



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



CICIMAR

SECRETARIA
DE
EDUCACION PUBLICA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MARINA

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
1992

**ESTUDIO MORFOLOGICO Y ANALISIS CITOQUIMICO
DEL MANTO DE LA MADREPERLA *Pinctada mazatlanica*
(HANLEY, 1856), EN RELACION A LA FORMACION DE NACAR**

TESIS

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

presenta:

SILVIA ALEJANDRA GARCIA GASCA

La Paz, B.C.S.

1992

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes.....	11
Justificación	13
Objetivos	15
Material y Método.....	16
Técnicas histológicas	19
Técnicas histoquímicas	19
Carbohidratos	19
Proteínas	22
Lípidos	24
Acidos nucleicos	25
Calcio	26
Anhidrasa carbónica	27
Fosfatasa alcalina	28
Prueba de Meigen.....	29
Resultados	34
Anatomía general	34
Descripción macroscópica del manto.....	34
Descripción histológica del manto.....	35
Citoquímica del manto	38
Discusión	56
Conclusiones	74
Recomendaciones y sugerencias para trabajos futuros	78
Glosario.;	79
Bibliografía.....	85



RELACION DE TABLAS Y FIGURAS

INTERDISCIPLINAR
 CIENCIAS MARINAS
 BIBLIOTECA
 I.P.M.
 DONATIVO

Figura 1. Sección transversal del manto y la concha de un bivalvo..... 7

Figura 2. Distribución geográfica de *P. mazatlanica*..... 10

Figura 3. Localización del sitio de muestreo..... 16

Figura 4. Valva derecha de *P. mazatlanica*. Zonas de muestreo en el manto..... 18

Figura 5. **Anatomía** general de *P. mazatlanica*..... 45

Figura 6. Representación esquemática de la sección longitudinal del manto de *P. mazatlanica*..... 46

Figura 7. Sección transversal del borde del manto de *P. mazatlanica*..... 47

Figura 8. Representación esquemática del metabolismo del calcio en un molusco..... 66

Lámina 1. 49

- a) Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*.
B1) células secretoras, **B2)** células basófilas
 Hematoxilina Eosina. **(400x)**. Inclusión en parafina.
- b) Lóbulo externo-del manto de *P. mazatlanica*
A1) glándulas unicelulares, **B1)** células secretoras
E) epitelio interno. Hematoxilina Eosina.
(400x). Inclusión en parafina.
- c) Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*.
Ep) Epitelio interno, **Ei)** epitelio externo del
 lóbulo interno del manto. Hematoxilina Eosina.
(400x). Inclusión en parafina.
- d) Surco Periostracal de *P. mazatlanica*.
B1) células secretoras, **A1)** glándulas
 unicelulares, **C)** conquiolina, **Ee)** epitelio
 interno del lóbulo externo, **Em)** epitelio
 externo del lóbulo medio. Hematoxilina Eosina.
(400x). Inclusión en parafina.
- e) Epitelio del Istmo del Manto de *P. mazatlanica*
(EI). Hematoxilina Eosina. **(400x)**.
 Inclusión en parafina.

Lámina 2.....

- a) Lóbulo externo del manto de *P.mazatlanica*. Fc) Fibras **colágenas** (azul), Al) glándulas unicelulares (rojo). Técnica Tricrómica de Massón. (400x). Inclusión en parafina.
- b) Zona Paleal del manto de *P.mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal. Impregnación Argéntica. (400x). Corte por congelación.
- c) Surco Periostracal del manto de *P.mazatlanica*. B1) células secretoras, Em) epitelio externo del lóbulo medio, Ee) epitelio interno del lóbulo externo, C) conquiolina. Técnica del Acido Peryódico-Schiff (PAS). (100x). Inclusión en parafina.
- d) Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Técnica del Acido Peryódico-Schiff (PAS). (400x). Inclusión en parafina.
- e) Surco Periostracal del manto de *P.mazatlanica*. B1) células secretoras, C) conquiolina, Le) lóbulo externo, Lm) lóbulo medio. Azul Alciano. (100x). Inclusión en parafina.
- f) Surco periostracal del manto de *P.mazatlanica*. B1) células secretoras. C) conquiolina, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Azul Alciano. (400x). Inclusión en parafina.
- g) Epitelio externo de la zona paleal del manto de *P.mazatlanica*. B1) células secretoras. Azul Alciano. (400x). Inclusión en parafina.
- h) Epitelio externo de la zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Técnica de Von Kossa. (400x). Inclusión en parafina.
- i) Zona central del manto de *P.mazatlanica*. B1) células secretoras, Ee) epitelio externo, Ei) epitelio interno. Azul Alciano. (100x). Inclusión en parafina.

51
CENTRO INTERDISCIPLINAR
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

- a) Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*.
B1) células secretoras. Azul de Toluidina alcalino (pH=9). (400x). Inclusión en parafina.
- b) Zona central del manto de *P.mazatlanica*.
B1) células secretoras, Ee) epitelio externo.
Azul de Toluidina alcalino (pH=9). (400x).
Inclusión en parafina.
- c) Lóbulo medio del manto de *P.mazatlanica*.
B2) células basófilas. Ee) epitelio externo.
Azul de Toluidina a pH=4. (400x). Inclusión en parafina.
- d) Surco Periostracal del manto de *P.mazatlanica*.
Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo, C) conquiolina.
Azul de Toluidina a pH=4. (100x). Inclusión en parafina.
- e) Tejido conjuntivo de *P.mazatlanica*.
Am) amebocitos con calcio. G) gametos masculinos.
Técnica de Von Kossa. (1000x). Inclusión en parafina.
- f) Zona central del manto de *P.mazatlanica*.
A2) células acidófilas con gránulos de glucógeno.
Técnica del Carmín de Best. (1000x). Inclusión en parafina.
- g) Surco Periostracal del manto de *P.mazatlanica*.
Al) glándulas unicelulares. Ee) epitelio interno del lóbulo externo, Em) epitelio externo del lóbulo medio, C) conquiolina. Técnica de Ninhidrina-Schiff. (400x). Inclusión en parafina.
- h) Surco Periostracal del manto de *P.mazatlanica*.
Al) glándulas unicelulares, Le) lóbulo externo, C) conquiolina. Técnica de Gothard. (100x).
Inclusión en parafina.
- i) Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*.
Al) glándulas unicelulares, Em) epitelio externo del lóbulo medio, Ee) epitelio interno del lóbulo externo. Técnica del Verde de Metilo Pironina. (400x). Inclusión en parafina.

- a) Zona marginal y paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal, Li) lóbulo interno, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Sudán Negro B. (100x). Corte por congelación.
- b) Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo, Al) glándulas? unicelulares. Rojo Oleoso. (100x). Corte por congelación.
- c) Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal. Rojo Oleoso. (100x). Corte por congelación.
- d) Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Al) glándulas unicelulares. Azul de Nilo. (400x). Corte por congelación.
- e) Epitelio externo (Ep) de la Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Técnica de Kurata para Anhídrida Carbónica. (400x). Inclusión en parafina.
- f) Zona marginal y paleal del manto de *P. mazatlanica*. Li) lóbulo interno, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Técnica de Gomori-Takamatsu para Fosfatasa Alcalina. (63x). Inclusión en parafina.
- g) Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ee) epitelio externo. Técnica de Gomori-Takamatsu para Fosfatasa Alcalina. (400x). Inclusión en parafina.

SECRETARIO
DE
BIBLIOTECAS
E
CA
L. N.
DOCTO
TIVO

Tabla 1. Resumen de técnicas utilizadas..... 30

Tabla 2. Identificación de calcio por las técnicas de Von Kossa y Rojo de Alizarina..... 42

Tabla 3. Distribución de las células en el manto de *P. mazatlanica*..... 43

Tabla 4. Reacciones histoquímicas en las células y epitelios del manto de *P. mazatlanica*..... 44

ESTUDIO MORFOLOGICO Y ANALISIS CITOQUIMICO DEL MANTO DE LA MADREPERLA *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1856) EN RELACION A LA FORMACION DE NACAR

RESUMEN

El manto de las ostras perleras presenta una estructura histológica y una fisiología características y específicas entre los moluscos bivalvos, lo cual permite las reacciones biológicas y químicas necesarias para la formación de perlas en condiciones naturales. Los estudios en este aspecto son escasos, por lo cual se realizó un análisis histológico y citoquímico para conocer la estructura fina y la naturaleza química de los componentes del manto de la madreperla *P. mazatlanica*. Los ejemplares fueron colectados en la Isla Espíritu Santo, B.C.S., México; fueron disectados y fijados con formol neutro al 10%, mezcla de Zenker, mezcla de Carnoy, alcohol absoluto y acetona a una temperatura de 0 a 4°C, dependiendo de la técnica. Se realizaron análisis histológicos para morfología general y técnicas histoquímicas para carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, calcio, anhidrasa carbónica y fosfatasa alcalina. Se observó una diferenciación regional de las células epiteliales, que varía de acuerdo con las diferentes áreas del manto. El lóbulo externo de la zona marginal es el responsable de la formación de la concha. El epitelio interno del lóbulo forma el periostraco y el externo forma la capa calcárea externa. El epitelio interno del manto (zona paleal y central) forma la capa calcárea interna de las valvas y el epitelio del istmo del manto forma la capa interna del ligamento. En el tejido subepitelial se observan las células secretoras asociadas, las cuales fueron caracterizadas por morfología y su naturaleza química. Los epitelios difieren: dependiendo de su función, principalmente en la altura de las células, pigmentación, ciliación, tipo y distribución de células secretoras y actividad enzimática. En las células secretoras que contienen mucopolisacáridos ácidos se encontraron precipitados de calcio; las células acidófilas de la zona central contienen gránulos de glucógeno; las glándulas unicelulares del surco periostracal y epitelio externo de la zona paleal contienen RNA y el epitelio externo de la zona paleal presenta actividad enzimática tanto de anhidrasa carbónica como de fosfatasa alcalina. Los lípidos fueron encontrados en los epitelios y en el nervio paleal.

MORPHOLOGICAL STUDY AND CYTOCHEMICAL ANALYSIS OF THE MANTLE OF PEARL OYSTER *Pinctada mazatlanica* (HANLEY, 1856) RELATED TO NACRE FORMATION

ABSTRACT

The pearl oyster mantle presents a histological structure and a characteristic physiology that allows the biological and chemical reactions for pearl formation under natural conditions. Studies on this aspect are limited. Histological and cytochemical analyses were performed to study the fine structure and the chemical nature of the mantle components of *P. mazatlanica*. The organisms were collected off Isla Espiritu Santo, B.C.S., Mexico. They were dissected and fixed with neutral 10% formalin, Zenker's mixture, Carnoy's mixture, absolute ethanol and ice-cold acetone (0 to 4°C). Histological and histochemical tests were done for carbohydrates, proteins, lipids, nucleic acids, calcium, carbonic anhydrase and alkaline phosphatase. Differentiation was observed in the epithelial cells which vary according to the different mantle areas. The outer mantle fold of the marginal zone secretes the shell. The inner epithelium of the outer mantle fold secretes the periostracum and the outer epithelium secretes the outer calcareous layer. The outer mantle epithelium (paleal and central zone) is responsible for the inner calcareous layer of the valves and the mantle isthmus epithelium forms the inner layer of the ligament. Associated secretory cells were observed in the subepithelial tissue. These cells were characterized by means of their morphology and chemical nature. The regional differentiation of epithelial cells depends on their function. The differentiation is in height, pigmentation, ciliation, type and distribution of the secretory cells, and enzymatic activity. Calcium was observed in the secretory cells that contain acid mucopolysaccharides. The acidophilic cells of the central zone contain glycogen granules. In the unicellular glands of the periostracal groove and outer epithelium of the paleal zone, RNA was present. In the outer epithelium of the paleal zone carbonic anhydrase and alkaline phosphatase were present. Lipids were found in the epithelium and the paleal nerve.

INTRODUCCION

Antiguamente, el origen de las perlas era un misterio. Después de observaciones detalladas, se llegó a la conclusión que la perla y la concha presentan la misma composición.

Los mecanismos de secreción de la sustancia que forma la concha y el proceso de formación de las perlas, han atraído la atención de científicos y personas interesadas en su valor económico. En condiciones naturales, la perla se forma en respuesta a un mecanismo de defensa interno llamado nacarización (Malek y Cheng, 1974), el cual, consiste en una reacción especializada como respuesta a la presencia de un cuerpo extraño (sea **biótico** o **abiótico**); dicho material debe estar situado en la superficie del manto, órgano responsable de la secreción del nácar. Aparentemente el fenómeno se debe a un estímulo físico.

Este proceso natural es y ha sido utilizado eficientemente por el hombre para inducir la formación de perlas cultivadas. Esto último se realiza transplantando un fragmento del epitelio del manto que secreta el nácar, perteneciente a una ostra donante, dentro de la masa visceral de una ostra receptora. Al mismo tiempo se inserta un núcleo, generalmente elaborado de concha, para provocar la regeneración del epitelio alrededor del mismo (Tsuji, 1960; Alagarswami, 1970; Alagarswami y Qasim, 1973; Shirai, 1981; Coeroli y Mizuno, 1985).

Tatsuhei **Mise** en 1907 patentó la necesidad de insertar un núcleo para formar una perla. Tokichi Nishikawa en 1917 propuso un método para producir perlas, consistente en cortar una pieza de tejido vivo incluyendo las células que forman el saco perlero con el tejido conectivo circundante insertandolo, con o sin núcleo, dentro del tejido de la misma, o de otra ostra. Fué Kokichi Mikimoto en 1918 quien patentó el método para obtener perlas cultivadas, insertando un núcleo cubierto por el tejido del manto capaz de secretar la sustancia de la perla dentro del tejido subepitelial de la ostra (Tsuji, 1960; Alaqarswami, 1970).

Tras muchos esfuerzos se ha logrado el desarrollo y perfeccionamiento de la técnica para producir perlas cultivadas en varias partes del mundo como Japón, La India, Polinesia Francesa, etc., utilizando el manto como tejido injerto (**Tamura**, 1960; Alaqarswami, 1970; Alaqarswami y Qasim, 1973; Shirai, 1981; Coeroli y Mizuno, 1985).

En México, la riqueza perlera se centró en el Golfo de California con dos especies nativas: *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna*. Los primeros datos se pueden encontrar desde la época de la Colonia y es probablemente la presencia de este recurso lo que justificó la colonización de la Península (**Cariño-Olvera**, 1987).

En 1903, el Sr. Juan Gastón Vivés consiguió del gobierno del General Porfirio Díaz una concesión para la explotación y uso de una patente para el cultivo de la concha perla (*Pinctada*

mazatlanica) en la Ensenada de San Gabriel, de la Isla Espiritu Santo, B.C.S. Un año después fundó la "**Compañía Criadora de Concha y Perla de Baja California**" con gran éxito en la producción perlera (Vivés, 1914). Las perlas se producían de manera natural y su incidencia era del 5 al 6% (Cariño-Olvera y Cáceres-Martínez, 1990). De 1910 a 1914 la Compañía había extendido su producción hacia las Islas San José y Cerralvo. El 18 de julio de 1914, los enfrentamientos armados de la Revolución Mexicana y la tensión social condujeron a la entrada del Coronel Constitucionalista Miguel L. Cornejo a la Ciudad de La Paz (Cariño-Olvera y Cáceres-Martínez, 1990). En junio de 1915 la "**Compañía Criadora**" fué destruida. Una de las consecuencias mas lamentables de este suceso fué le pérdida de los archivos de la empresa, así como el saqueo y destrucción de las instalaciones acuícolas (Cariño-Olvera, 1991).

Al aumentar la demanda en el mercado perlero y con el desarrollo de aparatos de buceo, se incrementó la pesca de ostras perleras en forma desmedida (Monteforte, 1990). Hacia 1939, cuando los bancos naturales presentaban un alto grado de agotamiento, se decretó veda permanente que sigue vigente hasta la fecha; sin embargo, la pesca clandestina ha constituído el principal obstáculo para la recuperación del recurso (Monteforte, 1991). Los estudios anatómicos, biológicos y ecológicos de ambas especies nativas productoras de perlas son indispensables para desarrollar la perlicultura en México. El manto, como ya se mencionó, es el órgano que forma la concha y es utilizado como

tejido injerto, por lo que el conocimiento de su estructura morfológica es importante.

Se sabe que el manto es un órgano que consiste de una fina capa de tejido sujeta a la superficie interna de la concha, presentando generalmente tres lóbulos en su parte distal: lóbulo interno, lóbulo medio y lóbulo externo. El lóbulo interno es el mas grande y posee músculos circulares y radiales, el lóbulo medio destaca por su función sensorial y el externo está relacionado con la secreción de la concha (Beedham, 1958a; Barnes, 1986) (Fig. 1).

El manto está fijo a la concha por las fibras musculares del lóbulo interno, a lo largo de una línea semicircular a corta distancia del margen de la misma. La línea de inserción del manto aparece impresa en la superficie interna de la concha como una cicatriz llamada línea paleal (Barnes, 1986).

En condiciones naturales, el manto secreta tres capas paralelas: el periostraco, la capa prismática también conocida como capa calcárea externa y la capa nacarada llamada también capa calcárea interna o calcitostraco (este último término en caso de que esta capa sea de calcita) (Bevelander y Benzer, 1948; Beedham, 1958a; Tsujii, 1960; Wilbur, 1964; Galtsoff, 1964; Dix, 1972a; Wilbur y Saleuddin, 1983; Watabe, 1983; Coeroli y Mizuno, 1985; Barnes, 1986) (**Fig. 1**). Las funciones secretoras del manto pueden alterarse en caso de regeneración de la concha (Tsujii, 1960; Galtsoff, 1964; Wilbur, 1964; Timmermans, 1969; Wilbur y Saleuddin, 1983; Watabe, 1983).

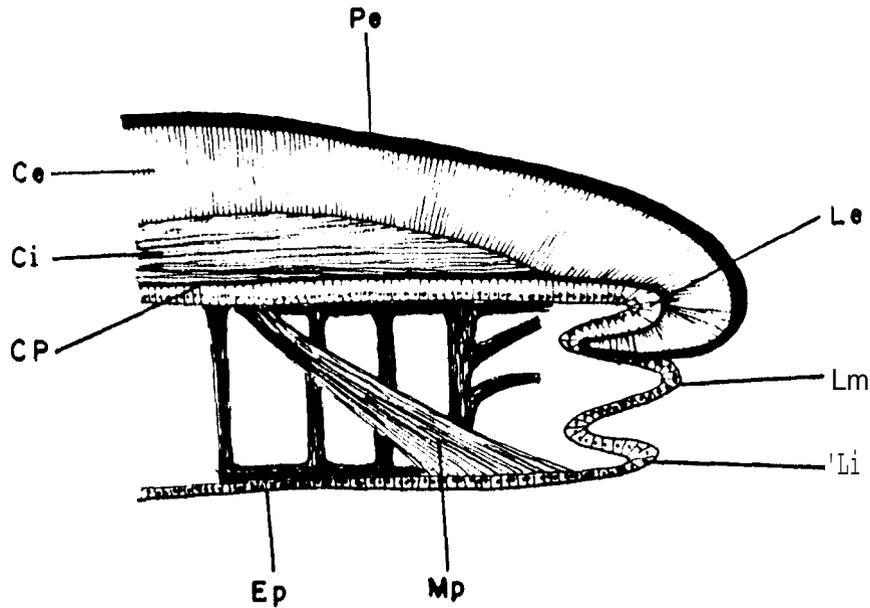


Figura 1. **Sección** transversal del manto y la concha de un bivalvo (no a escala) (Tomado de Beedham, 1958a y **Barnes**, 1986).

