura estable, gracias a la estimulación de las células neurosecretoras del sistema neuroendocrino que participan en la regulación de este proceso.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES

Determinar el patrón térmico, que acelere la gametogénesis en la almeja mano de león sin reducir la calidad de los ovocitos y determinar la presencia de monoaminas en diferentes órganos de esta especie para evaluar su posible relación con la actividad reproductiva.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el efecto de diferentes regímenes térmicos (estable, ascendente, descendente u oscilante) sobre la actividad reproductiva de la almeja mano de león *N. subnodosus*.
- 2.- Identificar y cuantificar los niveles de monoaminas en diversos tejidos de *N. subnodosus*, bajo diferentes estadios de desarrollo gametogénico.
- 3.- Determinar el efecto de la de la temperatura estable y oscilante, sobre los niveles de monoaminas en diversos tejidos de *N. subnodosus*.
- 4.- Determinar el efecto de diferentes monoaminas sobre la inducción al desove de la almeja catarina *A. ventricosus*\*

\*Nota: Debido a que no se encontraron reproductores maduros de *N. subnodosus*, el experimento fue realizado con la almeja catarina *Argopecten ventricosus* por su relación filogenética cercana con esta especie.

## VI. METODOLOGÍA GENERAL

### 6.1 Sitios de recolecta de organismos experimentales

La obtención de organismos experimentales estuvo limitada a la distribución espacial y disponibilidad temporal (ciclo reproductivo) de *N. subnodosus*, por tanto, se utilizaron organismos silvestres y de cultivo provenientes de cuatro áreas distribuidas en la costa del Pacífico de la Península de Baja California (Figura 2).

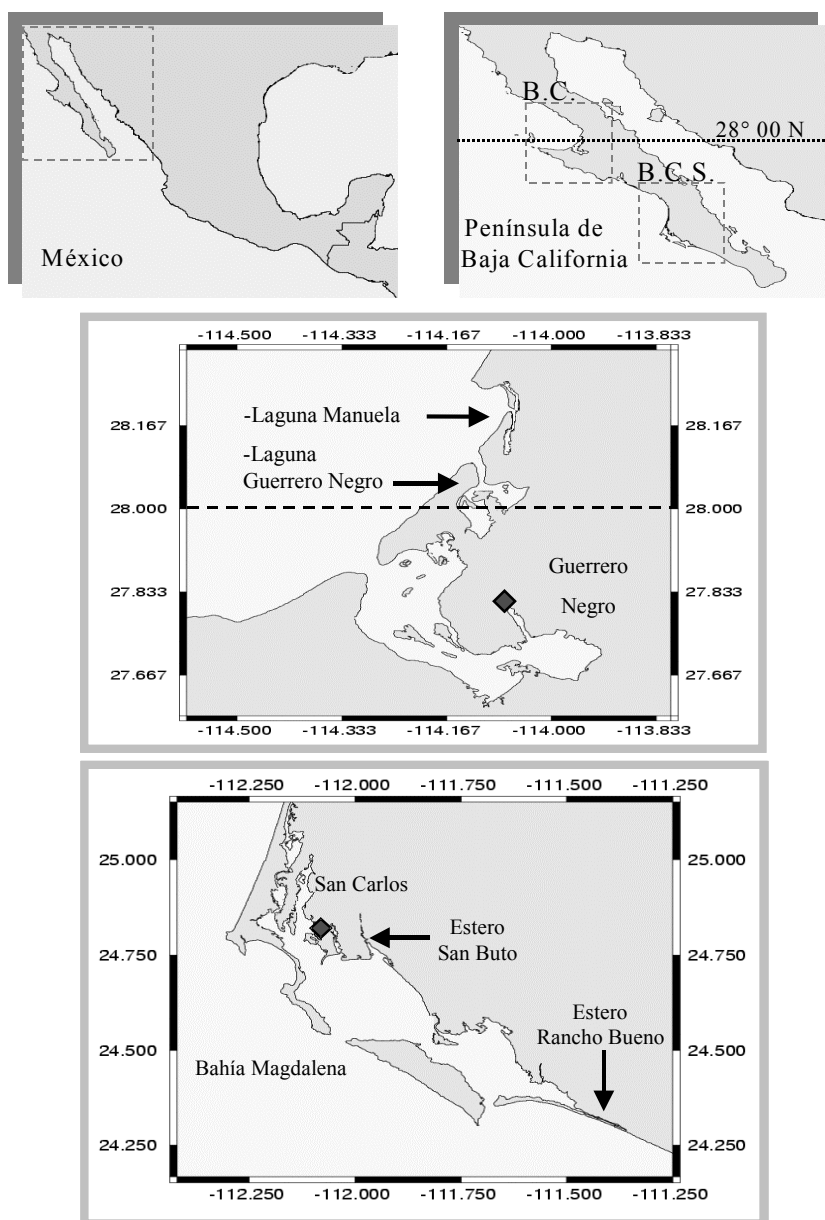


Figura 2. Ubicación de los sitios de recolecta de los organismos experimentales: Laguna Manuela B.C. ( $28^{\circ} 20' N$ ;  $114^{\circ} 06' W$ ), Laguna Guerrero Negro B.C.S. ( $28^{\circ} 01' N$ ;  $114^{\circ} 11' W$ ), Estero San Buto, B.C.S. ( $24^{\circ} 47' N$ ;  $112^{\circ} 02' W$ ) y Estero Rancho Bueno B.C.S. ( $24^{\circ} 32' N$ ;  $111^{\circ} 42' W$ ).

## 6.2 Métodos de transporte de organismos

Los organismos experimentales fueron transportados por vía terrestre bajo diferentes métodos, desde su sitio de colecta hasta el laboratorio de ecofisiología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en La Paz B.C.S.

### 6.2.1 Método seco tipo Sandwich

Este método (Figura 3) es descrito en Maeda-Martínez *et al.* (2000), el cual consistió en acomodar los organismos entre capas de esponja de poliuretano flexible de 2.5 cm de grosor previamente humedecidas con agua marina. Las capas de esponja se colocaron entre 2 piezas de madera de 0.9 m<sup>2</sup> en la parte superior e inferior de dichas capas, formando un sandwich, el cual, fue atado de manera firme para ajustar los organismos y cerrar sus valvas. Éste a su vez, fue colocado en una hielera plástica de cierre hermético Xactics® con volumen de 1 m<sup>3</sup>. La temperatura dentro de la hielera se mantuvo entre 17 y 20 °C colocando bolsas con hielo en las cantidades que se fueran necesitando. Se introdujo oxígeno puro a presión constante de 0.35 Kg cm<sup>-2</sup> (5 PSI) para mantener un ambiente saturado. Bajo estas condiciones se obtuvo 99 % de supervivencia.

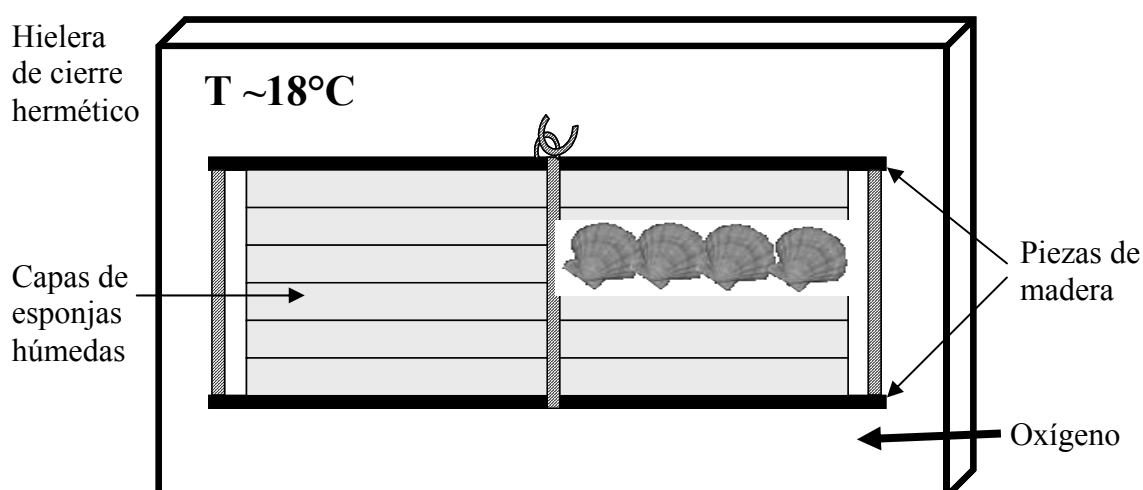


Figura 3. Esquema representativo del método de transporte de organismos tipo *Sandwich*.

### 6.2.2 Método húmedo tipo Rosario

Este método (Figura 4) fue realizado en el presente trabajo con el objetivo de transportar organismos de gran talla de la almeja mano de león en periodos de tiempo largo. Consistió en colocar agua marina del sitio de colecta dentro de un tanque tipo Rotoplas® de 750 L hasta una altura mayor a los  $\frac{3}{4}$  de la capacidad del tanque. La temperatura del agua fue regulada a 17 °C mediante adición de bolsas con hielo. Los organismos seleccionados para el transporte fueron colocados dentro de costales de plástico tipo cebollero en donde, primeramente, se colocó un grupo de 4 a 6 ejemplares en el fondo del costal. Éstos fueron ajustados atando hilo de polietileno. Posteriormente, otro grupo fue arreglado dentro del mismo costal (con el objetivo de distribuir los organismos y cerrar sus valvas) y así consecutivamente. Se formó un “tren” de grupos de tal manera que se adquirió la forma de un rosario. Los diferentes “rosarios” contruidos con aproximadamente 20 organismos, fueron colocados dentro del tanque y colgados verticalmente con una extensión del mismo hilo de polietileno a la base de la tapa del mismo tanque. Se inyectó oxígeno puro para mantener una cantidad disuelta en el agua entre los 8 y 9 mg/mL. Una vez ajustado este parámetro, se procedió al cierre del tanque de forma hermética. El monitoreo de los parámetros de temperatura y oxígeno se realizó de forma continua, mediante la introducción del sensor de un oxímetro YSI 550A. Con este método se obtuvo 100% de supervivencia en un lapso de transporte de 13 h.

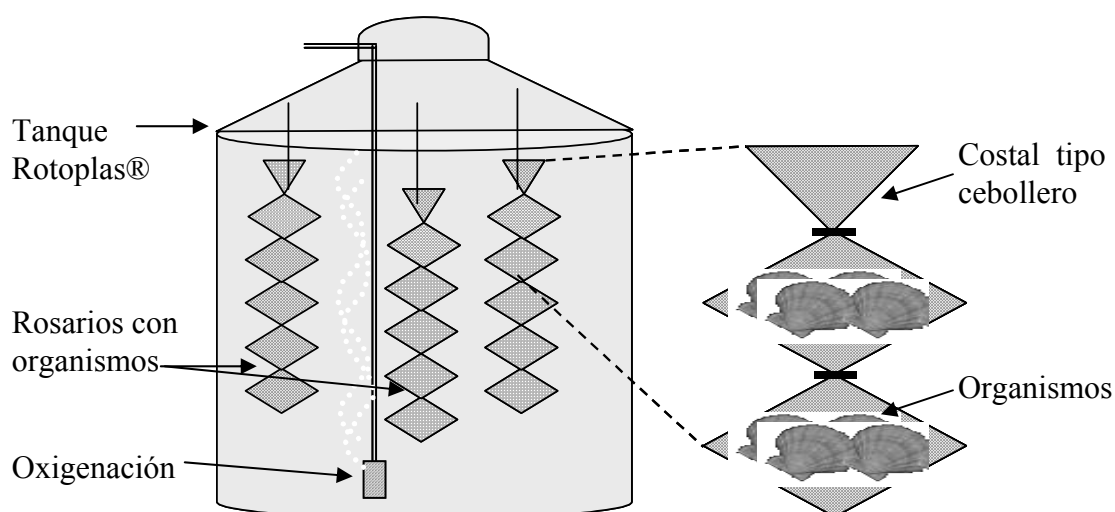


Figura 4. Esquema representativo del método de transporte de organismos tipo *Rosario*.

### 6.3 Regulación de temperatura con el Simulador Térmico Marino (SITMA)

El equipo de simulación térmica marina automatizado (SITMA) (Figura 5) fue fabricado en el CIBNOR con el propósito de controlar la temperatura del agua utilizada para experimentos de laboratorio. Este equipo fue diseñado para trabajar con seis tanques simultáneamente por tiempo indefinido, con una capacidad de variación de 5 °C/h en 90 L de agua. Consiste en una computadora con software y hardware que controlan los interruptores de encendido y apagado de 6 equipos de refrigeración con serpentín de acero inoxidable y de 6 calentadores de titanio (calefactores) de 1,000 W sumergidos en los 6 tanques mencionados (un serpentín y un calefactor por tanque). La computadora detecta y registra los datos de temperatura de cada tanque experimental con ayuda de un termistor flotante, estos datos son comparados con los datos de simulación térmica deseada que se encuentran guardados en memoria de la PC, la cual, por medio del software controla los interruptores de los equipos anteriormente mencionados.

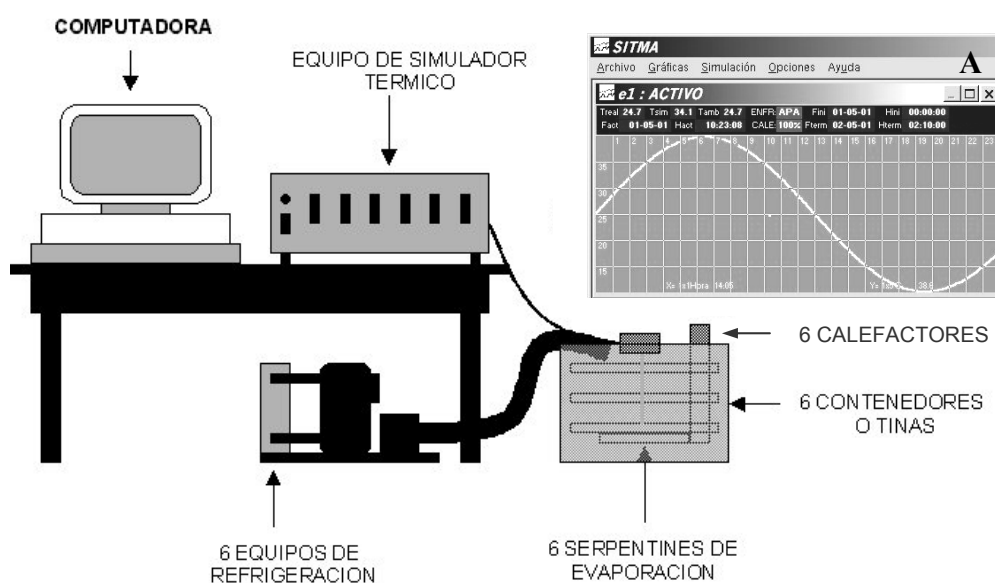


Figura 5. Esquema representativo del Simulador Térmico Marino Automatizado (SITMA). El dibujo superior derecho distinguido por la letra A, representa una de las gráficas generadas por simulación térmica en laboratorio.

#### 6.4 Análisis biométricos (Índices de Condición General y Gonadosomático)

En cada muestreo se midió la altura y peso de valvas, peso húmedo total, peso húmedo de tejidos y peso de gónada. Con estos datos se calculó el Índice de Condición General mediante la ecuación:  $ICG = (\text{peso fresco de tejidos} / \text{peso húmedo total}) * 100$  (Villalejo-Fuerte y Cevallos-Vázquez, 1996). También se calculó el Índice Gonadosomático (IG) que se interpreta como el valor que expresa el porcentaje del peso de gónada con respecto al peso de partes blandas y se calcula a partir de la razón:  $IG = (\text{peso húmedo del tejido} / \text{peso húmedo de las partes blandas}) * 100$  (Sastry, 1970).

#### 6.5 Análisis histológicos

De cada organismo experimental sacrificado se tomó una muestra de la parte media de gónada femenina. Dichas muestras fueron mantenidas durante 48 h en una solución Davidson (Anexo II) para fijación de los tejidos siguiendo el método de Shaw y Battle (1957). Posteriormente, los tejidos fueron procesados de acuerdo a los protocolos clásicos de histología. Las muestras fueron deshidratadas, incluidas en parafina, y seccionadas para obtener cortes de tejido gonádico con grosor de 5  $\mu\text{m}$ . Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina. Con este método, los ovocitos contenidos en las gónadas fueron observados con un microscopio compuesto Olympus BX41 y capturados en imágenes en 5 diferentes campos seleccionados aleatoriamente por medio de una cámara digital CoolSNAP-Pro. Estas imágenes fueron digitalizadas en una PC con el programa ImagePro Plus (versión 4.5.19) y fueron almacenadas para su posterior análisis.

##### 6.5.1 Estadios de desarrollo gametogénico

Las imágenes de cada una de las muestras de gónada de los tratamientos térmicos fueron clasificadas en 6 diferentes estadios de desarrollo gonádico; I.- Indiferenciado, II. Inicial, III.-Crecimiento, IV.-Madurez, V.-Desove parcial y VI.-Desove total y reabsorción. Las características de cada estadio fueron tomadas de las descripciones realizadas para la misma especie por Ramírez-Castillo (2003) y Arellano-Martínez (2005) y fueron complementadas con la ayuda de Rodríguez-Jaramillo (Com. Pers.).

### 6.5.2 Diámetro teórico y cantidad de ovocitos

Las imágenes de gónadas en estadios de crecimiento y madurez fueron analizadas en una PC con el programa Sigma Scan Pro5. Para cada tratamiento térmico y etapa reproductiva se midieron cincuenta ovocitos seleccionados aleatoriamente los cuales presentaban núcleo y nucleolo definidos. Fueron cortados aproximadamente en el plano ecuatorial con el fin de asegurar la medida más próxima de la circunferencia real del ovocito. Los datos del área de los ovocitos se usaron para obtener el Diámetro teórico propuesto por Saut (1999):  $DT = \sqrt{(4A/\pi)}$ . Con esta medida, los ovocitos vitelogénicos (de 30 a 60  $\mu\text{m}$ , según la descripción de Ramírez-Castillo, 2003) fueron discriminados, obteniendo un DT medio para cada tratamiento térmico. También con las imágenes y el programa Sigma Scan Pro5 se contabilizó la cantidad de ovocitos de un área estandarizada a 1  $\text{mm}^2$ .

## 6.6 Análisis de monoaminas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica (HPLC-ED).

### 6.6.1 Extracción de monoaminas

Todas las muestras se obtuvieron con un peso aprox. de  $221 \pm 40$  mg de tejido húmedo, las cuales, fueron colocadas en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad. Se les agregó 1 mL de ácido perclórico al 0.1 M y posteriormente se homogenizaron con un Ultra-Turrax T-25. Los homogenizados obtenidos se centrifugaron a  $4,300 \times g$  por 30 min a  $4^\circ\text{C}$  y después los sobrenadantes fueron colectados cuidadosamente con una micropipeta (usando diferentes puntas para cada muestra) y colocados en nuevos tubos Eppendorf. Por último, fueron almacenados a  $-80^\circ\text{C}$  para su posterior análisis de monoaminas en un lapso no mayor 25 días en el HPLC-ED.

### 6.6.2 Químicos usados para HPLC-ED

Acetonitrilo, tetrahydrofurano, metanol, fosfato de sodio monobásico y los estándares de monoaminas como 5-HT, DA e ISP fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química de México. NE, ácido octan-sulfónico, ácido ethylenediaminetetraacético (EDTA) y ácido perclórico 69-72 %, fueron adquiridos de VWR. Agua grado HPLC fue adquirida de Fisher.



### 6.6.3 Equipo cromatográfico

El equipo cromatográfico utilizado fue un Epsilon E5 (Bioanalytical Systems, BAS de México) que posee una bomba de la serie PM-80 acoplada a una válvula de inyección de 20  $\mu$ L y a un detector electroquímico con rango de sensibilidad desde 0 a  $\pm$  1 mA. La fase estacionaria para separación de monoaminas consistió en una columna de ultraesfera Supelcosil LC-18 (25 cm x 4.6 mm de Sigma-Aldrich) conectada en serie con una precolumna LC-18 2 cm kit (de Sigma-Aldrich) con partículas de octadecilsilano de 5  $\mu$ m. La temperatura de la columna se controló a 28 °C con un calentador externo marca Eppendorf modelo TC-50. La tasa de bombeo fue de 1.5 mL/min. La detección electroquímica se registró con un potencial ajustado a 700 mV y una sensibilidad de 10 nA.

La fase móvil fue preparada en agua grado HPLC adicionando fosfato de sodio monobásico (200 mM), ácido octan-sulfónico (0.75 mM), EDTA (15  $\mu$ M), metanol (7 %), acetonitrilo (4 %) y tetrahidrofurano (0.25 %). El pH fue ajustado a 4.3 con ácido fosfórico al 85 %. La desgasificación de la fase móvil se realizó con un desgasificador marca BAS.

Con cada uno de los químicos estándar (5-HT, DA, NE e ISP), se prepararon 6 soluciones diluidas en ácido perclórico a 0.1 M, bajo concentraciones desde 4 hasta 488 ng/mL. Estas diluciones fueron analizadas con el equipo cromatográfico y con los datos se construyeron curvas estándar para cada una de las monoaminas mencionadas, que fueron almacenadas en la memoria de la PC del equipo, las cuales ayudaron de referencia comparativa para determinar las concentraciones de monoaminas de las muestras en investigación (Figura 6). También se realizaron pruebas para analizar la variación de la concentración en una misma muestra (estándar y de tejidos), obteniéndose una variación de los resultados menor al 5 % entre resultados. Los resultados fueron expresados en nanogramos por miligramo de peso seco de tejido.

### 6.6.4 Nota importante del estudio cromatográfico:

El ISP es un químico artificial de uso farmacéutico perteneciente a la familia de las monoaminas que no es encontrado en forma natural en los organismos. Debido a esta característica, en estudios anteriores el ISP ha sido usado como un estándar interno, el cual se agrega en una cantidad conocida a cada una de las muestras por analizar para

contribuir con una posible corrección de los resultados. Esto en dado caso de que las cantidades disminuyan por efecto de error de muestreo o degradación por tiempo. Sin embargo, en el presente estudio se realizaron pruebas preliminares con y sin el uso de este químico, en las cuales se observó la presencia de un agente similar al ISP, que interactuaba en el mismo tiempo de retención del análisis de HPLC-ED. Por tanto, en el presente estudio no se usó ningún estándar interno, solo se realizaron las pruebas preliminares para disminuir el error de muestreo, utilizándolo en aquellos tejidos donde no se encontró este agente que fue observado en una variación del 5 % en las cantidades finales. Finalmente, el ISP fue usado como un estándar del agente desconocido, el cual, fue analizado y nombrado en el presente trabajo como isoproterenol-Like (ISP-L).

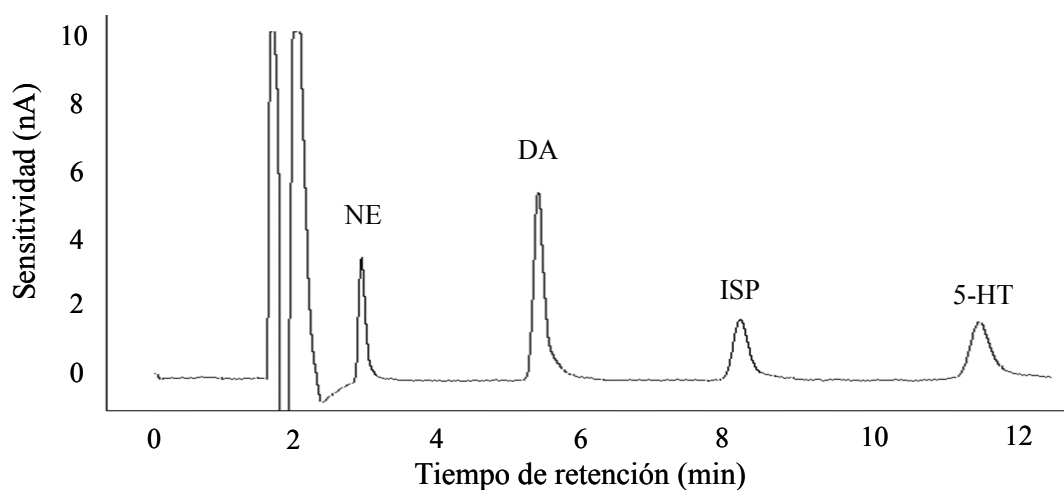


Figura 6. Cromatograma resultante de la inyección de una mezcla estándar de monoaminas a concentración de 120 ng/mL. NE, DA, 5-HT e ISP.

---

## VII. EFECTO DE DIFERENTES REGÍMENES TÉRMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN *NODIPECTEN SUBNODOSUS*.

### 7.1 Introducción

La temperatura es considerada como el factor ambiental más importante que determina el nivel de actividad en organismos poiquiloterms (Bayne, 1976). Este factor tiene influencia en el proceso reproductivo a través de la maduración de los gametos, desove, desarrollo embrionario, duración del periodo planctónico y asentamiento larvario (Kinne, 1970).

Loosanoff (1945) demostró que la maduración y el desove de la ostra americana *Crassostrea virginica* podía inducirse fuera de la estación de reproducción, elevando varios grados la temperatura del agua. A partir de entonces muchos trabajos se han realizado para observar la influencia de diferentes regímenes térmicos sobre el acondicionamiento reproductivo de los moluscos. La mayoría se han basado en temperaturas estables con varios grados por encima de la temperatura habitual de los organismos, otros se han empleado regímenes de temperatura ascendentes y algunos otros han trabajado con el concepto “Día-Grado” que muestra una supuesta acumulación térmica a través del tiempo. Debido a los resultados controversiales con respecto a la influencia de la temperatura sobre la actividad reproductiva de moluscos, se requiere un estudio para ampliar el conocimiento sobre este proceso, con fines de optimizarlo en laboratorio. En este estudio se comparó el efecto de los diferentes patrones térmicos hasta ahora descritos en la literatura, por ejemplo; temperaturas estables a diferentes niveles incluyendo la temperatura óptima de crecimiento (22 °C) reportada por González-Estrada (2003) en esta especie y temperaturas con diferentes amplitudes de oscilación. Adicionalmente se simuló el registro térmico real de Laguna Manuela, BC (sitio natural de reproducción de la especie) del mes de agosto (2003) que corresponde al periodo en que la especie madura reproductivamente. También otro régimen de comparación que incluye temperatura estable con incrementos repentinos de temperatura (pulsos) para probar la hipótesis de que estos pulsos disparan la secreción de neurotransmisores que a su vez, estimulan el desarrollo reproductivo en esta especie.

