



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
INSTITUTO OCEANOGRÁFICO DE VENEZUELA
COORDINACIÓN DE POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS



**INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL
SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LA OSTRA PERLA *Pinctada
imbricata* (Röding, 1758)**

M. Sc. Yelipza del Carmen Longart Rojas

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS MARINAS

Cumaná, Junio de 2024



TG-02-2024

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
NÚCLEO DE SUCRE
POSTGRADO EN CIENCIAS MARINAS

ACTA DE DEFENSA DE TRABAJO DE GRADO

Nosotros, *Dr. Dwight Arrieche, Dra. Mayré Jiménez, Dra. Berenice Licet, Dra. Sinatra Salazar y Dr. Luis Freites*, integrantes del jurado designado por la Comisión Coordinadora del Programa de Postgrado en Ciencias Marinas, para examinar el Trabajo de Grado intitulado: "INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LA OSTRA PERLA *Plinctada Imbricata* (Röding, 1758)", presentado por la M. Sc. *Yelipza Del Carmen Longart Rojas, C.I.: 9.458.959*, a los fines de cumplir con el requisito legal para optar al grado de *Doctor* en Ciencias Marinas.

Hacemos constar que hemos examinado el mismo e interrogado a la postulante en sesión pública celebrada hoy, a las 9:00 a.m., en el Segundo piso del Edificio del Complejo Cultural Luis Manuel Peñalver, Sector Vela de Coro, Cumaná, estado Sucre.

Finalizada la defensa del trabajo de grado por parte de la postulante, el jurado decidió **APROBARIO** por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor, que el mismo, se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado de la institución.

En fe de lo anterior, se levanta la presente acta, que firmamos conjuntamente con la Coordinadora del Postgrado en Ciencias Marinas en la ciudad de Cumaná, a los veintiocho días del mes de junio de dos mil veinticuatro.

Jurado Examinador:

Dr. Dwight Arrieche

(Tutor)

[Signature]
C.I.: 5.225.867

Dra. Mayré M. Jiménez

[Signature]
C.I.: 5.076.104

Dra. Berenice Licet

[Signature]
C.I.: 10.460.792

Dra. Sinatra Salazar

[Signature]
C.I.: 10.047.204

Dr. Luis F. Freites

[Signature]
C.I.: 4.181.869

Coordinadora Programa de Postgrado:

Dra. Ivis Marina Fermín

C.I.: 10.291.815

Firma y Sello



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS Y ECOFISIOLÓGICOS DE LA OSTRA PERLA <i>Pinctada imbricata</i> (RODING 1758) ANTE EL CAMBIO CLIMÁTICO	5
Aspectos Biológicos	5
Taxonomía	8
nombres Comunes	9
Ciclo de Vida	9
Habitat y Principales Factores Ambientales que Afectan a <i>Pinctada imbricata</i>	11
Reproducción	14
ASPECTOS MORFOMÉTRICOS	15
ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS, BIOMARCADORES Y CAMBIO CLIMÁTICO	19
Cambio Climático	27
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
General	34
Específicos	34
CAPÍTULO II	35
EVALUACIÓN DE ALGUNOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E ÍNDICES MOLECULARES DE LA OSTRA PERLA <i>Pinctada imbricata</i> (Röding, 1758)	35

RESUMEN	35
INTRODUCCIÓN	36
METODOLOGÍA	38
Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)	39
Superóxido dismutasa (SOD, EC 1. 15. 1.1)	40
Glutación S-Transferasa (GST, EC 1.11.1.9)	40
Peroxidación de Lípidos	40
Tioles Totales	41
Índices Moleculares de Condición	41
Proteínas Totales	42
Análisis Estadísticos	42
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	58
CAPÍTULO III	67
GAMETOGÉNESIS Y ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DE LAS GÓNADAS Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE LA OSTRA PERLA <i>Pinctada imbricata</i> (Röding, 1758)	67
RESUMEN	67
INTRODUCCIÓN	68
METODOLOGÍA	75
Área de Estudio	75
Recolección y Procesamiento de Muestras Biológicas	75
Técnicas Histológicas para Microscopía de Luz Visible	76
Técnicas Histoquímicas	76
Índices Moleculares	77
Cuantificación de ARN	77
Cuantificación de ADN	77
Análisis Digital de Imágenes	78
Índices de Glúcidos y Lípidos	78
Análisis Estadístico	78

RESULTADOS	80
Descripción Histológica	80
Gónada	80
Gametogénesis Activa	82
Madurez Gonadal	83
Atresia Gonadal	85
Machos	85
Glándula Digestiva	86
Índices Histoquímicos y Metabólicos de Crecimiento	87
DISCUSIÓN	89
CAPÍTULO IV	94
DISCUSIÓN GENERAL	94
CONCLUSIONES	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

DEDICATORIA

A mis perlas: Noelieth, Oriana y Noryeling

Cubiertas con el nácar del amor

AGRADECIMIENTO

A Dios, la Virgen y los ángeles, por estar siempre a mi lado para seguir adelante con este trabajo.

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, por la subvención al proyecto “ESTUDIO BIOENERGÉTICO DE POBLACIONES DE LA OSTRA PERLA *Pinctada imbricata* (RÖDING 1798) EN LA COSTA NORTE DEL ESTADO SUCRE, VENEZUELA”, identificado con el código N° CI-02-030603-1968-17.

A mis hijas Noelieth, Oriana y Noryeling, su apoyo, su amor, su comprensión fueron la clave para mantenerme firme hasta el final.

A mi familia, por su apoyo y motivación para alcanzar esta meta.

Al Dr. Dwight Arrieche, por su apoyo, análisis crítico y asesoramiento de este trabajo de investigación.

A la Dra. Sinatra Salazar, por su apoyo incondicional, su valiosa amistad, y sugerencias en la redacción del manuscrito.

Al Dr. Edgar Zapata y Dra. Vanessa Acosta por iniciarme en esta aventura, por su colaboración y brindarme su apoyo en los análisis bioquímicos.

A la Dra. Sonia Subero, por su gran amistad, palabras de ánimo y realización de las pruebas estadísticas.

Al Dr. Miguel Guevara por su aporte, al facilitarme su laboratorio para realizar algunos análisis.

Al Dr. Baumar Marín (†), por su apoyo y por facilitarme la base de datos de registro de temperatura.

A la Dra. Ivis Fermín, por su inmensa amistad, sus palabras de fortaleza y

gran apoyo.

A la Dra. Mayré Jiménez, por sus sugerencias y por siempre animarme a seguir con esta investigación.

A la Lcda. Noryeling Lanza, por sus palabras de ánimo, por su compañía durante largas horas en el laboratorio, colaboración en las salidas de campo y procesamiento de las muestras.

Al Dr. Luis Freites, por su apoyo, lectura y sugerencias para el trabajo.

Al Lcdo. Ericxander Jiménez, por su inigualable trabajo en la colección de las muestras.

A la Lcda. Noelieth Lanza, por su colaboración en arreglos de formato, adaptación del documento, formateo, programación de imágenes.

A Stefania Escalona, Antonio Gómez y Asdrúbal Calvo por su colaboración en el procesamiento histológico de las muestras.

Al laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias y al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente, por facilitar los equipos para el procesamiento de muestras de bioquímica, histología y microscopía.

A todas aquellas personas que de una forma u otra me brindaron su apoyo y estuvieron siempre allí, de manera personal y/o profesional, para poder culminar esta investigación.