Ep-epitelio; **Mp-músculo** paleal; Pe-periostraco; Ce-capa **calcárea** externa; **Ci-capa** calcdrea interna; Cp-cavidad extrapaleal; **Le**-lóbulo externo; Lm-lóbulo medio; Li-lóbulo interno.

La formación de la concha se ha comparado con la de las perlas porque estas últimas tienen la misma composición química que la capa calcárea interna de la concha (Robertson, 1941); así, todos los moluscos portadores de concha pueden producir perlas pero sólo los moluscos que tienen una capa interior de nácar producen perlas de valor comercial (Barnes, 1986).

BIBLIOTECA
D. I. P. N.
NATIVO

El proceso de formación de la concha sigue tres etapas (Kawai, 1954):

- 1) Absorción de materiales calcáreos dentro del organismo.
- 2) Secreción del material de la concha desde la epidermis del manto.
- 3) Transformación del material secretado en cristales de carbonato de calcio con una matriz orgánica que cementa el cristal.

En el presente estudio, se realizó un análisis morfológico y citoquímico del manto de *Pinctada mazatlanica*, enfocándose principalmente en el segundo aspecto y estableciendo como hipótesis de trabajo la existencia de una diferenciación regional en sus propiedades morfosecretoras.

Posición taxonómica y distribución geográfica de *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
CIENCIAS MARÍTIMAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

Phylum: Molluca

Clase: Pelecypoda

Subclase: Pterimorpha

Orden: Pterioida

Superfamilia: Pteriacea

Familia: Pteriidae

Género: *Pinctada* Röding, 1798

Especie: *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856)

Es la ostra perlera común del Pacífico Este Tropical. La concha del adulto mide entre 10 y 15 cm. La parte interna de la concha es altamente iridiscente, el periostraco es negro-púrpura a café-olivo; es rugoso y quebradizo formando láminas concéntricas. El margen de la charnela es recto y el biso está bien desarrollado. Esta especie es extensivamente buscada por sus perlas de alto valor comercial (Keen, 1971; Abbot, 1974; Emerson y Jacobson, 1976).

Distribución Geográfica.- Esta especie se distribuye desde el Golfo de California hasta Perú (Keen, 1971; Abbot, 1974) (Fig.2)

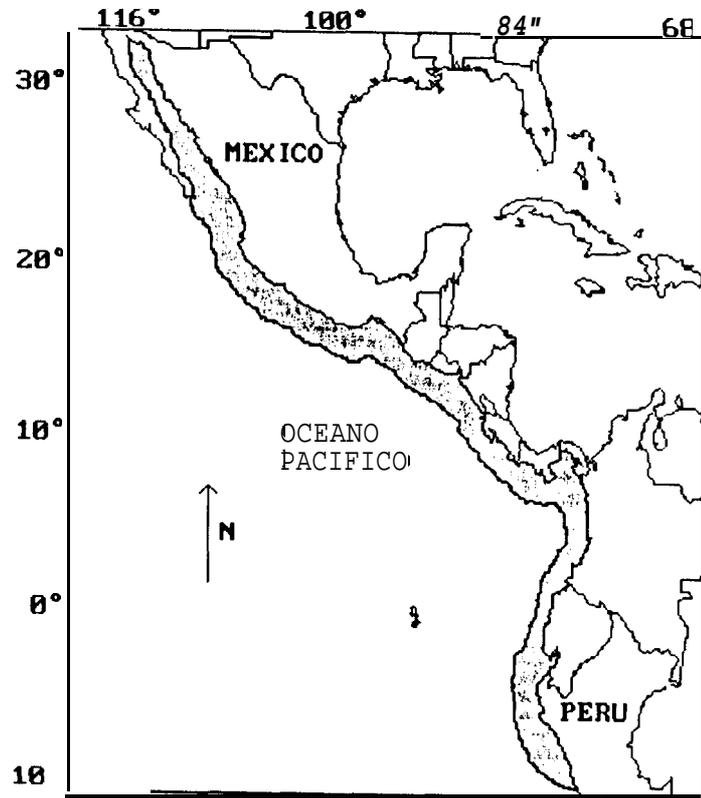


Figura 2. Distribución geográfica de *Pinctada mazatlanica*.

ANTECEDENTES

A partir de la Segunda Guerra Mundial se han efectuado estudios **físicos**, químicos, histoquímicos y bioquímicos que han permitido realizar grandes progresos en el conocimiento de los mecanismos de formación de la concha y de secreción de nácar en diversas especies de moluscos. Estos estudios incluyen aspectos morfológicos e histoquímicos del manto y saco perlero (Beedham, 1958a, 1958b, 1965; Tsujii, 1960; Wada 1964, 1966a, 1966b, 1967a, 1967b; Timmermans, 1969; Dix, 1972a, 1972b; Wada y Fujinuki, 1976) y estudios histoquímicos y bioquímicos del metabolismo del calcio (Manigault, 1939; Robertson, 1941; Freeman y Wilbur, 1948; Bevelander y Benzer, 1948; Stolowski, 1951; Bevelander, 1952; Wilbur y Jordey, 1952, 1955; Jordey, 1953; Hirata, 1953; Love y Frommhagen, 1953; Kawai, 1954, 1955; Kado, 1960; Freeman, 1960; Grégoire, 1967; Timmermans, 1969; Dix, 1972a, 1972b; Wada y Fujinuki, 1976; Weiner y Traub, 1984; Kunigelis y Saleuddin, 1984; Beirão y Sorenson, 1986; Gabbott y Peek, 1991; Peek y Gabbott, 1991).

La Histoquímica clásica ha sido y es una herramienta de gran utilidad para estudios de este tipo, en los cuales, el conocimiento de la morfología microscópica es indispensable.

En lo que respecta exclusivamente a los estudios sobre formación de la concha y metabolismo del calcio a partir de métodos histológicos y citoquímicos, destacan algunos autores

antes mencionados: Bevelander y Benzer (1948), que analizan varias especies de moluscos, incluyendo *Pinctada radiata*; Love y Frommhagen (1953), que estudian a *Mactra solidissima*; Beedham (1958a, 1958b) quien trabaja con el epitelio del manto y el componente no calcáreo de la concha de *Anodonta cygnea*, *Mytilus edulis* y *Ostrea edulis*; Tsujii (1960) publicó un trabajo referente al mecanismo de formación de la concha y saco perlero en diversas especies de bivalvos, incluyendo a *Pinctada martensii*; Beedham (1965) realizó un estudio sobre reparación de la concha en varias especies del género *Anodonta*; Timmermans (1969) analizó el manto de *Lymnaea stagnalis*, *Pomacea bridgesi diffusa* y *Anodonta cygnea*; y Dix (1972a, 1972b) que trabajó con *Pinctada maxima*.

Entre los autores que realizan análisis histológicos e histoquímicos en moluscos, que involucran al manto, destacan: Combs (1959) quien realiza un estudio sobre almacenamiento de lípidos y glucógeno en el manto de *Crassostrea virginica*; Galtsoff (1964) con un libro que incluye la morfología general y microscópica de *Crassostrea virginica*; García-Domínguez (1977) y Deleón, et al; (1984) analizan el tejido conjuntivo de esta misma especie.

Con estos trabajos se ha obtenido información valiosa sobre la estructura fina del órgano encargado de la formación de la concha, así como de su funcionamiento y si es el caso, de su utilidad en la perlicultura.

Por último, cabe mencionar que el único trabajo conocido

sobre la anatomía microscópica de *Pinctada mazatlanica*, es el de Sevilla (1969), donde se describe la anatomía general y el ciclo gonádico de la especie.

JUSTIFICACION

La perlicultura es una actividad altamente desarrollada en diferentes partes del mundo como Japón, República de Corea, China, La India, Polinesia Francesa, etc. Diversas especies de ostras perleras son utilizadas para este fin: *Pinctada fucata*, *P. maxima*, *P. margaritifera*, *Pteria penguin* y *Hyriopsis schlegeli*. Las cuatro primeras especies son bivalvos marinos y la quinta es una especie de agua dulce (Alagarswami, 1970; Alagarswami y Qasim, 1973; Shirai, 1981; Coeroli y Mizuno, 1985).

Japón obtiene una producción anual aproximada de 35 toneladas de perlas de *Pinctada* y 10 toneladas de la especie de agua dulce (Shirai, 1981; Coeroli y Mizuno, 1985). Para llegar a ésto, los japoneses llevaron a cabo diversos estudios acerca de la biología, ecología, cultivo y formación de las perlas.

En México, la explotación perlífera de *Pinctada mazatlanica* y *Pteria sterna* aún no ha sido desarrollada y según Monteforte (1990): "Aún se está muy lejos de establecer una industria perlícola competitiva..." "...es necesario conocer a fondo la bioecología de las especies..." "Por múltiples razones, se puede considerar que en México, el Golfo de California presenta un

sustantivo potencial perlicola, que por su alto valor generaría, de ser explotado racionalmente, elevados ingresos y beneficios considerables para el desarrollo **regional**". En efecto, la producción perlera puede ofrecer grandes perspectivas para México y el desarrollo de la perlicultura deberá estar basado en estudios previos sobre biología, ecología, fisiología y otras investigaciones científicas.

Uno de los puntos críticos del proceso de cultivo de perlas es la implantación de núcleos e injertos de manto de la ostra donadora a la ostra receptora que formará la perla, debido a que esta operación causa gran mortalidad en las ostras injertadas. Por tal motivo, la adecuada elección del tejido-injerto es indispensable para aumentar la posibilidad de formación de perlas en las ostras sobrevivientes.

Hasta la actualidad, no se había estudiado el manto de *P. mazatlanica* y siendo el órgano que participa en la formación de las perlas, es importante conocer sus características morfológicas y químicas. Este estudio está dirigido a obtener el conocimiento preciso de sus componentes tisulares y naturaleza química, lo cual contribuirá con información útil que permita proponer el sitio del manto mas activo en la secreción de nácar y por lo tanto el mas adecuado para emplearse como tejido injerto durante la implantación de núcleos. Este trabajo es parte de la información científica necesaria que permitirá iniciar el cultivo de perlas en México.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la estructura microscópica de los sitios del manto encargados de la formación de la concha y de la secreción del nácar en la madreperla *Pinctada mazatlanica* mediante métodos histológicos e histoquímicos.

METAS

- A) Realizar una descripción histológica del manto de *Pinctada mazatlanica*.
- C) Identificar la presencia de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácido ribonucleico en el manto de *P. mazatlanica*.
- B) Identificar la presencia de calcio en las diferentes zonas del manto de *P. mazatlanica*.
- D) Localizar los sitios de actividad enzimática de anhidrasa carbónica y fosfatasa alcalina en el manto de *P. mazatlanica*.
- E) Identificar la forma mineral en que el carbonato de calcio se presenta en la concha de esta especie.
- F) Proponer el sitio del manto adecuado para ser utilizado como tejido injerto en perlicultura.

MATERIAL Y METODO

El material biológico para el estudio histológico e histoquímico de este trabajo consistió de un total de 16 ejemplares adultos de madreperla colectados en la Isla Espíritu Santo, B.C.S., México, en noviembre de 1990, febrero, junio, agosto, octubre y diciembre de 1991. Las muestras se extrajeron mediante buceo autónomo a una profundidad de 3 a 7 metros (Fig.3).

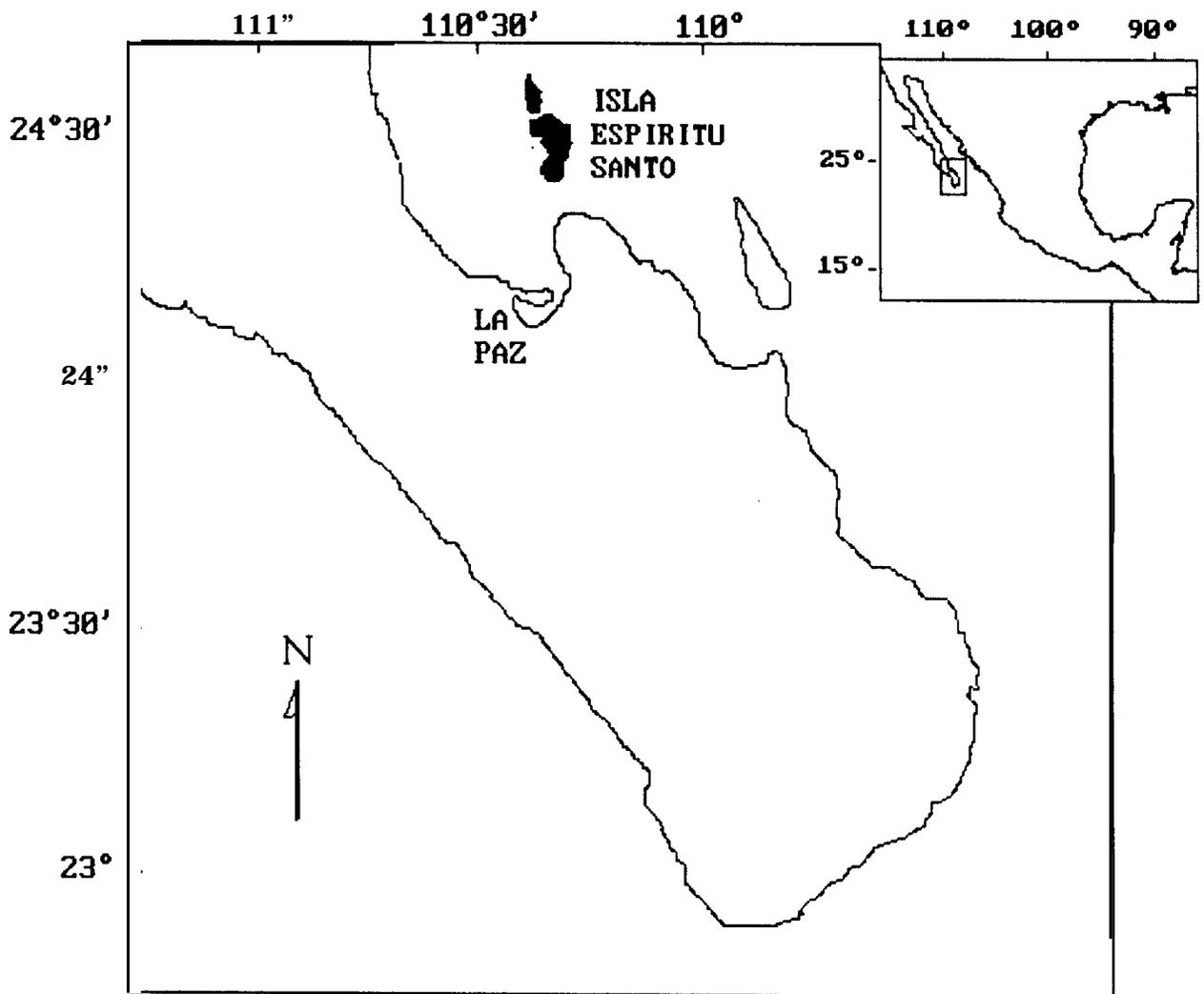


Figura 3. Localización del sitio de muestreo

En el laboratorio, se fijaron completos 6 ejemplares con talla promedio de 55.5 mm de altura por 54.8 mm de longitud mientras que 10 ejemplares con talla promedio de 108 mm de altura por 100.3 mm de longitud fueron **disectados** de la parte anterior, ventral, posterior y visceral del manto (Fig.4).

Los fijadores empleados fueron: formol al 10% neutralizado con fosfatos; mezcla de Zenker; mezcla de Carnoy; alcohol absoluto y acetona enfriada a 0-4°C (Tabla 1).

A las muestras fijadas en formol, Zenker, Carnoy y alcohol absoluto se les aplicó el proceso convencional de deshidratación e inclusión en parafina (Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Lynch et *al*, 1972; Gray, 1976; Humason, 1979; Estrada-Flores et *al*, 1982; Locquin y Langeron, 1985). Se hicieron cortes de 6 a 8 μm para realizar las técnicas correspondientes. A los cortes fijados en acetona se les aplicó también el proceso de inclusión en parafina, pero con ciertas modificaciones y consideraciones, ya que se emplearon para detectar actividad enzimática (Davenport, 1960; Tsujii, 1960; Spannhof, 1966). Por otro lado, se utilizaron también cortes por congelación de 30 a 50 μm fijados en formol neutro al 10%. Al mismo tiempo, se procesaron algunos órganos conocidos de mamífero (ratón) en condiciones idénticas a *P. mazatlanica* con fines comparativos, para ser utilizados como testigos de las técnicas histoquímicas (Tabla 1).

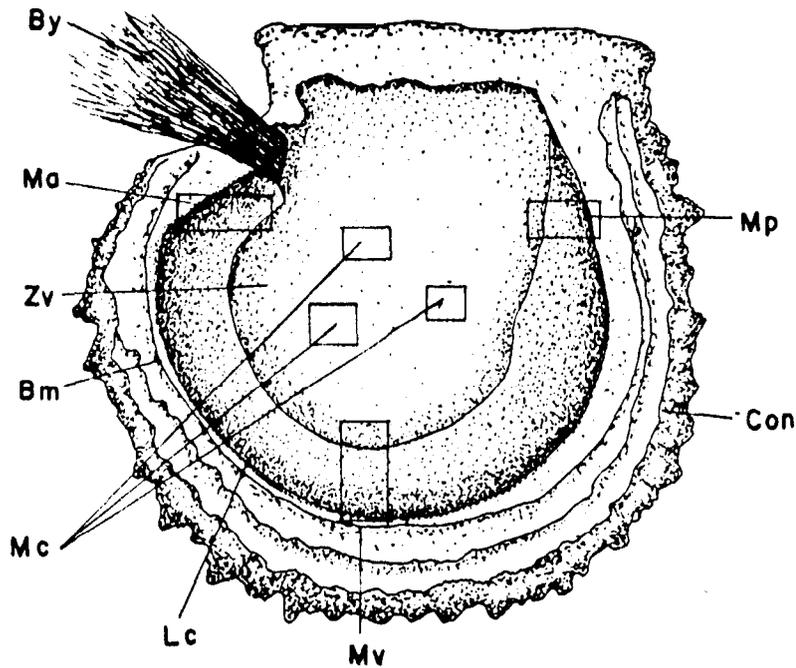


Figura 4. Valva derecha de *Pinctada mazatlanica*. Zonas de muestreo en el manto.

Con-concha; **Bm-borde** del manto; **Zv-zona** visceral del manto; **By-biso**; **Lc-límite** de la capa nacarada; **Ma-manto** anterior; **Mv-manto** ventral; **Mp-manto** posterior; **W-manto** central.

Se realizaron las siguientes técnicas:

TECNICAS HISTOLOGICAS PARA MORFOLOGIA GENERAL

- Técnica Hematoxilina Eosina (Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Lynch et al, 1972; Estrada-Flores et al, 1972; Humason, 1979): Se emplearon cortes por parafinación fijados en formol neutro al 10%, Zenker, Carnoy y cortes por congelación.
- Técnica de Van Gieson, tricrómica de Gallego y tricrómica de Massón para tejido conjuntivo (fibras **colágenas**) (Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Humason, 1979). Fueron empleados cortes fijados en formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy.
- Técnica de Gallego para fibras elásticas (Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Humason, 1979): Los cortes fueron fijados en formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy.
- Impregnación Argéntica de Río-Hortega selectiva para fibras reticulares (Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Lynch et al, 1972; Estrada-Flores et al, 1972; Humason, 1979): Se realizó en cortes por congelación y cortes en parafina fijados en formol neutro al 10%.