Se han reportado numerosas escalas reproductivas para diferentes especies de moluscos. Para la almeja mano de león se cuenta con dos escalas preliminares que han descrito el desarrollo gonádico de esta especie tanto en términos macroscópicos (Ramírez-Castillo, 2003) como microscópicos (Arellano-Martínez, 2005). La escala reproductiva del presente estudio utilizó descripciones de ambas escalas preliminares para describir el desarrollo del ciclo gametogénico más práctico utilizado bajo diferentes condiciones de temperatura.

## 7.2 Objetivo

Determinar el efecto de diferentes regímenes térmicos sobre la actividad reproductiva de la almeja mano de león *N. subnodosus*.

## 7.3 Materiales y métodos

Un total de 65 ejemplares de almeja mano de león con media de  $87 \pm 5$  mm ( $\pm$  SD) de altura de concha y en fase gametogénica incipiente (estadio I, basados en la escala macroscópica de Ramírez-Castillo, 2003) fueron recolectados en Laguna Manuela, Baja California ( $28^{\circ} 20' N$ ;  $114^{\circ} 06' W$ ) y transportados al laboratorio de ecofisiología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en La Paz, B.C.S., siguiendo el método de transporte tipo sandwich (Sección 6.2.1). En el laboratorio, los organismos se colocaron en un tanque de fibra de vidrio de 1,500 L de capacidad, donde se mantuvieron con agua de mar filtrada a  $17^{\circ} C$ , 35 ups, aireación continua y alimentados con *Isochrysis galbana* bajo una ración de  $7.5 \times 10^8$  cél/ind/día. La aclimatación se llevó a cabo, elevando gradualmente la temperatura del tanque hasta  $22^{\circ} C$  durante los 10 días posteriores y después los organismos se transfirieron a 6 tanques de 120 L (15 ind/tanque), los cuales recibieron flujo continuo de agua marina filtrada y microalgas a razón de 1.5 L/min, 35 ups y aireación continua. Durante este tiempo se realizaron estudios preliminares del ICG (Sección 6.4) para conocer el desempeño de la condición fisiológica de los organismos ante el efecto del transporte y la aclimatación de los organismos y en consecuencia, conocer el estado fisiológico previo a los experimentos.

### 7.3.1 Diseño experimental

Los regímenes térmicos experimentales para inducir a la maduración gonádica de *N. subnodosus* se ilustran en la Figura 7. Estos tratamientos incluyeron:

A) Temperatura estable de 22 °C.

B) Temperatura estable de 25 °C.

C) Temperatura oscilante de alta amplitud ( $22 \pm 4$  °C) con frecuencia de 1 ciclo por día;  
 $f(x) = 22 + 4 \text{ Sin}(2\pi/\text{día})$ .

D) Temperatura oscilante de baja amplitud ( $20 \pm 2$  °C) con frecuencia de 1 ciclo por día;  $f(x) = 20 + 2.5 \text{ Sin}(2\pi/\text{día})$ .

E) Temperatura estable a 22 °C con pulsos de + 5.5 °C durante 6 h, cada 3 días, y

F) Patrón térmico real registrado en Laguna Manuela, B.C. en Agosto del 2003. Los datos fueron obtenidos con un termógrafo submarino digital (Optic Stow Away marca Onset) ubicados en las líneas de cultivo de *N. subnodosus* con una frecuencia de registro térmico de un dato cada 30 min.

Durante el experimento, los organismos estuvieron expuestos a los diferentes regímenes térmicos durante un periodo de 30 días, en los cuales fueron alimentados con flujo continuo de *Isochrysis galbana* a ración de  $9.6 \times 10^8 \pm 3.0 \times 10^8$  cél/ind/día. La temperatura en los diferentes tratamientos térmicos fue controlada con calentadores eléctricos EBO-JAGER de 250 W y con el equipo SITMA (Sección 6.3). Los muestreos se realizaron en el tiempo inicial y en los días 15 y 30 del periodo experimental, donde 5 organismos fueron sacrificados de cada tratamiento térmico. El efecto de la temperatura sobre la actividad reproductiva de *N. subnodosus* se midió en el laboratorio a través del ICG, el IG, la frecuencia (%) de estadios ovogénicos, diámetro teórico y cantidad de ovocitos vitelogénicos de los organismos. Para lograr estos objetivos, primeramente se realizaron biometrías y categorización de estadios ovogénicos mediante análisis histológicos (Sección 6.5).

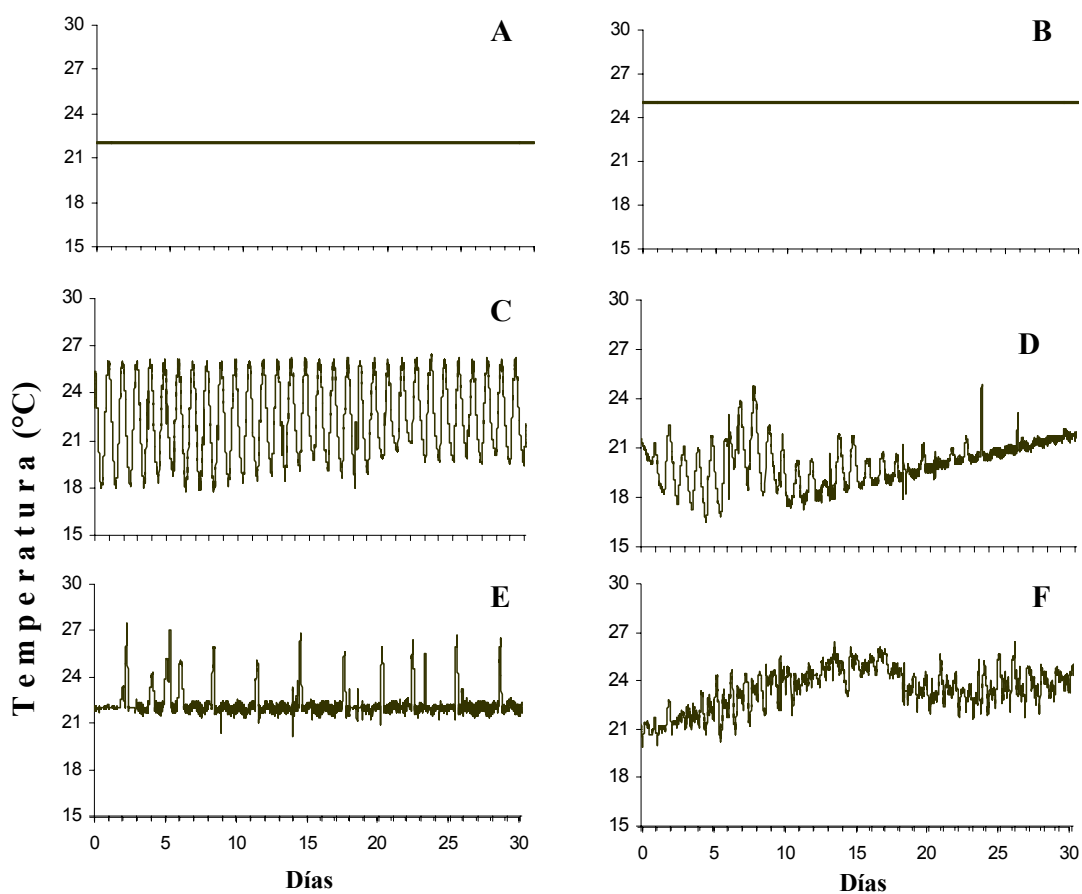


Figura 7. Regímenes térmicos experimentales, utilizados para estudiar su efecto sobre la actividad reproductiva de *Nodipecten subnodosus*. A-F representa la posición en que los tratamientos térmicos están descritos en la metodología.

### 7.3.2 Análisis de resultados

Se usaron análisis de varianza de una vía, seguidos de una prueba *a posteriori* de Tukey para comparar y discriminar entre tratamientos. Los análisis fueron establecidos con nivel estadístico de significancia a  $P < 0.05$ .

## 7.4 Resultados

### 7.4.1 Índice de Condición General

Los resultados del estudio usado para conocer el efecto del transporte y la aclimatación sobre la condición fisiológica de los organismos previo a los experimentos se muestran en la Figura 8. No se observó diferencia significativa ( $F_{2,27} = 0.53$ ;  $P > 0.05$ ) en el ICG de los organismos a través del tiempo de transporte y aclimatación.

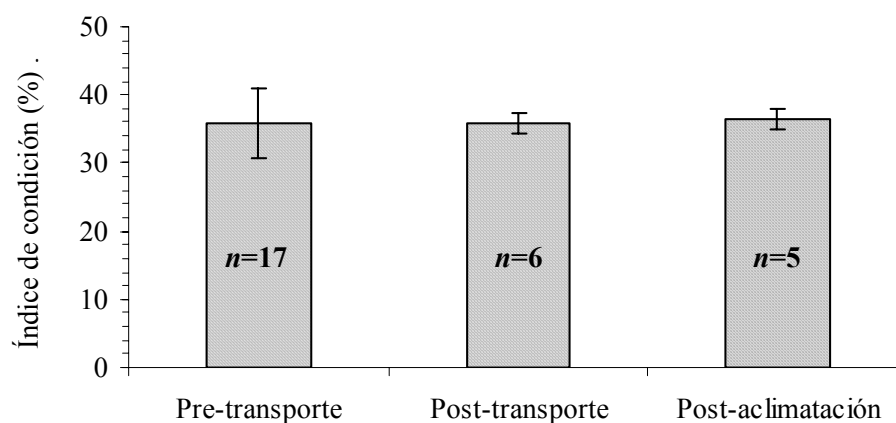


Figura 8. Índice de Condición General de *Nodipecten subnodosus* en tiempos pre-transporte, post-transporte y post-aclimatación. Los resultados son la media  $\pm$  DS.  $n$  es el número de organismos empleados para el análisis.

Los resultados de los diferentes tratamientos térmicos (Figura 9), muestran que durante todo el tiempo experimental solo los organismos de los tratamientos A y D obtuvieron ganancia en el peso húmedo de sus tejidos blandos. Los organismos de los tratamientos restantes (B, C, E y F) mostraron pérdida de peso húmedo de sus tejidos blandos, siendo mayor en los tratamientos B y C para el día 15 y en F para el día 30. En el muestreo del día 30 experimental, se observó que los organismos de los tratamientos

B y C obtuvieron ganancia en el ICG. Solo se observó diferencia estadística entre los tratamientos A y B para el muestreo del día 15 ( $F_{5,29} = 2.819$ ;  $P < 0.05$ ) y entre A y F para el muestreo del día 30 ( $F_{5,29} = 3.405$ ;  $P < 0.05$ ).

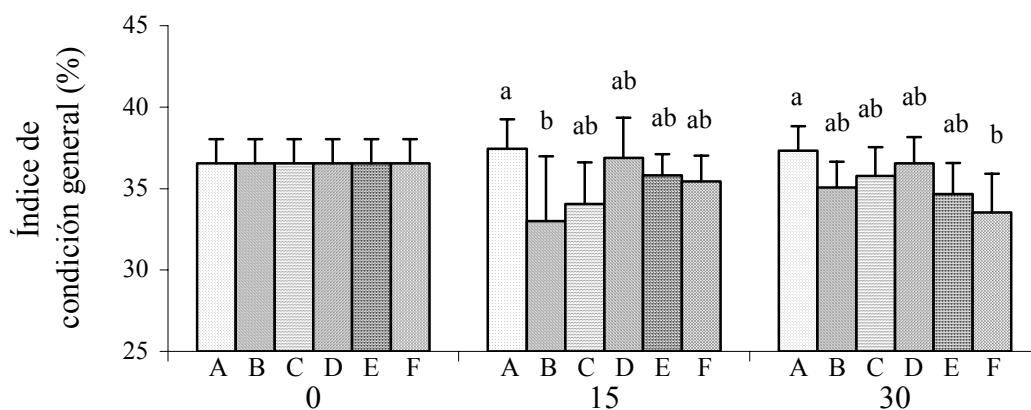


Figura 9. Índice de Condición General de *Nodipecten subnodosus* expuestos a 6 tratamientos térmicos con 3 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media  $\pm$  DS ( $n = 5$ ). ANOVA a los 15 ( $F_{5,29} = 2.819$ ;  $P < 0.05$ ) y 30 días ( $F_{5,29} = 3.405$ ;  $P < 0.05$ ).

#### 7.4.2 Índice Gonadosomático

En la Figura 10 se observa que con excepción del tratamiento C del día 15 experimental, en todos los tratamientos y durante todo el tiempo experimental no se observaron pérdidas de peso en gónada de los organismos con respecto al valor del IG inicial de 1.6. En el muestreo del día 15 se observó que los organismos del tratamiento E presentaron mayor ganancia de IG (3.12), seguido del tratamiento A (2.7). Los organismos de los tratamientos C y D no mostraron incremento de sus valores medios con respecto al IG inicial. En este tiempo experimental solo se observó diferencia significativa entre los tratamientos E y C ( $F_{5,35} = 2.88$ ;  $P = 0.032$ ).

En los resultados del muestreo del día 30 experimental se observó que los tratamientos A y E mostraron pérdida de IG (2.5 y 1.8, respectivamente) en



comparación con el día 15 experimental, en tanto que los organismos del tratamiento C y D mostraron ligero incremento de IG. Los tratamientos B y F no mostraron diferencia entre sus valores con respecto al muestreo del día 15 experimental.

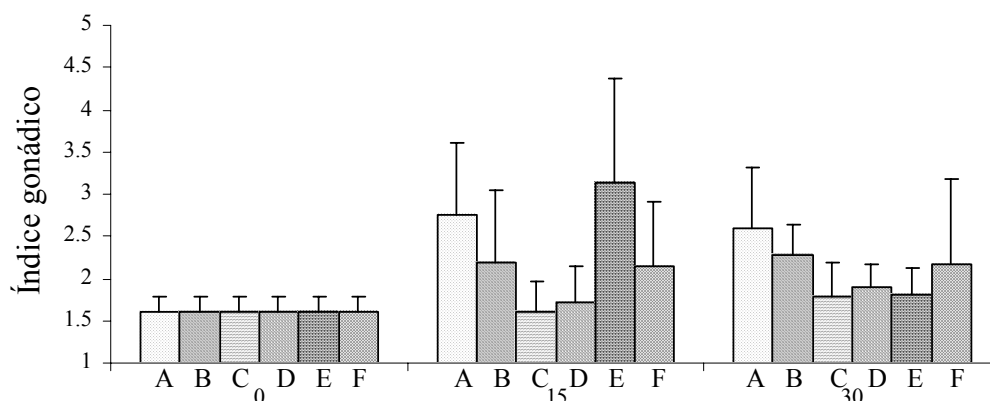


Figura 10. Índice Gonadosomático de *Nodipecten subnodosus* expuestos a 6 tratamientos térmicos con 3 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media  $\pm$  DS ( $n = 5$ ).

#### 7.4.3 Estadios de desarrollo gametogénico

Después del análisis de las muestras de gónada, el ciclo gametogénico se dividió en 6 diferentes estadios los cuales se describen a continuación y se pueden observar en la Figura 11:

Estadio I.- Indiferenciado: Este estadio se caracteriza por poseer abundante tejido conjuntivo; también se observa presencia de algunos fagocitos, poca o nula presencia de tejido folicular, nula presencia de ovogonias, nula presencia de ovocitos.

Estadio II.- Inicial: Este estadio se hacen aparentes los primeros signos de la gametogénesis; se caracteriza por poseer abundante tejido conjuntivo, entre el cual se han formado pequeños folículos con tejido de paredes gruesas, que soportan poca o gran cantidad de ovogonias y también pocos o abundantes ovocitos primarios de talla

homogénea y poca o nula presencia de ovocitos vitelogénicos. Poca o nula presencia de fagocitos.

Estadio III.- Crecimiento: Este estadio se caracteriza por la evidente dominancia de ovocitos previtelogénicos y vitelogénicos de diferentes tamaños, pedunculados a la pared folicular y algunos con forma alargada. Los folículos incrementan su tamaño y sus paredes se vuelven más delgadas. El tejido conjuntivo ínter-folicular se vuelve muy delgado. Existe poca o nula presencia de fagocitos. Existe poco espacio abierto en el lumen folicular.

Estadio IV.- Madurez: Este estadio se caracteriza por poseer folículos completamente llenos con ovocitos vitelogénicos y post-vitelogénicos en tallas homogéneas y formas poliédricas. No se observan espacios en el lumen folicular. El tejido conjuntivo está casi ausente.

Estadio V.- Desove parcial: Este estadio se caracteriza por presentar folículos con espacios abiertos en su lumen y paredes delgadas y rotas en algunos puntos. Se observan abundantes ovocitos vitelogénicos, en su mayoría adheridos a las paredes foliculares y también ovocitos post-vitelogénicos residuales en forma redonda que se encuentran libres en el lumen folicular. Hay presencia de fagocitos. El tejido conjuntivo es poco y disperso.

Estadio VI.- Desove total y reabsorción: Este se caracteriza por presentar una dominancia de tejido folicular roto y residual, se observan pocos ovocitos post-vitelogénicos libres en los folículos en estado de degeneración y lisis; los fagocitos son abundantes.

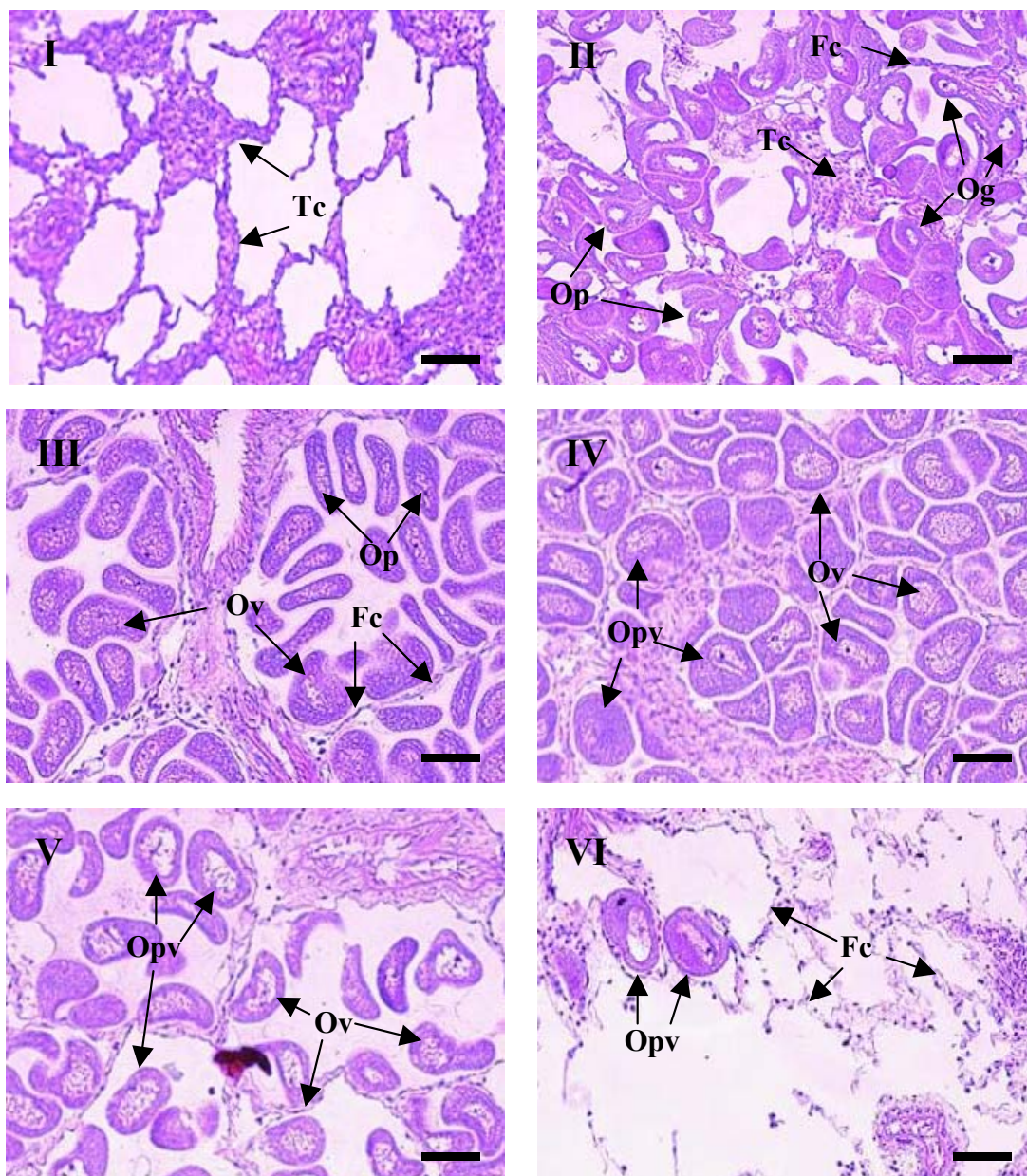


Figura 11. Estadios ovogénicos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. I.- Indiferenciado, II.- Inicial, III.- Crecimiento, IV.- Madurez, V.- Desove parcial y VI.- Desove total y reabsorción. Claves: Tc; tejido conjuntivo, Fc; folículo, Og; ovogonia, Op; ovocito primario, Ov; Ovocito vitelogénico, Opv; Ovocito postvitelogénico. La barra equivale a 50 micras.

#### 7.4.4. Fases de desarrollo gametogénico entre tratamientos térmicos

El efecto de los tratamientos térmicos experimentales sobre las fases de desarrollo gonádico se observa en la Figura 12. En la etapa inicial del experimento, el 80 % de los organismos experimentales se encontraban en el estado indiferenciado y 20 % en gametogénesis inicial.

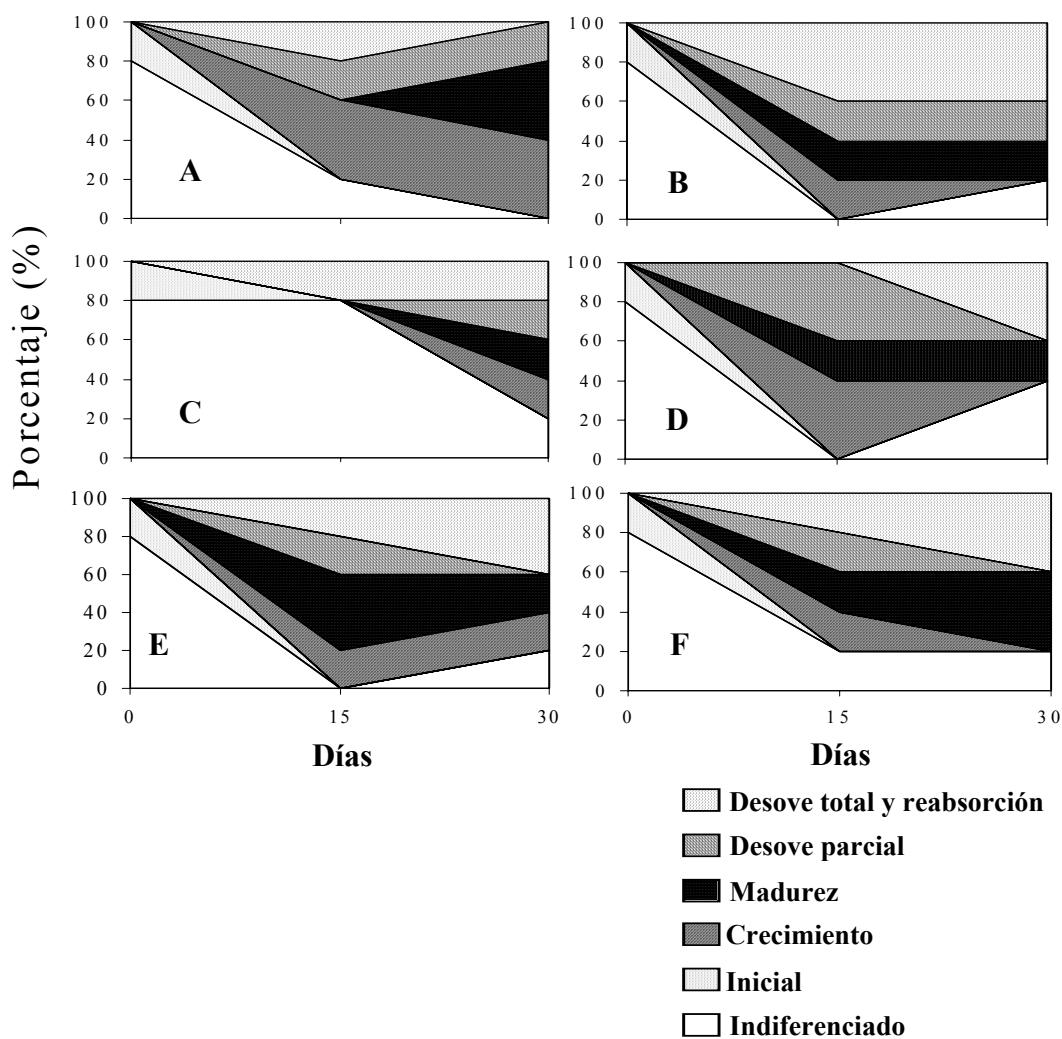


Figura 12. Frecuencia (%) de los estadios de desarrollo ovogénico de *Nodipecten subnodosus* en seis tratamientos térmicos y en 30 días experimentales. La letra mayúscula dentro de cada gráfico representa la clave de la descripción del tratamiento térmico descrito en la metodología.

Para el día 15 experimental, se observó que el 100 % de los organismos de los tratamientos B, D y E presentaban actividad gametogénica. Los tratamientos B y E

presentaron 60 % y 40 % de desoves respectivamente, mientras que el tratamiento D se encontró en gametogénesis avanzada, madurez y desove parcial. Este último tratamiento fue el que presentó mayor sincronía entre sus fases gametogénicas a corto plazo. Los tratamientos A, C y F presentaron organismos con gónadas vacías sin actividad gametogénica, donde el tratamiento C fue el que presentó mayor porcentaje (80 %) en estado indiferenciado. El tratamiento E fue el que presentó mayor porcentaje (40 %) de organismos en estado de madurez. Los tratamientos D y A fueron los que mostraron mayor porcentaje (40 %) en estado de gametogénesis avanzada. El tratamiento B presentó el mayor porcentaje (40 %) en fase de reabsorción de gónada.

Para el día 30 experimental, en la mayoría de los tratamientos térmicos se incrementó el porcentaje de organismos en estado de reabsorción. Los tratamientos A, C y F mostraron un incremento del porcentaje de organismos en estado de madurez con respecto al día 15 experimental, siendo el tratamiento A el que presentó mejores resultados con el 100 % de los organismos en actividad gametogénica y mayor sincronía de sus fases para este tiempo.