... MIL GRACIAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis morfométrico de los índices de cobertura y moleculares en los estadios de maduración sexual de *Pinctada imbricata* en ambos sexos. 88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de la ostra perla, <i>Pinctada imbricata</i> – (a) ovocito; (b) óvulo fertilizado (10-15 min); (c) primera división; (d) segunda división; (e) tercera división; (f) mórula; (g) blástula; (h) gástrula; (i) larva trocófora (18-24 h); (j) larva “D” inicial (26 h); (k) larva “D” tardía (48 h); (l) larva umbonada (día 6-7); (m) larva umbonada tardía (con presencia de mancha ocular, 20-25 días); (n) pediveliger (pie y doble anillo, 25-28 días); (ñ) postlarva (28-30 días); (o) y (p) juveniles (días 40 y 60 días); y (q) organismos adultos (Créditos: LODEIROS & LOVATELLI, 2019).....	11
Figura 2. Medidas morfométricas de <i>Pinctada imbricata</i> , colectada en la localidad de Merito, Sucre, Venezuela.....	17
Figura 3. Anatomía interna de la ostra perla <i>Pinctada imbricata</i> colectada en la localidad de Merito, Sucre, Venezuela.....	18
Figura 4. Valvas de la concha de la ostra perla <i>Pinctada imbricata</i> , por su cara externa e interna (Créditos: LODEIROS & LOVATELLI 2019).....	18
Figura 5. Acidificación oceánica. La quema de combustibles fósiles provoca un aumento del CO ₂ en la atmósfera que es captado por el océano y hace que se vuelva más ácido (Créditos: University of Maryland).....	22
Figura 6. Efecto de la acidez del océano sobre la tasa de calcificación de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>Mytilus edulis</i> (Créditos:GAZEAU <i>et al.</i> 2007).....	30
Figura 7. Ubicación geográfica del área de estudio. Merito municipio Cruz Salmerón Acosta. Estado Sucre. Venezuela.	38
Figura 8. Actividad mensual de la enzima catalasa (CAT), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla <i>P. imbricata</i> , en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	45
Figura 9. Actividad mensual de la enzima superóxido dismutasa (SOD), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla <i>P. imbricata</i> , en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	45
Figura 10. Actividad mensual de la enzima glutatona transferasa (GST), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla <i>P. imbricata</i> , en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	46
Figura 11. Variación mensual de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS (U TBARS/ mgP), en la glándula digestiva y músculo de <i>P. imbricata</i> , en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. TBARS expresada en nmoles/mg de tejido húmedo. Los	

índices indican grupos comunes de cada tejido.....	47
Figura 12. Niveles de tioles totales en muestras de glándula digestiva y músculo de <i>P. imbricata</i> , durante los meses de muestreo, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Datos expresados en mmoles de -SH/g de tejido húmedo. (abr-dic 2017; ene-2018). Los índices indican grupos comunes de cada tejido.	48
Figura 13. Variación mensual del ADN en <i>Pinctada imbricata</i> , en la localidad de Merito municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.	49
Figura 14. Variación mensual del ARN en <i>Pinctada imbricata</i> , en la localidad de Merito municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.	49
Figura 15. Variación mensual del índice ARN/ADN observado en la glándula digestiva y músculo de <i>P. imbricata</i> , en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.....	50
Figura 16. Variación mensual del contenido de proteínas (mgPT/gmh) en la glándula digestiva y músculo de <i>P. imbricata</i> , en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	51
Figura 17. Coeficiente PT:ADN en la glándula digestiva y músculo de <i>P. imbricata</i> , en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	52
Figura 18. Análisis de componentes principales entre los biomarcadores de <i>P. imbricata</i> y la temperatura de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.....	53
Figura 19. Análisis de componentes principales entre los coeficientes de condición fisiológica de <i>P. imbricata</i> (ARN:ADN y PT:ADN), los parámetros biométricos y las variables ambientales (temperatura del agua y clorofila), de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.	54
Figura 20. Proyección ortogonal de la temperatura del agua con las variables biológicas en el espacio definido por los dos primeros componentes del ACP para las actividades enzimáticas en poblaciones naturales de <i>P. imbricata</i> observada durante el periodo de surgencia (A) y en relajación (B), desde abril 2017 hasta enero 2018. En la Localidad de Merito, Municipio Cruz salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. CAT: Catalasa, SOD: súper óxido dismutasa, GST: Glutación S- Transferasa, -SH: tioles totales, TBARS, ARN, ADN, Proteínas, Temperatura del agua.....	55

- Figura 21.** Análisis de componentes principales entre los coeficientes de condición fisiológica de *P. imbricata* (ARN:ADN y PT:ADN) con los parámetros biométricos, de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. A: surgencia, B: Relajación..... 57
- Figura 22.** Tejido conectivo y gónada masculina (Gon) en estadio de gametogénesis. El tejido conectivo periférico está cargado de células de reserva con abundantes gránulos de secreción de aspecto refringente de naturaleza lipídica (círculo), y gránulos discretos glicoproteicos (flecha). La gónada presenta una capa prominente de células germinales periféricas (*), y espermatozoides (es). 81
- Figura 23.** Gónada femenina en gametogénesis activa. A.- Adenómero (A) en sección longitudinal, con abundantes células secretoras periféricas de perfil fusiforme con una vacuola distal. B.- Adenómeros y acinos gonadales con ovogonias (doble flecha) pegada a la membrana del acino, ovocito pedunculado (flecha gruesa) de citoplasma denso y ovocito maduro de aspecto oval y citoplasma denso. Gonoducto (Gd). 83
- Figura 24.** Gónada femenina en estadio de regresión gonadal. A.- Glándula digestiva de hembra en estadio de regresión gonadal. Adenómeros (A) en contacto con el tejido gonadal. Destaca la presencia de macrófagos (punta de flecha) y la pérdida de la integridad del tejido (*). B.- La membrana del acino gonadal presenta sitios de ruptura, con ovocitos de citoplasma disperso (Ovd), restos celulares (doble flecha) y macrófagos (punta de flecha). Debris celular (flecha). Gonoducto (Gd). Ovocito (Ov)..... 84
- Figura 25.** Acino de gónada masculina en el estadio de gametogénesis. A. Se observa predominio de espermátidas (flecha) de núcleo grande dispuestos en una franja periférica, seguida de las espermátidas (Ep), con los espermatozoides (E) menos abundantes y dispersos característicos del estadio de maduración. B. Gónada masculina con abundantes espermatozoides (flecha), espermatozoides (doble flecha), espermátidas (Ep). y espermatozoides (E) ordenados en hileras..... 85

Longart R. Yelipza del C. 2024. Influencia De Factores Ambientales Sobre El Sistema Antioxidante De La Ostra Perla *Pinctada imbricata* (Röding, 1758). Trabajo especial de grado. Universidad de oriente, Núcleo de Sucre. XI+168 p.

RESUMEN

Pinctada imbricata (Roding, 1758) es un bivalvo que forma densos bancos en el Mar Caribe, donde es explotada por las perlas y el nácar. Además, en el nororiente de Venezuela es apreciada por su carne. Al habitar la zona costera está sometida a cambios ambientales, que pueden afectar la condición fisiológica, siendo el propósito de ésta investigación evaluar, en una población del Golfo de Cariaco, la condición fisiológica por medio de biomarcadores de estrés oxidativo e índices moleculares en la glándula digestiva y músculo abductor. Los ejemplares se colectaron entre abril 2017 a enero 2018, en Merito, Municipio Cruz Salmerón Acosta. Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatona S- transferasa (GST), el marcador de daño oxidativo (TBARS), grupos tioles totales (-SH), la relación ARN/ADN y Proteína/ADN. Se cuantificaron las reservas de lípidos y carbohidratos de la glándula digestiva y gónada por métodos histoquímicos entre los estadios de madurez sexual usando microscopía de luz de alta resolución y tinción con azul de toluidina, y análisis de imágenes. Las enzimas (CAT, GST y SOD) mostraron valores dentro del rango normal, sin diferencias estadísticamente significativas entre los meses. Los índices ARN/ADN y Proteína/ADN, estuvieron entre los rangos normales de crecimiento para especies de moluscos. El ARN/ADN presentó valores máximos asociado con en el estadio de madurez (III) seguido de una caída en el desove (IV). La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste del metabolismo aerobio energético e integración funcional de los tejidos. Los promedios de los índices moleculares evidencian un estado fisiológico óptimo para los organismos. Se identificaron hembras en los estadios de gametogénesis activa (II), madurez (III) y desove (IV), y machos en gametogénesis activa (II); en ambos sexos los acinos están entremezclados con el tejido conjuntivo, presentando escasos gametos en diferentes estadios de desarrollo; en los machos las espermatogonias y espermatocitos secundarios se identificaron en acinos dilatados; en hembras se observaron ovogonias, ovocitos pedunculados, ovocitos y ovocitos atrésicos.