TECNICAS HISTOQUIMICAS

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS

Técnica del **Acido Peryódico-Schiff (PAS)** (Spannhof, 1966; Luna, 1968; Martoja y Martoja, 1970; Lynch et al, 1972; Junqueira y Carneiro, 1974; Humason, 1979). El ácido **peryódico** oxida los **1,2 glicoles (-CHOH-CHOH)** en aldehidos. La oxidación también ocurre

cuando un grupo hidroxilo (OH) es sustituido por un grupo amino o alquiamino. Los grupos aldehído son visibles con el Reactivo de Schiff, produciendo una coloración rosa a rosa-violeta en las estructuras de reacción positiva. Las sustancias que reaccionan con el ácido peryódico para formar grupos aldehídos son: glucógeno, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas, glucoproteínas, glucolípidos, lípidos no saturados, fosfolípidos, ciertas lipofuscinas, algunas células cebadas, algunas proteínas, reticulina y mucinas epiteliales ácidas. Los mucopolisacáridos ácidos son negativos a la técnica de PAS. Los lípidos se disuelven en un alto porcentaje durante la fijación, deshidratación y desparafinación. Los grupos reactivos de los aminoácidos individuales están ligados a una cadena peptídica y en ese caso no se oxidan con el ácido peryódico, por lo que esta técnica se utiliza comúnmente para carbohidratos. Los fijadores fueron Zenker, Carnoy y alcohol absoluto.

Como control se utilizó la acetilación de Lillie (Lynch et al, 1972): los cortes fueron tratados con piridina y anhídrido acético 3:2 por 24 horas a temperatura ambiente para bloquear la formación de grupos aldehído en los carbohidratos.

Para determinar la presencia de glucógeno, se trataron cortes control con enzimas glucogenolíticas, en este caso amilasa salival y alfa-amilasa por tres horas a 37°C para posteriormente realizar la técnica de PAS al mismo tiempo que en los cortes no sometidos a la digestión. Por otro lado, se emplearon cortes de hígado de ratón bajo las mismas condiciones que los cortes de manto.

Técnica del Azul de Toluidina para mucopolisacáridos ácidos
Técnica del azul de toluidina para mucopolisacáridos ácidos
(Técnica de Lyson) (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970;
Lynch et al, 1972).

El azul de toluidina es un colorante que modifica su espectro de absorción al reaccionar con determinados grupos químicos presentes en elementos citológicos e histológicos. La metacromasia gamma se distingue por su tono rojizo, es resistente al alcohol, se halla ligada a grupos ácidos y por lo tanto puede aparecer en mucopolisacáridos ácidos, ácidos nucleicos, ciertos lípidos y otros sustratos. La metacromasia beta se observa de color violeta, es poco resistente al alcohol, se debe principalmente a la presencia de grupos COOH y PO₄ y se observa en un mayor número de sustancias, entre ellas las mucoproteínas. Como fijadores, se utilizaron Carnoy, Zenker y formol neutro al 10%.

Técnica del Azul Alciano para mucopolisacáridos ácidos (pH 2.3)
(Spannhof, 1966; Lynch et al, 1972).

La base de tinción del azul alciano es la formación de una sal con los grupos ácidos de los mucopolisacáridos ácidos. Los resultados dependen principalmente del tiempo de tinción; si se utiliza un tiempo relativamente corto (30 minutos) en solución ácida, se vuelve mas específico de las mucinas del tejido conjuntivo y de los epitelios. Cuando el tiempo se prolonga, se tiñen con mayor o menor intensidad todos los componentes histológicos. Se utilizó formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy.

Técnica del **Carmin** de Best para glucógeno. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970).

Se trata de un método empírico y constituye una **tinción** selectiva para glucógeno. Como fijadores se utilizaron Carnoy y alcohol absoluto. Se emplearon cortes testigo digeridos con **amilasa** y cortes de hígado de ratón.

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE PROTEINAS

Reacción de Ninhidrina Schiff para grupos alfa **amino**. (Spannhof, 1966).

Al tratar los alfa aminoácidos con ninhidrina se produce una desaminación oxidativa, formándose un aldehído y liberándose CO₂ y NH₃. El aldehído originado permanece ligado a la proteína de la cual procede el aminoácido implicado en la reacción y se reconoce con el reactivo de Schiff, con un color rosa o rosa-violeta. La reacción comprende, en el corte por parafina, todos los grupos alfa-amino de proteínas, siempre que el correspondiente grupo COOH se encuentre libre, es decir, los grupos NH₂ de aminoácidos terminales. Los alfa aminoácidos libres no se presentan ya en el corte por parafina por lo que no dan reacción. La reacción ninhidrina - Schiff es apropiada para el reconocimiento general de proteínas, ya que en éstas es frecuente la presencia de alfa aminoácidos terminales. Como fijador se utilizó formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy. Los cortes control fueron tratados por bloqueo de los grupos NH₂, efectuando una desaminación mediante nitrito sódico al 5% y ácido acético al 10%. Los nitritos desaminan a los aminoácidos en solución ácida. Como órganos testigo se utilizaron corazón y pulmón de ratón.

Técnica del azul de toluidina alcalino para proteínas ácidas (García-Domínguez, 1977).

Las proteínas ácidas con azul de toluidina en medio alcalino (**pH=9**) presentan metacromasia que va del rojizo al violeta. Se utilizó formol neutro al 10% y Zenker.

Técnica del Verde Sólido para proteínas básicas. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970).

La tinción con verde sólido consiste en un colorante ácido cuya reacción se realiza en valores medios de pH (≈ 8). A esos valores de pH sólo las proteínas básicas reaccionan con colorantes ácidos, la tinción permite mostrar protaminas, histonas y globinas. Se utilizó formol neutro al 10% y Zenker. Los cortes control se trataron con nitrito de sodio y ácido clorhídrico para bloquear la reacción. Como órganos testigo se utilizaron corazón y pulmón de ratón.

Técnica de Chevremont y Frédéric para grupos -SH (tioles). (Martoja y Martoja, 1970).

Los radicales tiol (R-SH) y tioéter o disulfuro (R-S-S-R) que entran especialmente en la fórmula de la cisteína y la cistina, están ampliamente distribuidos. Al constituir un sistema de óxido-reducción, los grupos -SH y S-S se presentan con frecuencia y de manera conjunta en los tejidos. Raras son las estructuras que sólo contienen grupos disulfuro, como la queratina. El método se basa en el poder reductor de los grupos -SH. El ferricianuro férrico es reducido a ferrocianuro férrico, formando un precipitado azul, conocido como azul de prusia. La principal

desventaja del método es su falta de especificidad. Numerosos grupos reductores pueden reaccionar de manera positiva como son los pigmentos **melánicos**, monofenoles y polifenoles (tirosona, tiroxina y adrenalina), pirrol e indol (triptofano y triptamina), lípidos no saturados y ácido úrico o uratos. Se utilizó formol neutro al 10% y Zenker. Para bloquear los tioles, los cortes testigo fueron tratados mediante yodo en la forma de yodo-yoduro, a pH=3.2.

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LIPIDOS

Sudán III, Sudán Negro B y Rojo Oleoso. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970; Lynch et al, 1972).

Los **sudanes** y el rojo oleoso son sustancias orgánicas capaces de colorear los constituyentes celulares que contienen lípidos disolviéndose en ellos. Se trata de un proceso físico, no **químico**. Los tejidos que contienen gotitas de **lípidos** se sumergen en soluciones alcohólicas saturadas de colorantes altamente liposolubles y poco solubles en alcohol. Después de cierto periodo de tiempo, el colorante difunde del alcohol a los lípidos de los tejidos, quedando éstos coloreados. La especificidad de estos colorantes es satisfactoria, sin embargo existen inconvenientes como que el disolvente de los colorantes puede extraer total o parcialmente las partículas lipídicas finas y la **tinción** de los restos conservados puede ser a veces tan reducida, que imposibilite una diagnosis. Los cortes se fijaron en formol neutro al 10% y fueron cortados con un **microtomo** de congelación.

Técnica del Azul de Nilo para lípidos ácidos y neutros. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970).

Como en el caso de los **sudanes**, la coloración con el Azul de Nilo sólo es aplicable a los lípidos que se encuentran en estado líquido. Los lípidos neutros (glicéridos y colestéridos) se colorean de rosa, los lípidos ácidos (serinocefalina, sulfátidos y gangliósidos) se colorean de azul. Igual ocurre para determinados derivados de los lípidos, **tales** como los cromolípidos (derivados **lipídicos** que dan las reacciones generales de los lípidos como el pigmento seroide y lipofuscinas). Los cromolípidos son insolubles o casi insolubles en los solventes para grasas, por lo que se conservan en los cortes por parafina.

Especificidad: Numerosas estructuras basófilas dan también una reacción azul, por lo cual es preciso aplicar otras técnicas para lípidos, por ejemplo las del Sudan III, Sudan Negro, etc. a fin de comparar los resultados. Se utilizó formol neutro al 10% y cortes con **microtomo** de congelación.

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Técnica de Verde de Metilo-Pironina (Brachet) para DNA y RNA. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970).

La tinción del verde de metilo-pironina no es una reacción histoquímica propiamente dicha, sino una tinción por afinidad diferencial de los elementos ácidos del tejido por colorantes básicos. Cuando se tiñe simultáneamente con ambos colorantes, el verde de metilo se deposita preferentemente en los proteidos que contienen DNA (coloración verde) y la pironina lo hace en los que

poseen RNA (coloración roja). Se utilizó formol neutro al 10% y Zenker.

Técnica de Gothard para RNA. (Spannhof, 1966; Martoja y Martoja, 1970).

El ácido ribonucleico se demuestra en los tejidos gracias a su acentuada afinidad por los colorantes básicos (basofilia), lo que hace que se tiña intensamente con el azul de metileno. Se utilizó formol neutro al 10% y Zenker. Como el RNA no es la única sustancia **basófila** en los tejidos, fué necesario preparar cortes **testigo** a los cuales se les extrajo el RNA mediante una hidrólisis clorhídrica.

TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE CALCIO

Técnica de Von Kossa (Dahl, 1952; **McGee-Russel, 1957a, 1957b**).

En los tejidos animales, el calcio puede estar presente de diferentes formas: como una sal soluble, en forma ionizada y de una manera enmascarada. En estado disuelto la detección química es difícil, en estado encubierto sólo puede ser detectado por microincineración, sin embargo, en estado **iónico** su demostración puede darse por diversos métodos. El método de Von Kossa consiste en sustituir las sales de calcio con la sal de un metal pesado (plata), este último puede sustituir al calcio, a condición que la sal formada sea menos soluble que la sal de calcio. La sal de plata es reducida a plata metálica con luz 0 con un agente químico, coloreando de negro los sitios que originalmente contenían calcio. Este método proporciona imágenes precisas

especialmente para los fosfatos, carbonatos y oxalatos de calcio. Se utilizaron como fijadores, el formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy. Las preparaciones testigo fueron descalcificadas con buffer de citratos a pH 4. Además, debido a la gran cantidad de melanina, pigmento abundante en el epitelio del manto, los precipitados de plata quedan enmascarados, por lo que los cortes fueron sometidos a un tratamiento de peróxido de hidrógeno al 10% durante 48 horas para extraer el pigmento (Spannhof, 1966, Lynch, 1972). Como órgano testigo se utilizó fémur de ratón parcialmente descalcificado.

Técnica del rojo de alizarina S (Sulfonato de alizarina de sodio) (Dahl, 1952; **McGee-Russel, 1957a, 1957b**).

El Rojo de Alizarina S es un colorante del grupo de las antraquinonas. Forma un precipitado rojo anaranjado con el calcio. Ninguna antraquinona es estrictamente específica para calcio, por lo tanto, los cortes testigo fueron descalcificados con buffer de citratos a pH 4. Para la fijación se utilizó formol neutro al 10%, Zenker y Carnoy. El **órgano** testigo fué el mismo que en la técnica anterior.

IDENTIFICACION DE ANHIDRASA CARBONICA (Fand, et al; 1958; Davenport, 1960; Pearse, 1980).

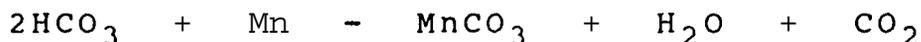
Técnica de Kurata (1953) modificada por Tsujii (1960).

Esta enzima puede ser considerada como sintetasa si la reacción va a la derecha o como liasa si va a la izquierda. Cuando la misma enzima puede funcionar para ambos lados, es difícil

determinarla, porque las condiciones en las cuales, ocurre la reacción (tipo de sustrato, presencia de coenzimas, presencia de inhibidores, pH, etc.) pueden dar como resultado que la reacción tenga una sola dirección. Este método para determinar anhidrasa carbónica puede ser usado como ejemplo para una liasa. El método está basado en el rompimiento enzimático del bicarbonato y en la atracción de los iones carbonato por iones de un metal en el cual el carbonato es insoluble. Kurata utilizó el cloruro de manganeso como fuente de ión metálico.

La anhidrasa carbónica cataliza la reacción: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{CO}_3$; donde el H_2CO_3 se disocia en HCO_3^- y H^+ .

La acumulación de bicarbonato desplaza el equilibrio:



El carbonato de manganeso formado se precipita y se reconoce por la reacción con peryodato de potasio, compuesto con el que forma un precipitado insoluble de color café, visible al microscopio. La fijación se realizó con acetona fría (0-4°C). Los cortes fueron incluidos en parafina. Los cortes control se trataron en solución incubadora sin carbonato.

IDENTIFICACION DE FOSFATASA ALCALINA (Davenport, 1960; Spannhof, 1966; Lynch *et al*; 1972; Pearse, 1980).

Técnica Gomori-Takamatsu (método del Glicerofosfato).

La fosfatasa existente en el tejido separa el glicerofosfato en glicerina y ácido fosfórico. Este último, forma con los iones calcio presentes en la solución incubadora, fosfato cálcico insoluble. El fosfato cálcico precipita en el lugar de

actividad enzimática y pasa luego a fosfato de cobalto. Este último se precipita a sulfuro de cobalto por un tratamiento posterior con sulfuro amónico, haciéndose así visible. La fijación se realizó con acetona fría (0-4°C). Los cortes se obtuvieron por inclusión en parafina. Los cortes control se trataron con la solución incubadora sin glicerofosfato.

DETERMINACION DE LA FORMA MINERALOGICA EN QUE SE PRESENTA EL CARBONATO DE CALCIO EN LA CONCHA (Williams, et al; 1979).

Para conocer la forma mineralógica en que el carbonato de calcio se presenta en la concha de *P. mazatlanica* se realizó un corte transversal de la concha, de manera que se puedan observar las tres capas que la componen. El corte fué adherido a un portaobjetos y se hizo una lámina delgada para observar e identificar los cristales al microscopio de polarización. Como los cristales son extremadamente pequeños se aplicó la prueba de Meigen, en la cual, la aragonita puede distinguirse de la calcita por el color violeta que adquiere cuando hierve durante 20 minutos en una solución de nitrato de cobalto .

Tabla 1. Resúmen de técnicas utilizadas.

TECNICA	FIJADOR	CORTE	RESULTADO	CONTROL Y/O TESTIGO
Hematoxilina Eosina	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Núcleos azules citoplasmas rosas	
Van Gieson	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Núcleos azules citoplasma y fibras musculares amarillas fibras colágenas rojas	
Tricrómica de Gallego	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Núcleos rojos fibras musculares verdes y fibras colágenas azules	
Tricrómica de Massón	Formol	Parafina	Núcleos grises fibras musculares rojas y fibras colágenas azules	
Gallego para fibras elásticas	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Fibras elásticas rojas	Corazón de ratón
Impregnación argéntica	Formol	Parafina Congelación	Fibras reticulares negras, fibras cológenas rojas	

Acido Peryó- dico Schiff	Formol Zenker Carnoy Alcohol absolu- 30	Parafina	Sustancias PAS positivas magenta	Cortes tratados con amilasa por tres horas para digerir el glucógeno. Cortes tratados por acetilación para bloquear la formación de aldehidos en carbohidratos. Hígado de ratón
Azul de Tolui- dina	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Metacromasia gamma color rojo en mucopolisacáridos ácidos	
Azul alciano	Formol benker Carnoy	Parafina	Mucopolisacáridos ácidos en azul	
Carmín de Best	Carnoy alcohol absolu- co	Parafina	Glucógeno rojo	Cortes tratados con amilasa por tres horas para digerir el glucógeno. Hígado de ratón
Ninhi- drina Schiff	Formol Xenker Carnoy	Parafina	Proteínas color magenta	Cortes tratados con nitrito sódico y ácido acético para bloquear los grupos NH₂ . Corazón y pul- món de ratón.
Azul de Toluidi- na alcalina	Formol Zenker	Parafina	Metacromasia en proteínas ácidas (color rojo)	

Verde sólido	Formol Zenker	Parafina	Proteínas básicas color verde	Cortes tratados con nitrito sódico y ácido clorhídrico para bloquear la tinción de proteínas básicas.
Chevremont y Frédéric	Formol Zenker	Parafina	Grupos -SH en azul de Prusia	Cortes tratados con yodo-yoduro a pH de 3.2 para bloquear los tioles.
Sudan III	Formol	Congelación	Lípidos rojos	
Sudan negro B	Formol	Congelación	Lípidos negros	
Rojo Oleoso	Formol	Congelación	Lípidos rojos	
Azul de Nilo	Formol	Congelación	Lípidos neutros rosas y lípidos ácidos azules	
Verde de metilo Pironina	Formol Zenker	Parafina	DNA verde y RNA rojo	
Gothard	Formol Zenker	Parafina	RNA azul	Cortes tratados por hidrólisis clorhídrica para extraer el RNA.
Von Kossa	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Precipitados negros en los sitios donde hay calcio	Cortes descalcificados con buffer de citratos a pH de 4. Hueso de ratón.

TECNICA	FIJADOR	CORTE	RESULTADO	CONTROL Y/O TESTIGO
Rojo de Alizarina	Formol Zenker Carnoy	Parafina	Los sitios donde hay calcio se tiñen de rojo	Cortes descalcificados con buffer de citratos a pH de 4. Hueso de ratón.
Kurata (Anhídrida carbónica)	Acetona fría	Parafina	Precipitados café en sitios enzimáticos	
Gomori Takamatsu (Fosfatasa alcalina)	Acetona fría	Parafina	Precipitados café oscuros en sitios enzimáticos	Cortes incubados sin sustrato.

RESULTADOS

ANATOMIA GENERAL DE *Pinctada mazatlanica*

Al quitar la concha, se puede observar la masa visceral cubierta por el manto, además de los músculos aductor y retractor. Al quitar el manto se observan, además de los músculos, las branquias, los palpos labiales, la boca, localizada en la región anterodorsal, el estómago, en la región dorsal, el intestino, el recto y el surco anal en la región posterior. Rodeando el aparato digestivo se encuentra el hepatopáncreas. El corazón y el hígado se localizan en la región posterodorsal. El pié se observa en la región anterodorsal al igual que el biso. En la periferia de la masa visceral se encuentra el tejido conjuntivo a partir del cual se **diferencia** el tejido gonádico cuando llega la época de reproducción. La anatomía de *P. mazatlanica* se esquematiza en la figura 5.