#### *7.4.5 Producción de ovocitos*

En la Figura 13 se muestra la cantidad promedio de ovocitos vitelogénicos encontrados en 1 mm<sup>2</sup> de las gónadas de los organismos experimentales. No se muestra el gráfico para el día inicial del experimento (día 0) puesto que al inicio del experimento no se encontraban organismos en fase de madurez gametogénica. Para el día 15 experimental todos los tratamientos térmicos mostraron incremento de la cantidad de ovocitos maduros, con excepción de los organismos del tratamiento C donde no se encontraron organismos en estos estados gametogénicos avanzados. La mayor cantidad de ovocitos fue observada en el tratamiento E con 302 ovocitos/mm<sup>2</sup>, seguido del tratamiento B con 293 ovocitos/mm<sup>2</sup>. En los tratamientos D y F se observaron menores cantidades con 196 y 200 ovocitos/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Para este tiempo fueron notables las diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $F_{5,41} = 35.249$ ;  $P < 0.001$ ). En el día 30 experimental se observó una caída cercana al 20 % de la cantidad de ovocitos en los tratamientos B y E, además de un 10 % en el tratamiento A. De manera contraria, los tratamientos C, D y F incrementaron sus cantidades. Para este tiempo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

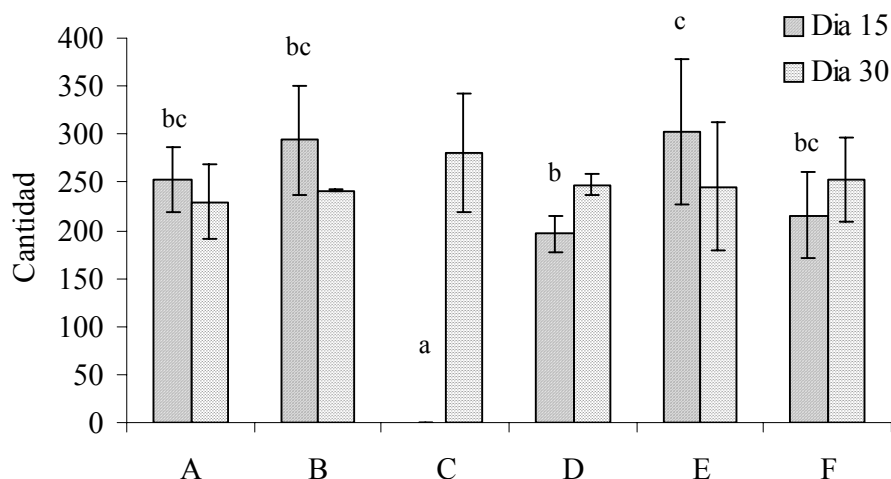


Figura 13. Cantidad de ovocitos producidos en 1 mm<sup>2</sup> de gónada en fases de crecimiento y madurez gametogénica de *Nodipecten subnodosus*, bajo 6 tratamientos térmicos a los 15 y 30 días experimentales. Los datos son la media  $\pm$  DS y ANOVA del día 15 ( $F_{5,41} = 35.249$ ;  $P < 0.001$ ).

#### 7.4.6 Diámetro teórico de ovocitos vitelogénicos

En los resultados del área promedio de ovocitos por tratamiento térmico experimental (Figura 14) se observaron diferencias significativas ( $F_{5,649} = 449.3$ ;  $P < 0.001$ ) entre ellos. El tratamiento D presentó el mayor diámetro teórico entre sus ovocitos vitelogénicos alcanzando talla media de 45.19  $\mu\text{m}$ , seguido del tratamiento F con 42.4  $\mu\text{m}$ , mientras que los tratamientos A, B y E se mantuvieron en alrededor de 37.7  $\mu\text{m}$  en promedio. El tratamiento C no obtuvo ningún valor para el tiempo del día 15 por no presentar organismos en estado gametogénico en crecimiento o madurez. Para el día 30 experimental hubo ganancia en el diámetro de todos los tratamientos, donde el tratamiento D describió nuevamente el mayor diámetro de ovocitos (46.1  $\mu\text{m}$ ). El tratamiento A mostró mayor ganancia con respecto a los tratamientos restantes, incrementando su valor hasta 45.2  $\mu\text{m}$  seguido del tratamiento B y E. Para este tiempo, el menor valor fue producido por el tratamiento C con 41  $\mu\text{m}$  de diámetro siendo estadísticamente diferente ( $F_{5,599} = 8.309$ ;  $P < 0.001$ ) del tratamiento D

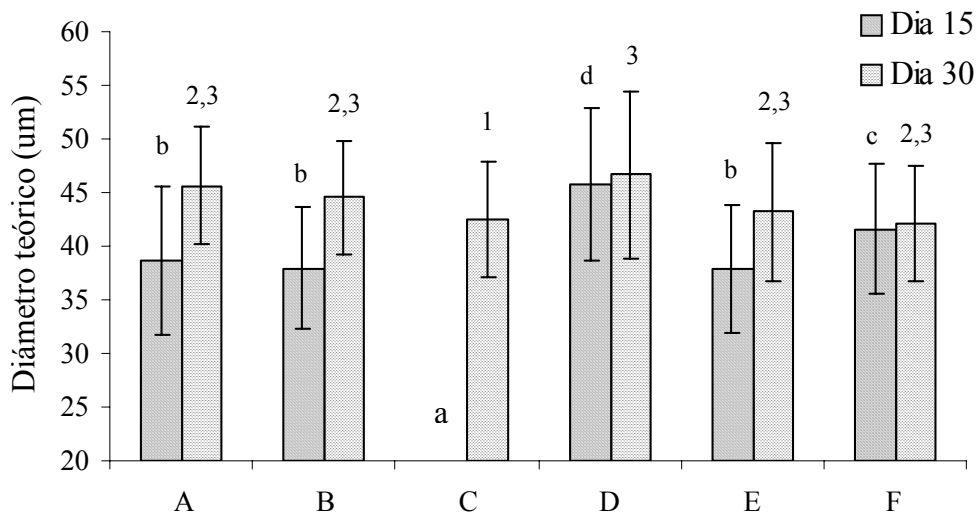


Figura 14. Diámetro teórico de ovocitos vitelogénicos *Nodipecten subnodosus* bajo 6 tratamientos térmicos en 15 y 30 días experimentales. Los puntos son la media  $\pm$  DS y ANOVA para día 15 (superíndices con letra;  $F_{5,649} = 449.3$ ;  $P < 0.001$ ) y día 30 (superíndices con número;  $F_{5,599} = 8.309$ ;  $P < 0.001$ ).

## 7.5 Discusión

El desarrollo reproductivo para el día 15 fue más rápido en el tratamiento de temperatura estable más alta (tratamiento B) y en los tratamientos oscilantes de baja amplitud en baja temperatura (tratamientos D y E). Sin embargo, el tratamiento D presentó mayor sincronía de desarrollo con respecto a los demás tratamientos a los 15 días experimentales. Robles-Mungaray (2001), y Gutiérrez-Villaseñor y Chi-Barragán (1997) reportan haber observado mayor eficiencia del acondicionamiento reproductivo de esta especie cuando la temperatura se incrementa gradualmente. Esto puede tener relación con lo descrito anteriormente para los tratamientos D y E, donde existe una aportación gradual de temperatura al acondicionamiento. Estos datos coinciden con el comportamiento de *P. mazatlanica* reportados por Saucedo-Lastra (2001), en donde el régimen de temperatura estable a 24 °C y el régimen de temperatura ascendente, favorecieron en mayor proporción de organismos maduros, mayor número y tamaño de ovocitos postvitelogénicos, así como los mayores índices gonádicos.

El tratamiento C con oscilación térmica de alta amplitud fue el que presentó los menores valores en todos los aspectos evaluados en este estudio a los 15 y 30 días experimentales. En el tiempo 15 experimental se observó la fase de reabsorción de gónada sin presentarse sincronía entre la fase incipiente y la mencionada, probablemente porque la influencia de la temperatura oscilante en alta amplitud conduce a la rápida maduración y expulsión de ovocitos de los organismos en estado gametogénico inicial provenientes del tiempo 0 experimental. Maeda-Martínez (2003) indica que ejemplares de *N. subnodosus* con gónadas en fase inicial de madurez sujetos a temperaturas fluctuantes ( $23 \pm 5$  °C en 24 h) en laboratorio, desovaron masivamente a los 16 días de iniciado el experimento, más no los mantenidos a temperatura estable (23 °C).

El desarrollo reproductivo en el tratamiento A con temperatura constante fue el más lento, pero a largo plazo (30 días) fue el que presentó mayor desarrollo gonádico, mayor sincronía en sus fases gametogénicas y mayor cantidad de ovocitos. Martínez y Pérez (2003) estudiaron el efecto de temperaturas estables (15 °C), ascendente (de 15 a 19 °C) y descendente (de 19 a 15 °C) en *A. purpuratus*. Ellos encontraron que los organismos mantenidos a temperaturas estables mostraron mayor porcentaje de desove



y los más altos valores del IG, mientras que el grupo que se sometió a temperatura creciente, mostró mayor variabilidad en el patrón de crecimiento.

El ICG en bivalvos es a menudo analizado para proveer estimados de factores como calidad del tejido y su rendimiento, así también se han utilizado en estudios para mostrar si los organismos son afectados por contaminación ambiental (Lawrence y Scout, 1982). En muchos pectínidos de regiones subtropicales como *Argopecten circularis*, el ICG está influenciado notablemente por el desarrollo gametogénico y la temperatura. Se atribuye que la disminución estacional de la temperatura es favorable para la transferencia de energía utilizada en el desarrollo gametogénico (Villalejo-Fuerte y Ceballos-Vázquez, 1996).

Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos térmicos en baja temperatura (estables u oscilantes de baja amplitud) como los tratamientos A y D pueden contribuir en el incremento del ICG de los organismos, en tanto que las temperaturas altas (arriba del óptimo 22 °C) y oscilantes de alta amplitud, como el tratamiento B y C, pueden contribuir en pérdida de peso húmedo de tejido o inestabilidad de este índice.

En este estudio, el incremento del ICG puede estar relacionado con la acumulación de nutrientes en los tejidos; la pérdida puede originarse de un gasto metabólico por compensación térmica o por liberación de energía en desoves, esto último en el día 30 experimental, donde se observaron organismos en estado gametogénico de desove parcial y reabsorción en la mayoría de los tratamientos térmicos lo cual puede estar muy relacionado a desoves muy ligeros y continuos (aquí denominados “desoves tenues”). Tenues inobservable gráciles

La ganancia en peso de la gónada parece estar relacionada con temperaturas estables intermedias, mientras que las temperaturas oscilantes de alta o baja amplitud conducen al crecimiento lento de la misma. Sin embargo, los pulsos térmicos contribuyeron a un mayor IG a corto plazo, tal como se presentaron en los resultados de este índice de la Figura 10.

La rapidez del ciclo gametogénico parece ser muy afectada con temperaturas altas y estables (tratamiento B), u oscilantes de baja amplitud en baja temperatura como los tratamientos D y E, puesto que en éstos se observaron organismos en estado de desove parcial y en estado de reabsorción para el día 15 experimental. Las oscilaciones

---

térmicas de alta amplitud (tratamiento C) mostraron que hay contribución en el letargo del desarrollo gametogénico. La producción de mayor cantidad de ovocitos parece estar relacionada con la exposición a temperaturas altas, tal como resultó en los tratamientos estables y de pulso térmico (B y E), dado que los valores menores de ovocitos en gónada fueron observados en las temperaturas bajas (estables y oscilantes) de los tratamientos D y F.

El crecimiento de los ovocitos en tamaño parece estar más relacionado con las temperaturas oscilantes de baja amplitud (D y F), pues se observó que estos tratamientos aun cuando presentaron menor cantidad de ovocitos vitelogénicos, éstos fueron de mayor diámetro comparado con los otros tratamientos. Rodríguez-Jaramillo *et al.* (2001) demostró en el callo de hacha *Atrina maura* que la rapidez con que ocurre el desove espontáneo en organismos madurados en el laboratorio, no necesariamente indica las condiciones óptimas de maduración en cuanto a la calidad de los gametos obtenidos. Ellos encontraron que el desarrollo reproductivo es más rápido a las temperaturas más altas (25 y 30 °C) en comparación con la más baja (20 °C). Sin embargo, los ovocitos madurados a altas temperaturas presentaron atresias y menor cantidad de vitelo que los madurados a 20 °C.

Estos resultados pueden indicar que para obtener mayor sincronía de desarrollo gametogénico a corto plazo, es necesario realizar combinaciones entre oscilaciones térmicas de baja amplitud y temperaturas estables por debajo o muy cercanas al óptimo.

## 7.6 Conclusiones

Los tratamientos térmicos con régimen de alta temperatura pueden contribuir en pérdida del ICG, rápido crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico pero asincrónico, alta producción de ovocitos pero con bajo crecimiento de los mismos.

Los tratamientos térmicos con oscilaciones térmicas de baja amplitud, pueden contribuir en incrementar el ICG, lento crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico con sincronía, baja producción de ovocitos pero con alto crecimiento de los mismos.

Las oscilaciones térmicas de alta amplitud pueden contribuir en fuertes pérdidas en los valores del ICG, así como de calidad en el desarrollo reproductivo.

La estabilidad térmica de baja temperatura puede contribuir a largo plazo en altos valores de calidad en el desarrollo reproductivo, mientras que los tratamientos combinados de estabilidad y oscilación térmica de baja amplitud pueden contribuir en corto plazo.

---

## VIII. NIVELES DE MONOAMINAS EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN *NODIPECTEN SUBNODOSUS* BAJO DIFERENTES ESTADOS DE DESARROLLO REPRODUCTIVO.

### 8.1 Introducción

El rol de los neurotransmisores en el proceso reproductivo de moluscos de importancia comercial es un tema que ha llamado la atención a muchos investigadores con fines de beneficio para la acuicultura. Sin embargo, el rol de las neurosecreciones en moluscos bivalvos ha sido pobremente entendido en comparación con algunos otros grupos de invertebrados. Muchas tendencias y contradicciones se han presentado en los resultados de diferentes especies de bivalvos; por ejemplo, Osada y Nomura (1989) reportaron que los niveles de DA en el sistema nervioso central de *P. yessoensis* no cambiaron durante todo ciclo reproductivo. Por otra parte, Stefano y Capatane (1977) reportaron que los niveles en el sistema nervioso de *M. edulis* cambian durante el ciclo reproductivo, siendo menores durante la gametogénesis. Contrario a esto último, Paulet *et al.* (1993) reportan que en *Pecten maximus* estos niveles se incrementan durante el mismo periodo, y otro resultado similar fue reportado por Martínez y Rivera (1994) en *A. purpuratus*.

Una tendencia generalizada de los niveles de monoaminas en diversos órganos, es similar a lo reportado por Khotimchenko y Deridovich (1991) donde mencionan que los niveles de 5-HT y DA en los ganglios de *Patinopecten yessoensis* mostraron ser más bajos durante la mínima actividad gametogénica, posteriormente se incrementa durante la gametogénesis obteniendo los máximos en la etapa de madurez, para caer abruptamente en el instante de desove. Otros autores que coinciden con esta dinámica son: Osada y Nomura (1989a) en *P. yessoensis*, Osada y Nomura (1989b) en *Crassostrea gigas* y Martínez y Rivera (1994) en *A. purpuratus*.

La función exacta de las monoaminas en la reproducción de bivalvos no es bien conocida, pero los diversos estudios brindan evidencia de que están involucradas en este proceso (Smith y Croll, 1997). Se cree que las diferencias observadas en los resultados de los niveles y tendencias de las monoaminas de distintas especies y poblaciones, pueden ser debidas no solo a los factores ambientales, sino también a diferencias

fisiológicas (gonocóricos o hermafroditas) y de estrategias reproductivas que dependen de las variaciones interanuales, latitudinales y genéticas.

En la almeja mano de león no se han realizado estudios relacionados con los factores neuroendocrinos que regulan el proceso reproductivo de la especie, por tanto, es importante expandir dichos estudios para tener mayor conocimiento de la especie en este proceso. Además, este tipo de investigaciones son prometedores para la acuicultura por el posible entendimiento de métodos y técnicas de manipulación fisiológica de organismos en cautiverio.

## 8.2 Objetivo

Identificar y cuantificar los niveles de monoaminas en diversos tejidos de *N. subnodosus*, bajo diferentes estadios de desarrollo gametogénico.

## 8.3 Materiales y métodos

En mayo del 2007, ejemplares adultos ( $90 \pm 20$  mm de altura de valvas) de la almeja mano de león fueron recolectados de Laguna Guerrero Negro, Baja California, México ( $28^{\circ} 01' N$ ;  $114^{\circ} 11' W$ ) (Sección 6.1). En esta época se pueden encontrar organismos en diferentes estados reproductivos (Arellano-Martínez, 2005). Los ejemplares fueron transportados mediante el método húmedo tipo rosario (Sección 6.2.2), al laboratorio de ecofisiología del CIBNOR en La Paz, B.C.S. donde fueron recibidos en 6 tanques de 120 L en condiciones de flujo continuo con agua marina filtrada a  $20 \mu\text{m}$ , temperatura de  $18^{\circ}\text{C}$ , aireación constante, 38 ups y alimentación continua de  $3 \times 10^9$  cel/org/día de *Isochrysis galbana*. Posteriormente, se inició su aclimatación térmica, la cual consistió en elevar la temperatura del agua marina un grado centígrado por día hasta llegar a los  $21^{\circ}\text{C}$ , en la cual fueron mantenidos para los posteriores experimentos.

### 8.3.1 Diseño experimental

Los organismos de los tanques fueron seleccionados y separados en grupos de acuerdo a su estado de desarrollo gonádico, evaluado con observación visual bajo la escala macroscópica reportada por Ramírez-Castillo (2003) y en complementación con la escala establecida en el Capítulo 7. Primeramente se formaron 4 grupos en fases

gonádicas de: incipiente, inicial, en crecimiento y avanzado (estadios I, II, III y V según Ramírez-Castillo, 2003). También, otros organismos en estado reproductivo avanzado (misma escala anteriormente mencionada) fueron separados e inducidos a desove mediante la adición de gametos, obteniendo dos grupos más de estados reproductivos: el de desove parcial y desove total.

Seis organismos de cada uno de los grupos fueron disectados para tomar muestras de branquias, manto, hepatopáncreas, músculo abductor, gónada femenina, gónada masculina y pie. A cada una de las muestras se le realizó la extracción y el análisis de monoaminas (NE, DA, 5-HT e ISP-L) (Sección 6.6).

### 8.3.2 *Análisis de resultados*

Análisis de varianza de una vía fueron aplicados para conocer si existían diferencias significativas entre las concentraciones de monoaminas en diferentes estados de desarrollo reproductivo. En caso de encontrar diferencia significativa a un nivel de  $P < 0.05$ , se usó una prueba *a posteriori* de Tukey para discriminar entre tratamientos.

#### 8.4 Resultados

La Figura 15 contiene los resultados concentrados del presente estudio y los resultados descritos en el presente capítulo estarán referidos a dicha figura. De manera generalizada, las concentraciones de las monoaminas de casi todos los órganos estudiados siguieron un patrón general de incremento durante los estadios reproductivos tempranos (estadios I a IV), alcanzando sus máximos valores en el estadio de madurez, para posteriormente caer durante el periodo de desove (estadios V y VI). La 5-HT en el músculo abductor fue único caso en donde se observó una dinámica inversa al patrón general observado durante los estadios reproductivos tempranos, observándose un incremento de la concentración en el estadio reproductivo inicial (estadio II), con una posterior caída gradual durante los siguientes estadios. Otro caso diferente al patrón general fue el observado con el ISP-L en gónada femenina y (en menor proporción) en gónada masculina, al presentarse en mayores concentraciones durante el estadio reproductivo de desove parcial.

La NE fue la monoamina más concentrada en los diferentes órganos estudiados en la almeja mano de león, observándose su máximo valor de 21.8 ng/mg en el tejido del manto durante el estadio reproductivo de madurez. Altas concentraciones de NE fueron observadas en gónada femenina, branquias, manto y pie. Con excepción de gónada masculina, la NE mostró un patrón general de incremento en los estadios reproductivos tempranos, posteriormente la concentración decrece en el momento del desove. Las más altas concentraciones de DA fueron observadas en branquias y el hepatopáncreas alcanzando valores de 11.4 ng/mg en el estadio reproductivo de madurez. Similar a la NE, la DA mostró un patrón de incremento en gónada femenina, hepatopáncreas, branquias y pie, desde los estadios reproductivos tempranos hasta la madurez, para posteriormente caer durante el desove. El ISP-L fue observado en altas concentraciones casi exclusivamente en el tejido de gónada femenina. Sus niveles se incrementaron con la ovogénesis y alcanzaron el mayor valor durante el estadio de desove parcial con 10 ng/mg de concentración y posteriormente cae durante la fase de desove total. Con excepción del tejido de gónada femenina y el estadio de desove de gónada masculina, el ISP-L fue observado a concentraciones menores de 0.3 ng/mg en al menos un estadio reproductivo de todos los órganos de la almeja mano de león.

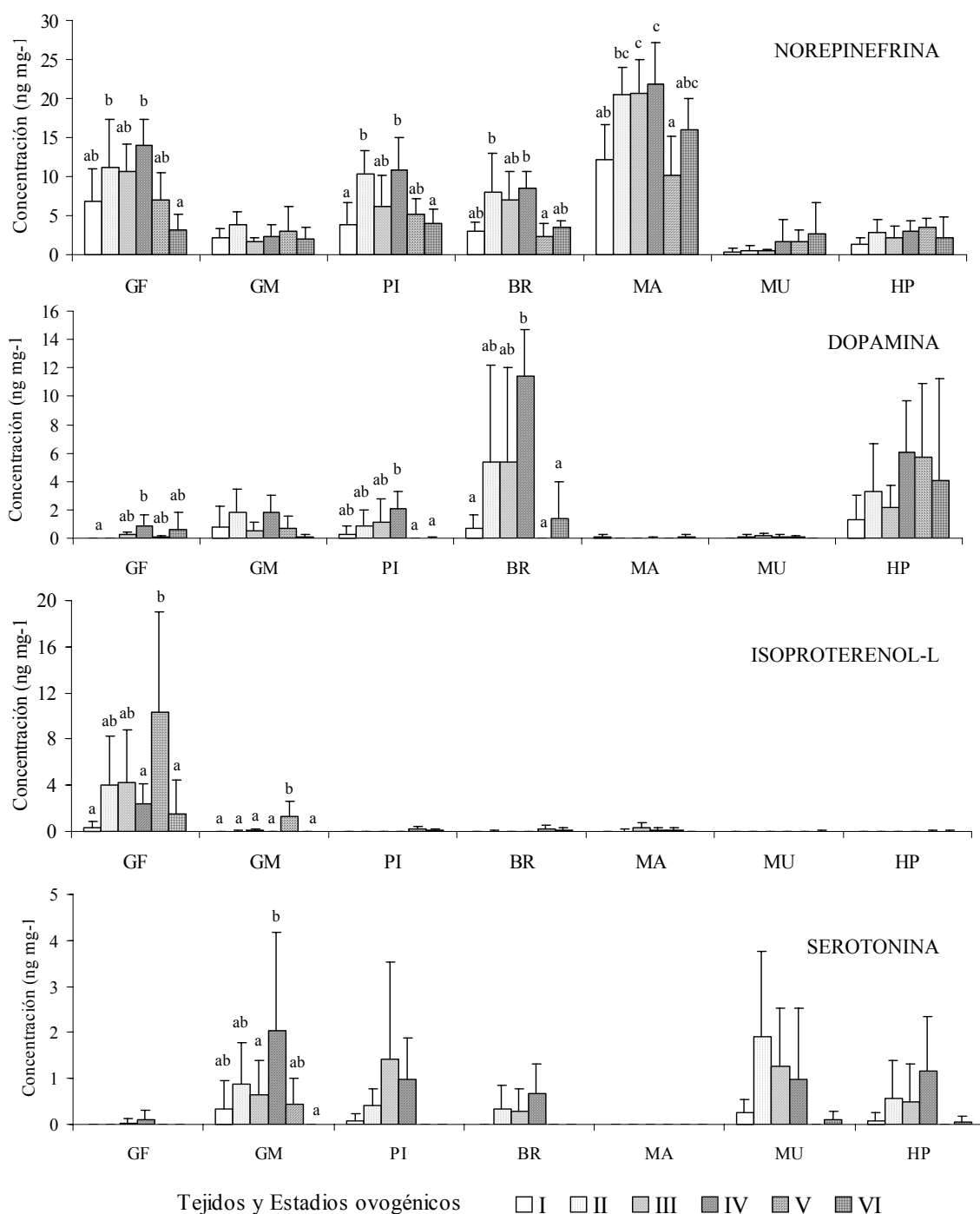


Figura 15. Concentraciones de monoaminas en gónada femenina (GF); gónada masculina (GM); pie (PI); branquia (BR); manto (MA); músculo abductor estriado (MU) y hepatopáncreas (HP), de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* bajo diferentes estadios gametogénicos: I = indiferenciado, II = inicial, III = crecimiento, IV = madurez, V = desove parcial y VI = desove total. Las barras indican la media  $\pm$  DS.  $n = 6$ . Las letras diferentes (a, b ó c) indican diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre diferentes estadios reproductivos.



La 5-HT fue encontrada a más bajas concentraciones que la NE, DA e ISP-L, presentando valores máximos de 2 ng/mg en gónada masculina durante el estadio reproductivo de madurez, seguido en concentración por los tejidos del músculo abductor, pie, hepatopáncreas y branquias. La 5-HT fue encontrada a muy bajas concentraciones en gónada femenina (menor a 0.1 ng/mg), mientras que en el manto no fue detectada. Con excepción del músculo abductor, el cual mostró el más alto contenido de 5-HT en la etapa reproductiva número II, las concentraciones de 5-HT siguieron el mismo patrón general anteriormente mencionado para la NE y DA.

En el tejido de gónada femenina se detectó mayor cantidad de NE, ISP-L y DA respectivamente, mientras que la 5-HT mostró casi nula presencia en este tejido. La NE y DA presentaron una dinámica similar al patrón general descrito anteriormente, observándose las menores concentraciones en los estadios de desove e indiferenciado y las mayores (14 y 0.9 ng/mg PST respectivamente) en el periodo de gametogénesis, en tanto que el ISP-L, presentó una dinámica diferente al patrón general, con un incremento significativo ( $F_{5,35} = 3.26$ ;  $P < 0.05$ ) de la concentración hasta 10.3 ng/mg PST durante el estadio de desove parcial y una abrupta caída en el desove total.

En gónada masculina se observó la presencia de las cuatro monoaminas estudiadas. La NE y DA fueron detectadas en todos los estadios reproductivos (sin diferencias significativas entre estadios), a bajas concentraciones con respecto a otros órganos. La 5-HT también presentó el patrón de dinámica general, sufriendo un incremento significativo de la concentración en el estadio de madurez, por arriba de los 2 ng/mg y posteriormente una caída durante el periodo de desove, no detectándose en el estadio final. Por otra parte, el ISP-L fue detectado en los estados de producción gametogénica a concentraciones más bajas de 0.1 ng/mg PST y solo se encontró un significativo incremento ( $F_{5,35} = 5.60$ ;  $P = 0.001$ ) en el estadio de desove parcial con 1.2 ng/mg PST.