Palabras claves: *Pinctada imbricata*, Enzimas antioxidantes, histoquímica, ciclo reproductivo

INTRODUCCIÓN GENERAL

La clase Mollusca está conformada por invertebrados que estuvieron su origen durante el período Cámbrico, con la aparición de estructuras de caparazones duros, a partir del cual evolucionaron hasta alcanzar la mayor diversidad de especies del medio marino y dulceacuícola, siendo los gasterópodos los únicos que conquistaron el medio terrestre. Son organismos que se encuentran desde los desiertos hasta las zonas polares, en los trópicos tienen una gran variedad de especies y hay especies que habitan las cuencas hidrotermales abisales. Desde el Ordovícico medio inferior, hace unos 470 millones de años, los bivalvos Pterioideos han habitado en una notable diversidad de ambientes de epifauna y semiinfauna marina en todo el mundo, típicamente confinados a hábitats crípticos, formando uniones bisales a varios sustratos (CAMACHO 2008).

Los moluscos comprenden unos de los grupos de animales marinos más abundantes, y mejor estudiados a nivel mundial, con una gran diversidad de especies y con una variedad de medidas, formas y ciclos vitales que les permite ocupar varios ambientes. Se encuentran tanto en desiertos y zonas polares, así como en trópicos y grandes profundidades oceánicas. Sin embargo, es en las lagunas litorales tropicales donde alcanzan su máxima diversidad y función (BAQUEIRO-CÁRDENAS *et al.* 2007).

Son apreciados desde los inicios de la civilización como fuente de alimento, intercambio comercial, ornamentos culturales, fuente de materia prima y en la actualidad se mantiene un mercado a nivel internacional con las perlas, mabés y el nácar (BAQUEIRO-CÁRDENAS *et al.* 2007; SOUTHGATE 2008; CARIÑO & MONTEFORTE 2018; HERNÁNDEZ *et al.* 2018). En este grupo, los bivalvos tienen un papel relevante en la ecología de los ecosistemas

costeros, ya que con su actividad filtradora ayudan a mejorar la calidad del agua, a la vez que sirven de alimento para numerosos organismos; además de la importancia económica que representan para el ser humano tanto en el campo de la acuicultura, alimentación y ornamentación ya que algunos de ellos son formadores de perlas (CRUZ *et al.* 2000; CÁCERES-PUIG 2007; MAEDA-MARTÍNEZ 2011).

La taxonomía de las ostras perlíferas se establece principalmente en función de las características de sus tejidos blandos y de su concha, incluida la forma y el color. Sin embargo, la taxonomía de estos organismos es compleja porque sus conchas son bastante similares y no hay muchos caracteres morfológicos disponibles para la identificación de las especies. En los últimos años, la aplicación de datos de secuencias moleculares ha proporcionado información valiosa sobre la clasificación taxonómica de numerosas especies de bivalvos (SHAN *et al.* 2023). La superfamilia Pterioidea abarca cuatro familias definidas tradicionalmente por la forma de la concha y la estructura de los ligamentos: Isognomonidae (Woodring, 1925); Malleidae (Lamarck, 1819); Pulvinitidae (Stephenson, 1941) y Pteridae (Gray, 1847) (BOSS 1982; TEMKIN 2006).

La familia Pteridae se caracteriza por tener organismos de tamaño mediano, tropicales y subtropicales que se distinguen por una concha oblicuamente ovada, tales como *Pteria hirundo* (Mediterráneo), *Pteria colymbus* (Caribe), *Pinctada martensi* (Japón) *Pinctada mazatlanica* (Golfo de California), *Pinctada margaritifera* y *Pinctada imbricata* (Indo-Pacífico) (ALBUQUERQUE *et al.* 2012). La ostra alada, *Pteria penguin*, es la más grande del género *Pteria*, con una longitud total (Lt) de la concha de 200 mm (HUAYANG *et al.* 2017). En cuanto al género *Pinctada*, la especie *P. maxima* es la más grande con 305 mm Lt y *P. mazatlanica* (220 mm Lt). Las otras

especies de Pteriidae son relativamente más pequeñas (CUNHA *et al.* 2011). Este género es considerado un grupo modelo adecuado para estudiar los patrones de diversificación y evaluar el modo predominante de especiación (GERVIS & SIMS 1992).

En una historia más reciente, las ostras perleras desde los albores de la humanidad, se han convertido en la principal fuente de perlas y nácar (TĚMKIN 2010), ya que la producción de perlas es una diversificación de la acuicultura que soporta actualmente un conjunto de empresas a nivel mundial en expansión y crecimiento (KISHORE & SOUTHGATE 2015; KISHORE *et al.* 2018). La extracción de perlas de bancos naturales ha sido la principal causa de la desaparición de las poblaciones y del recurso, y a través de la acuicultura se han recuperado los bancos y expandido hasta convertirse en una industria global en crecimiento, con un valor aproximado de más de medio billón de dólares estadounidenses por año (SOUTHGATE & LUCAS 2008) con 280 millones para 2023 (Exactitude Consultancy 2023).

El avance en el conocimiento del organismo, se ha incrementado a través del desarrollo de investigaciones en aspectos como el bioquímico, lo que a su vez ha permitido el empleo de protocolos metodológicos con fines a evaluar y monitorear las distintas respuestas metabólicas y sus variaciones que resultan importantes, ante condiciones de estrés de estos organismos productores de perlas.

En este sentido, se puede afirmar que los organismos en sus ambientes naturales a menudo están sujetos a condiciones de estrés ambiental continuo, cuya interacción sinérgica con estresores antropogénicos (p. ej., químicos, etc.) puede amplificar sus efectos (HOLMSTRUP *et al.* 2010).

Aunque se han realizado muchos estudios sobre *P. imbricata*, resulta

de gran interés seguir documentando y desarrollando otros aspectos no estudiados dada su gran importancia económica. Con el fin de contribuir con el enriquecimiento bibliográfico de la biología de la ostra perla, esta información pretende ser un aporte para la base de trabajos prácticos en el área.

Siendo el propósito de este trabajo, evaluar en un modelo abierto las oscilaciones de los sustratos bioquímicos energéticos, enzimas anti oxidantes, índices moleculares, e histoquímica en el tejido gonadal de una población natural de la ostra perla, las cuales pudieran causar un efecto estresante o ser sinérgico con los procesos metabólicos, crecimiento y del ciclo gametogénico, modulado por los factores ambientales y sus oscilaciones estacionales. En este contexto, el estado fisiológico de *P. imbricata* en el ambiente natural y su relación de los parámetros ambientales, permitirá generar información sobre los posibles efectos del cambio climático, y establecer protocolos de vigilancia ante la presencia de estresores ambientales.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS Y ECOFISIOLÓGICOS DE LA OSTRA PERLA *Pinctada imbricata* (RODING 1758) ANTE EL CAMBIO CLIMÁTICO

Aspectos Biológicos

Para comprender lo que sucede en la estructura de un organismo y su relación con su medio ambiente se necesita conocer sobre su biología. Dentro del Phylum Mollusca, la clase Bivalvia presenta en general un patrón morfológico del cuerpo comprimidos lateralmente y las partes blandas del cuerpo están completa o parcialmente recubiertas por la concha, que está formada por dos valvas secretadas por el manto, que lo cubre completo. Estas son unidas por una charnela, mientras que sus branquias o ctenidios están bien desarrollados y especializados puesto que son usados tanto para la alimentación como para la respiración (HELM *et al.* 2006).

La familia Pteriidae posee alrededor de más de 24 especies registradas en todo el mundo (RANGEL-DÁVALOS & CHÁVEZ-VILLALBA 1994). La concha se encuentra recubierta en su cara interna por nácar iridiscente y tienen la capacidad de producir perlas en forma natural. Las ostras perleras son especies que han sido aprovechadas integralmente en todo el mundo desde el período neolítico (MONTEFORTE 1996).