MANTO

DESCRIPCION MACROSCOPICA

El manto de *P. mazatlanica* es un órgano blanco amarillento, que envuelve el cuerpo del animal, cuyo borde libre presenta un color café oscuro a negro debido a la concentración de células pigmentadas por melanina. El manto se encuentra fusionado en el margen dorsal, sin embargo, en el margen ventral, los bordes están libres, siguiendo la curvatura de la concha. Cuando el animal se abre, el manto se extiende 'sobrepasando el borde de la concha, cuando se cierra, el manto se retrae, localizándose entre

el límite de la capa nacarada y el borde de la concha. A simple vista, se pueden observar los vasos sanguíneos, la arteria paleal, el nervio paleal y el borde del manto con sus tres lóbulos (interno, medio y externo) (Fig. 6).

DESCRIPCION HISTOLOGICA

En el manto de *P. mazatlanica* se observa la morfología típica de un bivalvo, presentando una diferenciación regional que consiste en tres zonas: MARGINAL, PALEAL Y CENTRAL (Fig. 7)

Morfología general de la zona marginal: Esta zona se encuentra revestida de epitelio cilíndrico simple. En el tejido conjuntivo se observan fibras musculares longitudinales, radiales, oblicuas y transversales. Las fibras **colágenas** fueron visibles mediante las técnicas Tricrómica de Gallego y Tricrómica de **Masson** (color azul) (**Lámina.2A**), con la técnica de Van Gieson (color rojo) y con la Impregnación Argéntica (color violeta rojizo). Las fibras reticulares no fueron evidentes con la técnica de Impregnación Argéntica y las fibras elásticas no se evidenciaron con la técnica de Gallego. En el tejido epitelial y subepitelial externo se observan células secretoras grandes, ligeramente basófilas, de aspecto globular de 24.6 ± 7.3 por $14.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$, con los núcleos excéntricos altamente basófilos, que serán caracterizadas en este trabajo como células "**B1**" (Lámina.1A). También se observan glándulas unicelulares de 17.2 ± 13.9 por $11.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$, con gránulos marcados, altamente acidófilas (células "**A1**") (Lámina.1B). Estos dos tipos celulares se encuentran en el tejido subepitelial observándose **conexión** con el epitelio. Además, en el tejido

conjuntivo se observan células basófilas de 6 a 10 μm que no presentan aspecto globular y no están en contacto con el epitelio (células "B2") (Tabla 3). También hay leucocitos granulares (granulocitos), leucocitos agranulares, fibroblastos, tejido nervioso y vasos sanguíneos. No se observan las células de Leydig ni células **café**s.

Lóbulo interno: El epitelio que lo reviste es cilíndrico simple, de 11 a 17 μm de altura con núcleos basales. El citoplasma de las células epiteliales contiene gránulos café oscuro (Lámina.1C). Se observa gran cantidad de fibras musculares. Las células "B1" se observan en el tejido subepitelial, principalmente en el externo.

Lóbulo medio: El epitelio externo es cilíndrico ciliado, de 9 a 11 μm de altura (los cilios miden de 4 a 7 μm), y el epitelio interno es cilíndrico simple de 13 a 17 μm ; en el citoplasma de las células del epitelio interno se observan gránulos de melanina. En el tejido subepitelial externo, cerca del surco periostracal se observa una densa red de fibras argentafines y dado que este lóbulo se caracteriza por su función sensorial, es probable que sean fibras nerviosas. En este lugar la cantidad de células "A1" se ve incrementada. Se observan numerosas células "B1" y células "B2", principalmente en el extremo **distal** del lóbulo. Las células epiteliales de la parte interna del lóbulo miden 16 a 30 μm , formando la llamada "**glándula periostracal**", donde se observa una secreción acidófila, que corresponde a la matriz orgánica que forma la concha (Lámina.1D).

Lóbulo externo: El epitelio interno, donde está el surco periostracal, es cilíndrico simple con células altas (25 a 30 μm) conteniendo en el citoplasma gránulos basófilos y núcleos basales, luego disminuyen de tamaño conforme se acercan al extremo distal del lóbulo (11 a 16 μm) y vuelven a aumentar su tamaño (18 a 27 μm) para formar el epitelio externo que es también cilindro simple. En el epitelio y subepitelio interno se observan numerosas células "A1" particularmente en el surco periostracal; estas células son menos numerosas del lado externo.

Zona paleal: El epitelio externo es cilíndrico simple de 11 a 23 μm y el epitelio interno es cilíndrico ciliado de 11 a 21 μm con pigmento oscuro en el citoplasma (**Lámina.1C**). Los cilios miden de 7 a 11 μm . El epitelio y subepitelio externo presenta un mayor número de células "A1" y células "B1" que el interno. Cerca de la zona marginal se observa el nervio paleal seguido de la arteria paleal (**Lámina.2B**) (Tabla 3).

Zona central: El epitelio que rodea al tejido conjuntivo es cilíndrico simple de 9 a 11 μm en la parte externa y cúbico simple de 6 a 7 μm en la parte interna. En el subepitelio externo se observan células "A1" y "B1", las cuales disminuyen en cantidad conforme llegan al istmo del manto. En esta zona se observan además unas células acidófilas, en su mayoría grandes de 38.9 ± 12.7 por 21.5 ± 7.4 μm con gránulos marcados (células "A2") (**Lámina.3F**) (Tabla 3).

Istmo del manto: Se refiere a la zona del manto fusionada, localizada en la región dorsal. El epitelio es **cilíndrico** simple con células altas (25 a 50 μm) y no se observan células secretoras asociadas de ningún tipo. El epitelio descansa sobre tejido conjuntivo con gran cantidad de leucocitos y fibras **colágenas** (Lámina.1E).

CITOQUIMICA DEL MANTO

Los carbohidratos del manto se identificaron mediante una reacción PAS positiva en: epitelios, membranas basales, células **"A2"** y con mayor intensidad en las células **"B1"** de la zona marginal y central. Las células de la zona paleal fueron negativas a la reacción. La mayor cantidad de células **"B1"** PAS positivas se encontraron en el lóbulo medio, mientras que en el lóbulo externo solo se observaron en el extremo distal (**Lámina.2C** y 2D) (Tabla 4). En los sitios donde hay glucógeno se observaron gránulos rojos positivos a la técnica de PAS y a la del carmín de Best. La reacción resultó positiva en la base de los epitelios de la zona paleal, en algunos leucocitos del tejido conjuntivo y en las células **"A2"** (**Lámina.3F**) (Tabla 4).

Los cortes tratados con saliva y alfa **amilasa** durante tres horas y teñidos con la técnica de PAS no presentaron ningún cambio en las células **"B1"**. Sin embargo, las membranas basales y las células **"A2"** no reaccionaron a esta técnica después de la

digestión. Asimismo, los cortes sometidos a digestión con **amilasa** fueron negativos a la técnica del carmín de Best. En los cortes tratados por acetilación la reacción PAS fué negativa. En el **hígado** de ratón, el glucógeno se observó en los hepatocitos con ambas técnicas, estos cortes fueron negativos después de ser tratados con **amilasa**.

Las células "**B1**" de las tres zonas del manto tuvieron una reacción positiva a la técnica del azul alciano para mucopolisacáridos ácidos (Tabla 4). La reacción también fué positiva en la conquiolina del periostraco, pero con menor intensidad (**Lámina.2E, 2F, 2G y 2I**). Las células "**A2**" de la zona central no presentaron mucopolisacáridos ácidos.

Los epitelios que contienen melanina fueron metacromáticos hacia el verde con la técnica del azul de toluidina; los demás epitelios presentaron metacromasia beta. La metacromasia gamma se observó en las células "**B2**" del lóbulo medio (**Lámina.3C**). La conquiolina del periostraco presentó una metacromasia gamma poco intensa (**Lámina.3D**).

Las proteínas del manto, así como las del corazón y pulmón de ratón, se observaron mediante la técnica de Ninhidrina-Schiff para grupos alfa-amino. La reacción fué positiva en todos los órganos de la madreperla con mayor o menor intensidad, ya que todas las células contienen proteínas. Sin embargo, las células "**A1**" presentaron una reacción positiva intensa, (**Lámina.3G**). Para identificar proteínas ácidas se utilizó la técnica del azul de toluidina alcalino. La reacción fué positiva en el epitelio

externo del lóbulo medio, los epitelios del lóbulo externo, zona paleal y zona central incluyendo el istmo. También las fibras del tejido conjuntivo presentaron metacromasia mientras que el tejido muscular fué ortocromático. Las células "B1" de la zona marginal y paleal presentaron una metacromasia débil (**Lámina.3A**). En la zona central, el lado externo presentó células "B1" con una metacromasia intensa (**Lámina.3B**). Las proteínas básicas se observaron en las células "A1", algunos leucocitos y músculo, mediante la técnica del verde sólido (Tabla 4).

La reacción positiva para grupos -SH se observó, mediante la técnica de Chevremont y Frederic, en los epitelios del lóbulo interno, epitelio interno del lóbulo medio, extremo **distal** del epitelio externo del lóbulo medio y epitelio interno del lóbulo externo. En la zona paleal, la reacción fué positiva en ambos epitelios, principalmente el epitelio interno, y en los gránulos de algunos granulocitos.

La reacción positiva para lípidos fué observada mediante las técnicas del **sudán III**, **sudán negro B**, rojo oleoso y azul de Nilo. Los lípidos fueron observados en los epitelios y en los nervios. Las células "B1" presentan una reacción positiva poco intensa al **sudán negro B** y al azul de Nilo. (**Láminas.4A, 4B, 4C y 4D**) (Tabla 4). No se observaron grasas neutras.

El RNA se evidenció con la técnica del verde de metilo pironina y con la técnica de Gothard. Estas técnicas fueron positivas en los epitelios, en particular, en el epitelio externo del lóbulo medio, en el epitelio del lóbulo externo, en el

epitelio externo de la zona paleal, en el istmo del manto y en las células "A1" (**Láminas.3H** y 31) (Tabla 4).

El calcio, con la técnica de Von Kossa, fué evidente en algunas células "B1" (**Lámina.2H**), en algunos leucocitos del tejido conjuntivo cercano al hepatopáncreas (**Lámina.3E**) y en los epitelios, particularmente el epitelio interno. Con la técnica del rojo de alizarina se presentó una reacción positiva en todos los tejidos en mayor o menor intensidad, las preparaciones testigo descalcificadas no reaccionaron a la técnica. El hueso de ratón fué positivo a las dos técnicas. Los resultados de las técnicas para calcio se resumen en la tabla 2 y tabla 4.

La reacción positiva para anhidrasa carbónica se presentó en el epitelio externo de la zona paleal (**Lámina.4E**), mientras que la fosfatasa alcalina fué evidente en el epitelio interno de la zona paleal, epitelio interno y externo del lóbulo interno, epitelio interno y externo del lóbulo medio, epitelio externo de la zona paleal, y con menor intensidad en el epitelio externo del lóbulo externo (**Lámina.4F** y 4G) (Tabla 4).

Con la prueba de Meigen se observó que la concha de *P. mazatlanica* está compuesta íntegramente de aragonita.

TABLA 2. IDENTIFICACION DE CALCIO POR LA TECNICA DE VON KOSSA Y POR LA TECNICA DEL ROJO DE ALIZARINA

ausente
 + raro
 ++ regular
 +++ abundante

	VON KOSSA	ROJO DE ALIZARINA
Epitelio de la superficie interna del manto		
zona marginal	ttt	ttt
zona paleal	++	++
zona central	+	
Epitelio de la superficie externa del manto		
zona marginal	++	++
zona paleal	++	+
zona central	+	
Istmo del manto	ttt	ttt
Tejido del manto	ttt	t

CE
 B. I.
 B. I. B. N. E. C. A.
 DONATIVO

TABLA 3. DISTRIBUCION DE CELULAS EN EL MANTO DE *P. mazatlanica*

A1-Glándulas unicelulares acidófilas
 AZ-Células acidófilas de la zona central
 B1-Células secretoras globulares
 B2-Células basófilas de la zona marginal

ausente
 + raro
 ++ regular
 +++ abundante

CELULAS				
	A1	A2	B1	B2
ZONA MARGINAL				
Lóbulo interno				
interno		-	+	-
externo		-	++	-
Lóbulo medio				
interno		-	++	+
externo (S.P.)*	++	-	+++	+
Lóbulo externo				
interno (S.P.)*	+++	-	+	
externo	++			
ZONA PALEAL				
interno	-		++	
externo	++		+	
ZONA CENTRAL				
interno		+	-	
externo	+t	++	++	
ISTMO DEL MANTO	-	-	-	

* Surco Periostraca 1

TABLA 4. REACCIONES HISTOQUIMICAS EN LAS CELULAS Y EPITELIOS DEL MANTO DE *P. mazatlanica*

reacción negativa
 + reacción positiva débil
 ++ reacción positiva moderada
 +++ reacción positiva intensa

TECNICAS	CELULAS				EPITELIOS		
	A1	A2	B1	B2	INT	EXT	ISTMO
ACIDO PERYODICO-SCHIFF (PAS)	-	-	+++	-	-	-	-
PAS + AMILASA	-	-	-	-	-	-	-
PAS + ACETILACION	-	-	-	-	-	-	-
AZUL DE TOLUIDINA	-	-	-	tt	t	t	t
AZUL ALCIANO	-	-	ttt	-	t	t	+
CARMIN DE BEST	-	t-	-	-	t	-	-
CARMIN DE BEST + AMILASA	-	-	-	-	-	-	-
NINHIDRINA-SCHIFF	++	t	-	-	+	t	+
NINHIDRINA-SCHIFF + NITRITOS	-	-	-	-	-	-	-
AZUL DE TOLUIDINA ALCALINO	-	-	-	+	-	+	+
VERDE SOLIDO	++	-	-	-	-	-	-
VERDE SOLIDO + NITRITOS	-	-	-	-	-	-	-
CHEVREMONT	-	-	-	-	tt	-	++
CHEVREMONT + YODO-YODURO	-	-	-	-	-	-	-
GOTHARD	t	t	-	-	+	++	+
GOTHARD + HIDROLISIS	-	-	-	-	-	-	-
VERDE DE METILO PIRONINA	ttt	-	-	-	+	++	+
ROJO SUDAN III	-	-	-	-	+	+	-
SUDAN NEGRO B	-	-	+	-	+	+	-
ROJO OLEOSO	-	-	-	-	+	+	-
AZUL DE NILO	-	-	+	-	t	+	-
VON KOSSA	-	-	+	-	ttt	tt	+
VON KOSSA + CITRATOS	-	-	-	-	-	-	-
ALIZARINAS	-	-	+	-	tt	t	+
ALIZARINAS + CITRATOS	-	-	-	-	-	-	-
ANHIDRASA CARBONICA (KURATA)	-	-	-	-	-	+	-
FOSFATASA ALCALINA (GOMORI)	-	-	-	-	-	+	-

Región Dorsal

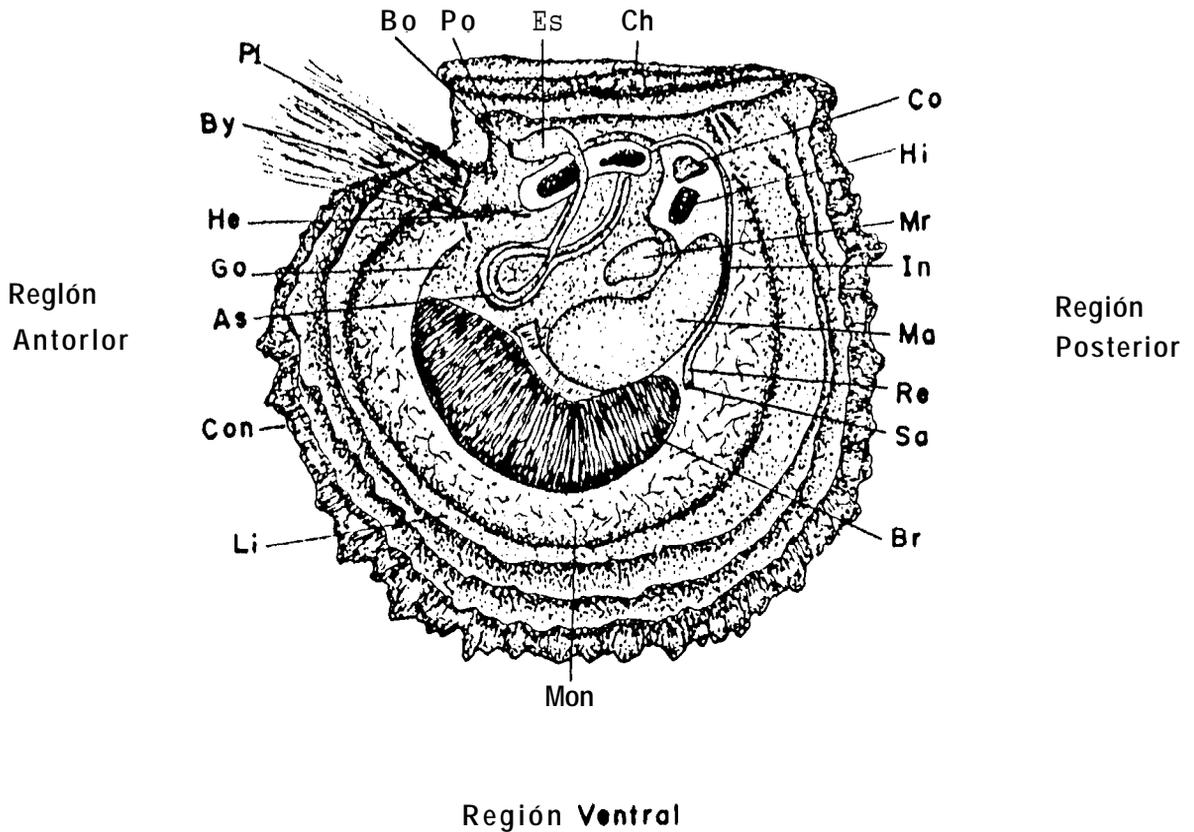


Figura 5. Anatomía general de *Pinctada nazatlanica*.

Es-estómago; **Co-corazón**; Iii-hígado; In-intestino; Bo-boca; **Pa**-palpo labial; Pi-pié; By-biso; He-hepatopáncreas; As-asa intestinal; Ma-músculo aductor; Mr-músculo retractor; **Br**-branquia; Re-reato; Li-límite de la capa nacarada; Con-concha; Man-manto; **Sa-surco** anal; Go-gónada; Ch-charnela.