En el hepatopáncreas se detectó presencia y mayor cantidad de DA, NE, 5-HT e ISP-L de forma respectiva. La DA y NE se midieron en todos los estados reproductivos sin mostrar variabilidad significativa entre estadios, con concentraciones máximas de 6 y 3.5 ng/mg PST durante los estadios de madures y desove parcial respectivamente. La 5-HT en este órgano mostró una dinámica similar al patrón general, incrementándose la

concentración por arriba de 1 ng/mg PST en el estadio de madurez con una posterior caída durante el periodo del desove. El ISP-L solo fue medido en el periodo del desove en concentraciones más abajo de 0.05 ng/mg PST.

En tejido del músculo abductor estriado se detectó presencia y mayor concentración de NE y 5-HT, con valores aproximados de 2.6 y 1 ng/mg PST respectivamente. Por otra parte, las concentraciones de DA e ISP-L, fueron casi nulas con valores menores a 0.2 ng/mg PST. La dinámica de la 5-HT en este órgano fue contraria al patrón general, registrándose el incremento de su concentración durante estadio gametogénico inicial y cayendo ligeramente sin diferencia estadística durante los estadios posteriores.

En tejido de las branquias se detectó presencia y mayor cantidad de DA, NE, 5-HT e ISP-L respectivamente. La dinámica de las primeras 3 monoaminas fue similar al patrón general, con concentraciones máximas de 11.3, 8.4 y 0.7 ng/mg PST respectivamente, las cuales fueron detectadas en el estadio de madurez y con una posterior caída en el periodo de desove. El ISP-L se detectó a concentraciones por debajo de 0.02 ng/mg PST con mayor representación en el periodo de desove.

En tejido del manto, la NE fue la monoamina representativa de este órgano y mostró las más altas concentraciones de todos los tejidos estudiados y la mayor concentración detectada de 21.9 ng/mg PST en el estadio de madurez. La menor concentración fue detectada en el estadio de desove parcial con un valor de 10 ng/mg PST. La DA, 5-HT e ISP-L mostraron casi nula presencia en este órgano.

En tejido del pie, la NE, DA y 5-HT mostraron una dinámica similar al patrón general, incrementándose las concentraciones durante el periodo de gametogénesis y con una posterior caída el periodo de desove. Las mayores concentraciones obtenidas para NE y DA fueron de aproximadamente 10.8 y 2 ng/mg PST respectivamente en el estadio de madurez, en tanto que la mayor concentración de 5-HT fue de 1.4 ng/mg PST en el estadio reproductivo de crecimiento (estadio III). ISP-L tuvo baja incidencia detectándose en concentraciones menores de 0.2 ng/mg PST durante el periodo de desove.

## 8.5 Discusión

En gónada de *N. subnodosus* se detectó la presencia de monoaminas específicas (de forma casi exclusiva) para cada género sexual. Es decir, NE e ISP-L fueron las monoaminas más abundantes encontradas en gónada femenina, mientras que la 5-HT fue la más abundante en gónada masculina. También se observó que estas monoaminas fueron acumuladas, en su respectiva porción de gónada, durante los estadios de producción gametogénica (estadios I a VI) y después decrecieron durante el periodo del desove (estadios V y VI). Para el caso exclusivo del ISP-L, esta monoamina presentó, además, otro incremento de su concentración durante el periodo de desove parcial, para después disminuir durante el periodo del desove total.

La mayoría de los estudios relacionados con la observación de monoaminas en gónada de bivalvos se han enfocado a estudiar solo la 5-HT, y sugieren una estrecha relación de ésta con la producción y desove de gametos masculinos y femeninos (Croll *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1996; Masseau, *et al.*, 2002). Sin embargo, son pocos los estudios con las otras monoaminas, además la mayoría de las especies estudiadas son gonocóricas. Esto refleja la necesidad de estudios más amplios y que se realicen en especies hermafroditas funcionales. En este sentido, *A. purpuratus* es una especie hermafrodita funcional en la cual Martínez y Rivera (1994) reportaron la presencia 5-HT, DA y NE en ambas porciones sexuales de la gónada, presentándose mayores concentraciones en gónada masculina con respecto a la femenina. En esta especie no encontró una diferencia inversa de las concentraciones entre 5-HT y NE para cada género de la gónada, como lo observado en *N. subnodosus*, sin embargo, sí se reportó que durante el periodo de recuperación (producción) gametogénica de esta especie, la 5-HT se incrementó en la porción masculina, mientras que en la porción femenina, solo sufrió un incremento al inicio de la recuperación y posteriormente se mantuvo estable. Por otra parte, la NE detectada en gónada macho sufrió un decremento durante este periodo de recuperación gametogénica, mientras que en la gónada femenina, esta monoamina (aunque en menor concentración que la 5-HT) sufrió un incremento gradual durante el mismo periodo. Esto sugiere, que *N. subnodosus*, siendo una especie hermafrodita funcional, puede estar utilizando diferentes neurotransmisores, de forma específica, en la producción de gametos y el desove para cada género sexual.

En muchos estudios se han observado pero no identificado diferentes factores de origen neural relacionados con los procesos reproductivos. Mathieu *et al.* (1992) demostraron que el extracto del ganglio cerebro-pleural estimula la mitosis *in vitro* en la gónada de *M. edulis*, el factor activo solo fue identificado como un péptido con peso molecular < 5000 Da. También Sato *et al.* (1985) y Lubet (1994) han reportado un factor que controla la maduración de ovocitos en la almeja *Spisula sp.* pero tampoco lo identificaron. En el presente estudio se encontró que el ISP-L está muy relacionado (casi de manera exclusiva) a la actividad gametogénica de la gónada femenina, así como en el proceso del tiempo inicial del desove. Este agente aun no se encuentra bien identificado, sin embargo, el hecho de haberlo detectado por medio del HPLC-ED en el mismo tiempo de retención que el químico ISP, demuestra que pertenece a la familia de las monoaminas y justifica su gran parecido a esta monoamina. Este hecho es de gran relevancia pues abre el campo de estudio, por medio del químico ISP, en la reproducción en bivalvos.

El uso de HPLC con detección electroquímica fue una buena herramienta para la cuantificación de monoaminas en *N. subnodosus*. Las concentraciones de monoaminas detectadas en el presente trabajo se encuentran entre los rangos previamente reportados para los mismos órganos en otras especies de bivalvos (Smith, 1982; Osada y Nomura, 1989a,b; Martínez y Rivera, 1994; Pani y Croll, 1995). Las diferencias con algunas fuentes son debidas, a que la mayoría de los otros estudios fueron referidos con base al peso húmedo de tejido, sin embargo, los reportes en bases de peso seco de tejido son preferibles, como lo utilizado en este trabajo. El agua representa una gran proporción del peso de los tejidos húmedos en moluscos y éste es altamente variable durante la vida de los organismos (Lucas y Benninger, 1985; Pazos *et al.*, 1997), por tanto, las concentraciones de nutrientes y otros químicos (ej. monoaminas) en tejidos son mejor expresados en bases de peso seco de tejido. En general, las concentraciones de monoaminas reportadas en el presente estudio, presentan relativamente fuertes variaciones inter-individuales, sin embargo, se ha observado, que también ha ocurrido en otras especies reportadas anteriormente (Martínez y Rivera, 1994; Pani y Croll, 1995; Masseau *et al.*, 2002).

En el músculo abductor de *N. subnodosus*, la 5-HT (< 1.91 ng/mg PST) y la NE (< 2.65 ng/mg PST) fueron las más abundantes monoaminas y la DA fue detectada a

más bajas concentraciones ( $< 0.15$  ng/mg). Esto es opuesto a lo reportado en el músculo abductor de *P. magellanicus*, donde la DA fue el más abundante neurotransmisor (0.4 ng/mg de peso húmedo) seguido por NE ( $< 0.3$  ng/mg de peso húmedo) y 5-HT (0.12 ng/mg de peso húmedo) (Pani y Croll, 1995). Esta diferencia puede ser debida en parte a las diferencias inter-específicas en la utilización de las monoaminas por especie.

Desde otra perspectiva, las concentraciones de NE y DA detectadas en el presente estudio, fueron relativamente menores en comparación con otros órganos de este mismo estudio, solo la 5-HT mostró una mayor cantidad con respecto a los otros órganos. Croll *et al.* (1995) reportan que el músculo abductor de *P. magellanicus*, presentó pocas fibras inmunoreactivas para las monoaminas, y en consecuencia, poca cantidad de las mismas. Esto puede explicar el hecho de que no se observaron grandes cantidades de NE y DA en relación con otros órganos en el presente estudio. La mayor presencia (relativa con otros órganos) de 5-HT y su dinámica de producción y utilización, inversa al patrón general observado para el ciclo reproductivo en esta especie, ayuda a establecer la hipótesis que esta monoamina puede estar implicada en el proceso de movilización de energía para la reproducción.

La NE y DA (con máximos de 8.44 y 11.39 ng/mg, respectivamente) fueron los más abundantes neurotransmisores en branquias de *N. subnodosus*, seguidos por 5-HT (0.67 ng/mg). Esto es similar a las concentraciones encontradas en las branquias del pectínido *P. magellanicus* (Pani y Croll, 1995) y es opuesto a lo observado en las branquias de *A. purpuratus*, donde la 5-HT fue la más abundante monoamina, seguido de DA y NE (Martínez y Rivera, 1994). Las branquias en *Mytilus edulis* están inervadas por fibras procedentes del ganglio visceral y han encontrado presencia de 5-HT (Aiello, 1962; Gosselin *et al.*, 1962) DA (Malanga *et al.*, 1972) y NE (Burell y Stefano, 1983), citados por Stefano (1990). Se menciona que la 5-HT está involucrada en el control de la actividad ciliar en branquias y palpos labiales (Catapane, 1983; Benninger y Le Pennec, 1991; Smith y Croll, 1997). Por otra parte, las concentraciones de DA (mayor a 1.5 ng/mg de peso húmedo) en branquias del ostión *C. gigas* y el pectínido *P. yessoensis* fueron 10 veces más altos que la concentración de NE (menor a 0.2 ng/mg de peso húmedo) y no se observaron diferencias significativas de las concentraciones en relación a los diferentes periodos reproductivos (Osada y Nomura, 1989a,b). Los patrones de producción y utilización de NE y DA fueron muy similares a *N.*

*subnodosus*, incrementándose en los estadios reproductivos tempranos y cayendo en el periodo de desove.

La NE fue el único neurotransmisor detectado en tejido del manto de *N. subnodosus*, sin embargo, este neurotransmisor presentó las más altas concentraciones (mayor a 10 ng/mg) detectados en todos los órganos y todos los estadios reproductivos del presente estudio. En el tejido del manto de *P. magellanicus*, la DA (0.3 ng/mg de peso húmedo) fue la monoamina más abundante seguido por NE (0.3 ng/mg de peso húmedo) (Pani y Croll, 1995). El patrón de producción y utilización de los neurotransmisores en el manto de *N. subnodosus* fue similar al observado en las branquias.

Con excepción de la 5-HT en músculo abductor estriado, las concentraciones de monoaminas en todos los órganos estudiados de *N. subnodosus*, mostraron una dinámica general de incremento durante los estadios reproductivos iniciales (estadios I a IV) y seguidos por una caída posterior al inicio del desove (estadio V y VI). Este patrón también ha sido observado en otras especies de bivalvos como *P. yessoensis*, *C. gigas*, *A. purpuratus*, entre otros (Osada y Nomura, 1989a,b; Martínez y Rivera, 1994; Martínez *et al.*, 1996). Pani y Croll (1995) también reportan amplia distribución de monoaminas en casi todos los órganos del pectínido *P. magellanicus* y mencionan que su función específica no es bien clara aún, pero intervienen en numerosas funciones fisiológicas. Ante esto, las monoaminas se han relacionadas con diferentes funciones como; la reiniciación de la meiosis de los ovocitos en bivalvos (Guerrier *et al.*, 1993), control del movimiento ciliar (Beiras y Widdows, 1995; Carroll y Catapane, 2007), modulación del ritmo cardíaco (Yamagishi *et al.*, 2004), en el incremento del metabolismo de carbohidratos como energía para el proceso gametogénico (Román *et al.*, 2001) y muy ampliamente reconocidos en la inducción al desove (Fong *et al.*, 1996; Velazco *et al.*, 2007). Además, las variaciones cíclicas apoyan fuertemente la posible participación en el ciclo reproductivo de los moluscos bivalvos.

Como se ha observado, las monoaminas tienen amplia distribución en los diversos órganos de los bivalvos. Aún cuando se menciona que éstas tienen numerosos roles fisiológicos, es difícil de comprender porque algunos órganos que al parecer no presentan una relación directa con la actividad de reproducción, como es el manto (en esta especie), presentan en conjunto, una dinámica similar con respecto al ciclo

reproductivo. Zwann y Mathieu (1992) estudiaron el número de células neurosecretoras activas en ganglios del sistema nervioso central de *M. edulis*, y reportaron que la actividad de estas células es baja durante el periodo de reposo gametogénico, posteriormente se incrementan en forma progresiva y en sincronía con el crecimiento de gónada, alcanzando su máxima actividad antes del desove. Esto puede explicar el incremento de las concentraciones de monoaminas, observado durante la gametogénesis, en la mayoría de los tejidos estudiados de *N. subnodosus*, así como su decremento en el tiempo posterior al desove. Esta actividad monoaminérgica generalizada en todos los órganos, puede ser una estrategia de la especie para tener mayor capacidad en la respuesta de cualquier órgano ante una mayor demanda de energía para la producción de gametos. Es posible que las monoaminas puedan estar involucradas de manera directa en el control de la gametogénesis, o también podrían trabajar indirectamente para influenciar este proceso mediante la activación de otras moléculas y/u órganos.

## 8.6 Conclusiones

Las concentraciones de monoaminas, en la mayoría de órganos de la especie, se incrementan durante la producción gametogénica, alcanzan los máximos valores en el estado de madurez y declinan posterior al desove.

La NE puede estar presente en todos los tejidos estudiados y en todas las etapas reproductivas de esta especie.

Es posible, que *N. subnodosus*, siendo una especie hermafrodita funcional, puede estar utilizando diferentes neurotransmisores, de forma específica para la producción de gametos y el desove de cada género sexual.

ISP-L puede estar relacionado en la producción y/o desove de ovocitos en esta especie.

La 5-HT puede estar involucrada en la producción y/o desove de gametos masculinos en esta especie.

La 5-HT puede ser la monoamina que influye en la transferencia de nutrientes del músculo abductor estriado a la gónada para la gametogénesis.

Es posible que el incremento de las monoaminas de manera general en la mayoría de los órganos en relación con el ciclo reproductivo, pueda ser una estrategia de la especie para tener una mayor capacidad fisiológica (por ejemplo, la movilización de nutrientes de reserva, actividad ciliar, respiración, alimentación, entre otros) para producir energía durante la producción de gametos.



---

## **IX. IDENTIFICACIÓN DE MONOAMINAS EN LA ALMEJA MANO DE LEÓN *NODIPECTEN SUBNODOSUS* EXPUESTA A PATRONES DE TEMPERATURA OSCILANTE Y ESTABLE.**

### **9.1 Introducción**

Es conocido que los cambios de los niveles de monoaminas en vertebrados dependen de las condiciones ambientales de temperatura y fotoperiodo (Le Bras, 1984) y estos cambios térmicos pueden jugar un papel dominante sobre los patrones de conducta de los organismos. Sin embargo en moluscos bivalvos, el conocimiento sobre los aspectos neuroendocrinos es limitado, comparado con algunos de otros grupos de invertebrados mayores y pocos estudios se han realizado sobre estos aspectos.

Se han realizado estudios de los cambios cíclicos en las formas y tallas de neuronas de los bivalvos, que han sido asociadas con el metabolismo y la reproducción (Gabe, 1966) pero la causa directa de sus efectos ha sido difíciles de demostrar. Se menciona que en invertebrados una estimulación específica del medio ambiente es recibida por receptores sensoriales y transmitidos al sistema nervioso, estimulando a neuronas específicas de los ganglios, las cuales, secreta neuroproductos (neurotransmisores o neurohormonas) las cuales regulan los cambios fisiológicos de algún órgano específico. Por ejemplo, Blake (1972) describió 5 etapas de un ciclo neurosecretorio en *A. irradians*, el cual fue correlacionado con los etapas de la ovogénesis. En donde demostró los cambios de talla y forma de las neuronas relacionados con el proceso del desarrollo ovogénico. Posteriormente, Blake y Sastry (1979), describieron los efectos de la temperatura y el alimento relacionados a estos ciclos (neurosecretorio y ovogénico) de la especie y mencionan que la exposición prolongada a inanición o temperaturas sub-óptimas pueden provocar lisis en los ovocitos y una degeneración y atrofia neuronal.

En algunos moluscos, también se han reportado cambios en los niveles de monoaminas ante las variaciones ambientales estacionales. Por ejemplo, Stefano y Catapane (1977 y 1980) mencionan que los niveles de monoaminas en el sistema nervioso central de moluscos bivalvos, muestran grandes variaciones estacionales y el metabolismo de estas monoaminas puede ser afectado por la variación de la

temperatura, sugiriendo que los cambios de estos niveles son dependientes de las condiciones térmicas ambientales.

El conocimiento de los intervalos óptimos de las variables ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y reproducción de las especies, es de gran utilidad para la acuicultura en general, sin embargo, también son necesarios conocer los límites de tolerancia y resistencia de los organismos ante estos factores, así como conocer los efectos de las fluctuaciones ambientales sobre la fisiología de los mismos.

A pesar de la influencia de la temperatura sobre los diversos procesos fisiológicos, los estudios que relacionan este factor con la fisiología en pectínidos son escasos y la mayoría se han realizado a temperaturas constantes. El presente trabajo es una continuación del capítulo anterior de esta tesis, y está enfocado a observar las posibles diferencias de las concentraciones de monoaminas de *N. subnodosus*, cuando se encuentra en la temperatura óptima de mantenimiento y cuando es sometido a una temperatura oscilante, la cual, contribuye positivamente en la actividad reproductiva.

## 9.2 Objetivo

Determinar los niveles de monoaminas en diversos tejidos de la almeja mano de león *N. subnodosus* ante condiciones de temperatura estable y oscilante.

## 9.3 Materiales y métodos

### 9.3.1 Organismos experimentales

Para el presente experimento se seleccionaron 42 ejemplares de la almeja Mano de león en fase gametogénica incipiente y con talla promedio de  $69.8 \pm 6$  mm de altura de la concha, los cuales, fueron recolectados en mayo del 2007 de Laguna Guerrero Negro, Baja California, México ( $28^{\circ} 01' N$ ;  $114^{\circ} 11' W$ ) (Sección 6.1). Los organismos fueron transportados bajo el método húmedo tipo *rosario* (Sección 6.2.2), al laboratorio de ecofisiología del CIBNOR de La Paz, B.C.S. Los organismos se colocaron en agua de mar filtrada a  $20 \mu m$  con temperatura de  $18^{\circ} C$ , aireación constante, salinidad 38 ups y alimentación continua de  $3 \times 10^9$  cel/org/día de *Isochrysis galbana*. Fueron mantenidos a  $18^{\circ} C$  por un periodo de 24 h y posteriormente se inició la aclimatación de los organismos mediante en uso del SITMA (Sección 6.3) realizando un incremento gradual de temperatura desde los  $18$  a los  $21^{\circ} C$  en una semana.

### 9.3.2 Diseño experimental

Los organismos durante su aclimatación, fueron separados en dos grupos, con los cuales, se realizaron 2 regímenes térmicos experimentales:

- A) Temperatura estable de 22 °C (Figura 16-A).
- B) Temperatura oscilante de baja amplitud ( $20 \pm 2$  °C) con frecuencia de 1 ciclo por día.  $f(x) = 20 + 2.5 \text{ Sin}(2\pi/\text{día})$ . (Figura 16-B).

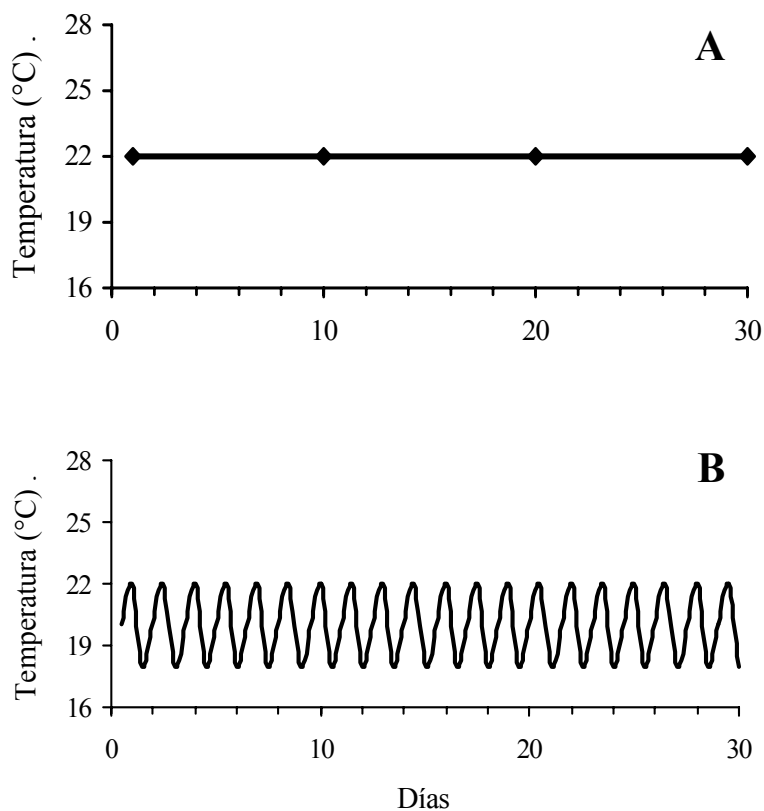


Figura 16. Regímenes térmicos experimentales utilizados para determinar los niveles de monoaminas en diversos tejidos de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. A) Temperatura estable de 22 °C, B) Temperatura oscilante de baja amplitud ( $20 \pm 2$  °C) con frecuencia de 1 ciclo por día;  $f(x) = 20 + 2.5 \text{ Sin}(2\pi/\text{día})$ .

Los regímenes térmicos fueron controlados por medio del SITMA (Sección 6.3) durante un periodo experimental de 30 días. Los muestreos fueron realizados en los días 1, 10 20 y 30 del tiempo experimental, en los cuales, se sacrificaron 6 organismos tomados al azar, de cada tratamiento térmico. Se realizaron análisis de biométricos para determinar el ICG (Sección 6.4), y posteriormente se realizaron disecciones de branquias, manto, hepatopáncreas, músculo abductor, gónada femenina, gónada masculina y pie. De cada órgano se tomó una muestra de aproximadamente 250 mg de tejido húmedo, la cual fue colocada en un tubo Eppendorf de 2 mL de capacidad (mantenidas en hielo), para posteriormente hacerles una extracción y el análisis de monoaminas (NE, DA, 5-HT e ISP-L) (Sección 6.6).

## 9.4 Resultados

### 9.4.1. Índice de Condición General y Gonadosomático de *Nodipecten subnodosus*, bajo dos tratamientos térmicos.

El ICG (Figura 17) de los organismos de *N. subnodosus* mostró ligero incremento del peso húmedo a través del tiempo experimental, con valores iniciales menores al 37 % y finalizando en valores mayores del 38 %. Ambos tratamientos térmicos, mostraron valores muy similares de este índice. Contrario a lo observado en el ICG, el IGS registró una caída en su peso porcentual a través del tiempo experimental, mostrando un valor inicial de casi 3.2 % y terminando con valores de 2.9 y 2.6 % para los tratamientos térmico estable y oscilante respectivamente. Ambos tratamientos térmicos mostraron valores muy similares de este índice.

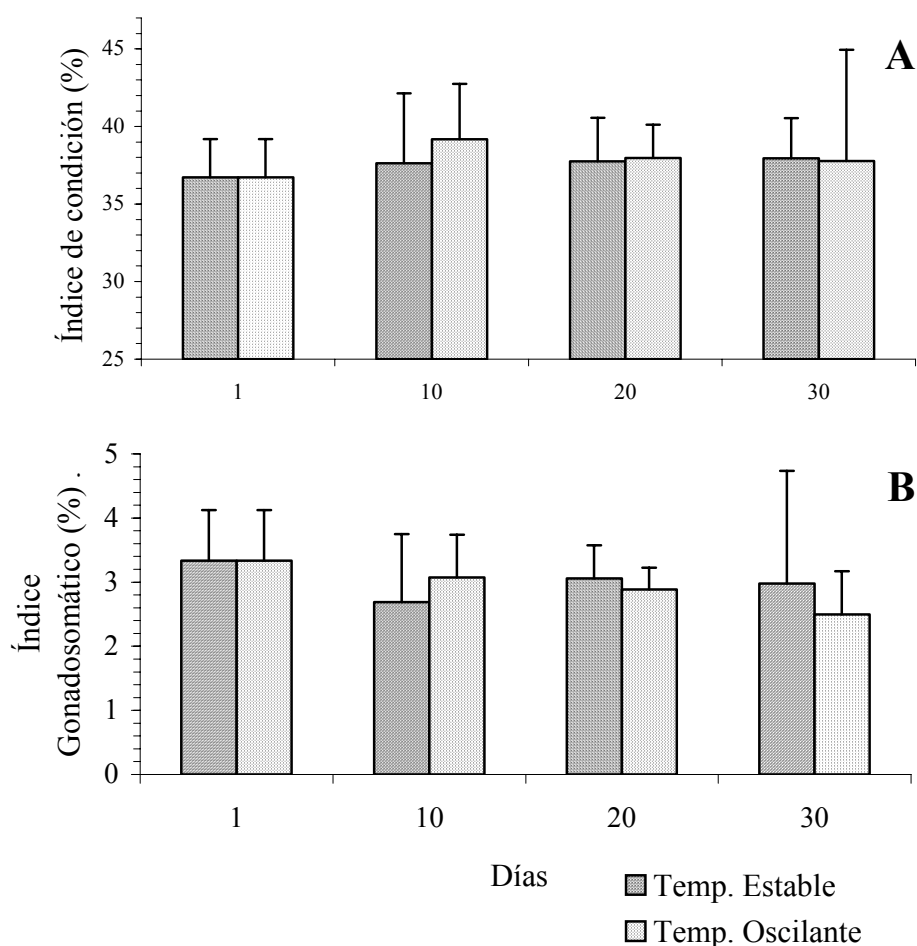


Figura 17. Índice de Condición General (A) y Gonadosomático (B) de *Nodipecten subnodosus* expuestos a dos tratamientos térmicos con 4 muestreos en 30 días experimentales. Las barras son la media  $\pm$  DS. ( $n = 6$ ).