La ostra perla *Pinctada imbricata* (Roding, 1758), presenta un tamaño que oscila entre 38 y 98 mm Lt (SABELLI 1982), es abundante en la costa de América del Sur, forma densos bancos en el Mar Caribe, tanto en Colombia

como en Venezuela. Se distribuye en el Océano Atlántico desde Carolina del Norte (EUA) hasta Brasil, desarrollándose en aguas poco profundas, generalmente localizadas en zonas de rocas, corales, raíces de mangle y asociada a praderas de *Thalassia sp.* (LODEIROS *et al.* 1999). Dada su distribución cosmopolita, extendida en la franja tropical y subtropical (URBAN 2000), es considerada una de las especies más importantes del Atlántico y del mar Caribe (O'CONNOR & LAWLER 2004). Esta especie junto a *Pinctada margaritifera mazatlanica*, que se distribuye desde el Pacífico entre el golfo de California, América Central hasta Perú, es la especie de mayor tamaño de las de ostras perlíferas en América.

La ostra perlera *P. imbricata radiata* (Leach, 1814) es una especie bentónica que habita en bancos de arena y rocas de coral, es originaria de la región del Indo-Pacífico y ha sido registrada en el mediterráneo como especie no endémica desde el siglo XIX, poco después de la apertura del canal de Suez (ZENETOS *et al.* 2005). A partir de allí se ha extendido y permanecido en el mediterráneo oriental con una presencia significativa en Sicilia, Malta, islas Jónicas y Adriáticas (THEODOROU *et al.* 2019).

SOUTHGATE (2008) definió a las “ostras perleras de Akoya” como un complejo de especies que engloba a *P. imbricata* de América, *P. fucata* y *P. martensii* de las costas japonesa y pacífica. TEMKIN (2010) amplió ese concepto al asignar *P. radiata* de Europa en un complejo de especies denominado grupo *P. fucata / martensii / radiata / imbricata*. Estudios recientes han reportado a las especies *P. imbricata radiata* (Leach, 1814) y *P. fucata* (Gould 1850) en la base mediterránea (SCUDERI *et al.* 2019; MURCIA-REQUENA *et al.* 2022). *P. fucata*, se distribuye naturalmente en la costa occidental del Océano Pacífico, como China, Japón, Australia y Filipinas, siendo la principal especie cultivada para obtener perlas marinas en China y

Japón (WANG *et al.* 2011). La industria de la ostra perla se ha convertido una de las industrias de maricultura más importantes en varias provincias del sur de China (HE *et al.* 2021).

En Venezuela en la zona nororiental, los bancos de *P. imbricata* fueron sobre-explotados desde la época de la colonia con el objetivo de extraer sus perlas, principalmente en las islas de Cubagua y Margarita (MACKENZIE *et al.* 2003; MARCANO *et al.* 2005; LODEIROS & FREITES 2008; MÁRQUEZ *et al.* 2011). Es a partir de la década de 1970, cuando se afianza la explotación de *P. imbricata* con fines de consumo, ya que presenta dualidad de producción: consumo directo y producción de perlas, representando un valioso recurso de gran interés económico en la región nororiental de Venezuela, especialmente en el estado Nueva Esparta, donde en años anteriores los bancos naturales producían un promedio de 380 toneladas de carne (GÓMEZ 1999; MARCANO 2001). Sin embargo, LEÓN (2009), alertó de síntomas de agotamiento, los cuales se estarían prolongando en el tiempo.

Hoy en día la ostra perla en el Caribe ha perdido protagonismo como productora de perlas naturales, y desde la década de 1960 su interés divergió en su uso como alimento, aunque hoy se mantiene el interés por actividades de cultivo dirigidas a la producción de perlas; este interés dual, conjuntamente con su importancia socioeconómica, y ecológica, le confiere una significación sin igual (LODEIROS & LOVATELLI 2019). En este sentido, se ha estudiado la factibilidad de su cultivo, tanto en condiciones naturales como experimentales, con el propósito de recuperar los bancos, haciendo repoblamiento con semilla obtenida en el laboratorio y colectores en el medio ambiente (LODEIROS *et al.* 2011), con expectativas para restaurar la población de ostras perlíferas en el Golfo de Cariaco, estado Sucre, sembradas en elementos verticales, los cuales proporcionan una mayor producción por área

disminuyendo notablemente los costos (FREITES *et al.* 2012).

En Venezuela se ha estudiado la biología de *P. imbricata* (VÁSQUEZ *et al.* 2015), el crecimiento y la supervivencia (PICO 2000; URBAN 2000; LODEIROS *et al.* 2002; MARCANO *et al.* 2005; NUÑEZ *et al.* 2006; TRUJILLO *et al.* 2007; SEMIDEY *et al.* 2010; MÁRQUEZ *et al.* 2011; PÉREZ *et al.* 2016), el ciclo reproductivo (RUFFINI 1984; LEÓN *et al.* 1987; VERGINELLI & PRIETO 1991; JIMÉNEZ *et al.* 2000; ROMERO- FERREIRA *et al.* 2017), índice de engorde (LEÓN & MILLÁN 1996), ecotoxicología (LODEIROS 1999; NUSSETTI *et al.* 2004), sistemas de cultivo (LODEIROS & FREITES 2008; LOVATELLI & SARKIS 2011; LODEIROS *et al.* 2011), el análisis histoquímico de las macromoléculas energéticas durante el ciclo gametogénico (ROMERO- FERREIRA *et al.* 2016), proporcionando datos valiosos del ciclo vital que es necesario para establecer los mejores períodos de cosecha o extracción, optimizando su potencial económico, y de conservación del recurso por medio de vedas o regulaciones de su extracción.

Taxonomía

La taxonomía de las especies de ostras perleras es compleja porque las conchas son bastante similares, y no hay muchos caracteres morfológicos diagnosticables disponibles para la determinación de especies (Tëmkin 2010). La clasificación se basa principalmente en los tejidos blandos y los caracteres de la concha como el color y la forma (GARCÍA & WINKLER 2012).

Pinctada imbricata, conocida como ostra perla fue descrita por primera vez por el investigador PETER FRIEDRICH RÖDING (1767- 1846). La clasificación se describe a continuación según la sistemática clásica propuesta por THIELE (1929-1935) y siguiendo el esquema usual de ABBOTT (1974), WARMKE & ABBOTT (1961), DIAZ Y PUYANA (1994) y LODEIROS *et al.*

(1999).

Phylum: Mollusca

Clase: Bivalvia Linne, 1758

Subclase: Pteriomorphia Beurlen, 1944

Orden: Pterioida Newell, 1965

Suborden: Pteriina Newell, 1965

Superfamilia: Pterioidea Gray, 1847

Familia: Pteriidae Gray, 1847

Género: *Pinctada* Röding, 1798

Especie: *Pinctada imbricata* Röding, 1798

Nombres Comunes

Pinctada imbricata es conocida con diferentes nombres comunes o vulgares principalmente asociados a la producción de perlas como ostra perla, concha de perla, tripa de perla, madre perla, entre otros.

Ciclo de Vida

Los primeros estadios larvales de los bivalvos son de vida planctónica y luego aparecen estructuras especializadas que inducen a la búsqueda de un sustrato adecuado de asentamiento; en este proceso se presentan alteraciones morfológicas y fisiológicas en el cual ocurren alta mortalidad e intervienen factores físicos y biológicos interrelacionados que definen los ciclos dentro de las poblaciones (CASTELLANO & CAMPOS 2007).