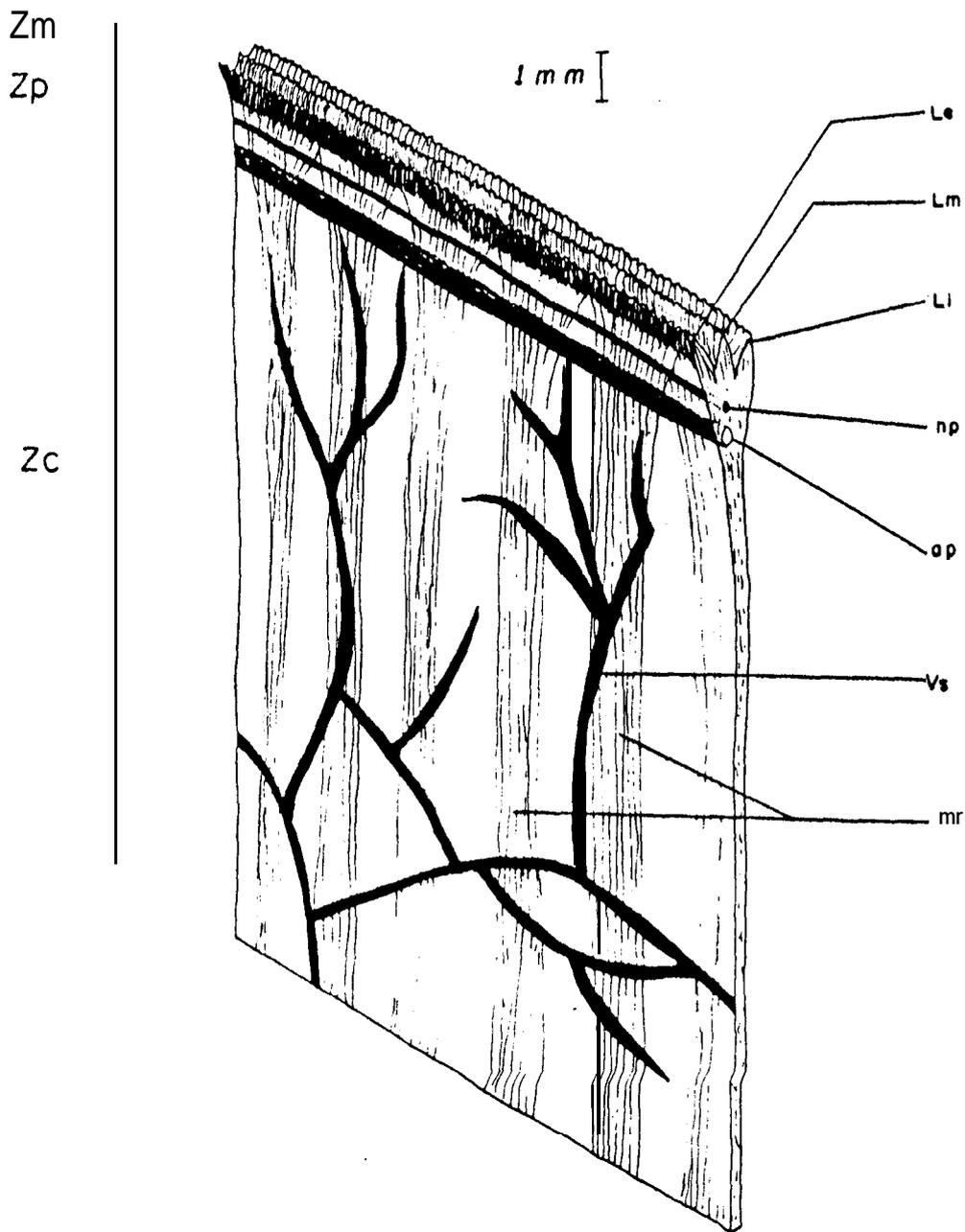


Figura 6. **Representación** esquemática de la **sección** longitudinal del manto de **Pinctada mazatlanica**.

Le-lóbulo externo; Lm-lóbulo medio; Li-lóbulo interno; np-nervio paleal; ap-arteria paleal; mr-músculos radiales; Va-vasos sanguíneos; Zm-zona marginal; Zp-zona paleal; Zc-zona central.

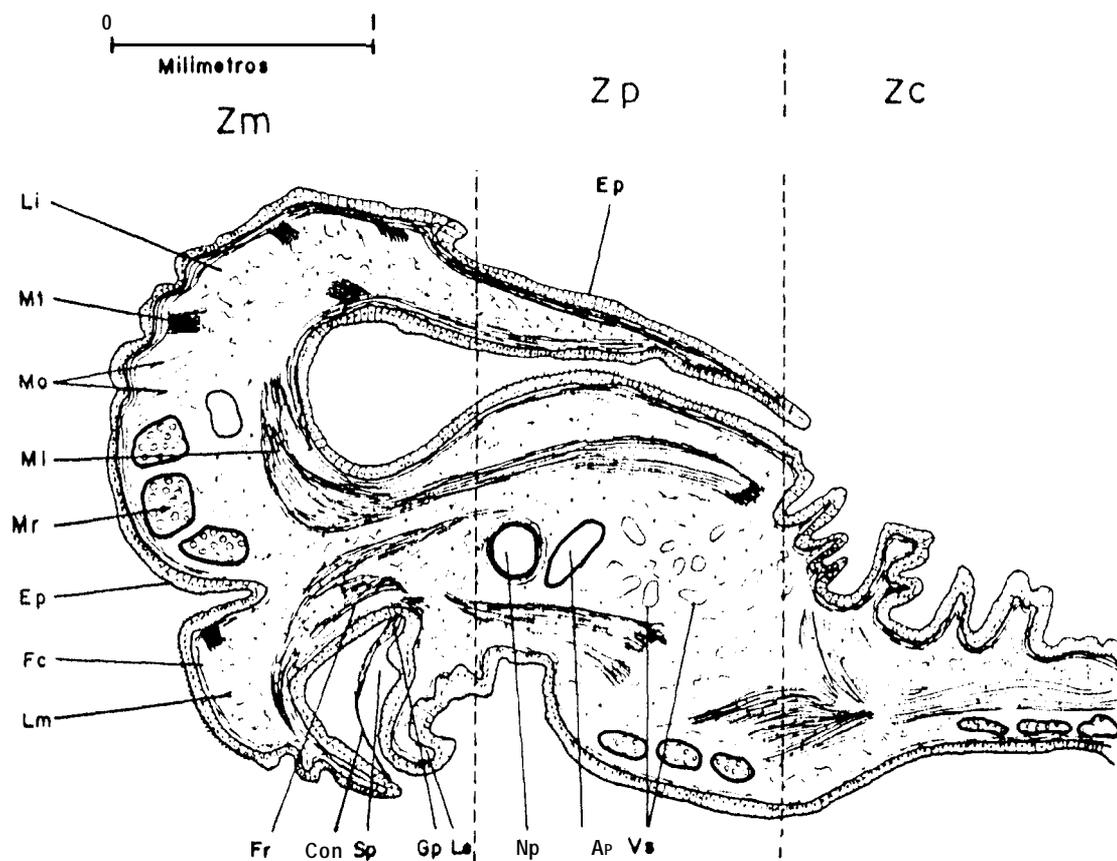


Figura 7. Sección transversal del borde del manto de **Pinctada mazatlanica** (Hematoxilina-Eosina, 35x).

Zm-zona marginal; Zp-zona paleal; Zc-zona central; Li-lóbulo interno; Lm-lóbulo medio; Le-lóbulo externo; Mt-músculos longitudinales; Mr-músculos radiales; Mt-músculos transversales; Mo-músculos oblicuos; Ep-epitelio; Fc-fibras **colágenas**; Fr-fibras nerviosas; Np-nervio paleal; Ap-Arteria paleal; Va-vasos sanguíneos; Con-conchiolina; Sp-surco periostracal; Gp-glándula periostracal.

Lámina.1A Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*. **B1)** células secretoras, **B2)** células basófilas. Hematoxilina Eosina. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.1B Lóbulo externo del manto de *P.mazatlanica*. Al) glándulas unicelulares, **B1)** células secretoras, E) epitelio interno. Hematoxilina Eosina. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.1C Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ep) Epitelio interno, **Ei)** epitelio externo del lóbulo interno del manto. Hematoxilina Eosina. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.1D Surco Periostracal de *P.mazatlanica*. **B1)** células secretoras, Al) glándulas unicelulares, C) conchiolina, **Ee)** epitelio interno del lóbulo externo, Em) epitelio externo del lóbulo medio. Hematoxilina Eosina. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.1E Epitelio del Istmo del Manto de *P.mazatlanica* (**EI**). Hematoxilina Eosina. (400x). Inclusión en parafina.

LAMINA 1

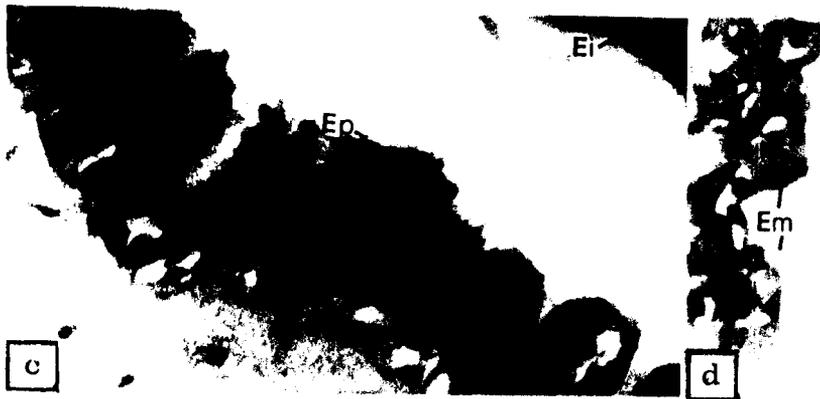
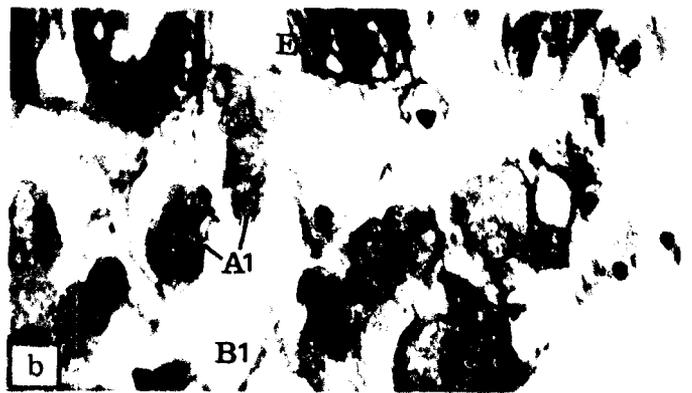
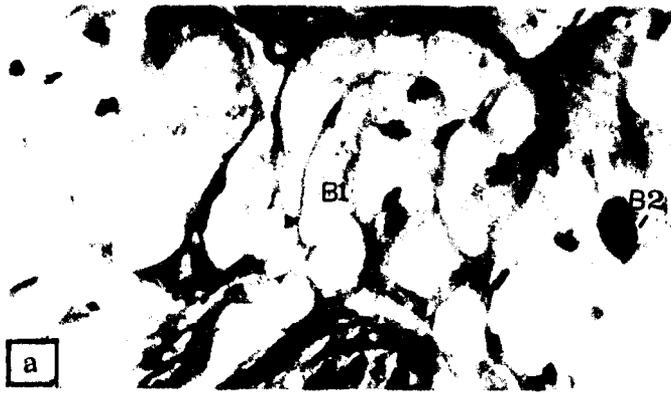


Lámina.2A Lóbulo externo del manto de *P. mazatlanica*. Fc) Fibras **colágenas** (azul), Al) glándulas unicelulares (rojo). Técnica Tricrómica de Massón. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.2B Zona Paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal. Impregnación Argéntica. (400x). Corte por congelación.

Lámina.2C Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras, Em) epitelio externo del lóbulo medio, Ee) epitelio interno del lóbulo externo, C) conchiolina. Técnica del Acido Peryódico-Schiff (PAS). (100x). Inclusión en parafina.

Lámina.2D Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Técnica del Acido Peryódico-Schiff (PAS). (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.2E Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras, C) conchiolina, Le) lóbulo externo, Lm) lóbulo medio. Azul Alciana (100x). Inclusión en parafina.

Lámina.2F Surco periostracal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. C) conchiolina, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Azul Alciano (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.2G Epitelio externo de la zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Azul Alciano (400x). Inclusión en Parafina.

Lámina.2H Epitelio externo de la zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Técnica de Von Kossa. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.2I Zona central del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras, Ee) epitelio externo, Ei) epitelio interno. Azul Alciano. (100x). Inclusión en Parafina.

Lámina.3A Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras. Azul de Toluidina alcalino (pH=9). (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.3B Zona central del manto de *P. mazatlanica*. B1) células secretoras, Ee) epitelio externo. Azul de Toluidina alcalino (pH=9). (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.3C Lóbulo medio del manto de *P. mazatlanica*. B2) células basófilas. Ee) epitelio externo. Azul de Toluidina a pH=4. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.3D Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo, C) conchiolina. Azul de Toluidina a pH=4. (100x). Inclusión en parafina.

Lámina.3E Tejido conjuntivo de *P. mazatlanica*. Am) amebocitos con calcio. G) gametos masculinos. Técnica de Von Kossa. (1000x). Inclusión en parafina.

Lámina.3F Zona central del manto de *P. mazatlanica*. A2) células acidófilas con gránulos de glucógeno. Técnica del Carmín de Best. (1000x). Inclusión en parafina.

Lámina.3G Surco Periostracal en *P. mazatlanica*. Al) glándulas unicelulares. Ee) epitelio interno del lóbulo externo, Em) epitelio externo del lóbulo medio, C) conchiolina. Técnica de Ninhidrina-Schiff. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.3H Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. Al) glándulas unicelulares, Le) lóbulo externo, C) conchiolina. Técnica de Gothard. (100x). Inclusión en parafina.

Lámina.3I Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. Al) glándulas unicelulares, Em) epitelio externo del lóbulo medio, Ee) epitelio interno del lóbulo externo. Técnica del Verde de Metilo Pironina. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.4A Zona marginal y paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal, Li) lóbulo interno, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Negro Sudán B. (100x). Corte por congelación.

Lámina.4B Surco Periostracal del manto de *P. mazatlanica*. Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo, Al) glándulas unicelulares. Rojo Oleoso. (100x). Corte por congelación.

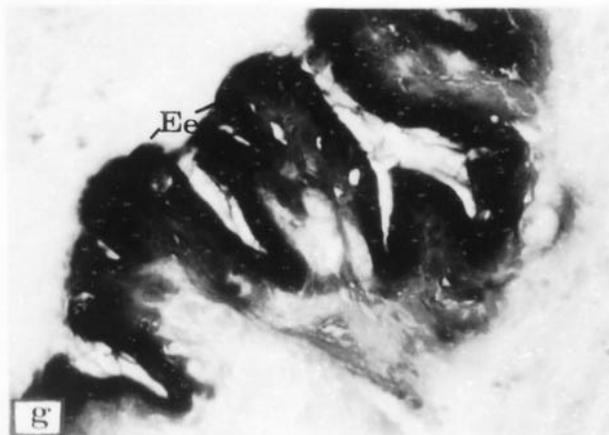
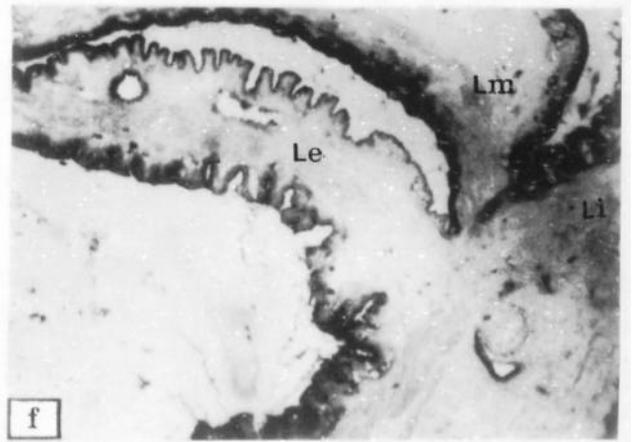
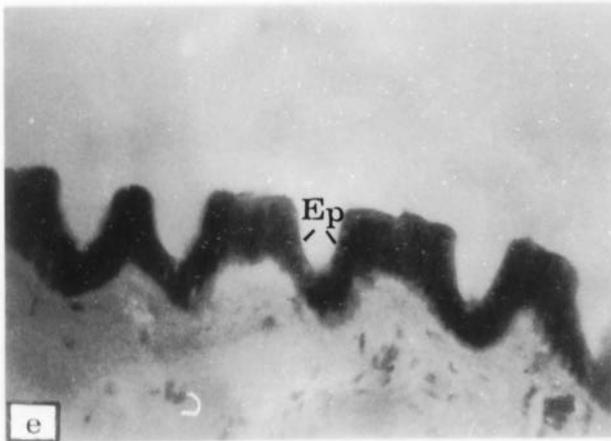
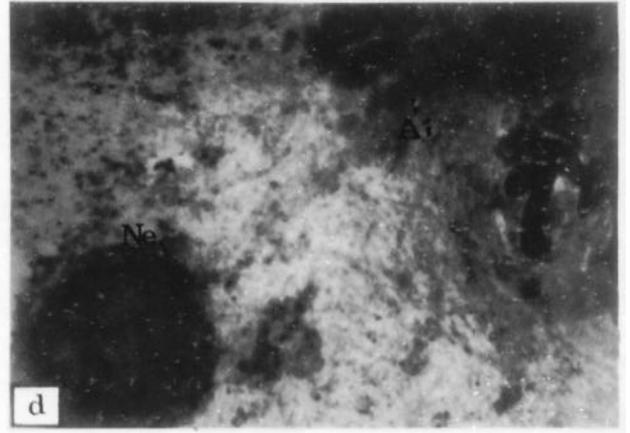
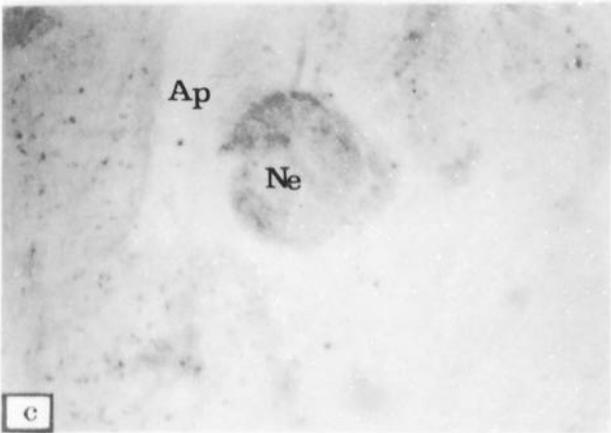
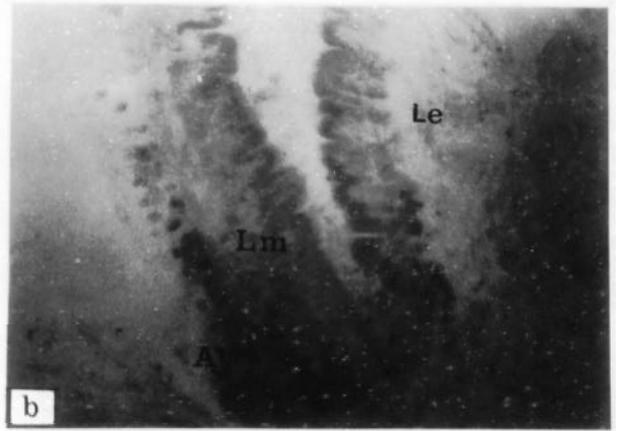
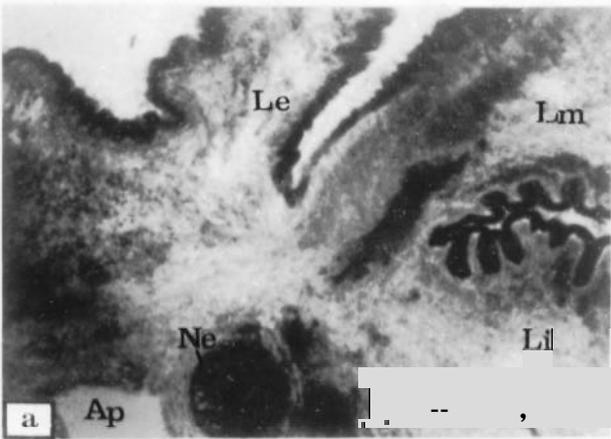
Lámina.4C Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Ap) arteria paleal. Rojo Oleoso. (100x). Corte por congelación.