*9.4.2. Concentraciones de monoaminas en diversos tejidos de *Nodipecten subnodosus*, bajo dos diferentes tratamientos térmicos.*

Las concentraciones de las monoaminas de todos los órganos estudiados están recopiladas en la Figura 18. Los resultados fueron muy similares en ambos tratamientos térmicos. La NE fue la monoamina con mayor concentración en los diferentes órganos estudiados de la almeja mano de león, observándose sus máximos valores en el tejido del manto, los cuales fueron de 21.1 ng/mg en el día 30 experimental para el tratamiento de temperatura estable y de 19.1 ng/mg en el día 20 experimental para el tratamiento térmico oscilante.

En ambos tratamientos, altas concentraciones de NE fueron observadas en manto, pie y branquias, siguiendo una tendencia de incremento en relación al tiempo experimental. La concentración de NE en hepatopáncreas no fue tan alta como en la mayoría de los órganos, sin embargo, también se observó un incremento en relación al tiempo experimental. Con excepción de la gónada masculina en el tratamiento de temperatura oscilante, los órganos restantes mostraron una estabilidad o ligera caída de la NE a través del tiempo experimental, siendo esto más notorio en gónada hembra y en tejido del músculo abductor.

Para ambos tratamientos térmicos y a través de todo el tiempo experimental, la DA solo fue observada en los tejidos de las branquias y hepatopáncreas, con tendencia a incrementarse rápidamente, alcanzado mayores valores en el tiempo terminal del experimento. La excepción fue durante el muestreo del día 10 del tratamiento estable, en el cual se observó la máxima concentración de esta monoamina con valor de 12.5 ng/mg. En tejido del pie se observó la presencia de DA a partir del muestreo del día 10 en ambos tratamientos, con una concentración aproximada de 1.6 ng/mg. No se registró presencia esta monoamina en tejido del manto y del músculo abductor, mientras que en ambas porciones de gónada esta monoamina fue observada en el muestreo de día 10 del tratamiento térmico oscilante y para el día 30 en el tratamiento térmico estable.

Con excepción del tejido de gónada femenina, el ISP-L no fue observado en ninguno de los órganos muestreados ni de los dos tratamientos térmicos durante todo el tiempo experimental. El único caso registrado fue durante el muestreo del día 10 del tratamiento térmico oscilante con valor de 1.4 ng/mg.

La 5-HT fue encontrada a más bajas concentraciones que la NE y la DA. Para ambos tratamientos térmicos, la 5-HT solo fue observada en tejido del músculo y hepatopáncreas, con una tendencia de incremento a través del tiempo experimental, excepto por el tratamiento térmico estable, en donde se registró un incremento de 2.1 ng/mg durante el muestreo del día 10 y posteriormente cae a valores menores que el tiempo inicial. Para el tratamiento térmico oscilante, el mayor registro fue observado en tejido del músculo abductor, con un valor máximo de 2.3 ng/mg durante el muestreo del día 10, y posteriormente se mantiene estable, con valores próximos a 2 ng/mg. En los tejidos de gónada masculina, pie y branquia, esta monoamina fue observada con un solo registro, en tanto que en los tejidos de gónada femenina y manto no fue registrada.

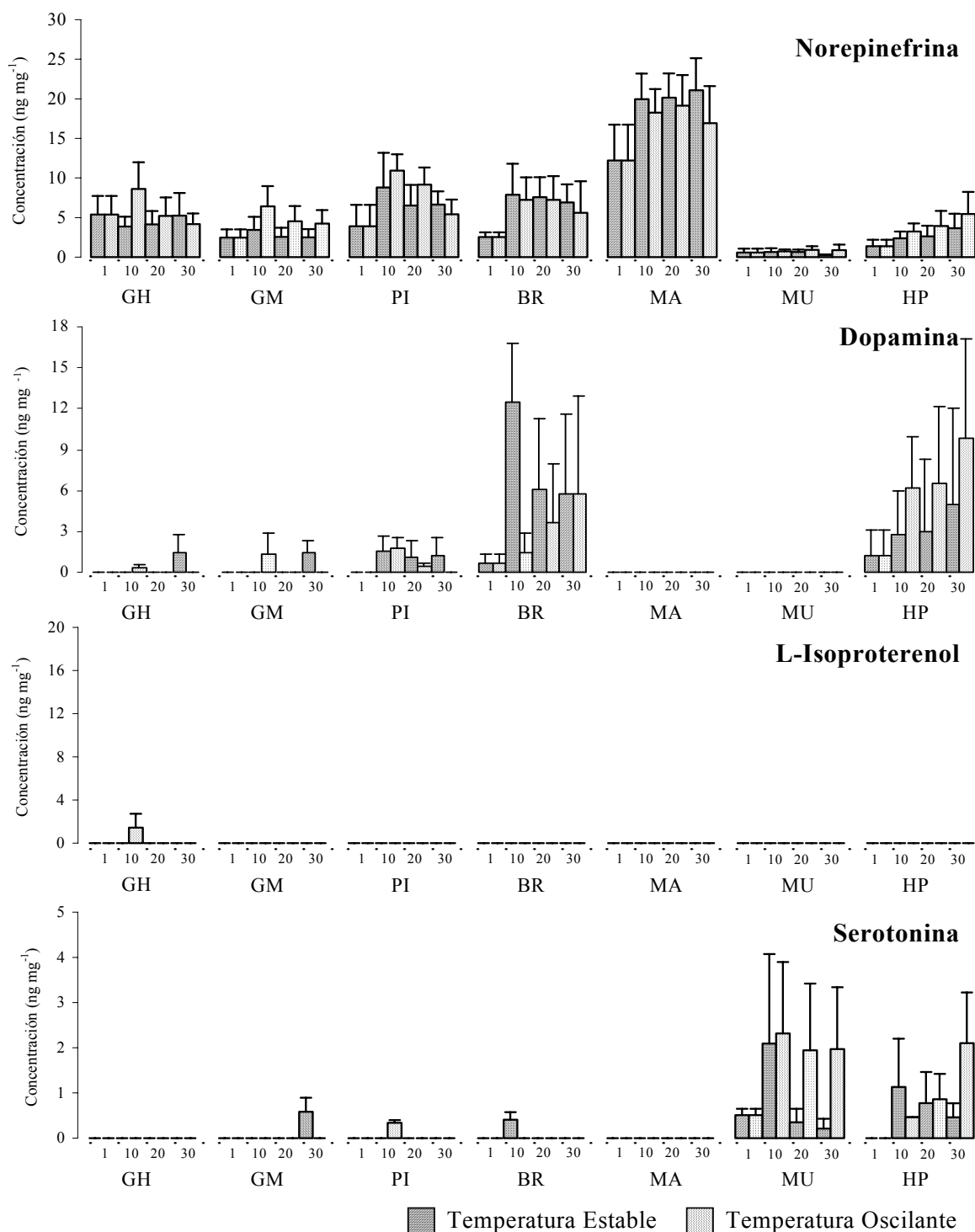


Figura 18. Concentraciones de monoaminas en gónada femenina (GF); gónada masculina (GM); pie (PI); branquia (BR); manto (MA); músculo abductor estriado (MU) y hepatopáncreas (HP), de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* bajo dos diferentes regímenes térmicos (temperatura estable y oscilante), con muestreos a los días: 1, 10, 20 30. Las barras indican la media  $\pm$  DS.



#### 9.4.3 Monoaminas: perspectiva general por órgano estudiado

En tejido de gónada femenina se obtuvieron registros de NE, DA e ISP-L, sin embargo solo la NE fue observada de modo constante y de tendencia estable durante todos los muestreos y ambos tratamientos térmicos. La DA e ISP-L solo fueron observados a bajas concentraciones de manera esporádica. No se obtuvo registro de 5-HT en este órgano.

En gónada masculina se observó la presencia de NE, DA y 5-HT. Este órgano mostró una tendencia similar a la gónada femenina, con respecto a la dinámica de la NE y DA, diferenciándose en el sentido de que en este órgano no se observó ISP-L pero si se registró 5-HT con un valor de 0.6 ng/mg obtenido durante el día 30 experimental y bajo el tratamiento térmico estable. Las concentraciones de NE en este órgano fueron mayores en el tratamiento térmico oscilante registrándose un mayor valor de 6.4 ng/mg durante el muestreo del día 10 y posteriormente los valores se mantienen en alrededor de 4.3ng/mg. Por otra parte, esta misma monoamina en el tratamiento térmico se mantuvo entre valores de 3.5 y 2.5 ng/mg a lo largo del periodo experimental.

En tejido del pie se obtuvo registro de NE, DA y 5-HT. Los mayores valores registrados de NE para ambos tratamientos térmicos fueron registrados en el muestreo del día 10 experimental con valores de 8.8 y 11ng/ng para el tratamiento térmico estable y oscilante respectivamente, posteriormente estos valores decrecen ligeramente. Por otra parte la DA fue registrada en este órgano a partir del día 10 experimental con valores máximos de 1.5 y 1.7 ng/mg para los tratamientos térmicos estable y oscilante respectivamente, posteriormente esta monoamina no fue observada en el tratamiento térmico oscilante para el día final, en tanto que en el tratamiento térmico estable disminuye a 1.2 ng/mg. La 5-HT en tejido del pie solo fue observada de manera puntual durante el muestreo del día 10 del tratamiento térmico oscilante con un valor de 0.34 ng/mg.

En tejido de branquia fue observada en mayor abundancia NE y DA en tanto que la 5-HT fue observada puntualmente durante el muestreo del día 10 del tratamiento térmico estable con un valor de 0.4 ng/mg. La NE en este órgano presentó incremento de su concentración de la etapa inicial (2.5ng/mg) hasta 7.8 y 7.3 ng/mg del tratamiento térmicos estable y oscilante respectivamente para el día 10 experimental posteriormente estos valores se mantienen estables con ligero decremento. En el caso de la DA en este

órgano se observó un incremento constante a través del tiempo experimental en el tratamiento térmico oscilante presentando valores de 0.7 ng/mg en el tiempo inicial y de 5.7 ng/mg en el tiempo final. Por otra parte el tratamiento térmico estable presentó pronunciado incremento durante el muestreo del día 10 alcanzando un valor de 12.5 ng/mg y posteriormente la concentración se mantiene en alrededor de 5.8 ng/mg hasta el tiempo final del experimento.

En tejido del manto solo fue observada NE de las cuatro monoaminas estudiadas en el cual, como ya se había mencionado anteriormente, se presentaron las mayores concentraciones de todos los tejidos y de todas las monoaminas. En ambos tratamientos térmicos la DA se incremento a niveles aproximados a los 19 ng/mg a partir del día 10 experimental hasta la etapa final.

En tejido del músculo solo se observó 5-HT y NE de las cuales la NE se mantuvo de forma estable a través del tiempo experimental en alrededor de 0.5 ng/mg para ambos tratamientos térmicos, en tanto que la 5-HT en el tratamiento térmico oscilante registró un incremento en el muestreo del día 10, alcanzando valores de 2.3 ng/mg para posteriormente mantenerse constante en alrededor de 2 ng/mg hasta el tiempo final del experimento. En cambio, el tratamiento térmico estable registró un agudo incremento hasta 2.1 ng/mg en el día 10 experimental y posteriormente sufrió una caída hasta 0.2 ng/mg en el tiempo final del experimento.

En tejido del hepatopáncreas se observaron NE, DA y 5-HT de manera abundante en relación a los demás órganos. En el tratamiento térmico oscilante se observó que las tres monoaminas presentaron una dinámica de incremento constante de sus concentraciones de éstas, iniciando con valores de 1.4 ng/mg, 1.3 y 0 ng/mg en el día 1 para NE, DA y 5-HT respectivamente, e incrementándose hasta 5.4, 9.8 y 2.1 ng/mg en el mismo orden durante la etapa final del experimento.

## 9.5 Discusión

Durante el tiempo experimental no se observó desarrollo de actividad gametogénica. Los organismos usados en ambos tratamientos térmicos se encontraban en periodo vegetativo (estadio indiferenciado) de desarrollo reproductivo, con un IG promedio de 3.2 % el cual sufrió una ligera y gradual caída a través del tiempo, observándose su mínimo valor de 2.8 % al final del experimento. De modo opuesto al IG, el ICG de los organismos de ambos tratamientos térmicos presentó ligero incremento gradual a través del tiempo experimental, iniciando con un valor de 36.7 % del peso porcentual, y finalizando con un valor aproximado de 38 % en ambos tratamientos térmicos.

En los bivalvos existe una correlación negativa muy clara entre el ciclo reproductor y el almacenamiento de reservas energéticas (Arellano-Martínez, 2005). Las relaciones entre los índices de condición y de otros órganos con respecto al IG, han sido reportadas como indicadores de los patrones de almacenaje y utilización de energía (Villalejo-Fuerte y Cevallos-Vázquez, 1996). Se ha reportado que la almeja mano de león se comporta como una especie conservativa, presentando un claro ciclo de almacenamiento y utilización de nutrientes en relación a la actividad reproductiva en donde el almacenamiento de energía se realiza principalmente durante el periodo vegetativo (Ramírez-Castillo, 2003; Arellano-Martínez, 2005). Por tanto, se puede mencionar que los organismos del presente experimento posiblemente se encontraban en una fase vegetativa, en la cual las condiciones experimentales contribuyeron a la acumulación de energía reflejada en el incremento de la condición de los mismos y también en la reabsorción de energía por parte de la gónada.

Las concentraciones de monoaminas en los diferentes tejidos estudiados, también mostraron ciertas similitudes entre los dos tratamientos térmicos, por ejemplo, las tendencias y concentraciones de NE fueron muy similares en la mayoría de los tejidos, en tanto que la 5-HT mostró ciertas diferencias de acuerdo a las tendencias y concentraciones en los diferentes muestreos realizados. La DA por otra parte mostró similitud en tejido del hepatopáncreas, en tanto que en branquias si presentó diferencias. Es difícil descifrar la razón de tales diferencias, pero se observó que los órganos en los que éstas se presentaron (hepatopáncreas, músculo y branquias), por tanto es probable que puedan estar relacionadas con la acumulación y utilización de energía, sin embargo

son necesarios estudios más profundos para poder elucidar esto. Es posible que las similitudes en las tendencias y concentraciones en las monoaminas observadas en los dos tratamientos térmicos, se hayan dado a partir de una aclimatación de los organismos sometidos a las oscilaciones térmicas de baja amplitud. En *M. edulis*, Widdows (1976) estudió las respuestas de la tasa respiratoria y de filtración ante temperaturas fluctuantes. Él observó una relación directa entre la tasa respiratoria y la temperatura, así como un proceso de aclimatación parcial a partir del día 14 de exposición. Por otra parte, López-Sánchez (2003) midió la tasa de filtración en individuos de *N. subnodosus*, sometidos a dos tratamientos de temperatura oscilante con frecuencias (oscilatorias) distintas. Este autor registró una relación entre la temperatura y la tasa de filtración de manera desfasada durante las primeras 36 horas, pero posteriormente los organismos regularon por completo la tasa de filtración.

La mayoría de los estudios de monoaminas durante el ciclo reproductivo de bivalvos reportan que estas sustancias tienen una dinámica general durante el ciclo reproductivo, en la cual las concentraciones se incrementan a través del desarrollo gametogénico, alcanzando sus máximos valores en los periodos avanzados de madurez reproductiva, para posteriormente caer de manera abrupta durante el periodo del desove (Martínez y Rivera, 1994; Osada y Nomura, 1989a,b). En el presente estudio se observó que en la mayoría de los órganos no se presentó la dinámica anteriormente descrita, por ejemplo, las concentraciones de NE en gónada masculina y femenina se mantuvieron casi estables durante todo el tiempo experimental, lo cual, concuerda con la etapa vegetativa en la que se encontraban los organismos. Khotimchenko y Deridovich (1991) reportan que los niveles de 5-HT y DA en los ganglios de *Patinopecten yessoensis*, mostraron ser más bajos durante la mínima actividad gametogénica.

También, la mayoría de estos autores, reportan que en gónada se pueden encontrar altas concentraciones de monoaminas durante la mayoría de las fases gametogénicas, mientras que en la vegetativa reportan una caída en las concentraciones en dichos órganos. Osada y Nomura (1989a) reportaron que los valores mínimos de NE y DA (aprox. 2 y 50 ng/mg de peso húmedo) se observan durante los meses fríos, correspondiente a la fase vegetativa de la reproducción. Sin embargo, en el presente trabajo no se logró observar DA de manera constante en ambas porciones de la gónada,

lo que permite suponer que esta monoamina podría estar muy relacionada con la producción de gametos (masculinos y femeninos) en la especie.

De manera general, la mayoría de los órganos presentaron un incremento de monoaminas registrado a partir del día 10 experimental, el cual se mantiene estable o en crecimiento durante el resto del periodo experimental, esto tal vez pudieran estar relacionados con la ganancia en peso porcentual observado con el ICG, observándose que la 5-HT presentó claros incrementos en tejidos del músculo y hepatopáncreas, la DA presentó incrementos de hepatopáncreas y branquias, y la NE presentó mayor distribución en los órganos, mostrando pronunciados incrementos en hepatopáncreas, manto, branquias y pie.

Blake (1972) describió 5 etapas de un ciclo neurosecretorio en *A. irradians*, el cual fue correlacionado con las etapas de la ovogénesis. Esto lo demostró con los cambios de talla y forma de las neuronas relacionados con el proceso del desarrollo ovogénico. En el estadio I, el pectínido secreta agentes neuroendocrinos que permiten la acumulación de nutrientes y los estadios II y III actúan como mecanismos de activación y desactivación que controlan la transferencia de nutrientes a la gónada dependiendo de las condiciones de temperatura y alimento. Blake y Sastry (1979) mencionan que cuando *A. irradians* se encuentra durante la etapa vegetativa bajo el estadio neurosecretorio II (correspondiente a la transferencia de nutrientes a la gónada), un estímulo de inanición provocó reabsorción del epitelio germinal observado a 5 y 15 °C (umbrales de baja y alta temperatura para esta especie) y el ciclo neurosecretorio regresó al estadio I. Por otra parte mencionan que cuando los organismos (del mismo estadio II, pero más avanzado) ya se encontraban produciendo ovocitos previtelogénicos, la inanición no provocó ningún cambio a 5 °C, pero a 15 °C los ovocitos avanzaron a la vitelogénesis. Desde esta perspectiva, posiblemente algo similar sucedió en los organismos del presente experimento, los cuales, se encontraban en una fase vegetativa previa a la generación de ovocitos; los estímulos térmicos y de alimentación, pudieron provocar el retorno a un estado similar al neurosecretorio I, provocando la ligera caída del IG (reabsorción del epitelio germinal) y un incremento del ICG (regreso a la acumulación de nutrientes).

Existen pocos estudios sobre los factores endógenos que regulan la reproducción de los pectínidos. Por tanto, aún se desconoce mucho sobre el papel específico de las

monoaminas dentro del proceso gametogénico. Es difícil comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, el interés sobre estos aspectos se ha incrementado en los últimos años, y es posible que éste contribuya en el área de la reproducción en pectínidos.

## 9.6 Conclusiones

En *N. subnodosus*, durante el periodo de inactividad reproductiva, los niveles de NE se mantienen estables mientras que la DA, 5-HT e ISP-L son bajos o nulos.

Posiblemente la DA, ISP-L y 5-HT, son las monoaminas más relacionadas con el proceso de producción de gametos, siendo la DA y el ISP-L los agentes involucrados en el proceso de gametos femeninos, en tanto que la DA y 5-HT se encuentran involucradas en la producción de gametos masculinos.

A temperatura estable y oscilante de baja amplitud, los niveles de monoaminas se mantienen en concentraciones similares en ambos estados térmicos, tal vez, debido a una adaptación de los organismos a las fluctuaciones térmicas de baja amplitud.

Posiblemente la 5-HT se encuentra involucrada en el proceso de acumulación o transferencia de energía en el músculo abductor.

Posiblemente las tres monoaminas están involucradas en la acumulación y utilización de nutrientes en el hepatopáncreas.

---

## X. INDUCCIÓN AL DESOVE DE LA ALMEJA CATARINA *ARGOPECTEN VENTRICOSUS* MEDIANTE DIFERENTES MONOAMINAS

### 10.1 Introducción

En un centro de producción de semillas de moluscos, la manipulación, el acondicionamiento y el control del desove de reproductores, son actividades muy importantes y de gran interés para el éxito de la industria acuícola. Sin embargo, aún no logran tener efectividad total sobre el proceso de desove de todos los organismos que son de interés comercial, aún cuando parezca que sus gónadas se encuentran maduras y en periodo natural del desove. Maeda-Martínez (2003) reporta que en el laboratorio Marimex S.A. de C.V, el proceso de maduración se interrumpe por ocurrencia de desoves no controlados, e indica que aún desconocen las variables ambientales y causas que los provocan.

En un experimento exploratorio de las concentraciones de monoaminas en diversos órganos de *N. subnodosus* (Sección 6.6.4), se detectó un agente muy similar a la monoamina artificial Isoproterenol (ISP), formando parte (casi exclusivamente) en la porción femenina de la gónada y en concentraciones mayores durante el tiempo de desove.

*A. ventricosus* es un pectínido que ha sido estudiado con anterioridad, con el uso de varios métodos inductivos (entre ellos la 5-HT) de desove (Monsalvo-Spencer *et al.*, 1997). Es también una especie hermafrodita funcional que se encuentra formando grandes poblaciones sobre la costa de la península de Baja California Sur. Esta especie, se comporta como un organismo tropical y posee el privilegio de encontrarse con mayor frecuencia en estado de madurez en el medio natural, ofreciéndose como buen candidato para estudios exploratorios relacionados con el químico ISP. Por tanto, el presente estudio está enfocado a estudiar el efecto de diferentes monoaminas (incluido el ISP) como estimuladores de desove de este pectínido.

### 10.2 Objetivo

Determinar el efecto de diferentes monoaminas sobre la inducción al desove de la almeja catarina *A. ventricosus*.



### 10.3 Materiales y métodos

La presente investigación fue realizada en abril del 2008 (tiempo inicial de primavera), en la cual, se emplearon un total de 328 organismos de la almeja catarina *A. ventricosus*, que fueron seleccionados (mediante inspección visual de gónadas) en estado reproductivo de madurez (estadío IV, acuerdo con la escala reportada por Ramírez-Castillo, 2003). Este trabajo se dividió en dos fases; la primera fue empleada para la ejecución de diferentes experimentos inductores de desove de la especie bajo condiciones de laboratorio y la segunda fase se enfocó a la ejecución de diferentes experimentos inductores de desove de organismos en su hábitat natural (*in situ*), justo en el momento de recolecta en campo.

Los organismos de la primera fase de investigación, presentaron tallas promedio de  $36.6 \pm 1.8$  mm de altura de la concha; fueron recolectados en el Estero Rancho Bueno, ubicado al Sureste de Bahía Magdalena, Baja California Sur ( $24^{\circ} 32' N$ ;  $111^{\circ} 42' W$ ) y transportados vía terrestre (2 horas) al laboratorio de Ecofisiología del CIBNOR en La Paz B.C.S. mediante un método tradicional en donde todos los organismos se colocan en un tanque (50 L) con agua del sitio de recolecta (a  $23^{\circ} C$ ) y tapados herméticamente. Fueron recibidos contenedores plásticos de 60 L de capacidad (aprox. 35 organismos por contenedor) con agua marina filtrada a temperatura de  $18^{\circ} C$  (para evitar desoves por efecto de este factor), 38 ups y aireación constante. Posteriormente, la temperatura se elevó gradualmente a  $21^{\circ} C$  en 48 h, como periodo de aclimatación de los organismos. Los organismos de la segunda fase de investigación presentaron tallas promedio de  $48.5 \pm 2.2$  mm de altura de concha, y fueron recolectados del estero San Buto, ubicado al Norte Bahía Magdalena ( $24^{\circ} 47' N$ ;  $112^{\circ} 02' W$ ) (Sección 6.1), con ellos, se ejecutaron los experimentos en campo en el tiempo posterior a su colecta.

#### 10.3.1 Diseño experimental

Los químicos utilizados en el presente experimento para inducción al desove de los organismos experimentales, fueron las monoaminas: NE, DA, 5-HT e ISP, las cuales, fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Química de México. Las soluciones fueron preparadas con agua marina doblemente filtrada (AMDF) en filtros millipore de  $0.45 \mu m$  a diferentes concentraciones, de las cuales la concentración al 1mM fue

seleccionada en referencia a la 5-HT, mediante el análisis previo del efecto positivo de inducción al desove, así como por ser la monoamina más reportada en la bibliografía para este tipo de investigaciones. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4 °C y fueron usadas en un tiempo no mayor a los 10 días después de su elaboración.

Con estas soluciones se efectuaron 7 diferentes pruebas en las cuales se emplearon diferentes métodos de inducción al desove, mediante la combinación entre métodos químicos (NE, DA, 5-HT e ISP) y mecánicos (estrés por transporte, exposición aérea, alto y bajo contenido de oxígeno en el agua), así como la intervención del factor *tiempo, espacio* (sitio de mantenimiento) y *órgano* (músculo abductor y gónada) para la inyección.

Todas las pruebas realizadas en laboratorio se ejecutaron a una temperatura de 23 °C, en tanto que las pruebas a línea de costa se realizaron a temperatura ambiente. Por otra parte, cada uno de los métodos de inducción al desove fueron realizados usando 12 ejemplares y tiempo de 240 min para observación del efecto por la aplicación del mismo. Las soluciones fueron aplicadas mediante inyección (con jeringa para insulina) de 0.3 mL, con una o dos monoaminas, concentrada al 1 mM. Para el método usado como control (CONTROL) en algunas pruebas, se utilizó AMDF. La temperatura de las soluciones fue regulada a 23 °C previo al uso de las mismas. Cada uno de los organismos inyectados fueron colocados en contenedores de poliuretano con capacidad de 1 L de agua.

*Prueba I.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus, mediante inyección de diferentes monoaminas en su hábitat natural:*

La presente prueba se realizó a línea de costa con organismos recién colectados de su hábitat, con el objetivo de conocer su respuesta ante la inducción al desove con monoaminas bajo condiciones naturales de la población, para tener una referencia de comparación con las condiciones de laboratorio. Se utilizaron 96 organismos con una talla promedio de  $48.7 \pm 2.3$  mm de altura de la concha, a los cuales se les practicaron 5 métodos de inducción con inyecciones de monoaminas en el músculo abductor, 1 método de inyección en gónada y 2 controles para cada órgano, los cuales se denominan a continuación:

a) Inyección de NE en músculo abductor (NE).