Los miembros de la clase Bivalvia son en su mayoría gonocóricos,

algunos son hermafroditas protándricos. Los embriones se convierten en larvas trocófora que nada libremente, seguidas por la larva veliger, que se asemeja a un adulto en miniatura (KATSANEVAKIS *et al.* 2008). Sus ciclos de vida han sido descritos como “conservativos” cuando la producción de gametos ocurre durante otoño/invierno usando la energía almacenada durante verano, y “oportunistas” cuando ocurre en primavera/verano cuando el alimento está disponible (BAYNE *et al.* 1982). En la región nororiental, se destacan dos períodos de productividad primaria que son clave para el desarrollo de los organismos y las estrategias reproductivas, los cuales son perfectamente aprovechados por *P. imbricata*. Durante la surgencia incrementa la proliferación de microalgas favoreciendo el desarrollo gametogénico y la reproducción, mientras que durante el período de no surgencia la temperatura del agua es alta, la productividad primaria es baja, el desarrollo de los tejidos gonadales está paralizado, presentando vestigios de la gónada o desaparece completamente que corresponde a un estado sin actividad reproductiva, y de acumulación de reservas para ser usadas al haber las condiciones adecuadas en el medio ambiente, que muchas veces son aprovechadas para la producción de gametos y liberación por surgencias cortas, presentando varios desoves al año, con un desove principal durante la surgencia y desoves parciales (Figura 1).

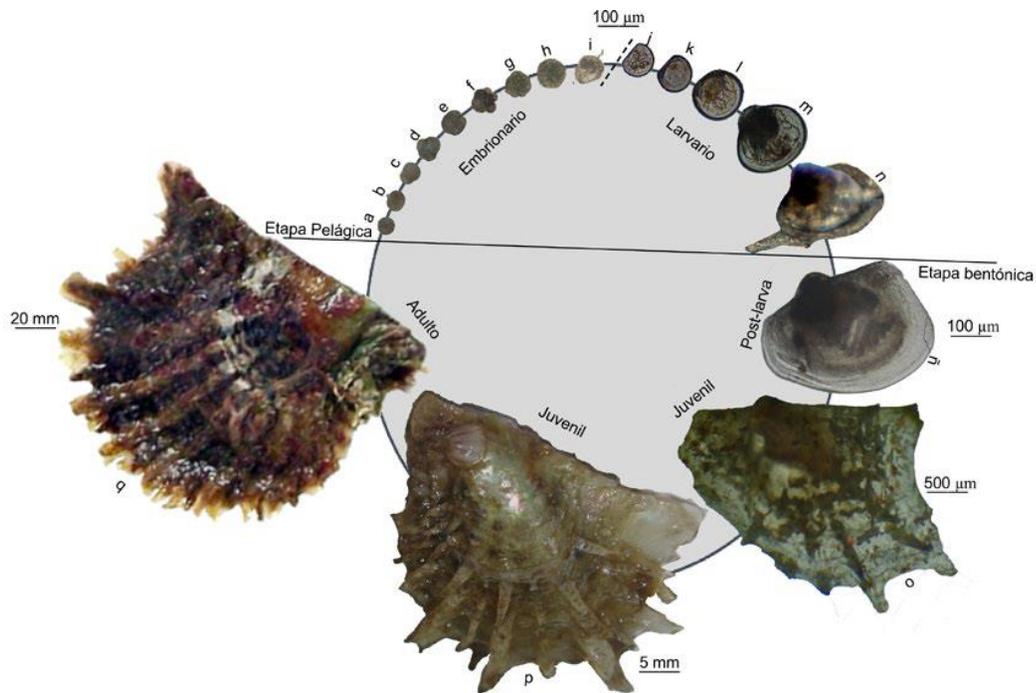


Figura 1. Ciclo de vida de la ostra perla, *Pinctada imbricata* – (a) ovocito; (b) óvulo fertilizado (10-15 min); (c) primera división; (d) segunda división; (e) tercera división; (f) mórula; (g) blástula; (h) gástrula; (i) larva trocófora (18-24 h); (j) larva “D” inicial (26 h); (k) larva “D” tardía (48 h); (l) larva umbonada (día 6-7); (m) larva umbonada tardía (con presencia de mancha ocular, 20-25 días); (n) pediveliger (pie y doble anillo, 25-28 días); (ñ) postlarva (28-30 días); (o) y (p) juveniles (días 40 y 60 días); y (q) organismos adultos (Créditos: LODEIROS & LOVATELLI, 2019).

Hábitat y Principales Factores Ambientales que Afectan a *Pinctada imbricata*

Comúnmente es encontrada en sustratos duros naturales o artificiales de aguas someras, en general en zonas de rocas, corales y conchas formando densas poblaciones. Ocasionalmente se puede encontrar en praderas de *Thalassia testudinum* sobre sedimentos arenoso fangosos, normalmente en hábitat marinos con condiciones hidrodinámicas

relativamente agitadas (LODEIROS *et al.* 1999; KATSANEVAKIS *et al.* 2008). Aunque las poblaciones de *P. imbricata* se ubican normalmente entre los 2 y 10 m, es una especie común que pueden encontrarse hasta 30 m de profundidad (LODEIROS & LOVATELLI 2019), con aguas relativamente claras (URBAN 2000; MARCANO *et al.* 2005).

Las respuestas de los organismos en el medio ambiente son complejas, por lo que deben analizarse principalmente los factores que sean o puedan hacerse limitantes para su crecimiento. Entre los factores (exógenos) que pueden afectar el crecimiento de los bivalvos se encuentran la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, seston y disponibilidad de alimento, entre los cuales se consiguen interacciones positivas o negativas que afectan a la población. Con alta temperatura la productividad primaria es baja, y a baja temperatura aumenta la productividad, lo que favorece el crecimiento. La salinidad es un factor limitante, que restringe la distribución de la especie a lugares distantes de desembocaduras de ríos caudalosos, estuarios y marismas (LODEIROS *et al.* 2002).

Los organismos marinos están expuestos a una amplia variedad de factores ambientales, que varían en el tiempo y el espacio, esto significa que su exposición a extremos elevados de factores como la temperatura, requiere de un metabolismo que se ajuste para mantener la homeostasis, crecer y reproducirse (LESSER *et al.* 2010). Es bien conocido que tanto sus funciones fisiológicas individuales como el balance energético integrado están asociados a la temperatura y la disponibilidad de alimento (LODEIROS *et al.* 2016). Estudios ecológicos de los bivalvos han demostrado que el desarrollo, crecimiento y supervivencia se ve afectada por parámetros físicos, en particular la temperatura y la salinidad (LÓPEZ- ROJAS *et al.* 2017). La temperatura es uno de los factores ambientales de mayor influencia en la

vida marina dado que determina las tasas de todos los procesos biológicos, acelerando la velocidad de las reacciones bioquímicas en la medida que la temperatura aumenta, o retardándolas si la temperatura disminuye (LISTA *et al.* 2014). Esta modifica el flujo de energía, que regula la velocidad de los procesos biológicos, en tanto que la salinidad, impone una carga metabólica adicional y afecta actividades biológicas tales como las respuestas inmunes, la fertilización, el desarrollo de embriones, y supervivencia y crecimiento de larvas y juveniles (HUO *et al.* 2014).

Al estudiar el efecto de la temperatura y salinidad en el crecimiento y supervivencia de *Crassostrea nipona*, a lo largo de las costas de Japón y Korea, WANG & LI (2018) encontraron un efecto significativo de la salinidad, sobre el tamaño del juvenil en términos de altura de la concha. Según MARCANO *et al.* (2005) en la Península de Araya, Venezuela, determinaron que la amplitud de la oscilación del crecimiento de *P. imbricata*, estaría asociada principalmente con las variaciones de los parámetros ambientales en el área durante las estaciones de lluvia y sequía, ya que la temperatura presenta una variación estacional de 4–5°C y la salinidad varía en hasta 2 UPS. Las variaciones en las tasas de crecimiento en longitud, se explican por las condiciones ambientales del área, ya que está marcado por un período de surgencias costeras caracterizadas por baja temperatura del agua y alto contenido de nutrientes y biomasa fitoplanctónica, originando un periodo de elevada productividad primaria. En contraste, con un periodo de estratificación de las capas superficiales del mar, con una contracción de la zona productiva de incrementos de temperatura y baja disponibilidad del fitoplancton (LODEIROS *et al.* 2002).