Lámina.4D Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ne) nervio paleal, Al) glándulas unicelulares. Azul de Nilo. (400x). Corte por congelación.

Lámina.4E Epitelio externo (Ep) de la Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Técnica de Kurata para Anhídrida Carbónica. (400x). Inclusión en parafina.

Lámina.4F Zona marginal y paleal del manto de *P. mazatlanica*. Li) lóbulo interno, Lm) lóbulo medio, Le) lóbulo externo. Técnica de Gomori-Takamatsu para Fosfatasa Alcalina. (63x). Inclusión en parafina.

Lámina.4G Zona paleal del manto de *P. mazatlanica*. Ee) epitelio externo. Técnica de Gomori-Takamatsu para Fosfatasa Alcalina. (400x). Inclusión en parafina,



El manto de *P. mazatlanica*, al igual que el de *P. maxima* (Dix, 1972a) y *P. martensii* (Tsuji, 1960), presenta la anatomía típica de un bivalvo, con tres lóbulos en la zona marginal. Las fibras **colágenas** se observan distribuidas por todo el manto, claramente en la zona subepitelial. No se obtuvo evidencia de fibras elásticas, coincidiendo con lo observado en *Crassostrea virginica* por García-Domínguez (1977) y Deleón et al., (1984), aunque Galtsoff (1964) menciona la presencia de estas fibras en el tejido conjuntivo del manto de esta misma especie. En el lóbulo medio de *P. mazatlanica* se observa una densa red de fibras argentafines que no presentan una estructura a manera de estroma observada por García-Domínguez (1977) y Deleón et al., (1984) en las fibras reticulares de *C. virginica*. Sería conveniente saber con certeza de que tipo de fibras se trata observando con microscopio electrónico. Se observan además, leucocitos granulares, leucocitos agranulares, fibroblastos, vasos sanguíneos, la arteria paleal, fibras nerviosas y el nervio paleal. No se observaron células cafés ni células de Leydig. Las células epiteliales difieren, dependiendo de su función, principalmente en su altura, pigmentación, **ciliación** y tipo y distribución de las células secretoras asociadas. Los epitelios son altos y se observa pigmentación de color **café** oscuro, debido a la presencia de melanina. Las células epiteliales del lóbulo externo presentaron gránulos basófilos en el citoplasma y núcleos basales.

Las células (B1) observadas en *P. mazatlanica*, principalmente las del lóbulo medio y las del epitelio que secreta el nácar (zona paleal y central), fueron positivas a la técnica del azul alciano para mucopolisacáridos ácidos sulfatados y presentaron gránulos de calcio en su interior. Estos resultados son comparables con los de Timmermans (1969), quien encontró calcio en las células del tejido conjuntivo y sugiere que existe un almacenamiento de calcio que no es directamente utilizado para la formación de la concha. Por su parte, Tsujii (1960) reporta que en las glándulas mucosas existe calcio en abundancia, mientras que Dix (1972b) encontró calcio en las células secretoras del manto central de *P. maxima*. Probablemente, el calcio encontrado en las células de *P. mazatlanica* pueda ser debido a dos factores: 1) almacenamiento de calcio, y/o 2) el calcio es secretado al mismo tiempo que las mucosubstancias. Según Wada (1964), la matriz orgánica de la concha calcificada contiene mucopolisacáridos ácidos, mientras que la matriz no calcificada no los presenta. Los mucopolisacáridos ácidos sulfatados de las sustancias mucosas se pueden combinar con calcio y transportarlo al sitio de mineralización de la concha a través del tejido del manto, de esta manera, juegan un papel importante en la depositación de los cristales de carbonato de calcio (Tanaka y Hatano, 1963, citados en Wada, 1967a; Bevelander y Benzer, 1948). Love y Frommhagen (1953) y Beedham (1958a) no encontraron calcio en las células mucosas de *Mactra solidissima*, sin embargo, proponen que la secreción mucosa de las células participa en la tranferencia de las sales de calcio del manto a

la concha; por otro lado, Weiner y Hood (1975) encontraron residuos de ácido aspártico con carga negativa y sugieren que esta secuencia de ácido aspártico puede unirse a iones de calcio teniendo una importante función en la mineralización. Es necesario realizar un seguimiento del calcio mediante radioisótopos, utilizando en este caso Ca^{45} .

Por otro lado, en el tejido conjuntivo del manto y en el tejido que rodea al hepatopáncreas de *P. mazatlanica* se observaron amebocitos con calcio en su interior; esto se podría relacionar con el transporte de calcio, tal como lo propone Wagge (1951) (citado en Timmermans, 1969), aunque al parecer, no existen bases sólidas que fundamenten esta hipótesis. Tsujii (1960) encontró calcio en células dispersas en el tejido conjuntivo y región subepitelial del manto y asume que el calcio puede ser transferido de un lugar a otro por medio de estas células. La mayor parte del material calcáreo de la concha de los moluscos marinos es obtenido directamente del agua de mar (Robertson, 1941; Bevelander, 1952; Jordey, 1953; Kado, 1960); esto hace necesaria la participación de células con movimiento para transportarlo al sitio de mineralización. Otra fuente de calcio es el alimento, sin embargo, en los moluscos acuáticos no es la mas importante (Kado, 1960). Cuando finalmente el calcio es depositado en la concha de *P. mazatlanica*, como carbonato de calcio, la forma mineral en que se presenta es aragonita en su totalidad, como se demostró con la prueba de Meigen. La aragonita y la calcita son prácticamente los únicos minerales carbonatados secretados por los organismos. El material esquelético compuesto

de aragonita es carbonato de calcio puro, mientras que en la calcita probablemente existe magnesio en solución sólida (Williams et al., 1979). Muchas conchas consisten de calcita o de aragonita, aunque algunas contienen ambos minerales; en el último caso, ambos minerales nunca forman una mezcla íntima, sino que ocurren separadamente en capas diferentes en la misma concha, generalmente la capa exterior está compuesta de calcita prismática ó fibrosa mientras que las capas interiores, por lo general de lustre perlino, están formadas de aragonita fibrosa o laminar (Williams et al., 1979). Entre los lamelibranquios, la concha de los ostreidos y pectínidos son enteramente de calcita; en los avicúlidos, mitílidos y *Trigonia* la capa prismática es de calcita y la capa nacarada es de aragonita, en los unionidos y otros lamelibranquios las conchas están hechas de aragonita (Stolowski 1951).

Algunas células secretoras (B1) de la zona marginal y central, presentaron además metacromasia con el azul de toluidina alcalino para proteínas ácidas; es probable, de acuerdo con Beedham (1958b), Wada (1964) y Grégoire (1967), que estas células secreten un complejo mucopolipeptídico. Por sus características, se puede decir que las células "B1" son glándulas unicelulares de secreción mucosa. Para identificar y cuantificar las proteínas y carbohidratos en las células, se necesitan realizar análisis bioquímicos y mediciones de la intensidad de tinción mediante espectrofotometría.

CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDIOS DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I. P. N.
DONATIVO

En *Pinctada mazatlanica*, como en todos los bivalvos, la capa orgánica no calcificada de la concha o periostraco, se origina en el espacio entre los lóbulos medio y externo del manto, llamado "**surco periostracal**". Bevelander y Benzer (1948) Y Tsujii (1960) sugieren que el periostraco es secretado por el epitelio externo del lóbulo medio del manto mientras que Beedham (1958a,b; 1965) y Dix (1972a) establecen que el periostraco es formado por el epitelio interno del lóbulo externo. Galtsoff (1964) se refirió a la parte mas interna del surco periostracal como "**glándula**" periostracal, cuya función es suplementar grandes cantidades del material requerido para el crecimiento de la nueva concha en el borde de las valvas. La matriz orgánica de la concha se conoce como conquiolina o conquina, la cual se compone de una escleroproteína con uno o mas azúcares reductores (Bevelander y Benzer, 1948; Galtsoff, 1964; Wada, 1964; 1966a,b; 1967a,b) y probablemente algunos lípidos (Beedham, 1958b; Weiner y Hood, 1975; Hunt y Oates, 1978 citados en Kunigelis y Saleuddin, 1984). La conquiolina es un material insoluble en agua, alcohol, éter, hidróxidos alcalinos fríos y ácidos diluídos. A simple vista y bajo microscopio óptico, la conquiolina se observa como un material amorfo, viscoso y transparente que calcifica poco después de haber sido depositado (Galtsoff, 1964).

Las proteínas constituyen el componente principal de la matriz orgánica. Ghiselin et al., (1967) propone que la concha de los moluscos ha evolucionado por modificación de las proteínas originadas en el manto, además de un descenso en la proporción proteína-carbohidrato y de un mayor grado de calcificación.

El patrón de aminoácidos del periostraco indica que se trata de una proteína quinona obscura (Beedham, 1958b; Wada, 1966b). La composición de aminoácidos de la capa calcárea interna difiere a la de la capa calcárea externa, tal como lo demostraron Beedham (1958b) y Wilbur y Watabe (1967). Así mismo, la composición de aminoácidos de la capa de calcita no es igual a la capa de aragonita (Wada, 1966a).

Intercaladas con las células epiteliales y en el tejido conjuntivo subepitelial del surco periostracal se observan células secretoras (A1), positivas a la técnica de Ninhidrina-Schiff para grupos alfa-amino y a la técnica del verde sólido para proteínas básicas y células secretoras (B1), metacromáticas al azul de toluidina alcalino para proteínas ácidas, positivas a la técnica de PAS y al azul alciano para mucopolisacáridos ácidos sulfatados. Se sabe que la reacción PAS positiva en estas células es debida a los carbohidratos gracias al control por acetilación, puede tratarse de algún mucopolisacárido neutro, alguna glucoproteína o algún glucolípido, ya que las células fueron ligeramente positivas a las técnicas de Sudán negro B y azul de Nilo. No se trata de glucógeno, ya que el control tratado con amilasa fué positivo a la técnica. Estas células secretoras (B1) se encuentran en mayor cantidad en la parte distal del lóbulo medio y su número disminuye al tiempo que aumentan las células (A1) en la parte mas interna del surco de ambos lados y en el epitelio interno del lóbulo externo. Beedham (1965) al analizar el material orgánico de la concha de *Anodonta cygnea* no

encontró sustancias PAS positivas, ni mucopolisacáridos ácidos en el periostraco, sin embargo, en *P. mazatlanica* el periostraco recién formado fué positivo a las técnicas para mucopolisacáridos ácidos y fué negativo a la técnica de PAS. Con estas observaciones se puede decir que probablemente las células secretoras (B1) del lóbulo medio participan en la formación de los carbohidratos del periostraco.

Con respecto a las células secretoras (A1), cabe mencionar que el ser positivas a las técnicas para proteínas no necesariamente significa que tienen una función secretora, sino que presentan una naturaleza proteica, sin embargo, su morfología y su ubicación en el manto indican que estas células sí llevan a cabo una función secretora, probablemente de tipo seroso. Estas glándulas, al igual que las células epiteliales, presentaron una reacción intensa a las técnicas para RNA, indicando, de acuerdo con Beedham (1958a), Tsujii (1960) y Timmermans (1969) su participación en la síntesis de proteínas.

En el lóbulo medio se observaron además las células basófilas (B2), metacromáticas con azul de toluidina (pH=4). Estas células no están en contacto con el epitelio, probablemente participen en la formación del periostraco ya que la conquiolina presenta una metacromasia gamma poco intensa. Los epitelios presentan metacromasia beta que probablemente se refiere a alguna glucoproteína.

Con respecto a las capas mineralizadas, Galtsoff (1964) y Dix (1972a) observaron que la capa prismática es secretada por la

superficie externa del lóbulo externo y que la capa nacarada es secretada por la superficie externa del manto (que incluye la zona paleal y central). La capa interna del ligamento es secretada por el epitelio del istmo del manto. Tsujii (1968) (citado en Dix, 1972a) sugiere que las células secretoras localizadas en la superficie del manto que forma la concha participan en el proceso de mineralización, particularmente los grupos amino y mucosubstancias ácidas. Dix (1972b) encontró proteínas en las células acidófilas y mucopolisacáridos en las células basófilas, tanto del surco periostracal como de la superficie externa del manto de *Pinctada martensii* y propone que las células secretoras del manto central participan en la formación de nácar.

Beedham (1965) concluyó que durante el proceso de regeneración de la concha no existe diferencia entre las propiedades secretoras de las diferentes zonas epiteliales del manto, es decir, el manto en su totalidad es capaz de secretar las tres capas de la concha.

En el epitelio externo del lóbulo externo y en el epitelio externo de la superficie del manto de *Pinctada mazatlanica*, se observaron abundantes células secretoras (A1), aunque en menor cantidad que en el surco periostracal; estas células se encontraron intercaladas con las células epiteliales. Las células secretoras (B1) del epitelio externo del lóbulo externo y del epitelio externo de la zona paleal son positivas únicamente a la técnica de azul alciano no presentando sustancias PAS positivas y

las células secretoras de la zona central son positivas al azul de toluidina alcalino, la metacromasia es mas intensa que en el surco periostracal. El epitelio externo del manto (zona paleal y central) es positivo a la técnica de Chévremont y Frédéric para grupos **-SH**. Ambos epitelios presentaron una metacromasia beta intensa con el azul de toluidina (**pH=4**). Estas observaciones indican que la matriz orgánica de la capa prismática contiene proteínas básicas y mucopolisacáridos ácidos positivos al azul alciano, mientras que la matriz orgánica de la capa nacarada contiene además proteínas ácidas unidas a mucopolisacáridos ácidos (positivos al azul alciano y metacromáticos al azul de toluidina) y grupos **-SH**. La metacromasia beta de los epitelios puede indicar la presencia de glucoproteínas.

En la zona central se observaron unas células grandes, con gránulos acidófilos (A2); estas células contienen glucógeno como se pudo comprobar con los controles tratados con amilasa y con el hígado de ratón. Tsujii (1960) encontró estas células en *Pinctada martensii* y Beedham (1958a) encontró glucógeno en las células epiteliales que secretan la capa calcárea interna de *Anodonta* sp. Probablemente estas células almacenan energía para el proceso de calcificación. Galtsoff (1964), Peek y Gabbott (1990) y Gabbott y Peek (1991) llamaron a estas células "células vesiculares" y encontraron glucógeno en su citoplasma, el primero por métodos histoquímicos y los segundos por métodos bioquímicos. Por su parte, Combs (1959), estudiando a *C. virginica*, las denominó "células parenquimales" y estimó que la cantidad de glucógeno contenido en ellas es del 95 al 99% del glucógeno total del

manto; además, dividió a estas células en dos grupos: las del grupo I, caracterizadas por ser pequeñas (4 μm) y no glucogénicas; en cambio, las del grupo II son células grandes (de 12 a 52 μm) altamente glucogénicas, núcleo excéntrico ó céntrico dependiendo de la cantidad de glucógeno almacenado. Las células II A 2 II observadas en *P. mazatlanica* presentan las mismas características que las células parenquimales del grupo II.

El epitelio del istmo del manto contiene mucopolisacáridos ácidos, presenta metacromasia beta con el azul de toluidina y es positivo a las técnicas para RNA, por lo que se observa que la capa interna del ligamento está constituida por proteínas y mucopolisacáridos ácidos.

Por otro lado, en el nervio paleal se encontraron gránulos de glucógeno. Combs (1959) sugiere que existe una depositación de glucógeno en la capa que rodea los procesos neuronales.

Cabe mencionar que el contenido de glucógeno varía de acuerdo a la estación del año y al estado de madurez sexual del organismo, ya que es utilizado durante la gametogénesis (Tsuji, 1960; Galtsoff, 1964; Gimeno et al., 1990; Peek y Gabbott, 1990; Gabbott y Peek, 1991).

Lozada y Reyes (1981) reportan la presencia de amebocitos conteniendo abundante glucógeno en la gónada de *Perumytilus purpuratus* durante el periodo de desove y sugieren que pueden tener diferentes funciones ya que han sido observadas en muchos moluscos. En el manto de *P. mazatlanica* se observaron algunos

amebocitos con glucógeno en la zona central, tal vez estos amebocitos aporten energía al proceso reproductivo. Peek y Gabbott (1990) observaron que en el mejillón *Mytilus edulis* la gametogénesis tiene lugar en el manto, a expensas del tejido conjuntivo de reserva.

Es probable que las proteínas encontradas en el manto puedan ser utilizadas para otros procesos biológicos además de la biomineralización, sin embargo, no se tienen datos al respecto. Faveris (1987) propone que en *Pecten maximus* las proteínas de la gónada probablemente derivan del músculo y Gimeno et al., (1990) sugiere que las proteínas ricas en lisina, arginina y grupos -SH y -S-S- son sintetizadas en el interior del ovocito.

Con respecto a los lípidos encontrados en el manto, la literatura los registra en las células vesiculares (Galtsoff, 1964), células de Leydig (García-Domínguez, 1977; Deleón et al., 1984) y células adipogranulares (Gabbott y Peek, 1991).

Según Combs (1959) el manto es un órgano fisiológicamente activo en la formación de la concha, respiración, excreción y almacenamiento de lípidos; encontró que en *C. virginica* los tejidos con grandes cantidades de glucógeno también almacenan lípidos y sugiere que una célula parenquimal, capaz de glucogénesis es potencialmente una célula lipogénica.

En el manto de *P. mazatlanica* se observan lípidos en los epitelios, en los nervios y escasamente en las células secretoras (B1). El contenido de lípidos en los tejidos depende principalmente del alimento y del estado de madurez del organismo

(Combs, 1959; Besnard, 1987). Combs (1959) y Timmermans (1969) encontraron una escasa cantidad de lípidos en el tejido epitelial del manto. Probablemente las células epiteliales producen algunos lípidos para la formación del material orgánico ya que Beedham (1958b) obtuvo una reacción positiva con **sudán negro B** en las capas del periostraco de tres especies de bivalvos. Es probable que los lípidos de los epitelios tengan otras funciones ya que no sólo se localizan en el epitelio que forma la concha, también se observan en el epitelio interno del manto. En cuanto a las células secretoras (B1) positivas al **sudán negro B** y al azul de Nilo, posiblemente contienen lípidos unidos a carbohidratos (glucolípidos) o la reacción positiva es debida a otra sustancia ya que ninguno de estos dos colorantes es estrictamente específico para lípidos y con el rojo oleoso la reacción en estas células fué negativa.

En relación a la actividad enzimática presente en el epitelio externo de la zona paleal del manto, los resultados coinciden parcialmente con los de Tsujii (1960), quién encontró que la actividad de la anhidrasa carbónica es mayor en el epitelio de la superficie externa de la zona marginal y paleal que en la zona central del manto de *Pinctada martensii* y sugiere que la anhidrasa carbónica puede estar activa también en el saco perlero; esto indica que el tejido injerto (a partir del cual se forma el saco perlero) debe presentar actividad enzimática. Por su parte, Timmermans (1969) obtuvo una reacción positiva en el epitelio externo del manto de *Lymnaea stagnalis*.