- b) Inyección de DA en músculo abductor (DA).
- c) Inyección de 5-HT en músculo abductor (5-HT).
- d) Inyección de ISP en músculo abductor (ISP).
- e) Inyección de 5-HT+ISP en músculo abductor (5-HT+ISP en MU).
- f) Inyección de 5-HT+ISP en ambas porciones sexuales de gónada (5-HT+ISP en Gon).
- g) Inyección de AMDF como control para músculo abductor (Control MU).
- h) Inyección de AMDF como control para gónada (Control Gon).

*Prueba II.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus en estado de estrés post-transporte, con posterior inyección de monoaminas:*

Esta prueba se realizó en laboratorio con el objetivo de observar el efecto de las monoaminas bajo condición de estrés por transportación reciente. Se utilizaron 60 organismos con tallas promedio de  $36.8 \pm 2$  mm de altura de concha, los cuales se encontraban en condición de estrés por transportación reciente. Para lo cual, se utilizaron 5 métodos de inducción al desove, por medio de inyecciones en el músculo abductor, denominados:

- a) Transportación más inyección de DA: (Transp+DA).
- b) Transportación más inyección de ISP: (Transp+ISP).
- c) Transportación más inyección de NE: (Transp+NE).
- d) Transportación más inyección de 5-HT: (Transp+5-HT).
- e) Transportación más inyección de AMDF: (Transp+CONTROL).

*Prueba III.- Inducción al desove mediante inyecciones de isoproterenol y serotonina en diferentes órganos de la almeja catarina Argopecten ventricosus, bajo condiciones de laboratorio:*

La presente prueba se realizó en laboratorio con el objetivo de conocer el efecto de la 5-HT e ISP en forma individual o combinado sobre el desove de gametos de la almeja catarina y para conocer el efecto de estos químicos en diferentes órganos de este organismo. Se utilizaron 96 organismos con talla promedio de  $36.5 \pm 1$  mm de altura de concha, con los cuales, se realizaron 5 métodos de inyección de las monoaminas y 3 controles para cada órgano empleado, los cuales se denominan a continuación:

- a) Inyección de ISP en músculo abductor: (ISP en MU).

- b) Inyección de ISP en gónada femenina: (ISP en GH).
- c) Inyección de ISP en gónada masculina: (ISP en GM).
- d) Inyección de 5-HT en músculo abductor (5-HT en MU).
- e) Inyección de 5-HT en gónada femenina (5-HT en MH)
- f) Inyección de AMDF como control para músculo abductor (Control MU).
- g) Inyección de AMDF como control para gónada femenina (Control GH).
- h) Inyección de AMDF como control para gónada masculina (Control GM).

*Prueba IV.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus mediante el uso de isoproterenol y serotonina en combinación con diferentes factores estresantes:*

La presente prueba se realizó en laboratorio con el objetivo de conocer el efecto de la combinación de ISP, 5-HT, factores mecánicos y el factor tiempo, sobre el desove de esta especie. Se utilizaron 72 organismos con talla promedio de  $36.5 \pm 1.8$  mm de altura de concha, y se realizaron 6 métodos con inyección en el músculo abductor, denominados:

- a) Inyección de ISP con posterior exposición aérea de 60 min (ISP+Exp.Aérea).
- b) Previa exposición aérea de 60 min con posterior inyección de ISP (Exp.Aérea+ISP).
- c) Mantenimiento en agua con oxígeno a saturación durante 60 min con posterior inyección de ISP (AltoOxi+ISP).
- d) Mantenimiento en agua con baja cantidad de oxígeno durante 60 min con posterior inyección de ISP (BajoOxi+ISP).
- e) Combinación de 5-HT más ISP (5-HT+ISP).
- f) Combinación de 5-HT más ISP + exposición aérea (5-HT+ISP+Exp.Aérea).

## 10.4 Resultados

*Prueba I.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus, mediante inyección de diferentes monoaminas en su hábitat natural:*

En la figura 19 se observan las respuestas a la inducción al desove en organismos recién colectados de su hábitat. Se observó que solo hubo expulsión de gametos masculinos (Figura 19-B) con el empleo de estos químicos. La combinación de 5-HT+ISP inyectada en gónada femenina (5-HT+ISP en Gon), mostró mayor porcentaje de desove de gametos masculinos, así como menor tiempo de respuesta al desove, obteniéndose 100 % de desove de organismos de la porción masculina en un tiempo entre los 0 y 50 min. De manera similar se observó el efecto de la 5-HT presentando el desove de espermas en el mismo lapso de tiempo, con un éxito del 90 % de los organismos estimulados. Otro método efectivo fue la inyección de 5-HT+ISP en músculo abductor, presentando alrededor del 90 % de éxito en el desove de gametos masculinos en un lapso menor a los 80 min. El ISP produjo 25 % de éxito de desove organismos de la porción masculina, obtenido en un rango de tiempo desde los 50 hasta 235 min del periodo experimental. La DA y NE, solo presentaron 8 % de éxito, obtenido en el tiempo de los 8 y 55 min, respectivamente. No se observó desove de óvulos, en ninguno de los métodos realizados durante esta prueba en campo.

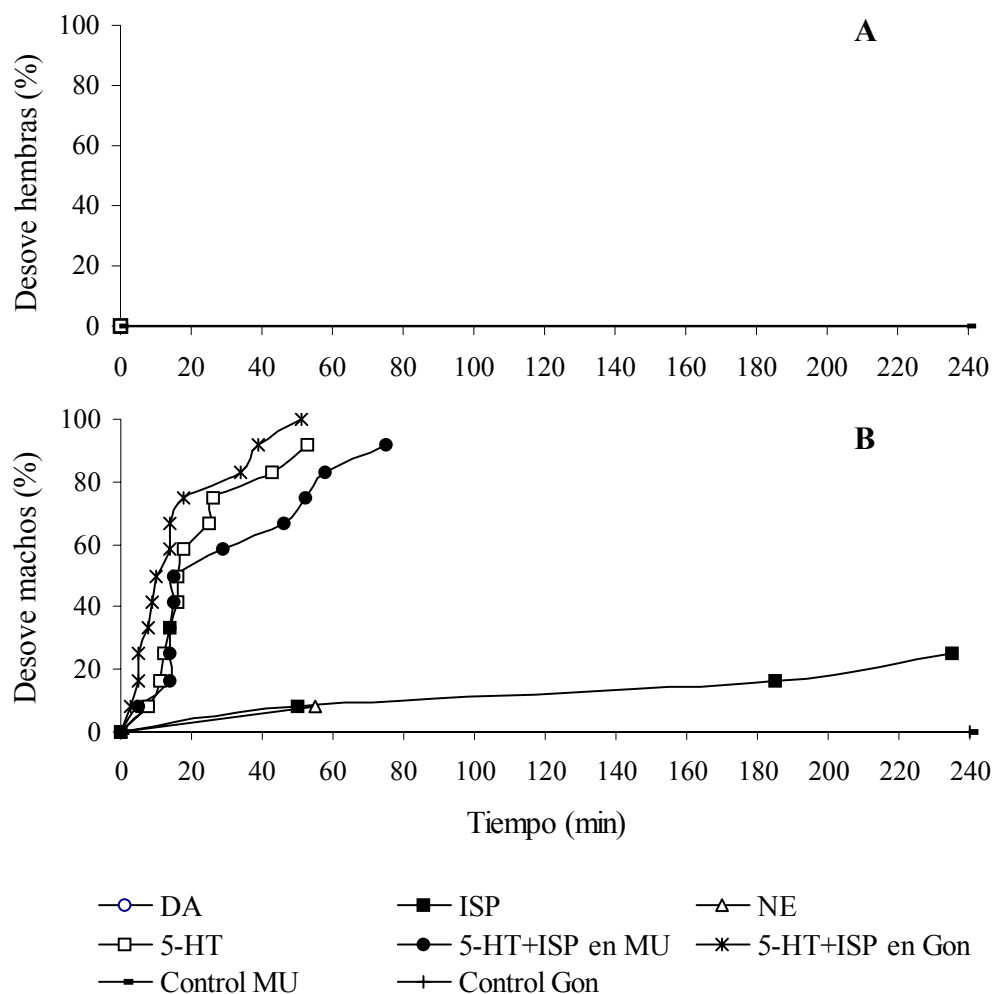


Figura 19. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove *in situ* de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, con 6 métodos de inducción: NE, DA, ISP, 5-HT, 5-HT+ISP en músculo abductor (5-HT+ISP en MU) y 5-HT+ISP en ambas porciones de gónada (5-HT+ISP en Gon). Además de 2 métodos control usando AMDF en músculo abductor y gónada (Control Mu y Control Gon respectivamente). La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermias.

*Prueba II.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus en estado de estrés post-transporte, con posterior inyección de monoaminas:*

En la figura 20 se muestran los resultados de los organismos inducidos a desove bajo las condiciones de estrés por transportación reciente, de la cual la sección “A” muestra que el mayor porcentaje de organismos que presentaron desove de gametos femeninos fue observado en el método donde se usó el ISP, con el cual se obtuvo 40 %

entre los 55 y 220 min, seguido por la DA con 25 % obtenidos entre los 70 y 220 min. Por el contrario, la NE y 5-HT solo obtuvieron 8 % de éxito en el desove en el tiempo cercano a los 140 min. El método control no presentó expulsión de gametos femeninos.

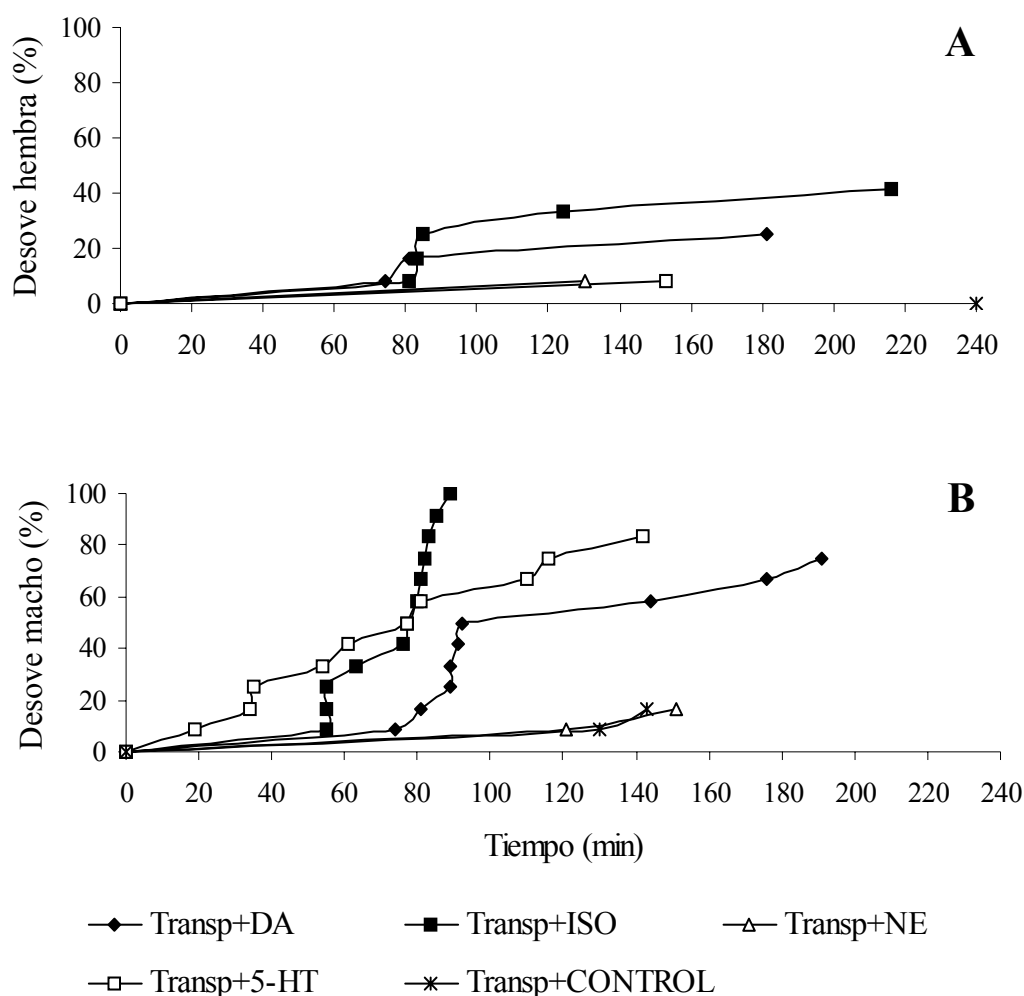


Figura 20. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* bajo condición de estrés post-transporte, con 4 métodos de inducción: NE, DA, ISP, 5-HT y AMDF (CONTROL). La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermas.

En la figura 20-B se observó que el ISP fue el agente que promovió el desove más efectivamente y en menor tiempo (menor a los 80 min) ante las condiciones ya mencionadas. La 5-HT presentó altos porcentajes de desove (80 %) en un lapso de tiempo entre los 20 y 140 min, en tanto que la DA presentó 75 % de organismos

---

desovados de la porción masculina en un tiempo correspondiente entre los 70 y 190 min. La NE y el control (AMDF), fueron los que presentaron los menores porcentajes (17 %) de desove observados entre los 120 y 150 min posteriores a la inyección.

*Prueba III.- Inducción al desove mediante inyecciones de isoproterenol y serotonina en diferentes órganos de la almeja catarina Argopecten ventricosus, bajo condiciones de laboratorio:*

En la figura 21-B, se observa que el método de inyección con 5-HT en gónada hembra produjo 80 % de desove de organismos machos en un lapso de tiempo entre los 10 y 60 min. La 5-HT inyectada en el músculo abductor resultó en menor éxito de desove (75 %) con respecto a la 5-HT en gónada, obtenidos en su mayoría alrededor de los 10 y 20 min del tiempo experimental. En la figura 21-A, se observa que la 5-HT en gónada hembra y en músculo abductor provocaron un 33 % de éxito en el desove de organismos hembras, obtenidos principalmente alrededor de los 165 min (5-HT en GH) y 180 min (5-HT en MU). El ISP no fue efectivo en la inducción al desove de la almeja catarina, bajo ningún método de inyección de los órganos muestreados. Solo la inyección colocada en la porción masculina reflejó un bajo valor de 8 % de desove de gametos tanto femeninos como masculinos.



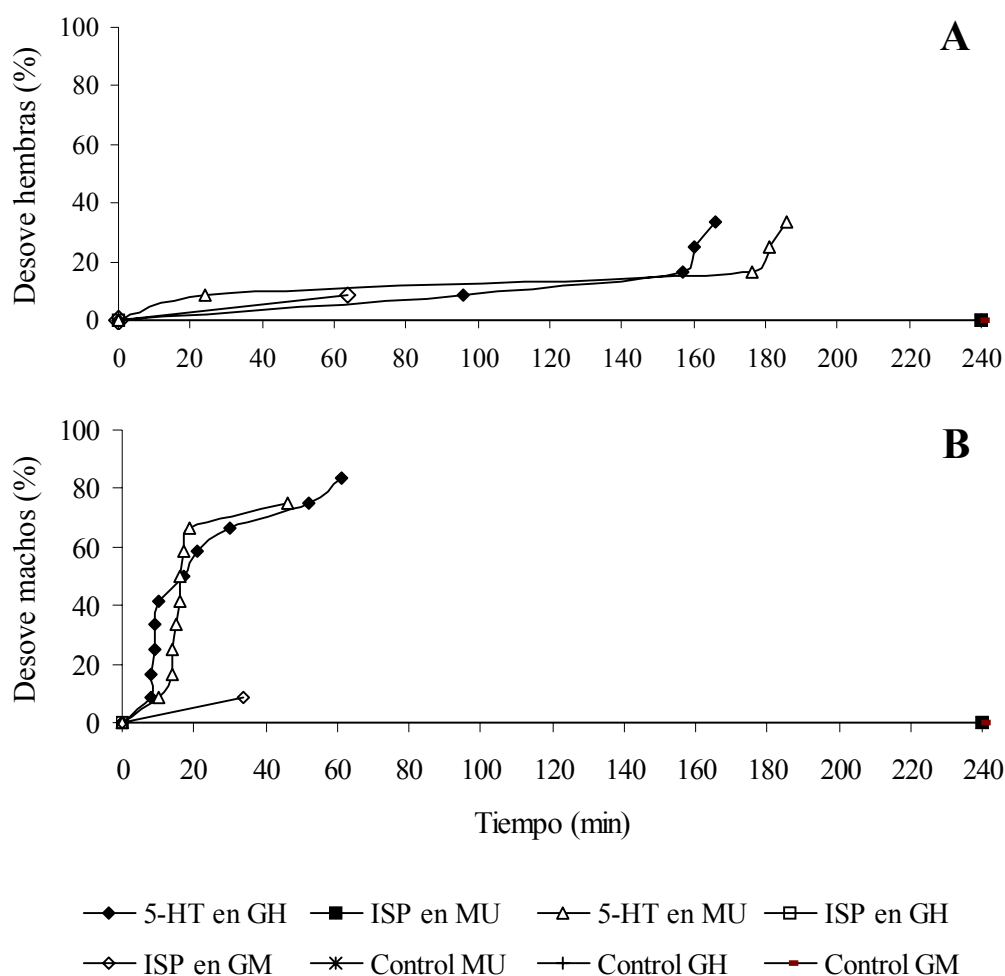


Figura 21. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus* con inyecciones de ISP y 5-HT en 3 diferentes órganos: Músculo abductor (MU), Gónada femenina (GH) y Gónada masculina (GM). Se ejecutaron 3 controles (con AMDF) para cada uno de los órganos. La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermatozoides.

*Prueba IV.- Inducción al desove de la almeja catarina Argopecten ventricosus mediante el uso de isoproterenol y serotonina en combinación con diferentes factores estresantes.*

La inyección de 5-HT+ISP en combinación con un periodo previo de exposición de los organismos al aire, no contribuyó en la expulsión de gametos femeninos, sin embargo se observó 100 % de éxito de desove de machos en un tiempo de 25 min. Con el método combinado de la 5-HT + ISP tampoco se logró obtener desoves de hembras, solo el desove de organismos machos se alcanzó con 86 % de éxito en un lapso de

tiempo que inició en alrededor de los 40 min y concluyó a los 140min. En los resultados del presente experimento (Figura 22) se observaron bajos valores en el porcentaje de desove, tanto de espermas como de óvulos, en todos los métodos ejecutados. Sin embargo se logró apreciar que el método de inducción donde se usó el ISP con una posterior exposición aérea (ISP+Exp.Aérea) presentó 25 % de desoves de organismos, tanto machos como hembras, obtenidos entre los tiempos 70 y 180 min del periodo experimental. El método de exposición aérea previa a la inyección de ISP (Expo.Aérea +ISP), solo resultó con un 8 % de éxito en el desove de ambos sexos. Los métodos de exposición de los organismos a aguas con alto y bajo contenido de oxígeno con una posterior inyección de la monoamina, no causó reacción en la expulsión de gametos.

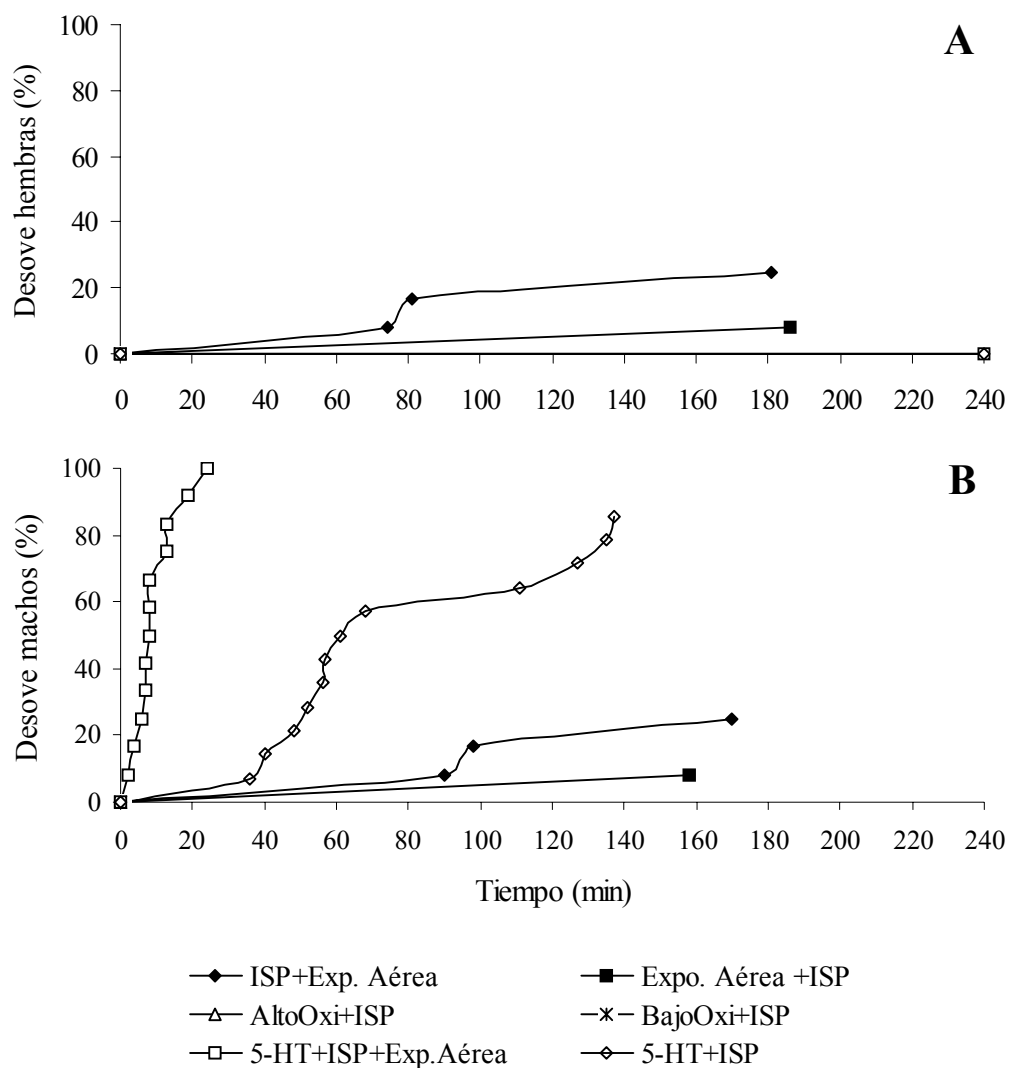


Figura 22. Porcentaje y tiempo de respuesta al desove de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, inducidos mediante 6 diferentes métodos, en los cuales, se usa ISP y 5-HT en combinación con factores estresantes. La descripción de cada denominación se encuentra en la metodología. La sección A corresponde al desove de ovocitos y la sección B corresponde al desove de espermias.

## 10.5 Discusión

En el presente estudio, el químico ISP no reflejó ser un buen inductor de desove de gametos para *A. ventricosus* ni de forma individual ni en forma combinada con 5-HT, debido a que fue menos o casi igual de efectiva que la 5-HT sola. Por tanto, dicha combinación tampoco contribuyó de manera sustancial en el proceso del desove de esta especie. Sin embargo, esta monoamina provocó algunos eventos de desove cuando fue combinada con factores de estrés; por ejemplo, con la exposición aérea de los organismos previamente inyectados con este químico y más aún, cuando los organismos se encontraron en condición de estrés debido al efecto post-transporte, en donde se obtuvo el 100 % de éxito sobre la expulsión de gametos masculinos y 40 % en la expulsión de gametos femeninos. Este último valor fue el más alto observado en este trabajo referente a la expulsión de ovocitos. De igual manera sucedió para la DA, la cual no causó ningún efecto de desove en la mayoría de los métodos empleados en el presente trabajo; solo se observó un éxito de desove del 70% para gametos masculinos y del 25% para gametos femeninos cuando los organismos se encontraron bajo la condición de estrés debido a la transportación reciente. Sobre este aspecto se puede mencionar que en la transportación de organismos se generan condiciones estresantes como son la manipulación, exposición al aire, cambios en la cantidad de oxígeno y temperatura, aglomeración de organismos, ruidos y vibraciones por actividad mecánica entre otros, que pueden además, generar la expulsión de productos sexuales contribuyendo aún más a estimular el desove de estos organismos. Monsalvo-Spencer *et al.* (1997), mencionan que la simple manipulación y exposición al aire de los reproductores durante su colecta y transporte al laboratorio provocan un estímulo mecánico suficiente para inducir al desove en *A. ventricosus*. Como ya se ha mencionado anteriormente, ISP y DA no fueron inductores efectivos para el desove de esta especie. Sin embargo, bajo las condiciones de estrés post-transporte, fueron las que obtuvieron mejores resultados con respecto a las otras monoaminas y el control usado. Es probable que estas monoaminas estén involucradas en este proceso como potencializadores o mediadores del desove. Martínez *et al.* (1996a) mencionan que en el caso del desove inducido, las catecolaminas (DA y NE) en gónada se incrementan mientras que la 5-HT disminuye. Señalan que después de la estimulación, la respuesta depende de la especie, el grado de madurez y el sistema empleado para la estimulación,

lo que repercute en el éxito del desove, que puede o no, ocurrir en minutos u horas posteriores al estímulo.

La DA y NE (sin estímulos adicionales) no reflejaron ser buenos inductores al desove en esta especie. Martínez *et al.* (1996) reportó que las inyecciones intragonadales de 5-HT, DA, y noradrenalina (NE) fueron efectivas para inducir el desove de esperma en *A. purpuratus*, sin embargo, no fueron efectivas en la liberación de ovocitos. Por otra parte, Velasco *et al.* (2007) reportaron que la DA fue muy efectiva para inducir el desove *A. nucleus* y *N. nodosus*, con un 100% de éxito de desove de espermias y ovocitos al inyectar DA al 2 mM en *A. nucleus* y un 100 y 90 % desove de espermias y ovocitos (respectivamente) para *N. nodosus*.

En el presente trabajo se logró observar claramente que la 5-HT es un inductor efectivo en el desove de espermias de esta especie, obteniéndose éxitos de desove desde 80 hasta 100 % de los organismos inducidos, bajo lapsos de tiempos observados no mayores de 25 min y hasta los 140 minutos. Esto concuerda con lo reportado por Monsalvo-Spencer *et al.* (1997) y Lora-Vilchis *et al.* (1997) quienes reportaron que la 5-HT fue un inductor efectivo para el desove de espermias solamente. También concuerda muchos autores afirman que la 5-HT induce solamente la liberación de espermatozoides en estas especies de pectínidos hermafroditas funcionales como *A. irradians* (Gibbson y Castagna, 1984) y *P. ziczac* (Velez *et al.*, 1990).