Trabajos como el de VÁSQUEZ *et al.* (2015) en *P. imbricata* indican claramente que la influencia de las condiciones ambientales puede afectar la

fisiología de los organismos, al observar individuos de diferentes tallas con un crecimiento alométrico minorante lo que podría ser atribuidas a la cantidad de alimento disponible en el medio o a los cambios en los factores ambientales del ecosistema al momento del estudio. Otro estudio que corrobora la influencia de factores ambientales en la fisiología de *Pinctada imbricata*, fue realizado por MÁRQUEZ *et al.* (2011) en la Bahía de Mochima, tanto la dimensión de la concha y su masa, como otros tejidos estudiados muestran una correlación con el patrón general de la temperatura y la disponibilidad de alimento-seston y biomasa fitoplanctónica. Según CASTELLANO & CAMPOS (2007), en el Caribe Colombiano la temperatura está relacionada con el asentamiento de juveniles de *P. imbricata*, lo cual se vio favorecida en presencia de agua fría.

Reproducción

La actividad reproductiva de los bivalvos está determinada por factores estacionales tales como la temperatura y la disponibilidad de alimentos (KIMANI *et al.* 2006).

Los moluscos del género *Pinctada*, maduran por primera vez como machos y luego cambian a hembra generalmente al llegar a un tamaño superior a 3cm, exhibiendo un comportamiento protándrico que en algunos casos muestra variaciones impredecibles. El proceso de cambio de sexo puede estar potencialmente relacionado con la disponibilidad de alimento en el ambiente. Macroscópicamente es difícil distinguir el sexo de esta especie, ya que el tejido gonadal está inmerso en la masa visceral. Sin embargo, los individuos en pleno desarrollo gonadal o maduros tienen gónadas conspicuas de color crema en machos y ligeramente anaranjadas en hembras (ROMERO-FERREIRA *et al.* 2016). El desove ocurre en la columna de agua, principalmente en verano y principios de otoño, pero la reproducción puede

ocurrir todo el año (POUVREAU *et al.* 2000).

En Venezuela se han realizado trabajos sobre la reproducción de *P. imbricata* que conducen a establecer que posee una actividad reproductiva a través de todo el año (JIMÉNEZ *et al.* 2000).

La ostra perla es un organismo gonocórico (los gametos femeninos y los masculinos son portados por individuos diferentes) con fecundación externa; de esta manera, los productos sexuales son expulsados por efecto de estímulos exógenos y/o endógenos (LODEIROS & LOVATELLI 2019).

Los estudios de reproducción en *P. imbricata* (MARCANO 1984; RUFFINI 1984; URBAN 2000) y observaciones de la fijación larvaria y reclutamiento de juveniles (LEÓN *et al.* 1987; JIMÉNEZ *et al.* 2000) en el nororiente de Venezuela, indican que la especie se reproduce todo el año, teniendo su máxima actividad de desove en los períodos de marzo-abril y septiembre hasta enero.

La disponibilidad de alimento favorece el desarrollo gonadal asociado al ciclo de nutrientes, en que la producción y liberación de gametos coincida con el período de surgencia, presentando una estrategia reproductiva dual, siendo oportunista en el período de surgencia y de tipo conservador con menor proporción de desoves durante la estratificación (ROMERO-FERREIRA *et al.* 2017).

Aspectos Morfométricos

Según la Organización de las naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO (2006), para describir los bivalvos se emplean los mismos términos anatómicos que se usan en otros animales. La concha de los bivalvos, está constituida por dos valvas, similares entre sí, convexas y más

o menos ovaladas, articuladas una a la otra por su región dorsal y se empieza a formar en el estado de larva veliger. El umbo o zona de la charnela, donde se unen las valvas, es la parte dorsal y la región en el lado opuesto es el margen ventral.

Al retirar una de las valvas de la concha se puede observar las partes blandas o pulpa entre ellas: manto, músculo aductor, branquias, pie, sistema digestivo, sistema circulatorio, sistema nervioso y sistema urogenital (FAO, 2006).

Los pteridos se distinguen por una concha oblicuamente ovada, *Pinctada maxima* es la especie más grande con una longitud de caparazón de hasta 305 mm (ALBUQUERQUE *et al.* 2012). La ostra alada, *Pteria pingüino*, es la más grande del género *Pteria*, registrada con una longitud de concha hasta 200 mm (ADZIGBLI *et al.* 2019). Las otras especies de Pteriidae son relativamente pequeñas. Se ha estimado que viven entre 5 y 5,5 años en un entorno natural (FAO, 2006).

Pinctada imbricata, posee una longitud máxima con un rango normalmente entre 50 y 80 mm (Figura 2), presenta concha redondeada, frágil y de color variable en su exterior, desde marrón tostado a amarillo hasta verde y bronce con líneas más oscuras, e interiormente es nacarada, capaz de producir perlas (Figura 3). La valva izquierda es más cóncava que la derecha y posee una muesca bisal de donde se distribuye el biso que segrega para adherirse a un sustrato duro (Figura 4). El periostraco se encuentra formando láminas concéntricas con proyecciones espinosas frágiles más evidentes en individuos juveniles (LODEIROS *et al.* 1999)

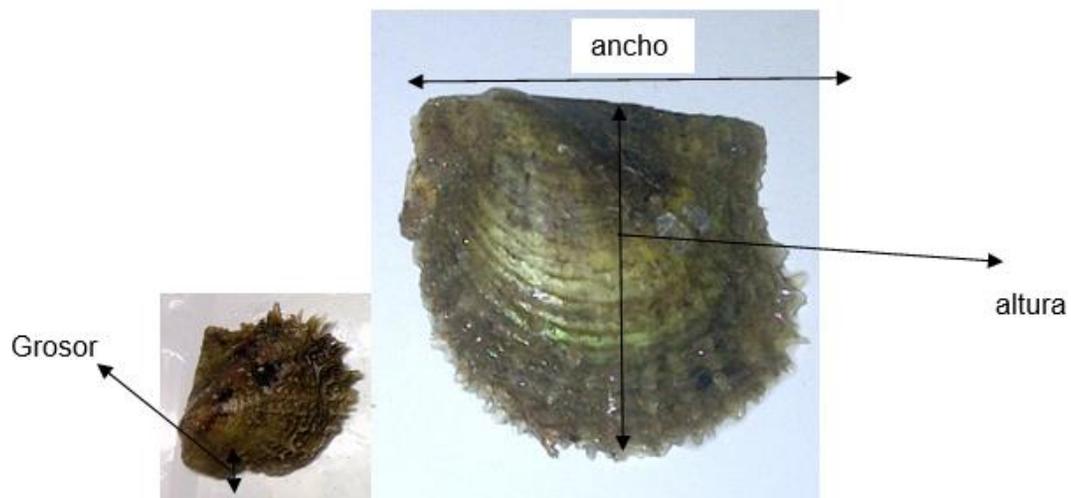


Figura 2. Medidas morfométricas de *Pinctada imbricata*, colectada en la localidad de Merito, Sucre, Venezuela.