La anhidrasa carbónica **cataliza** la hidratación reversible del

CO₂. El CO₂ metabólico es la principal fuente de carbonato en los moluscos (Robertson, 1941; Jordey y Wilbur, 1955). Jordey y Wilbur (1955) observaron que el ciclo del ácido tricarboxílico provee fuentes de energía y carbonato para la depositación de la concha. El carbonato de calcio ocupa alrededor del 95% del peso total de la concha, el 5% restante está formado por carbonato de magnesio, sulfato de calcio, sílice, otras sales de magnesio, fierro, aluminio, metales pesados en cantidades traza y aproximadamente 1.5% de materia orgánica (Galtsoff, 1964).

La actividad de la anhidrasa carbónica se ha encontrado en el manto y otros tejidos de muchos moluscos, y se ha observado que dicha enzima juega un papel importante en la tasa de depositación de carbonato de calcio (Robertson, 1941; Freeman y Wilbur, 1948; Stolowski, 1951; Kawai, 1954, 1955; Wilbur y Jordey, 1955; Freeman, 1960; Tsujii, 1960; Wilbur, 1964; Timmermans, 1969; Wilbur y Saleuddin, 1983; Watabe, 1983; Maeda-Martinez, 1985). Algunos inhibidores de la enzima afectan la tasa de calcificación (Stolowski, 1951; Wilbur y Jordey, 1955; Freeman, 1960; Maeda-Martínez, 1985).

La actividad enzimática de la anhidrasa carbónica varía de acuerdo a la estación del año, la edad del animal y la función reproductiva (Stolowski, 1951; Kawai, 1955). Meldrum y Roughton (1933) encontraron que la enzima acelera 300 veces la conversión de CO₂ en carbonato ácido. Van Goor (1957) (citado en Timmermans, 1969) observó que a la reacción en ausencia de la enzima es lenta, transcurriendo un tiempo prolongado hasta completarse en

un 90%. De acuerdo con Stolowski (1951), esta enzima también es importante en la determinación de la forma cristalina en la cual el carbonato de calcio aparece en la concha (calcita o aragonita) y no todos los moluscos la presentan.

De esta manera, un molusco que presenta actividad enzimática de anhidrasa carbónica en el epitelio del manto que forma la concha será mas eficiente en la depositación de carbonato de calcio que un molusco que no presente la enzima. Freeman y Wilbur (1948) sugieren que esta enzima tiene funciones adicionales al proceso de calcificación, ya que se ha observado en otros tejidos.

En la figura 8 se esquematiza el metabolismo del calcio y del carbonato desde su ingreso al organismo hasta su depositación en la concha. La anhidrasa carbónica acelera la formación de H_2CO_3 (reacción a). La reacción b es espontánea; en esta reacción se forman los iones bicarbonato que posteriormente serán convertidos en iones carbonato (reacción c). Hamen y Wilbur (1959) (citados en Timmermans, 1969) mostraron que el CO_2 se fija en los intermediarios del ciclo del ácido tricarbónico. En la reacción c el CO_3 se podría combinar con el calcio, sin embargo, esto no sería posible debido a la baja solubilidad del producto ($CaCO_3$). Si esto sucediera, el $CaCO_3$ cristalizaría dentro de las células (Diamantstein y Schlüns, 1964; Diamantstein, 1966; citados en Timmermans, 1969). Estos autores asumen que los iones carbonato se forman fuera de las células (reacción d) para posteriormente unirse a los iones de calcio. Otra alternativa es

que los iones bicarbonato se combinen con el calcio fuera de las células formándose el CaCO_3 y un protón (**reacción e**). El medio donde se regula la composición mineral y orgánica de la concha es una delgada capa de fluido llamado fluido extrapaleal (Wilbur, 1964; Wilbur y Saleuddin, 1983).

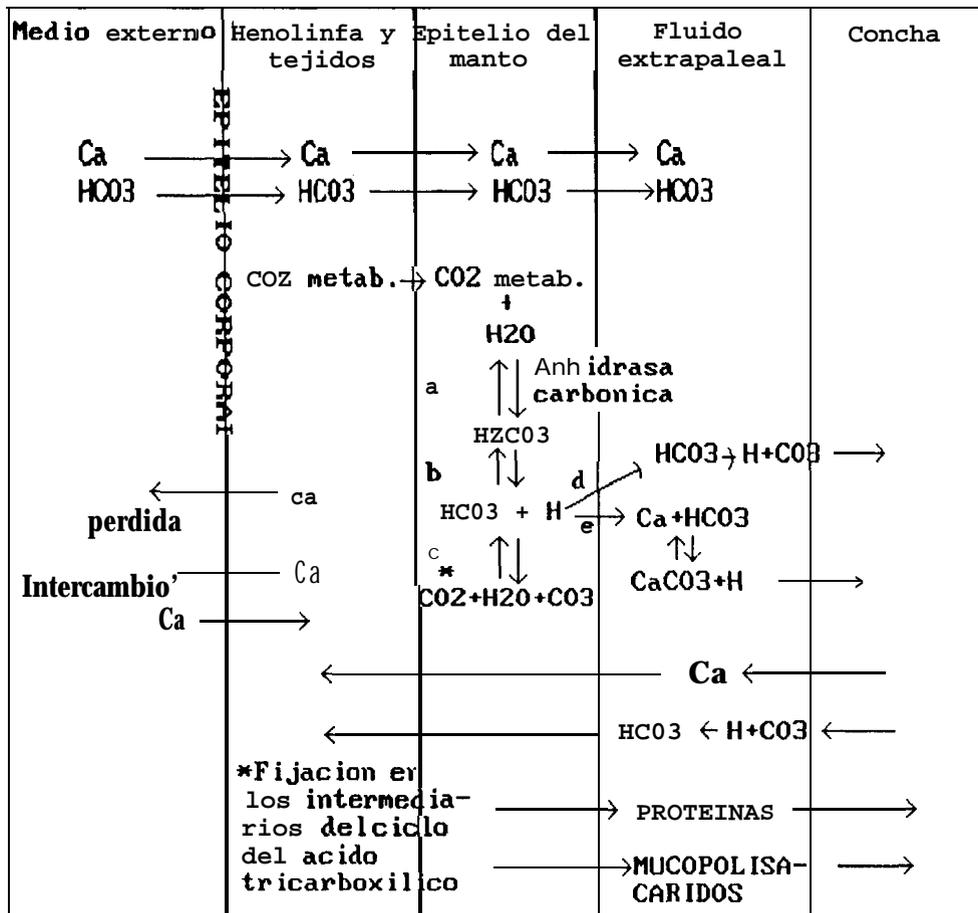


Figura 8. Metabolismo del calcio y del carbonato desde su ingreso al organismo hasta su depositación en la concha. (Tomado de Wilbur y Saleuddin, 1983)

En *P.mazatlanica*, en contraste con lo reportado por Tsujii (1960) para otros moluscos, en el epitelio externo de la zona marginal y el surco periostracal la reacción fué negativa; esto puede indicar que el epitelio que forma el nácar es el mas eficiente en el proceso de calcificación. Cabe mencionar que aunque la reacción haya sido negativa en la zona marginal, no significa ausencia de la enzima ya que se trabajó con cortes incluidos en parafina y durante el procedimiento se llega a perder hasta el 90% de la actividad enzimática (Davenport, 1960 y Spannhof, 1966). El epitelio externo de la zona paleal fué positivo a pesar de estas limitaciones de la técnica, por lo que la actividad enzimática en este lugar es intensa; estos resultados permiten sugerir que este epitelio puede ser recomendable como tejido injerto en el cultivo de perlas. Existen técnicas bioquímicas (manométricas, colorimétricas, etc.) para medir la actividad enzimática.

Otra enzima encontrada en el epitelio del manto de *P. mazatlanica* es la fosfatasa alcalina. Se han realizado algunos estudios sobre el papel de esta enzima en el proceso de mineralización. Maniagault (1939) estableció una correlación directa entre la actividad de la fosfatasa en el manto y la precipitación de calcio en la concha; además concluyó que la fosfatasa sirve como agente de transferencia en la movilización del calcio. Guardabassi y Piacenza (1958), citados en Timmermans (1969) proponen que la enzima está involucrada en el transporte de iones y moléculas a través de las células. Por otro lado, Kado (1960) al estudiar la fosfatasa alcalina en el manto, concluye

que ésta no está involucrada en la toma de calcio del medio, pero probablemente forma parte del sistema de enzimas relacionadas en la secreción de las proteínas de la concha. Turek (1933) (citado en Bevelander, 1952) observó cristales de fosfato en la concha de moluscos en cantidades extremadamente pequeñas, en contraste con Biederman (1914) (citado en Bevelander y Benzer, 1948), el cual afirma que el producto final de la concha calcificada es carbonato de calcio y carece completamente de fosfato. Bevelander y Benzer (1948) proponen que el fosfato de calcio se convierte en carbonato de calcio mediante la disolución del fosfato de calcio por medio de un ión orgánico. La fosfatasa transfiere el fosfato a algún sustrato, así, los iones de calcio quedan disponibles; cuando la concentración de calcio es alta, el carbonato del medio se precipita como carbonato de calcio.

Tsujii (1960) encontró actividad enzimática en el lóbulo interno y en la superficie externa del manto de *Pinctada martensii* y Timmermans (1969) encontró actividad enzimática en el epitelio externo del manto de *Lymnaea*, mientras que en el surco periostracal fué negativa. En ese estudio, se propone que la enzima está involucrada en el transporte de iones y moléculas a través del epitelio. Beedham (1958a) encontró actividad enzimática con mayor intensidad en el epitelio interno del lóbulo externo de *Anodonta*, mientras que en la superficie interna del lóbulo medio la reacción fué negativa y propone que la enzima está relacionada con la formación del periostraco. En el epitelio secretor de nácar de *Anodonta*, la reacción fué débil (Beedham, 1958a), en cambio, en *Pinctada mazatlanica* se observó un

comportamiento diferente, aunque similar al que encontraron Tsujii (1960) y Timmermans (1969). La actividad enzimática se presentó en todos los epitelios excepto en el epitelio interno del lóbulo externo, mismo epitelio que forma el periostraco. La mayor intensidad fué observada en el epitelio interno de la zona paleal y marginal, en el epitelio externo del lóbulo medio y en el epitelio externo de la superficie del manto. Estas observaciones indican que la enzima puede estar involucrada en el proceso de calcificación, principalmente de la capa nacarada. Su presencia en el epitelio interno del manto sugiere además, funciones adicionales, como lo propone Donachy et al., (1990), quien encontró actividad enzimática de fosfatasa alcalina durante la regeneración del brazo de la estrella de mar *Asterias forbesi*, sin embargo, no encontró relación con la mineralización, esto sugiere que en invertebrados, la enzima puede estar relacionada con diversos procesos.

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

CONCLUSIONES

- El manto de la madreperla *Pinctada mazatlanica* presenta la morfología típica de un bivalvo con 3 lóbulos en la zona marginal.
- En el tejido conjuntivo del manto de *P. mazatlanica* hay fibras colágenas, no se encontraron fibras reticulares ni fibras elásticas.
- *P. mazatlanica* no presenta células cafés ni células de Leydig en el tejido conjuntivo del manto, pero si presenta leucocitos granulares, leucocitos agranulares y fibroblastos.
- En el tejido subepitelial del manto de *P. mazatlanica* se observaron 4 tipos celulares: 1) células de aspecto globular, con citoplasma ligeramente basófilo y núcleo pequeño altamente basófilo (B1); 2) células pequeñas con citoplasma altamente basófilo observadas únicamente en el lóbulo medio (B2); 3) células acidófilas con gránulos notables (A1) y 4) células acidófilas grandes observadas únicamente en la zona central (A2).
- El glucógeno se observó en las células acidófilas de la zona central (A2) y es. probablemente utilizado como fuente energética para el proceso de calcificación o en el proceso reproductivo.

- Las células secretoras (**B1**) se caracterizaron por presentar carbohidratos de distintos tipos, lo que sugiere un tipo de secreción mucoso. Las células secretoras del nácar presentan mucopolisacáridos ácidos y **proteínas** ácidas, no se encontró evidencia de azúcares PAS positivos (mucopolisacáridos neutros).
- Las proteínas y el ácido ribonucleico se encontraron en las células secretoras (A1), lo que sugiere un producto de secreción seroso e indica su participación en la síntesis de las proteínas de la concha. Estas células fueron abundantes en el tejido que secreta nácar.
- El epitelio que secreta nácar presentó grupos -SH, lo que indica que estos grupos pueden estar presentes en la matriz orgánica.
- Los lípidos se observaron en los epitelios de todo el manto y en los nervios.
- El calcio se observó en algunas células secretoras del lóbulo medio, lóbulo externo y epitelio externo de la zona paleal. Probablemente estas células almacenan calcio ó secretan calcio en combinación con los mucopolisacáridos ácidos.
- El calcio también está presente en amebocitos que probablemente participen en el transporte del mismo.

- La anhidrasa carbónica está presente en el epitelio externo de la zona paleal, lo que indica su eficiencia en la formación de carbonato a partir del CO_2 metabólico.
- La fosfatasa alcalina se presenta en el epitelio externo del lóbulo medio y no así en el epitelio interno del lóbulo externo, indicando que la fosfatasa no participa en la formación del periostraco.
- El epitelio externo del lóbulo externo y el epitelio externo de la zona paleal presentan sitios enzimáticos de fosfatasa alcalina, indicando que la enzima está relacionada con el proceso de calcificación.
- La parte mineral de la concha de *P. mazatlanica* está constituida enteramente de aragonita.
- Por sus características citoquímicas (células secretoras de mucopolisacáridos ácidos que pueden participar en el transporte de calcio, células secretoras con abundante RNA y alta actividad enzimática de anhidrasa carbónica en las células epiteliales) se propone la zona paleal del manto como tejido injerto, teniendo cuidado que el epitelio externo esté en contacto con el núcleo.
- La zona paleal del manto también es recomendable para la formación de medias perlas.

RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos, es recomendable utilizar la zona paleal o central del manto como tejido injerto en el cultivo de perlas, cuidando que el epitelio externo esté en contacto directo con el núcleo.

Una vez formado el saco perlero, es importante realizar un estudio histológico y citoquímico del mismo, para compararlo con la estructura tisular del manto.

Por otro lado, se recomienda hacer un trabajo similar con la concha nácar *Pteria sterna*, ya que también es una especie productora de perlas y presenta un alto potencial para la perlicultura; esto permitirá, además, compararla con *P. mazatlanica*.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Es necesario hacer estudios químicos y bioquímicos para medir e identificar los componentes orgánicos del manto y de la concha. Cuantificar la anhidrasa carbónica del manto, por edad y estación del año.

Realizar un seguimiento del calcio en condiciones experimentales, utilizando Ca^{45} , para conocer la ruta que sigue desde su ingreso al organismo, a través de los tejidos corporales, hasta su depositación en la concha, así como las células que lo transportan.

Se necesitan estudios de ultramicroscopía para conocer los componentes de las células secretoras.

Es importante iniciar las descripciones histológicas e histoquímicas de otros órganos y tejidos para conocer la anatomía microscópica normal y patológica de la especie, con el fin de sentar las bases para la diagnosis de posibles enfermedades en futuros cultivos.

Se sugiere realizar una caracterización citoquímica de la gónada en los diferentes estadios de desarrollo, en hembras y machos, principalmente para glucógeno, lípidos y proteínas, ya que se ha observado que el manto participa en el aporte de glucógeno y lípidos para el proceso reproductivo, sin embargo, el aporte proteico no está claro.

Por último, se recomienda realizar estudios de inmunocitoquímica para la localización de anticuerpos y/o antígenos, ya que en perlicultura se trabaja con injertos, y el tejido puede ser rechazado por la ostra receptora.

Acidófilo.- Estructura que presenta afinidad por las sustancias ácidas.

Anhidrasa **carbónica.-** Enzima que **cataliza** la interconversión del CO_2 gaseoso y el H_2CO_3 .

Amebocitos.- Células con movimiento ameboide.

Aminoácido.- Compuesto orgánico que posee un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). Los aminoácidos **pu**den unirse para formar cadenas peptídicas en la molécula de proteína.

Aragonita.- Forma mineral en que se presenta el carbonato de calcio. Cristales de aspecto vítreo y color nacarado blanquecino. Se encuentra en la mayoría de las conchas de los moluscos.

Azul **alciano.-** Colorante diferencial para mucopolisacáridos ácidos si se regula el pH y se controla el tiempo de tinción.

Azul de **Toluidina.-** Colorante básico derivado de la anilina que presenta metacromasia (rojo) al teñir mucinas ácidas.

Basófilo.- Estructura que presenta afinidad por las sustancias básicas.

Biso.- Organo a manera de escobillón secretado por algunas especies de moluscos bivalvos, mediante el cual se fijan a un sustrato.

Calcificación.- Proceso mediante el cual se forman cristales de carbonato de calcio para ser depositados en la concha junto con una matriz orgánica, principalmente proteica.

Calcita.- Forma mineral en que se presenta el carbonato de calcio, encontrado en algunas conchas de moluscos. Las conchas de calcita muestran un patrón químico mas simple que las conchas de aragonita.

- Carbohidrato.-** Compuesto que contiene carbono, hidrógeno y oxígeno en proporciones de 1C:2H:10.
- Carmín.-** Colorante natural obtenido de la cochinilla *Dactylococcus*; utilizándolo en la técnica del Carmín de Best tiñe de rojo el glucógeno.
- Carnoy (mezcla).- Substancia fijadora de tejidos a base de alcohol y ácido acético.
- Células "A".- Células acidófilas con granulos marcados encontradas en el tejido subepitelial del manto de *P. mazatlanica*.
- Células "B".- Células basófilas encontradas en el tejido subepitelial del manto de *P. mazatlanica*, principalmente en el lóbulo medio.
- Cilios.-** Pequeñas prolongaciones citoplasmáticas parecidas a cerdas, en la superficie libre de las células; laten de manera coordinada para mover las células o el medio en que viven.
- Citoquímica.-** Estudio de la naturaleza química de la célula mediante microscopía.
- Citología.-** Estudio de la célula y sus partes mediante microscopía.
- Concha.-** Estructura a base de carbonato de calcio, secretada por el manto, que cubre el cuerpo de la mayoría de los moluscos.
- Conquiolina.-** Escleroproteína con uno o más azúcares reductores, secretada por el manto de los moluscos. Es un material insoluble en agua, alcohol, éter, hidróxidos alcalinos fríos y ácidos diluídos. A simple vista, es un material amorfo, viscoso y transparente que calcifica poco después de haber sido depositado. También se conoce como conquina o epicutícula.
- Enzima.-** Catalizador proteico producido en el interior de un organismo vivo que acelera reacciones químicas específicas.

Eosina.- Colorante ácido que tiñe estructuras celulares básicas (citoplasmas).

Epicutícula.- Ver Conquiolina.

Epitelio.- Tejido tenue, que cubre el cuerpo y los órganos.

Fibras **colágenas.**- Sustancia intercelular fibrosa encontrada en el tejido conjuntivo que incluye la proteína colágena.

Fibras **elásticas.**- Sustancia intercelular fibrosa encontrada en el tejido conjuntivo laxo, que contiene elastina. Pueden presentarse como filamentos largos y cilíndricos o como cintillas aplanadas.

Fibras **reticulares.**- Sustancia intercelular fibrosa ramificada, que forma una trama de apoyo o retículo en el tejido conjuntivo. Contiene reticulina.