Ninguna de las monoaminas utilizadas en el presente trabajo fue efectiva para inducir el desove de gametos femeninos de forma constante. Ruiz-Verdugo *et al.* (2000) reportaron la obtención de gametos femeninos por medio de una sola inyección intramuscular de 0.2 mL de 5-HT concentrada al 0.5 mM, con un tiempo aproximado de 60 a 180 min después de realizado el estímulo, sin embargo, no se especifica la proporción de organismos desovados. En el presente estudio, con el uso de la 5-HT se lograron tener algunos desoves de gametos femeninos entre los 160 y 180 min con bajo porcentaje (33 %) de éxito en condiciones de laboratorio, en tanto que en organismos recién colectados de su hábitat natural (condiciones *in situ*), no se logró obtener ningún desove de gametos femeninos. Probablemente estos resultados controversiales y de mayor éxito en laboratorio sean debidos a factores de estrés del tipo mecánico por los diversos niveles de ruido o vibraciones que se generan dentro de un laboratorio, o bien, por otros factores referentes a la calidad del agua y alimento (diferente al hábitat

natural) o una estimulación tipo química por efecto de aglomeración por confinamiento durante el acondicionamiento en dichos laboratorios. En referencia a estos aspectos, Monsalvo-Spencer *et al.* (1997), mencionan que la simple manipulación puede inducir al desove en *A. ventricosus*. Por otra parte, Lillie y Just (1913) demostraron que el confinamiento de organismos entre machos y hembras de *Nereis limbata* provocaba liberación de gametos. También, Maeda-Martínez (2003), menciona que en laboratorio, el proceso de maduración se interrumpe por ocurrencia de desoves no controlados, los cuales, pueden estar relacionarlos con las fluctuaciones de temperatura, de concentración de alimento, actividad de los técnicos y actividad mecánica del mismo laboratorio.

El método de inducción al desove, al cual se sometieron los organismos con inyección de monoaminas y una posterior exposición del organismo al aire por un lapso de 30 a 60 minutos, resultó ser muy efectiva para aumentar el éxito de desove (porcentaje) así como acortar el tiempo de respuesta al estímulo. Ante esto, en el presente trabajo se observó 100% de organismos desovados (solo esperma) en un lapso de 20 minutos posterior a la exposición aérea. Velasco *et al.* (2007) reportaron que bajo el método de exposición al aire se obtiene un 90% de éxito para *A. nucleus* en ambos gametos masculinos y femenino, sin embargo, este método no fue efectivo para *N. nodosus*.

Hasta la actualidad no se ha encontrado un químico efectivo para la inducción de desove de ovocitos para la mayoría de moluscos bivalvos. Ram *et al.* (1992) propusieron un modelo de regulación del desove en moluscos bivalvos, en donde mencionan que los machos y hembras detectan diferentes factores químicos y ambientales por medio de receptores sensoriales y que esos signos son dirigidos por el sistema nervioso a la gónada, pudiéndose inducir la liberación de otra sustancia (hormona o neurotransmisor) que activa el desove de los gametos. Los autores proponen que la 5-HT (en el caso de *Dreissena polymorpha*) puede ser la sustancia intermediaria entre el sistema nervioso y las gónadas. En el presente estudio no se logró observar desoves efectivos de gametos femeninos, sin embargo, se logró observar que las monoaminas se encuentran involucradas en este proceso.

## 10.6 Conclusiones

El ISP no fue un inductor efectivo de desove de gametos en esta especie.

El uso del ISP en organismos estimulados por diferentes factores mecánicos (exposición al aire) y químicos (como la adición de gametos) puede contribuir en potencializar el desove de los organismos.

La 5-HT es un buen inductor de desove de gametos masculinos en esta especie.

El método combinado de la inyección de 5-HT con una posterior exposición al aire (30 a 60 min) brindó los mejores resultados sobre el porcentaje de éxito en el desove de espermias, así como en el tiempo de respuesta al estímulo.

## XI. DISCUSIÓN GENERAL

La fisiología reproductiva de los organismos depende de diversos factores, tanto exógenos como endógenos. En el presente trabajo se observó que en la almeja mano de león los tratamientos térmicos con oscilaciones de baja amplitud, pueden contribuir en corto plazo en mejorar los índices de calidad gametogénica y fisiológicos para un adecuado acondicionamiento reproductivo en laboratorio. Las temperaturas estables óptimas ofrecen altos índices de calidad a largo plazo. Se detectó la presencia de monoaminas en los diferentes órganos de esta especie bajo diferentes estados de desarrollo gametogénico, destacando la presencia de NE y de ISP-L en gónada femenina, mientras que la 5-HT se encontró en gónada masculina. Se observó que estas monoaminas fueron acumuladas, en su respectiva porción de gónada, durante los estadios de producción gametogénica (estadios I a VI) y después decrecieron durante el periodo del desove (estadios V y VI). También se propone que el ISP-L puede influir en el proceso del desove de esta especie.

Uno de los principales problemas para la acuicultura es el abastecimiento de juveniles (semilla) para cultivo. En este sentido, el conocimiento del ciclo reproductivo de las especies y de los factores que intervienen en él, es de gran importancia para la manipulación y control de su reproducción a nivel de laboratorio. Actualmente ya existen empresas mexicanas produciéndola a nivel comercial en Baja California Sur (Laboratorio de reproducción de moluscos del Cibnor), Sonora (Marimex S.A. de C.V) y Sinaloa (Sea Farmers S.A. de C.V.), pero esta actividad se está realizando aún con deficiencia de bases científicas sobre la biología reproductiva. La maduración de reproductores de *N. subnodosus* constituye el mayor problema a resolver, ya que el proceso de maduración se interrumpe por ocurrencia de desoves no controlados y aún se desconocen las variables ambientales para inducir la maduración de esta especie y las causas que provocan los desoves espontáneos (Maeda-Martínez, 2003).

El presente trabajo aporta información sobre la influencia de la temperatura sobre la fisiología de *N. subnodosus* en su acondicionamiento para la reproducción, así como, sobre la fisiología interna involucrada en la regulación de este proceso. Por tanto, con esta información es posible mejorar las técnicas actuales de acondicionamiento de ésta y otras especies de moluscos.



La producción de semillas de pectínidos inicia con el manejo de las fases reproductivas de los adultos que servirán de reproductores. Estos organismos son seleccionados tomando en cuenta su buen aspecto, buena relación del tamaño, edad, conducta activa, aspecto sano, manto turgente sin deformaciones y gónadas maduras. Los organismos son madurados reproductivamente en cualquier época del año, incluso fuera de las épocas naturales de reproducción, manipulando principalmente las condiciones ambientales de temperatura y alimentación. De ésta forma es como se pueden obtener larvas de manera continua. En *N. subnodosus* se han reportado diferentes métodos para lograr un acondicionamiento reproductivo con éxito. Por ejemplo, la empresa Marimex S.A. de C.V. realiza la maduración a temperatura estable de 18 °C y alimentación con 167,000 cél/mL (Maeda-Martínez, 2003). Villavicencio (1997) obtuvo la madurez gonadal de *N. subnodosus* a 24 °C con alimentación continua. Las técnicas más difundidas para lograr la maduración reproductiva los moluscos bivalvos recomiendan el uso de temperatura estable, bajo el supuesto de evitar que parte de la energía destinada a la reproducción se desvíe a procesos de compensaciones fisiológicas si la temperatura fuese variable. Otras investigaciones (Gutiérrez-Villaseñor y Chi-Barragán, 1997; Villegas-Carrasco, 2004), han encontrado que la maduración reproductiva se acelera con incrementos graduales de temperatura. Robles-Mungaray (2001) obtuvo la maduración reproductiva de *N. subnodosus* con un incremento de temperatura (de 17 a 21 °C) en 20 días, y alimentación de  $8.0 \times 10^4$  cél/mL.

En el presente trabajo se realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto de diferentes regímenes térmicos sobre la actividad reproductiva de la almeja mano de león *N. subnodosus*, encontrándose que los métodos donde utilizan regímenes térmicos de alta temperaturas en secuencia estable, pueden contribuir con un rápido desarrollo gametogénico pero asincrónico, alta producción de ovocitos pero de tallas pequeñas y pérdida del peso corporal de los organismos, que pueden provocar desoves parciales. Los regímenes térmicos que presentan oscilaciones de baja amplitud, pueden contribuir al incremento del peso de los organismos, lento crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico con sincronía, baja producción de ovocitos pero de tallas grandes. Los regímenes térmicos que presentan oscilaciones de alta amplitud pueden provocar fuertes pérdidas del peso corporal, destrucción del tejido germinal y decaimiento gonádico a corto plazo. Los regímenes térmicos que presentan una

secuencia estable dentro de un rango cercano y por debajo de la temperatura óptima, pueden contribuir al desarrollo reproductivo en largo plazo pero con sincronismo, una alta producción de ovocitos y mantenimiento del peso corporal estable. Los regímenes térmicos que presentan secuencia combinada entre periodos de estabilidad y con incrementos (pulsos) eventuales, pueden contribuir al rápido desarrollo gametogénico, con baja cantidad de ovocitos de tallas regulares, mantenimiento del peso corporal estable. Sin embargo, si los pulsos son mal planteados, pueden inducir desoves parciales. Por otra parte, en los diferentes tratamientos térmicos experimentales se encontraron organismos con ovocitos en fase de crecimiento y vitelogénesis, a pesar de que la gónada no obtuvo un alto índice de crecimiento (3%) como sucede en el medio natural. Arellano-Martínez (2005) reportó un índice gonadosomático de hasta 25% en organismos de Laguna Ojo de Liebre B.C.S. Esto nos puede indicar que no es necesario un alto índice de crecimiento de la gónada para que el organismo pueda entrar en una fase de madurez gametogénica. Si los organismos se encuentran en fases reproductivas iniciales y en condiciones de temperatura, alimento y reservas energéticas adecuadas para acelerar el metabolismo de la gametogénesis, es posible que éstos pasaran a madurar los pocos ovocitos que se encuentren en la gónada, sin necesidad de producir un incremento considerable de la misma. Se reporta que esta especie tiene un solo desove anual sin embargo Arellano-Martínez (2005) menciona que esta especie también puede tener uno o más desoves facultativos en el periodo de primavera, si las condiciones de temperatura son favorables para este evento. Illanes *et al.* (1985) estudiaron algunos aspectos reproductivos de *A. purpuratus* durante un evento del fenómeno del niño (1982), cuando la temperatura superficial del mar subió 2 °C y la de fondo 2.5 °C, más que los años anteriores y posteriores al fenómeno. Estos autores observaron que el tiempo de maduración de la especie fue más rápida y presentaron mayor evacuación del contenido gonádico y también se observó una mayor captación (300%) de larvas en el medio natural durante éste evento.

Otro propósito del presente trabajo fue obtener más información sobre los mecanismos endógenos que regulan el proceso reproductivo. Este tema ha sido difícil de estudiar en bivalvos. La poca información que se tiene al respecto presenta diferencias en varios aspectos de los resultados obtenidos, los cuales parecen estar muy relacionados con las diferencias entre las especies estudiadas. Generalmente se cree que

los factores ambientales son los que estimulan la regulación interna de la madurez sexual en estos organismos (Shumway, 1991). Muchos estudios se han centrado en el sistema nervioso como coordinador principal de las actividades involucradas en el proceso reproductivo, y en los efectos de diferentes agentes de origen neural involucrados en este proceso. Ante esto, el presente estudio se enfocó en identificar y cuantificar las concentraciones de monoaminas en diversos tejidos de *N. subnodosus*, bajo diferentes estadios de desarrollo gametogénico así como en conocer el comportamiento de dichas concentraciones ante condiciones de temperatura estable y oscilante. En la mayoría de órganos de *N. subnodosus*, se encontró que las concentraciones de monoaminas se incrementan durante la producción gametogénica, alcanzan los máximos valores en el estado de madurez y declinan posterior al desove. En estos estudios se encontró una monoamina casi específica en la gónada hembra de esta especie, la cual es muy parecida al producto químico sintético conocido como Isoproterenol. En base a esta monoamina y a la exclusividad registrada de la 5-HT en tejido de gónada masculina, se puede sugerir que *N. subnodosus*, siendo una especie hermafrodita funcional, puede estar utilizando diferentes neurotransmisores de forma específica (5-HT en espermas e ISP-L en ovocitos) para la producción de gametos y para la expulsión alternada de gametos femeninos y masculinos. La 5-HT puede ser la monoamina que influye en la transferencia de nutrientes del músculo abductor estriado a la gónada para la gametogénesis. Además, se observó que a temperaturas estables y oscilantes de baja amplitud, los niveles de monoaminas se mantienen en concentraciones similares en ambos estados térmicos, tal vez debido a una adaptación de los organismos a las fluctuaciones térmicas de baja amplitud.

El desove es uno de los eventos mas importantes en el proceso reproductivo de los invertebrados y en el medio natural puede ocurrir en poblaciones completas en un corto lapso de tiempo. Sin embargo en organismos madurados en laboratorio es frecuente que no desoven al aplicar un estímulo inductor a pesar de que sus gónadas parezcan maduras y se encuentren en el periodo natural de desove. El desove en moluscos frecuentemente se correlaciona con una variedad de cambios ambientales pero los mecanismos que disparan el desove aun se encuentran en estudio (Uriarte *et al*, 2001). Con base en el resultado de la presencia del ISP-L en gónada femenina, se sugiere que ésta puede estar involucrada en el proceso del desove de ovocitos de esta

especie, por tanto se procedió a realizar otro estudio exploratorio para conocer si el químico artificial ISP puede inducir al desove a las especies hermafroditas funcionales. Sin embargo la especie *N. subnodosus* no se encontraba en época de máximo desarrollo gametogénico, por tanto, el trabajo exploratorio sobre la efectividad del ISP como agente inductor de desove se llevó a cabo en el pectínido hermafrodita funcional *A. ventricosus*. Los resultados en esta especie no fueron muy alentadores en el sentido del desove. Sin embargo, sí se observó que esta monoamina puede tener una influencia potencializadora para el desove de machos y hembras.

Con base en estos resultados se sugiere que *N. subnodosus* tiene ciertos límites térmicos de tolerancia para activar o inactivar los diferentes estados de desarrollo reproductivo dependiendo de la condición general, del estado reproductivo en que se encuentren y del historial térmico al que se encuentran adaptadas. Para determinar estos límites en relación a los diferentes estadios reproductivos en la almeja mano de león, son necesarios estudios más precisos sobre análisis de temperaturas y neurosecreciones. Se puede proponer que *N. subnodosus* originaria de Guerrero Negro B.C.S. puede presentar un límite para activar la acumulación de nutrientes no mayor a los 19 °C (estadio neurosecretorio I), posteriormente en un rango temperatura muy cercana al óptimo (posiblemente entre 19 y 21 °C) se activa la transferencia de nutrientes a la gónada para la producción de epitelio germinal (estadios neurosecretorios II y III). A partir de la temperatura óptima (21 o 22 °C) se activa la vitelogénesis de los ovocitos que se encuentran en gónada (estadio neurosecretorio IV). Por último, el desove de los ovocitos maduros puede activarse a un límite cercano a los 25 °C (estadio neurosecretorio V). Es posible que los organismos necesiten de cierto periodo de tiempo para la acumulación de algún agente que active cada estadio reproductivo. También, como lo mencionan Sastry y Blake (1979) la exposición a temperaturas sub-letales y condiciones de alimentación inadecuada (sobre todo en las etapas iniciales) pueden ocasionar que se activen o inactiven los diferentes estados gametogénicos.

Para un buen acondicionamiento reproductivo de esta especie (u otras), el régimen de temperatura a utilizar se debe escoger de acuerdo a las condiciones fisiológicas en las que se encuentran los organismos reproductores seleccionados. Por ejemplo: si se seleccionan organismos en estado reproductivo vegetativo, es necesario brindarles altas concentraciones de alimento durante cierto tiempo, bajo un régimen

térmico estable que se encuentre varios grados por debajo de la temperatura óptima de la especie, para que pueda almacenar reservas para la reproducción. Posteriormente se puede optar por un régimen térmico oscilante de baja amplitud, en un rango que no sobrepase el límite de activación de la vitelogénesis. A continuación, se debe incrementar de la temperatura, para activar la vitelogénesis, manteniéndola de forma estable y muy por debajo del límite que activa el desove de ovocitos. Por otra parte, si se obtienen organismos en fases intermedias o avanzadas del estado reproductivo, es necesario cuidar la temperatura de transporte y la aclimatación de los organismos en su llegada al laboratorio y escoger un régimen de temperatura adecuada dependiendo de las condiciones de los organismos y las necesidades del acuicultor.

Con respecto al desove inducido de los organismos por medio de monoaminas, se puede mencionar que el ISP no mostró buenos resultados como inductor al desove en *A. ventricosus*. Sin embargo, se puede concluir que la inyección de 0.4 mL de 5-HT al 1mM en gónada, seguida de una exposición aérea de los organismos por un periodo de 30 a 60 min, arroja buenos resultados en la expulsión de espermatozoides, y posiblemente (a largo plazo) de ovocitos.

## XII. CONCLUSIONES GENERALES

Los tratamientos térmicos con régimen de alta temperatura pueden contribuir en una pérdida del peso corporal, rápido crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico pero asincrónico, alta producción de ovocitos pero con bajo crecimiento de los mismos.

Los tratamientos térmicos con oscilaciones térmicas de baja amplitud, pueden contribuir en un incremento del peso húmedo, lento crecimiento gonádico, rápido desarrollo gametogénico con sincronía, baja producción de ovocitos pero con alto crecimiento de los mismos.

Las oscilaciones térmicas de alta amplitud pueden contribuir en fuertes pérdidas en los valores del ICG, así como de calidad en el desarrollo reproductivo.

La estabilidad térmica de baja temperatura, puede contribuir a largo plazo en altos valores de calidad en el desarrollo reproductivo, mientras que el tratamiento combinado de estabilidad y oscilación térmica de baja amplitud pueden contribuir en corto plazo.

*Nodipecten subnodosus* puede entrar en una fase de maduración de gametos aun cuando no presente altos índices de crecimiento gonádico.

En la mayoría de órganos de *N. subnodosus*, las concentraciones de monoaminas se incrementan durante la producción gametogénica, alcanzan los máximos valores en el estado de madurez y declinan posterior al desove.

La NE está presente en todos los tejidos estudiados y en todas las etapas reproductivas de *N. subnodosus*.

Es posible que *N. subnodosus*, siendo una especie hermafrodita funcional, puede estar utilizando diferentes neurotransmisores, de forma específica, en la producción de gametos y desove, para cada género sexual.

ISP-L puede estar relacionado en la producción y/o desove de ovocitos en *N. subnodosus*.

La 5-HT puede estar involucrada en la producción y/o desove de gametos masculinos en *N. subnodosus*.

La 5-HT puede ser la monoamina que influencia la transferencia de nutrientes del músculo abductor estriado a la gónada para la gametogénesis en *N. subnodosus*.

Es posible que la estrecha correlación de la dinámica general de las monoaminas en los órganos con el ciclo reproductivo, pueda ser una estrategia de *N. subnodosus* para tener una mayor capacidad de respuesta en actividades fisiológicas (por ejemplo, la movilización de nutrientes de reserva, actividad ciliar, respiración, alimentación, entre otros), ante una mayor demanda de energía para la producción de gametos.

En *N. subnodosus* durante el periodo de inactividad reproductiva, los niveles de NE se mantienen estables mientras que la DA, 5-HT e ISP-L son bajos o nulos.

Posiblemente la NE y el ISP-L son los agentes involucrados en el proceso de gametos femeninos, en tanto que la DA y 5-HT se encuentran involucradas en la producción de gametos masculinos en *N. subnodosus*.

A temperatura estable y oscilante de baja amplitud, los niveles de monoaminas se mantienen en concentraciones similares en ambos estados térmicos, tal vez, debido a una adaptación de los organismos a las fluctuaciones térmicas de baja amplitud.

El ISP no fue un inductor efectivo de desove de gametos en *A. ventricosus*. Sin embargo, en organismos estimulados por diferentes factores mecánicos (exposición al aire) y químicos (como la adición de gametos) puede contribuir en potencializar el desove de los organismos.

La 5-HT es un buen inductor de desove de gametos masculinos en *A. ventricosus*.

El método combinado de la inyección del agente químico con una posterior exposición al aire (30 a 60 min) brindó los mejores resultados sobre el tiempo de respuesta al estímulo y éxito de desove de *A. ventricosus*.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aiello E.L. 1962. Identification of the cilioexcitatory substance present in the gill of mussel *Mytilus edulis*. J. Cell. Comp. Physiol. 60: 17-21.
- ❖ Arellano-Martínez M., Racotta I.S., Ceballos-Vázquez B.P. y Elorduy-Garay J.F. 2004. Biochemical composition, reproductive activity, and food availability of the Lion's Paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México. J. Shellfish Res. 23: 15-23.
- ❖ Arellano-Martínez M. 2005. Características ecofisiológicas de la reproducción de *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (Pectinidae) en la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Tesis doctoral. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. IPN. 151 pp.
- ❖ Barber B.J. y Blake N.J. 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Gay). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 52: 121-134.
- ❖ Barber B.J. y Blake N.J. 1991. Reproductive physiology. En: Shumway, S.E. (ed.). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier. New York. 7: 377-428.
- ❖ Bayne B.L. 1976. Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press. 505 pp.
- ❖ Beiras R. y Widdows J. 1995. Effect of the neurotransmitters dopamine, serotonin and norepinephrine on the ciliary activity of mussel (*Mytilus edulis*) larvae. Marine Biology. 122: 597-603.
- ❖ Benninger P.G. y Le Pennec M. 1991. Functional anatomy of scallops. En: Shumway S.E. (ed.). Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier. New York. 3: 133-224.
- ❖ Berry R.W. 1984. Environmental temperature modulates the rate of synthesis of egg-laying hormone in *Aplysia*. J.Com. Physiol.154: 545-548.
- ❖ Blake N. J. 1972. Environmental regulation of neurosecretion and reproductive activity in the bay scallop, *Aequipecten irradians* (Lamarck). Tesis de Doctorado, University of Rhode Island, Kingston. 161 pp.
- ❖ Blake N.J. y Sastry A.N. 1979. Neurosecretory regulation of oogenesis in the bay scallop *Argopecten irradians* (Lamarck).En: Naylor E. y Hartnoll R.G. (eds). Cyclic Phenomena in Marine Plants and Animals. Pergamon Press. New York. 181-190.



- 
- ❖ Boss K.J. 1982. Mollusca. En: Parker S.P. (ed.), *Synopsis and Classification of Living Organisms*. McGraw-Hill. New York. 1: 945-116 pp.
  - ❖ Boyle J.P. y Yoshino T.P. 2002. Monoamines in the albumen gland, plasma, and central nervous system of the snail *Biomphalaria glabrata* during egg-laying. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A: 411-422.
  - ❖ Bradford H.F. 1988. *Fundamentos de Neuroquímica*. Ed. Labor. 1ra Edición. Barcelona, España. 485 pp.
  - ❖ Burrell D.E y Stefano G.B. 1983. Analysis of monoamine accumulation in the neuronal tissues of *Mytilus edulis* (Bivalvia). Variations due to age. *Comp. Biochem. Physiol.* 74C: 59-63.
  - ❖ Carroll M.A. y Catapane E.J. 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 148: 445-450.
  - ❖ Catapane E.J. 1983. Comparative study of the control of lateral ciliary activity in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C: 403-405.
  - ❖ Coe W.R. 1945. Development of the reproductive system and variations in sexuality in *Pecten* and other pelecypod mollusks. *Trans. Conn. Acad. Arts. Sci.* 36: 673-700.
  - ❖ Croll R.P., Too C.K., Pani A.K. y Nason J. 1995. Distribution of serotonin in the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Invertebrate Reproduction and development.* 28(2): 125-135.
  - ❖ Croll R.P. 2001. Catecholamine-Containing Cells in the Central Nervous System and Periphery of *Aplysia californica*. *The Journal Of Comparative Neurology.* 441: 91-105.
  - ❖ Dall W.H. 1898. Contributions to the Tertiary Fauna of Florida, with especial reference to the Miocene silex- beds of Tampa, and the Pliocene beds of the Caloosahatchie River, including in many cases a complete revision of the generic groups treated of and their American Tertiary Species. *Transactions of the Wagner Free Institute of Science.* 3: 571-947.
  - ❖ De Jong-Brink M., Bergaming-Sassen M.J.M., Kuyt J.R.M., y Tewari-Kanhai A.L. 1986. Enzyme cytochemical evidence for the activation of adenylate cyclase in the follicle cells of vitellogenic oocytes by the dorsal body hormone in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63: 212-219.
  - ❖ Dogterom G.E., Bohlken S. y Joosse J. 1983. Effect of photoperiod on the time Schedule of egg-mass production in *Lymnaea stagnalis*, as induced by ovulation hormone injections. *Gen. Comp. Endocr.* 49: 255-260.

- 
- ❖ Dorange G. 1989. Les gametes de *Pecten maximus* L. (Mollusca, Bivalvia). Tesis de Doctorado, Université de Bretagne Occidentale. Francia. 140 pp.
  - ❖ Farias A. y Uriarte I. 2001. Effect of microalgae protein on the gonad development and physiological parameters for the scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). J. Shellfish Res. 20(1): 97-105.
  - ❖ Fong P.P. y Kyojuzuka K. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Activation by internal or external application of serotonin. J. Exp. Zool. 265: 587-598.
  - ❖ Fong P.P., Deguchi R. y Kyojuzuka K. 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Macra chinensis* from Central Japan. Biol. Bull. 191: 27-32.
  - ❖ Galtsoff P.S. 1930. The role of chemical stimulation in the spawning reactions of *Ostrea virginica* and *Ostrea gigas*. Zoology: National Academy of Sciences. 16(9): 555-559.
  - ❖ Galtsoff P.S. 1938. Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*: II. Stimulation of spawning in the female Oyster. Biol. Bull. 75: 286-307.
  - ❖ Galtsoff P.S. 1940. Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*: III. Stimulation of spawning in the female Oyster. Biol. Bull. 78: 117-135.
  - ❖ Gibbons M.C. y Castagna M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture. 40: 189-191.
  - ❖ Gómez-Jarabo G. 1997. Farmacología de la conducta: Manual Básico para Psicoterapeutas y Clínicos. Ed. Síntesis. Madrid, España. 544 pp.
  - ❖ González-Estrada F. 2003. Temperaturas letales y temperatura óptima para crecimiento de una población de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz B.C.S. 90 pp.
  - ❖ Gosling E. 2003. Culture of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Europe. En: Gosling E. (ed.). Bivalve Molluscs. Biology, Ecology and Culture. Fishing News Books – Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido. 317-332.
  - ❖ Gosselin R.E., Moore K.E. y Milton A.S. 1962. Physiologic control of molluscan gill cilia by 5-hydroxytryptamine. J. Gen. Physiol. 46: 277-96.
  - ❖ Greenberg B. y Mounzih K. 1960. The response of the Venus heart to catecholamine and high concentrations of 5-hydroxytryptamine. Br. J. Pharmacol. 15: 365-374.