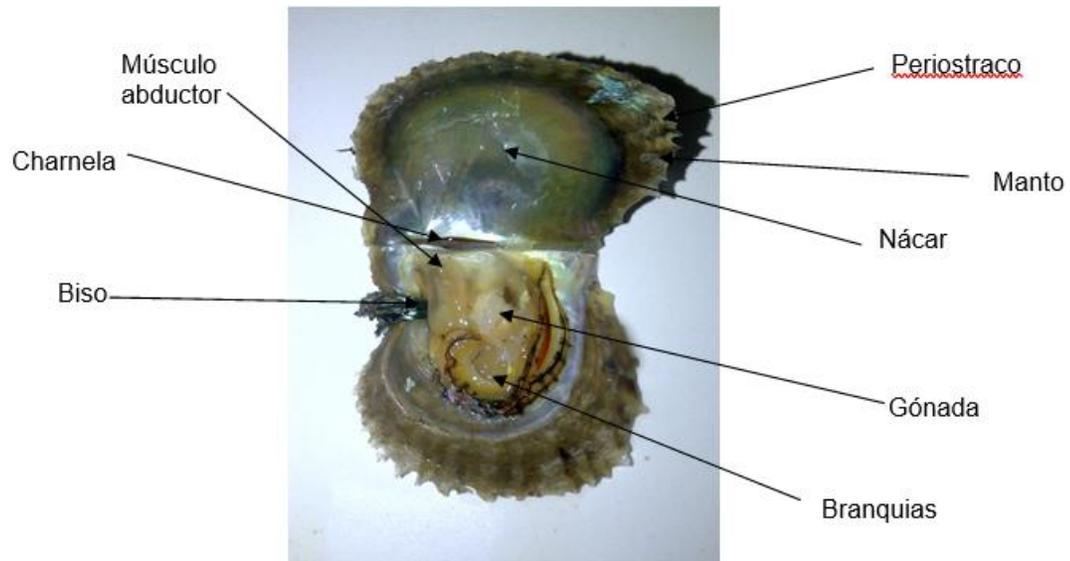


Figura 3. Anatomía interna de la ostra perla *Pinctada imbricata* colectada en la localidad de Merito, Sucre, Venezuela.

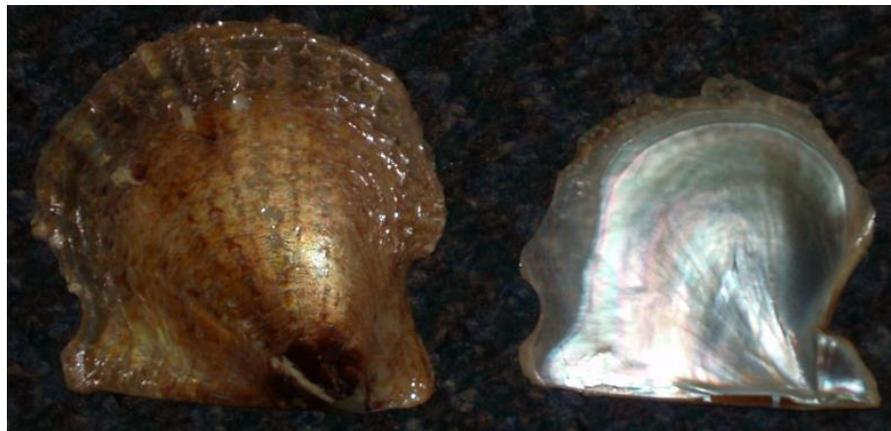


Figura 4. Valvas de la concha de la ostra perla *Pinctada imbricata*, por su cara externa e interna (Créditos: LODEIROS & LOVATELLI 2019).

Estos organismos poseen un cuerpo blando suave de color crema que ocupa gran parte del espacio interior de la concha. El manto es el tejido blando más externo, que está íntimamente unido a su concha y es el

encargado de secretar la concha, al retirar este se encuentra una masa visceral y los músculos aductor y retractor, también encontramos las branquias, las cuales sirven para el intercambio gaseoso con el medio (respiración) y filtración del agua para obtener el alimento. Se observan los palpos labiales que se localizan en la zona antero dorsal que se encargan de la selección de partículas y transferencia de alimento, desde las branquias y hacia la boca. El esófago y el estómago se encuentran ubicados en la región dorsal y en la región posterior se observan el intestino, recto y surco anal. La glándula digestiva se encuentra rodeando el aparato digestivo, esta es un órgano fusionado que engloba funciones del hígado y páncreas. El corazón se localiza en la región antero dorsal y en la región antero lateral se encuentran el pie y la glándula del biso, el cual es de un material fibrilar proteico con el que el bivalvo se fija a los sustratos duros (MARQUES & BARBIERI 2015).

Entre los indicadores que permiten su caracterización morfométrica se encuentran: longitud (largo, ancho, y alto), peso de la concha, peso de la carne o pulpa, rendimiento y proporción de sexos.

Aspectos Ecofisiológicos, Biomarcadores y Cambio Climático

Una clave para el avance en el conocimiento de esta especie, se ha incrementado a través de investigaciones en aspectos bioquímicos, con el empleo de protocolos metodológicos para evaluar respuestas metabólicas y sus variaciones que resultan importantes, ante las condiciones ambientales y en modelos experimentales del estrés que son producto de exposición a rangos extremos del medio ambiente, así como agentes potencialmente peligrosos para la salud (YU *et al.* 2019).

Tales estudios aportan información relevante acerca del estado

fisiológico de los animales y ayudan al diagnóstico de la calidad del ambiente para el cultivo de bivalvos (ALVES DE ALMEIDA *et al.* 2007). ACOSTA *et al.* (2010) evaluaron las oscilaciones del contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos, de la glándula digestiva, músculo y lóbulos gonadales de los mejillones *Perna perna* y *P. viridis*, detectando variaciones en los lóbulos gonadales de ambas especies. ACOSTA *et al.* (2013) estudiaron la bioacumulación y el efecto del cadmio en juveniles del mejillón verde *Perna viridis*, el cual se acumula en el tejido a los dos días de tratamiento y se estabiliza, acompañado por un descenso del biomarcador metabólico de la relación ARN/ADN. ZAPATA-VIVENES *et al.* (2014) estimaron la tolerancia a la anoxia y su efecto sobre las defensas antioxidantes en el mejillón verde *P. viridis* expuesto al cadmio, concluyendo que es acumulado y posiblemente afectó algunas estrategias bioquímicas relacionadas con la tolerancia a la anoxia. VILLEGAS *et al.* (2015) evaluaron el efecto subletal del cadmio en *P. imbricata* sin efectos significativos sobre la masa de tejido, así como índice de ARN/ADN y consumo de oxígeno con una disminución significativa en la reposición de la concha. ZAPATA-VIVENES *et al.* (2017) determinaron que las defensas antioxidantes e índices proteína/ADN y ARN/ADN en el poliqueto *Eurythoe complanata*, incrementan de forma continua durante todo el año y la síntesis de proteínas sólo en temporadas de baja temperatura. En este sentido, se puede afirmar que los organismos, en su ambiente natural, a menudo están sujetos a condiciones de estrés ambiental continuo, cuya interacción sinérgica con estresores antropogénicos puede amplificar sus efectos (HOLMSTRUP *et al.* 2010).

P. imbricata ha sido objeto de este tipo de estudios, ya que como todo organismo que habita la zona costera, se ve expuesto a considerables variaciones ambientales de temperatura, salinidad, que someten su ritmo y actividad metabólica a realizar ajustes homeostáticos (LODEIROS *et al.* 1999;

ERK *et al.* 2011). Estos ajustes en el metabolismo pueden comprometer la condición fisiológica de los organismos, afectando la tasa de crecimiento, reproducción y síntesis de lípidos (LESSER *et al.* 2010; LEMUS *et al.* 2014). Por tal motivo, la capacidad para hacer ajustes fisiológicos en respuesta a los cambios ambientales es un factor crucial para su supervivencia y éxito reproductivo (KANG *et al.* 2016). *P. imbricata* es sugerida como apropiada para realizar estudios de toxicidad del medio marino, por ser un organismo de amplia distribución y fácil manipulación en el laboratorio, su modo de vida sésil donde la energía es canalizada para el crecimiento y acumulación de reservas energéticas, obtenidas a través de la filtración, están íntimamente asociada a la bioacumulación de metales pesados, así como otros compuestos potencialmente peligrosos (MARCANO *et al.* 2005).

Actualmente se ha establecido que los cambios ambientales se han incrementado, debido al aumento de los gases de efecto invernadero en la atmósfera, y gran parte del gas es absorbido por los océanos, que al reaccionar con el agua de mar forma ácido carbónico con el consecuente aumento de la acidez en los mares, pudiendo ser muy dañino para algunos organismos marinos productores de exoesqueleto, entre ellos los moluscos con concha, puesto que estos para desarrollar sus conchas necesitan de un medio alcalino (Fig. 5). Además, este decremento del pH puede llegar a disminuir la presencia del plancton, principal alimento para las especies filtradoras (PARKER *et al.* 2013).