Fluido **extrapaleal.**- Delgada capa de fluido localizada en la cavidad extrapaleal donde se regula la composición mineral y orgánica de la concha.

Fosfatasa **alcalina.**- Esterasa que cataliza la síntesis o la hidrólisis de los fosfatos orgánicos en medio alcalino (pH 8.6 a 9.4). Juega un papel importante en la calcificación de huesos y dientes.

Glándula.- Organismo animal o vegetal que segrega algún producto.

Glucolípidos.- Derivados primarios carbohidrato-glicerol, que no contienen fosfato.

Glucoproteína.- Proteína conjugada que posee uno o más residuos de azúcar.

Gónada.- Organismo productor de gametos.

Hematoxilina.- Colorante básico natural, obtenido del árbol *Haematoxylon campechianum*, tiñe estructuras celulares ácidas (núcleos).

Hemolinfa.- Fluido tisular análogo a la sangre de los vertebrados, constituido por un componente líquido con iones y proteínas disueltas y por un componente celular, principalmente amebocitos fagocíticos. Efectúa funciones de regulación **ionica**, transporte de nutrientes, deshechos y neurosecreciones, intercambio gaseoso y mecanismos inmunológicos.

Hepatopáncreas.- Glándula digestiva formada por folículos, rodeada por el tejido conjuntivo que da lugar al tejido gonádico al llegar la época de reproducción.

Hidrólisis.- Proceso por el cual una molécula es convertida en dos moléculas mas pequeñas mediante la adición de agua, lo que por lo general produce la liberación de energía; rompimiento por agua.

Histoquímica.- Estudio de la naturaleza química de los tejidos mediante microscopía.

Histología.- Estudio de los tejidos animales o vegetales mediante microscopía.

Lamelibranchios.- (Bivalvos, Pelecípodos). Moluscos comprimidos lateralmente que poseen una concha con dos valvas articuladas dorsalmente por medio de la charnela, que encierran el cuerpo por completo.

Leucocitos.- Células incoloras capacitadas para ejercer fagocitosis y dotadas de movimiento ameboide.

Lípido.- Clase heterogénea de compuestos orgánicos escasamente solubles o insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos no acuosos.

Manto.- Organo delgado y resistente que cubre la masa visceral de los moluscos; da origen a la concha.

Matriz **orgánica.-** Sustancia principalmente proteica, con algunos azúcares, que cementa los cristales de carbonato de calcio en la concha (conocida como conquiolina).

- Melanina.**- Pigmento pardo oscuro a negro común en el integumento de muchos animales y hallado a veces en otros órganos. Suele estar incluido en células especiales llamadas melanocitos.
- Metacromasia.**- Propiedad de un colorante para teñir de un color diferente al suyo.
- Mucopolisacáridos.**- Componentes tisulares ricos en carbohidratos, desde las secreciones mucoides, viscosas y transparentes hasta el cemento o sustancia amorfa entre las células y fibras del tejido conjuntivo.
- Mucus.**- Materia viscosa, glutinosa que tapiza las cavidades del cuerpo de los animales que comunican con el exterior.
- Nácar.**- Sustancia blanca, dura e iridiscente, localizada en el interior de algunas conchas de moluscos.
- Periostraco.**- Cubierta principalmente proteica, que forma la capa orgánica no mineralizada de las conchas de los moluscos.
- pH.- (Potencial de Hidrógeno) Logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno por virtud de la cual se expresa el grado de acidez o alcalinidad de un líquido.
- Proteínas.**- Macromoléculas compuestas de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y generalmente azufre y fósforo; compuestas de cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.
- Ribonucleico (ácido).- **Acido** nucleico que contiene azúcar ribosa; se encuentra en el núcleo y citoplasma de las células y tiene importancia primordial en la síntesis de proteínas.
- Rojo **Oleoso.**- Colorante ácido soluble en lípidos, los tiñe de rojo.
- Sitio **activo.**- Región de una enzima con la que un sustrato se une y reacciona para formar un complejo transitorio enzima-sustrato.

Sudan Negro.- Colorante ácido soluble en lípidos, que los tiñe de negro.

Zenker (mezcla).- Substancia fijadora a base de dicromato de potasio, cloruro de mercurio, formol y alcohol.

CENTRO DE ESTUDIOS Y MONITORIO DE
CIENCIAS QUÍMICAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO

BIBLIOGRAFIA

- Abbott, R.T. 1974. **American** Seashells The Marine Mollusca of the Atlantic and **Pacific** Coasts of North **America**. Van Nostrand Reinhold Company. Segunda Edición. Nueva York. pag. 440
- Alagarswami, K. 1970. Pearl culture in Japan and its lessons for India. Mar. Biol. **Ass.** India. 3: 975-973
- Alagarswami, K. y S.Z. Qasim. 1973. Pearl culture. Its potential implications in India. **Indian** J. Fish. 20 (2): 533-550
- Barnes, R.D. 1986. Zoología de los Invertebrados. Interamericana. Cuarta edición. México. 414-418
- Beedham, G.E. 1958a. Observations of the mantle of lamellibranchia. Quart. J. of Micros. Science. 99: 181-197
- Beedham, G.E. 1958b. Observations on the Non Calcareous Component on the Shell of the Lamellibranchia. Quarterly Journal of Microscopical Science. 99(3): 341-357
- Beedham, G.E. 1965. Repair of the Shell in Species of *Anodonta*. **Proc.** 2001. **Soc.** London.. 145: 107-125
- Beirão, P. y A.L. Sorenson. 1986. Two Types of Action Potentials in a Secretory Epithelium of a Clam Mantle. J. Exp. Biol. 121: 179-195
- Besnard, J.Y. 1987. Biochemical Investigations on the Lipid content from the Female Gonad of the Scallop (*Pecten maximus* L.). The Sixth International Pectinid Workshop **Menai** Bridge, Wales. 9-14 de abril (Abstract).
- Bevelander, G. y P. Benzer. 1948. Calcification in marine molluscs. Biol. **Bull.** 94: 176-183
- Bevelander, G. 1952. Calcification in Molluscs. III Intake and Deposition of Ca^{45} and P^{32} in relation to Shell Formation. Biol. **Bull.**, 102: 9-15
- Cariño-Olvera, M. 1987. Le Mythe Perlier dans l'Historie Coloniales de la Sudcalifornie (1530-1850). Tesis de Maestría en Historia. Universidad de Paris. VII Jussieu, 164 pp
- Cariño-Olvera, M. 1991. "Mi Padre Cultivaba la Concha Perla...". Panorama, (38): 20-27

- Cariño-Olvera, M. y C. Cáceres-Martínez. 1990. La Perlicultura en la Península de Baja California a principios de siglo. Serie Científica, UABCS. México. 1 (No. Esp. 1 **AMAC**): 1-16
- Coeroli, M. y K. Mizuno. 1985. Study of different **factors** having **an influence upon the pearl** production of the black lip pearl oyster. Proceedings of the Fifth International Coral Reef Congress, Tahiti. 5: 551-556
- Combs, R.M. 1959. Cytology of Glycogen and Lipid Storage in the Pallium of *Crassostrea virginica* (Gmelin). Journal of Morphology, 105(2): 307-382
- Dahl, L.K. 1952. A simple and sensitive histochemical method for calcium. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 20: 474-479
- Davenport, M.D. 1960. Histological and Histochemical Techniques. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 401 pp
- Deleón, I.; A. Pérez y García-Domínguez, F. 1984. Descripción morfológica y análisis citoquímico del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin). **An. Esc. Nac. Cienc. Biol. México.** 28: 183-191
- Dix, T.G. 1972a. Histology of the mantle and **pearl** sac of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Lamellibranchia). **J. Malac. Soc. Aust.** 2: 365-375
- Dix, T.G. 1972b. Histochemistry of mantle and **pearl** sac secretory cells in *Pinctada maxima* (Lamellibranchia). **Aust. J. Zool.** 20: 359-368
- Donachy, J.E.; N. Watabe and R.M. Showman. 1990. Alkaline Phosphatase and **Carbonic Anhydrase** associated with arm regeneration in the sea star *Asterias forbesi*. **Mar. Biol.**, 105: 471-476
- Emerson, W. y M.J. Jacobson. 1976. The **American** Museum of Natural History Gude of Shells. Alfred A. Knopf. U.S.A. pag. 363
- Estrada-Flores, E, L. Peralta-Zamora y P. Rivas-Manzano. 1982. Manual de Técnicas Histológicas. AGT Editor. México. 140 pp
- Fand, S.B.; H.J. Levine y H.L. Erwin. 1958. A reappraisal of the histochemical method for **Carbonic Anhydrase**. **J. Histochem. Cytochem.** 7: 27-33
- Faveris, R. 1987. Studies on the Evolution of Glycogen content of **Somatic and Germinal Tissues** during the Annual **Reproductive Cycle** in *Pecten maximus* L. (Bay of Seine). Sixth International Pectinid Workshop. **Menai** Bridge (Wales). 9-14 abril.

- Freeman, J.A. y K.M. Wilbur. 1948. Carbonic Anhydrase in molluscs. *Biol. Bull.* 94: 55-59
- Freeman, J.A. 1960. Influence of Carbonic Anhydrase inhibitors on shell growth of a fresh-water snail *Physa heterostropha*. *Biol. Bull.* 118: 412-418
- Gabbott, P. y K. Peek. 1991. Cellular Biochemistry of the Mantle Tissue of the Mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture*, 94: 165-176
- Galtsoff, P.S. 1964. The American Oyster. Cap. III y V. *Fishery Bulletin of the Fishery and Wildlife Service.* 64: 16-110
- García-Domínguez, F. 1977. Estudio Histológico e Histoquímico del tejido conjuntivo de *Crassostrea virginica* Gmelin. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México. 65 pp
- Ghiselin, M., E.T. Degens, D.W. Spencer y R.H. Parker. 1967. A Phylogenetic Survey of Molluscan Shell Matrix Proteins. *Breviora*, (262): 1-35
- Gimeno, S., M.C. Sarasquete y M.L. González. 1990. Histoquímica de Proteínas y Carbohidratos en la Gónada de *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) durante la Gametogénesis. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 6(1): 81-86
- Gray, P. 1976. Lo Esencial de la Microtoma. El Manual Moderno. México. 118 pp
- Grégoire, Ch. 1967. Sur la Structure de Matrices Organiques des Coquilles de Mollusques. *Biol. Rev.* 42: 653-687
- Hirata, A. 1953. Studies on shell formation. II. A Mantle-Shell preparation for *in vitro* studies. *Biol. Bull.* 104: 394-397
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques Cuarta ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 692 pp
- Jordey, L. 1953. Studies on Shell Formation, III. Measurement of Calcium Deposition in Shell and Calcium Turnover in Mantle Tissue using the Mantle-Shell Preparation and Ca^{45} . *Biol. Bull.* 104: 398-407
- Jordey, H. y K. Wilbur. 1955. Studies on Shell Formation. IV. The Respiratory Metabolism of the Oyster Mantle. *Biol. Bull.* 108: 346-358
- Junqueira, L.C. y J. Carneiro. 1974. Histología Básica Salvat Editores. Barcelona. 442 pp

- Kado, Y. 1960. Studies on Shell Formation in Molluscs. Hiroshima University Journal of Science. Division 1 Zoology Series B (19): 163-210
- Kawai, D.K. 1954. Carbonic Anhydrase in pearl oyster. 1. Distribution and some properties of the enzyme. Memoirs of the College of Science, University of Kyoto, Series B. 21(1): 39-44
- Kawai, D.K. 1955. Carbonic Anhydrase in pearl oyster. II. Changes of the enzyme activity in relation to growth and seasons. Publ. Seto. Mar. Biol. Lab. 5(1): 89-94
- Keen. M. 1971. Sea Shells of Tropical West **America**. Stanford University Press. Segunda Edición. Standford, Ca. 1064 PP
- Kunigelis, S.C. y A.S.M. Saleuddin. 1984. Studies on the *in vitro* formation of periostracum in *Helisoma duryi*: The Influence of the Dorsal Epithelium on Calcium Incorporation. Canadian Journal of Zoology. 62(6): 1177-1180
- Locquin, M. y M. Langeron. 1985. Manual de **Microscopía**. Labor. Barcelona. 373 pp
- Love, R. y L. Frommhagen. 1953. Histochemical Studies on the Clam *Macra solidissima*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 83: 838-844
- Lozada, E. y P. Reyes. 1981. Reproductive Biology of a Population of *Perumytilus purpuratus* at El Tabo, Chile. The Veliger, 24(2): 147-154
- Luna, L.G. (ed). 1968. Manual of Histology Staining Methods of the Armed **Forces** Inst. of Pathology Tercera ed. Mc. Graw Hill. Nueva York. 258 pp
- Lynch, M.; S. Raphael, L. Mellor, P. Spare y M. Inwood. 1972. Métodos de Laboratorio. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Segunda edición. México. 1522 pp
- Maeda-Maertínez, A. 1985. Studies on the Physiology of Shell Formation in Molluscan Larvae, with special reference to *Crepidula fornicata*. Tesis Doctoral. Universidad de Southampton. 155 pp
- Malek, F.A. y T.C. Cheng. 1974. Medical and Economic Malacology. Academic Press INC. Nueva York. 155-263 pp

- Manigault, P. 1939. Recherches sur le Calcaire chez les Mollusques Phosphatase et precipitation Calcique Histochemie du Calcium. Annales de l'Institut Océanographique, Tomo XVIII: 331-426
- Martoja, R. y M. Martoja-Pierson. 1970. Técnicas de Histología Animal. **Toray-Masson**, S.A. Barcelona. 350 pp
- McGee-Russell**, S.M. 1957. Histochemical methods for calcium. J. Histochem. cytochem. 6: 22-42
- McGee-Russell**, S.M. 1957. Tissues for Assesing Histochemical Methods for Calcium. Quarterly Journal of Microscopical Science, 98: 1-8
- Meldrum, N.U. y F.J.W. Roughton. 1933. Carbonic Anhydrase, its preparation and properties. Jour. Physiol. 80: 113-170
- Monteforte, M. 1990. Ostras Perleras y Perlicultura: Situación Actual en los Principales Países Productores y Perspectivas para México. Ser. Cient., U.A.B.C.S., México, 1 (No. Esp.1 AMAC): 13-18
- Monteforte, M. 1991. Las Perlas, Leyenda y Realidad: Un Proyecto Actual de Investigación Científica. Panorama, (38): 28-35
- Pearse, A.G.E. 1980. Histochemistry Theoretical and Applied. **Vol.I**. Churchill Livingstone. Cuarta Edición. London. 439 **PP**
- Peek, K. and P.A. Gabbott. 1990. Seasonal Cycle of Lysosomal Enzyme Activities in the Mantle Tissue and Isolated Cells from the Mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 104: 403-412
- Robertson, J.D. 1941. The function and metabolism of calcium in the invertebrata. Biol. Rev. 16: 116-121
- Sevilla, M.L. 1969. Contribución al conocimiento de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). Rev. **Soc. Mex. Hist. Nat.** 30: 223-262
- Shirai, S. 1981. Pearls. Shunposha Photo Printing Co. LTD. Japón. 168 **PP**
- Spannhof, L. 1966. Histoquímica Práctica. Acribia. Zaragoza. 195 **PP**

- Stolowski, J. 1951. Essai sur le Déterminisme des Formes Minéralogiques du Calcaire chez les Etres Vivants (Calcaires Coquilliers). Annales de **L'Institut Océanographique**, Tomo XXVI: 1-113
- Tamura, T. 1960. Especies Productoras de Perlas Pinctada **margaritifera y Pinctada martensii**. Charls E. Turtle co. INC. Japón. 3-47 pp
- Timmermans, L. 1969. Studies on shell formation in molluscs. Netherlands Journal of **Zoology**. 19 (4): 417-523
- Tsujii, T. 1960. Studies on the mechanisms of shell and pearl formation in mollusca. J. **Fac. Fish. Pref. Univ. Mie-Tsu**. 5: 1-70
- Vives, G. 1914. Compañía Criadora de Concha y Perla de la Baja California. Bol. **Secr. Fom.**, México. 6: 173 pp
- Wada, K. 1964. Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue in Molluscs. X. Histochemical Determination of the Nature of Acid Mucopolysaccharide in Organic Crystals. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 30(12): 993-998
- Wada, K. 1966a. Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue in Molluscs. XI. Comparative Biochemical Study on the Amino Acid Composition of Conchiolins from Calcitic and Aragonitic Layers. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 32(4): 295-303
- Wada, K. 1966b. Studies on the Mineralization of the Calcified Tissue in Molluscs. XII. Specific Patterns of Non-Mineralized Layer Conchiolin in Amino Acid Composition. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 32(4): 304-311
- Wada, K. 1967a. Studies on the Mineralization of Calcified Tissues in Molluscs. XV. Amino Acids in Organic Matter of Extrapallial Fluids Forming Calcite Shell. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 33(11): 1002-1006
- Wada, K. 1967b. Studies on the Mineralization of Calcified Tissues in Molluscs. XVI. Amino Acid Composition of Mucous Substance Secreted through Inner Surface of Mantle of some Marine Bivalves. Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries. 33(11): 1007-1012

- Wada, K. y T. Fujinuki. 1976. Biomineralization in Bivalve Molluscs with emphasis in the Chemical Composition of the Extrapallial Fluid. The Mechanisms of Hineralization in the Invertebrates and Plants (N. Watabe y K.M. Wilbur, eds). Univ. of South Carolina Press, Columbia. 175-190 pp
- Watabe, N. 1983. Shell Repair in The Mollusca Physiology Vol. IV (Wilbur, K.M. y A.S.M. Saleuddin ed.). Academic Press Inc. Nueva York. 289-316 pp.
- Weiner, S. y L. Hood. 1975. Soluble Protein of the Organic Matrix of Mollusk Shells: A Potential Template for Shell Formation. Science, 190: 987-988
- Weiner, S. y W. Traub. 1984. Macromolecules in Mollusc Shells and their Functions in Biomineralization. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 304: 425-434
- Wilbur, K. y L.H. Jordey. 1952. Studies on Shell Formation. I. Measurement of the Rate of Shell Formation Using Ca^{45} . Biol Bull. (Woods Hole, Mass)., 103: 269-276
- Wilbur, K.M. y L.H. Jordey. 1955. Studies on shell formation. V. The inhibition of shell formation by Carbonic Anhydrase inhibitors. Biol. Bull. 108: 359-365
- Wilbur, K. 1964. Shell formation and regeneration. Physiology of Mollusca Vol. II (Wilbur, K. y C.M. Yonge (eds)). Academic Press Inc. Nueva York. 211-237 pp
- Wilbur, K. y N. Watabe. 1967. Mechanisms of Calcium Carbonate in Coccolithophorids and Molluscs. Stud. Trop. Oceanogr.. 5: 113-154.
- Wilbur, K. y A.S.M. Saleuddin. 1983. Shell Formation en: The Mollusca Physiology Vol. IV (A.S.A. Saleuddin y K.M. Wilbur, ed.) Academic Press Inc. Nueva York. 235-287 pp.
- Williams, H., F. Turner y Ch. Gilbert. 1979. Petrografía. Introducción al Estudio de las Rocas en Secciones Delgadas. Compañía Editorial Continental, S.A. México. 354-358 pp

ENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
 CIENCIAS MARINAS
 BIBLIOTECA
 I.P.N.
 DONATIVO