- ❖ Guerrier P., Leclecr-David C. y Moreau M. 1993. Evidence for the involvement of internal calcium stores during serotonin-induced meiosis reinitiation in oocytes of the bivalves mollusc, *Ruditapes philippinarum*. *Develop. Biol.* 159: 474-484.
- ❖ Gutiérrez-Villaseñor C.E. y Chi-Barragán G. 1997. Effect of the temperature and feeding ratio on the conditioning of *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835. 11<sup>th</sup> International Pectinid Workshop. 11–15 Abril, La Paz, B.C.S., México. 73–75.
- ❖ Herbert D.G. 1982. Fine structural observations on the juxtaganglionar organ of *Gibbula umbilicalis* (Da Costa). *J. Molluscan Stud.* 48: 226-228.
- ❖ Hernández R.M., Gómez G.J., Sánchez O.C. y Saldierna, M.R. 1993. Atlas de temperatura superficial en el complejo lagunar de Bahía Magdalena – Bahía Almejas, Baja California Sur, México 1980 – 1989. Ed. Secretaría de Marina. Atlas Oceanográfico Nacional. Sección Físico – Químicos Vol. II.
- ❖ Hiroshi M., Hiroko H., Hariyama T., Takano S. y Yamagishi H. 2004. Photosensitive neurogenic heart of the isopod crustacean *Ligia exotica*. *Proc. R. Soc.* 273B: 2535-2540.
- ❖ Horohov J., Silverman H., Lynn J.W. y Dietz T.H. 1992. Ion transport in the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Biol. Bull.* 183: 297-303. Iberoamérica: ciencia y Acuicultura. Limusa. México.1: 1-25pp.
- ❖ Jones H.D. y Richards O.G. 1993. The effects of acetylcholine, dopamine and 5-hydroxytryptamine on water pumping rate and pressure in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170: 227-240.
- ❖ Joosse J. 1988. The hormones of molluscs. En: Laufer H. y Downer R.G.H. (eds.) *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*. Alan R. Liss. Inc. New York. 89-140 pp.
- ❖ Keen M.A. 1971. *Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. Stanford, California: Stanford University Press. 1064 pp.
- ❖ Keen M.A. y Coan E. 1974. *Marine molluscan genera of western north America, an illustrated key*. Stanford University Press. 208 pp.
- ❖ Khotimchenko Y.S. 1991. Biogenic monoamines in oocytes of echinoderms and bivalve molluscs. A formation of intracellular regulatory systems in oogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 671–675.

- ❖ Khotimchenko Y.S. y Deridovich I.I. 1991. Monoaminergic and cholinergic mechanisms of reproduction control in marine bivalve molluscs and echinoderms: a review. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 311-317.
- ❖ Kinne O. 1970. Temperature: animals-invertebrates. In: Kinne O. (Editor), *Marine ecology. Vol. I, Environmental factors.* Wiley-Interscience. London. 407-514 pp.
- ❖ Krusch B., Schoenmakers H.J.N., Voogt P.A. y Nolte A. 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda). An in vitro study. *Comp Biochem Physiol.* 64 B: 101-104.
- ❖ Kuhlmann D. 1966. Die Dorsalkörper der Stylommatophoren. *Z Wiss Zool.* 172: 23-40.
- ❖ Kupfermann I. 1967. Stimulation of egg-laying: Possible neuroendocrine functions of bag cells of abdominal ganglion of *Aplisia californica*. *Nature, Lond.* 216: 814-815.
- ❖ Le Bras Y.M. 1984. Circadian variations of catecholamine levels in brain, heart, and plasma in the cel, *Anguilla anguilla* L., at three different times of year. *Gen. Comp. Endocrinol.* 55(3): 472-479.
- ❖ Lever J. 1957. Some remarks on neurosecretory phenomena in *Ferrisia sp.* (Gastropoda Pulmonata). *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.* 61C:235-242.
- ❖ Lever J. 1958. On the relation between the medio-dorsal bodies and the cerebral ganglia in some pulmonates. *Arch Néerl Zool.* 13:194-201.
- ❖ Lillie F.R. y Just E.E. 1913. Breeding habits of the heteronereis form of *Nereis limbata* at woods hole, mass. *Biol. Bull.* 24: 147-159.
- ❖ Longo F.J. 1983. Meiotic Maturation and Fertilization. En: Verdonk N.H., Van Den Bigelaar J.A.M. and Tompa, A.S. (eds). *The Mollusca, Vol.3. Development.* Academic Press. New York. 498 pp.
- ❖ López-Sánchez J.A. 2003. Tasa de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) a dos tallas, en función de la temperatura y cantidad del alimento. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S., México. 85 pp.
- ❖ Lora- Vilchis M.C. y Maeda- Martínez A.N. 1997. Ingestion digestion index of Catarina scallop *Argopecten ventricosus* (circularis, Sowerby II, 1842), veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research.* 28: 905-910.
- ❖ Lubet P. 1956. Effets de l'ablation des centres nerveux sur l'émission des gametes chez *Mytilus edulis* L. et *Chlamys varia* L. (Mollusques Lamellibranches). *Ann. Sci. Nat. Zool.* 18:175-183.

- ❖ Lubet P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilides et les Pectinides. Rev. Trv. Inst. Peches Marit. 23: 389-548.
- ❖ Lubet P., Besnard J.Y., Faveris R. y Robbins I. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St Jacques (*Pecten maximus* L.) Oceanis. 13(3): 265-290.
- ❖ Lucas A. y Benninger P.G. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture. 44: 187-200.
- ❖ Luna-González A. 1997. Ciclo reproductivo de la almeja catarina *Argopecten ventricosus*, cultivada en la rada del Puerto de Pichilingue, B.C.S. y su relación con el medio. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. La Paz, B.C. S.
- ❖ Mackie G.L. 1984. Bivalves. En: Wibur K.M., Tompa A.S., Verdonk N.H. y Van Den Biggelaar J.A.M. (eds.). The Mollusca: Reproduction. Academic Press. New York. 7(5): 351-418.
- ❖ Maeda-Martínez AN, Ormart-Castro P, Mendez L, Acosta B, Sicard MT. 2000. Scallop growout using a new bottom-culture system. Aquaculture 189: 73-84.
- ❖ Maeda-Martínez A.N., Lombeida P., Freitas L., Lodeiros C. y Sicard M.T. 2001. Cultivo de Pectínidos en fondo y en estanques. En: Maeda-Martínez A.N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Ibero-América. Ciencia y Acuicultura. Editorial Limusa. México. 11: 213-231.
- ❖ 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 pp.
- ❖ Malanga C.J., Wenger G.R. y Aiello E. 1972. Endogenous dopamine in bivalve gills. Comp. Biochem. Physiol. 43A: 825-830.
- ❖ Martínez G. y Rivera A. 1994. Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. Invertebr. Reprod. Dev. 25(2): 167-174.
- ❖ Martínez G., Mettifogo L. y Campos E. 1996. Studies on the endogenous control of the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. J. Med. & Appl. Malaco. 8: (1).
- ❖ Martínez G., Saleh F., Mettifogo L., Campos E. y Inestrosa N. 1996. Monoamines and the release of gametes by the scallop *Argopecten purpuratus*. J. Exp. Zool. 274: 365-372.

- ❖ Martínez G., Mettifogo L., Lenoir R. y Campos E.O. 1999. Prostaglandins reproduction of the scallop *Argopecten purpuratus*. I. Relationship with gamete development. *J. Exp. Zool.* 284: 225-231.
- ❖ Martínez G. y Pérez H. 2003. Effect of different temperature regimes on reproductive conditioning in the scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture.* 228: 153-167.
- ❖ Masseur I., Bannon P., Anctil M. y Ois Dube F. 2002. Localization and Quantification of Gonad Serotonin During Gametogenesis of the Surf Clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 202: 23-33.
- ❖ Mathieu M., Robbins I. y Lenoir F. 1990. A novel approach to the neuroendocrine control of the gametogenesis and the gamtogenesis-related storage cycle of *Mytilus edulis* L. En: Hoshi, M. y Yamashita, O. (eds.) *Advances in Invertebrate Reproduction Vol. 5.* Elsevier. New York. 239-246.
- ❖ Matsutani T. y Nomura T. 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Mar. Biol. Lett.* 3: 353-358.
- ❖ Matsutani T. y Nomura T. 1984. Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Jap. Soc. Scien. Fish.* 50: 425-430.
- ❖ Matsutani T. y Nomura T. 1986. Serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and gonad of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Cell Tissue Res.* 244: 515-517.
- ❖ Matsutani T. 1990. Endogenous factors controlling spawning in marine bivalves. En: Hoshi M. y Yamashita, O. (eds.). *Advances in Invertebrate Reproduction, Vol. 5,* Elsevier. New York. 231-237.
- ❖ Miller W., Nishioka R.S. y Bern H.A. 1973. The juxtaganglionic tissue and the brain of the abalone *Haliotis rufescens* Swainson. *The Veliger.* 16: 125-129.
- ❖ Monsalvo-Spencer A., Maeda-Martinez A.N. y Reynoso-Granados T. 1997. Reproductive maturity and spawning induction in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus* (=circularis) (Sowerby II, 1842). *J. Shellfish Res.* 16(1): 67-70.
- ❖ Morse D.E., Duncan H., Hooker N. y Morse A. 1977. Hydrogen peroxide induced spawning in mollusks, with activation of prostanglandin endoperoxide synthetase. *Science* 196: 298-300.
- ❖ Nelson T.C. 1928. Relation of spawning of the oyster to temperature. *Ecology.* 9: 145-154.

- ❖ Nelson T.C., y Allison J.B. 1940. On the nature action of dilantin: a new hormone-like substance carried by the spermatozoa of the oyster. *J. Exp. Zool.*, 85: 299-338.
- ❖ Nolte A. 1983. Investigations on the dorsal bodies of Stylommatophoran snails. In Lever J., Boer H.H. (eds): *Molluscan Neuro-endocrinology*. Amsterdam. North- Holland. 142-146 pp.
- ❖ Osada M. y Nomura T. 1989a. Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C(2): 349-353.
- ❖ Osada M. y Nomura T. 1989b. Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C(1): 171-173.
- ❖ Osanai K. 1975. Seasonal gonad development and sex alteration in the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Mar.Biol. Stn. Asamushi.* 15: 81-88.
- ❖ Pani A.K y Croll R.P. 1995. Distribution of catecholamines, indolamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). *Cellular and Molecular Neurobiology.* 15(3): 371-386.
- ❖ Pani A.K y Croll R.P. 2000. Catechol Concentrations in the Hemolymph of the Scallop, *Placopecten magellanicus*. *General and Comparative Endocrinology.* 118: 48-56.
- ❖ Paulet Y.M., Donval A. y Bekhadra F. 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23: 89-94.
- ❖ Paulet Y.M. 1990. Role of reproduction in the determinism of recruitment in *Pecten maximus* (L) from the Bay of Saint Brieuç. Tesis de Doctorado, Universite de Bretagne Occidentale. Francia. 340 pp.
- ❖ Pani A.K. y Croll R.P. 1995. Distribution of catecholamines, indoleamines, and their precursors and metabolites in the scallop, *Placopecten magellanicus* (Bivalvia, Pectinidae). *Cell. Mol. Neurobiol.* 15: 371-386.
- ❖ Pazos A.J., Roman G., Acosta C.P., Abad M. y Sanchez J.L. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp..Mar. Biol. Ecol.* 211: 169-193.
- ❖ Peña B. J. 2001. Taxonomía, morfología distribución y hábitad de los pectínidos. En: Maeda-Martínez A.N. (ed). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Editorial Limusa. México. 1: 1-26.

- ❖ Pinsker H.M. y Parsons D.W. 1985. Temperature dependence of egg-laying in *Aplysia brasiliiana* and *A. californica*. J. Comp. Physiol. 156B: 21-27.  
*polymorpha*): Activation by internal or external application of serotonin. J. Exp. Zool. 265: 587-598.
- ❖ Prytherch H.F. 1929. Bull. Bureau Fisheries, 44, pp. 429-503. Doc. No. 1054.
- ❖ Ram J.L., Fong P., Croll R.P., Nichols S.J. y Wall D. 1992. The zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), a new pest in North America: reproductive mechanisms as possible targets of control strategies. Invertebr. Reprod. Dev. 22: 77-86.
- ❖ Ram J.L., Fong P.P. y Kyoizuka K. 1996. Serotonergic mechanism mediating spawning and oocytes maturation in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. Inv. Reprod. Dev. 30:29-37.
- ❖ 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 pp.
- ❖ Reynecke-Reyes M.A. 1996. Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* en la Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. Boletín pesquero. CRIP, La Paz. 3: 17 – 20.
- ❖ Robles-Mungaray M., Mazón-Suástegui J.M., Monsalvo-Spencer P., Osuna-García M. y Flores-Higuera F. 2001. Antecedentes, estado actual y perspectivas del cultivo de *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus* en la península de Baja California, México. En: Consulta técnica del proyecto II.6, CITED. Cultivo de los pectínidos gigantes del genero *Nodipecten*: problemas y perspectivas. Florianopolis, Brasil. 21-23 de noviembre. 34-35 pp.
- ❖ Rodríguez-Jaramillo C., Maeda-Martínez A.N., Valdéz M.E., Reynoso-Granados T., Monsalvo-Spencer P., Prado-Ancona D., Cardoza-Velasco F. y Robles-Mungaray M. 2001. The effect of temperature on the reproductive maturity of the penshell *Atrina maura* (Sowerby 1835) J. Shellfish Res. 20(1): 39-47.
- ❖ Rodríguez-Jaramillo C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, B.C.S. México. 75 pp.
- ❖ Román G., Martínez G., García O. y Freites L. 2001. Reproducción. En: Maeda-Martínez A.N. (ed). Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura. Editorial Limusa. México. 2: 27-59.



- ❖ Ruiz-Verdugo C.A., Ramirez J.L., Allen S.K. Jr. e Ibarra A.M. 2000. Triploid Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): Growth, gametogénesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquacult. Eng.* 20: 175-189.
- ❖ 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. 1975. Physiology and ecology of reproduction in marine invertebrates. En: Vernberg, F.J. (ed.). *Physiological ecology of marine organisms.* University of South Carolina Press. Columbia. 279–299.
- ❖ Sastry A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). En: Giese, C. y Pearse, J.S. (eds.). *Reproduction of marines invertebrates.* Academic Press, New York. 113-292.
- ❖ Sato E., Wood H.N., Lynn D.G., Sahni M.K. y Koide S.S. 1985. Meiotic arrest in oocytes regulated by a *Spisula* factor. *Biol. Bull.* 169: 334-341.
- ❖ Saucedo-Lastra P.E. 2001. Investigación aplicada al acondicionamiento gonadal y reproducción de la madreperla de calafia, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) en el laboratorio. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz, B.C.S. México.
- ❖ Scharrer B. 1935. Ueber dat Hanströmsche Organ X bei Opisthobranchiern. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli.* 15: 132-142.
- ❖ Shaw B.L. y Battle H.I. 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* 35: 325-347.
- ❖ Shumway S.E. 1991. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture.* Elsevier Science Publishers. New York. 1095 pp.
- ❖ Sicard-González M.T. 1999. Temperatura letal superior y temperatura óptima de una población de almeja catarina (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). Tesis de maestría. CICIMAR. I.P.N. La Paz, B.C.S. 95 pp.
- ❖ Sicard-González M.T. 2006. Efecto de la Oscilación Térmica en la Fisiología de la almeja Mano de León (*nodipecten subnodosus* sowerby, 1835). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. 185 pp.
- ❖ Siegel G.J., Agranoff B.W., Wayne R. y Molinoff P.B. 1993. *Basic neurochemistry.* 5ta edición. Raven Press, New York. 1080 pp.
- ❖ Simpson L. 1969. Morphological studies of possible neuro-endocrine structures in *Helisoma tenue* (Gastropoda Pulmonata). *Z. Zellforsch.* 102: 570-593.

- ❖ Siniscalchi A., Cavallini S., Sonetti D., Sbrenna G., Capuano S., Barbin L., Turolla E. y Rossi R. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Marine Biology*. 144: 1205-1212.
- ❖ Smith J.R. 1982. A survey of endogenous dopamine and serotonin in ciliated and nervous tissues of five species of marine bivalves, with evidence for specific, high-affinity dopamine receptors in ciliated tissue of *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 71C: 57-61.
- ❖ Smith J.R. y Sleet R.B. 1982. The effects of laboratory environment, holding time and simulated intertidal conditions on dopamine and serotonin levels in ciliated and nervous tissues of the marine bivalve *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73C: 115-119.
- ❖ Smith J.R. 1987. The role of the nervous system in algae-induced gamete release by *Mytilus californianus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C: 215-218.
- ❖ Smith S.A. y Croll R.P. 1997. Mollusca. En: Adams T.S. (ed.). *Reproductive biology of invertebrates*. State University Station, Fargo, ND. U.S.A. 151 pp.
- ❖ Smith S.A., Nason J. y Croll R.P. 1998. Distribution of catecholamines in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Can. J. Zool.* 76: 1254-1262.
- ❖ Stefano G.B. y Aiello E. 1975. Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Biol. Bull.* (Woods Hole, Mass.). 148: 141-156.
- ❖ Stefano G.B., Catapane E.J. y Stefano J.M. 1976. Temperature effects on ciliary activity and serotonin levels in *Mytilus edulis*. *Ani. Zool.* 16: 184.
- ❖ Stefano G.B. y Catapane E.J. 1977. Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia*. 33: 1341-1342.
- ❖ Stefano G.B., Catapane E.J. y Stefano J.M. 1977. Temperature dependent ciliary rhythmicity in *Mytilus edulis* and the effects of monoaminergic agents on its manifestation. *Biol. Bull.* (Woods Hole Mass.). 153: 618-629.
- ❖ Stefano G.B. 1990. *Neurobiology of Mytilus edulis*. Manchester University Press. Manchester and New York. 311 pp.
- ❖ Sweeney D.C. 1968. The anatomical distribution of monoamines in a fresh-water bivalve mollusc, *Sphaerium sulcatum* (L.) *Comp. Bioc. Physiol.* 25: 601-613.
- ❖ Takeda N. 1989. Hormonal control of reproduction in land snail *Venus*. *Jap. Jour. Malac.* 48: 99-139.




- 
- ❖ Twarong B.M y Muneoka Y. 1972. Calcium and the control of contraction and relaxation in a molluscan catch muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 489-503.
  - ❖ Uriarte I., Rupp G. y Abarca A. 2001. Producción de Juveniles de Pectínidos Iberoamericanos Bajo Condiciones Controladas. En: Maeda-Martínez A.N. (ed). *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Editorial Limusa. México. 8: 147-172.
  - ❖ Velasco L.A., Barrios J. y Acosta E. 2007 “Spawning induction and early development of the caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*”. *Aquaculture*. 266: 153-165.
  - ❖ Velez A., Alifa A. y Azuaje O. 1990. Induction of spawning by temperatura and serotonin in the hermaphroditic tropical scallop, *Pecten ziczac*. *Aquaculture*. 84: 307-313.
  - ❖ Villalejo-Fuerte M. y Ceballos-Vázquez B.P. 1996. Variación de los índices de condición general, gonádico y de rendimiento muscular en *Argopecten circularis* (Bivalvia: Pectinidae). *Revista Biología Tropical*. 44: 591-594.
  - ❖ Villavicencio-Peralta G. 1997. Acondicionamiento gonadal, desarrollo embrionario y cultivo de larvas de almeja mano de león, *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835), alimentados con cuatro especies de microalgas. Tesis Profesional. ITMAR. La Paz B.C.S., México. 89 pp.
  - ❖ Villegas-Carrasco M. 2004. Evaluación de los cultivos larvarios de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) realizados en el laboratorio de larvicultura de especies marinas del CIBNOR, de 1998-2003. Tesis profesional. Universidad Autónoma de B.C.S., La Paz, México. 106 pp.
  - ❖ Widdows J. 1976. Physiological adaptation of *Mytilus edulis* to cyclic temperatures. *J. Comp. Physiol.* 105: 115-128.
  - ❖ Wijdenes J., Schluter A.C.M., Gomot L. y Boer H.H. 1987. In the snail *Helix aspersa* the gonadotropic hormone-producing dorsal bodies are under inhibitory nervous control of putative growth hormone-producing neuroendocrine cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68. 224-229.
  - ❖ Young R.T. 1945. Stimulation of spawning the mussel (*Mytilus californianus*). *Ecology*. 26: 58-69.

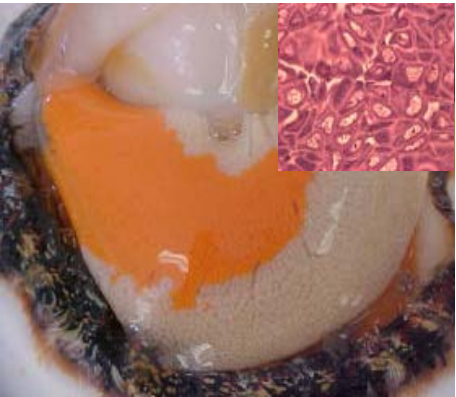
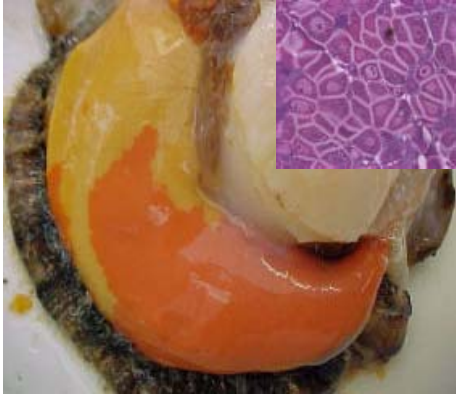

---

# **ANEXO I**

## ANEXO I

Cuadro 1. Estadios de maduración macroscópica del desarrollo gonadal de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* Reportado por Ramírez-Castillo (2003).

Estadio	Aspectos macroscópicos	Figura
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gónada vacía, transparente o hialina, plana y roma.</li> <li>-Parte femenina y masculina no definidas.</li> <li>-Intestino fácilmente visible.</li> </ul>	
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La gónada en crecimiento inicial. La coloración característica de las partes masculina y femenina empieza a hacerse visible. Blanquecina en la parte proximal (macho) y naranja en la parte distal (hembra).</li> <li>- Su forma tiende a afilarse. Intestino aun observable.</li> </ul>	
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La gónada gana volumen y consistencia. Su coloración aumenta de tono pero su apariencia se muestra granulosa.</li> <li>- Intestino sólo visible en la parte hembra</li> <li>- La parte hembra se afila alrededor del músculo.</li> </ul>	

<p>IV</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Los cambios más importantes se muestran en el aumento de volumen. La gónada sufre un alargamiento pronunciado, que desarrolla principalmente la parte hembra.</li> <li>-Colores vivos, parte macho blanquecina (algunas veces ligeramente amarilla). Parte hembra varía en tonos que van del naranja claro al naranja vivo.</li> <li>- Intestino visible en la parte hembra. Aunque el color tiende a homogeneizarse algunas zonas pueden presentar una textura granulosa.</li> </ul>	
<p>V</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gónada muestra su tamaño máximo. Su forma voluminosa rodea al músculo en media luna casi en un 70%.</li> <li>La parte hembra sobresale pronunciadamente de la parte macho.</li> <li>- La coloración es firme pero la textura granulosa no desaparece completamente; el intestino color café, puede ser visible en el extremo de la gónada hembra.</li> </ul>	
<p>VI</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gónada parcial o totalmente vacía.</li> <li>- Apariencia flácida y granulosa.</li> <li>- Coloración presente pero casi opaca.</li> <li>- Apariencia parecida al estadio II y III.</li> </ul>	

---

## **ANEXO II**

---

## ANEXO II

### TÉCNICAS HISTOLÓGICAS USADAS EN EL LABORATORIO DE HISTOLOGÍA DEL CIBNOR.

Técnico responsable: M. en C. Carmen Rodríguez Jaramillo

#### FORMULACION DE LA SOLUCIÓN DE DAVIDSON

(Shaw y Battle, 1957 citado en Howard y Smith, 1983)

Glicerina	100 ml
Formaldehído al 37- 40%	200 ml
Alcohol etílico 96%	300 ml
Agua de mar filtrada	300 ml
Ácido acético	100 ml

#### TECNICA HISTOLÓGICA PARA CORTES EN PARAFINA DESHIDRATACIÓN Y ACLARAMIENTO

- 1.- Alcohol etílico 70° (mínimo 1 hora)
- 2.-Alcohol etílico 80° (1 hora)
- 3.- Alcohol etílico 90° (1 hora)
- 4.- Alcohol etílico 96° (1 hora)
- 5.- Alcohol etílico 100° (2 cambios de 1 hora en c/u)
- 6.- Mezcla de alcohol etílico absoluto -xilol 1:1 (20 minutos)
- 7.- Xilol absoluto (5 minutos)

#### INCLUSIÓN EN PARAFINA

- 8.- Parafina-xilol (1:1) (25 minutos)
- 9.- Paraplast X-Tra (3 cambios de 1 hora c/u)



---

**TECNICA DE HEMATOXILINA- EOSINA**  
**(Humason, 1979; Sheehan y Hrapchak, 1973)**

- |  |                                  |
|--|----------------------------------|
| 1.- Xilol                                  | (3 cambios de 10 minutos en c/u) |
| 2.- Alcohol etílico 96°                    | (2 minutos)                      |
| 3.- Alcohol etílico 70°                    | (2 cambios de 2 minutos c/u)     |
| 4.- Agua destilada                         | (5 minutos)                      |
| 5.- Hematoxilina de Harris                 | (1-2 minutos)                    |
| 6.- Agua destilada                         | (2 cambios de 5 minutos c/u)     |
| 7.- Alcohol ácido                          | (10 segundos)                    |
| 8.- Agua destilada                         | (5 minutos)                      |
| 9.- Agua amoniacal                         | (10 segundos)                    |
| 10.- Agua destilada                        | (5 minutos)                      |
| 11.- Alcohol etílico 50°                   | (2 minutos)                      |
| 12.- Alcohol etílico 70°                   | (2 minutos)                      |
| 13.- Eosina-floxina                        | (3 minutos)                      |
| 14.- Alcohol etílico 96°                   | (2 cambios de 2 minutos c/u)     |
| 15.- Alcohol etílico 100°                  | (2 cambios de 1 minuto c/u)      |
| 16.- CitriSolv (sustituto de xilol)        | (5 minutos c/u)                  |
| 17.- Montar en Entellan (resina sintética) |                                  |

Resultados:

Núcleos azules  
Nucléolos azules  
Citoplasma rosa o naranja  
Tejido conjuntivo rosa