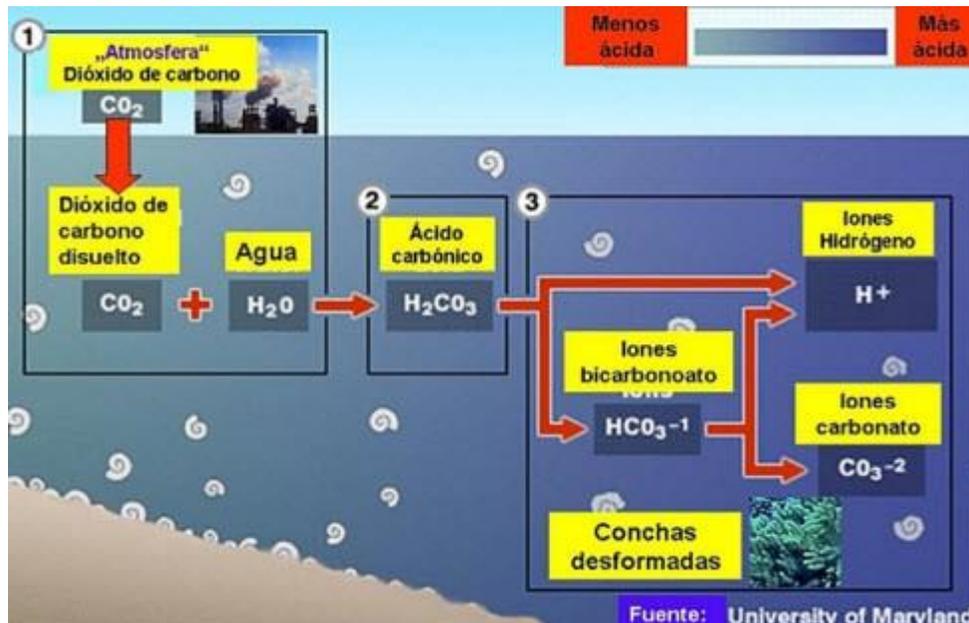


Figura 5. Acidificación oceánica. La quema de combustibles fósiles provoca un aumento del CO_2 en la atmósfera que es captado por el océano y hace que se vuelva más ácido (Créditos: University of Maryland).

El cambio global que está presentando en la actualidad pudiera acentuarse en los próximos decenios en caso de no tomar acciones correctivas a tiempo (Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC 2013) afectando el ecosistema planetario e impactando sensiblemente los sistemas socioeconómicos de los países (ROJAS-HIGUERA & PABÓN-CAICEDO 2015). Este fenómeno global se ha evidenciado en los océanos por el aumento de la temperatura del agua, la acidificación y el aumento del nivel del mar, modificando la biodiversidad marina y la estructura ecológica (HELMUTH *et al.* 2006; IPCC 2013).

Se ha señalado que todos estos cambios pudieran contribuir con el estrés oxidativo el cual se ha destacado como la principal causa del desequilibrio en la homeostasis redox a nivel celular, tisular y orgánico (CALDERÓN-PEÑA 2018). Esta condición es producida por una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (EROs); producto del

metabolismo, exposición a contaminantes, ingestión a través de la dieta, radiaciones UV o de los procesos metabólicos que implican los procesos de liberación de radicales libres, tales como el anión superóxido (O_2^-), el radical hidróxilo ($^{\cdot}OH$) y otros no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxidos orgánicos (CARVAJAL 2019), que en estado libre interactúan con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando sus funciones con efectos severos en el metabolismo y balance natural (ESPINOSA- DIEZ *et al.* 2015).

La producción de EROs es un proceso natural que desempeña funciones en la cadena respiratoria y mecanismos de defensa celular. En los bivalvos, por ejemplo, además de producir enzimas hidrolíticas y de participar en el proceso fagocítico, también están acompañados de un aumento importante en el consumo de oxígeno, fenómeno conocido como “burst” respiratorio. Durante este proceso se generan EROs, las cuales son potentes microbicidas contenidos en los fagolisosomas, responsables de la opsonización o destrucción de bacterias que son lisadas intracelularmente. Estos compuestos tienen un papel importante en la degradación de microorganismos invasores, funcionando como efectores inmunológicos potentes, ocasionando en algunos casos daños importantes en el hospedero (TORREILLES & GUÉRIN 1999; VARGAS- ALBORES & BARRACCO 2001).

La correcta respuesta al incremento en la producción de EROs es crítica para prevenir el daño oxidativo y para mantener la supervivencia celular. La alteración a los componentes celulares desencadena la muerte celular por procesos de apoptosis que conducen a la necrosis de tejidos y órganos, dependiente de la magnitud del estrés oxidativo (MORGAN & LIU 2011). Por tanto, estas situaciones crean un desbalance a favor de especies pro-oxidantes, generando el estrés oxidativo. Entre los efectos de daños ocasionados se destacan: vacuolización de células digestivas, atrofia de

túbulos digestivos, incremento en la proporción de células basófilas, cambios en el tamaño de las células, alteraciones histopatológicas, microerosión del epitelio, oclusión del lumen, las cuales se han evidenciado en secciones histológicas del mejillón de agua dulce *Diplodon chilensis* sometido a tratamiento con cobre (SABATINI *et al.* 2011).

No obstante, la producción de EROs, ya sea por procesos endógenos ó exógenos, demanda en los organismos respuestas de defensas antioxidantes, por lo que los organismos marinos han desarrollado un mecanismo de depuración de estos radicales, llamado sistema de defensa antioxidante, que las mantiene en concentraciones fisiológicamente apropiadas (LIVINGSTONE 2001). Este conjunto de defensas antioxidantes constituido principalmente por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S transferasa (GST), y no enzimáticas (glutatión reducida (GSH), β – carotenos y vitaminas A, C y E, se encargan de transportar los electrones de los radicales libres para los procesos metabólicos y eliminación de los desechos (FASSIANO *et al.* 2012).

Las defensas antioxidantes también pueden ser incrementadas o inhibidas por estresores, y la ocurrencia de un tipo de respuesta u otro va a depender de la intensidad y duración del estrés causado y la susceptibilidad de la especie (BEBIANO *et al.* 2005). En los bivalvos ha sido reportado la actividad de las enzimas antioxidantes como una respuesta a los radicales libres (LIVINGSTONE *et al.* 1990; PELLERIN-MASSICOTTE 1994; FOURNIER *et al.* 2000; DAFRE *et al.* 2004; ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2014).

Desde hace más de tres décadas se pueden destacar trabajos en bivalvos sobre este tema, particularmente en Mytilidos como *Mytilus edulis* (NOEL *et al.* 1991; PIPE 1992; WISTON *et al.* 1996), *Mytilus galloprovincialis*

(PIPE *et al.* 1995, CARBALLAR *et al.* 1997, TORREILLES & GUÉRIN 1999) y *Perna perna* (BARRACO *et al.* 1999; ALVES DE ALMEIDA *et al.* 2007); además de Ostreidos, *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* (BACHERE *et al.* 1991; BÉGUEL *et al.* 2013) y *C. virginica* (ANDERSON 1994, AUSTIN & PAYNTER 1995, FISHER *et al.* 1996); Veneridos *Tridacna crocea*, *Mya mercenaria* y *Mercenaria mercenaria* (ANDERSON 1994, NAKAYAMA & MARUYAMA 1998); y en los Pectínidos *Patinopecten yessoensis* (NAKAMURA *et al.* 1985) y *Pecten maximus* (LEGALL *et al.* 1991).

En este escenario, se han determinado incrementos en la actividad de algunas enzimas antioxidantes y moléculas del sistema en algunos organismos marinos mediante prueba de estrés, enfatizando la importancia de éstas como moduladores de las respuestas inmunes (DOWNS *et al.* 2001). XIANG *et al.* (2017) señalaron la dinámica de la respuesta de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada martensii* expuesta a 2-ethylhexyl phthalate (DOP), concluyendo que la actividad del GSH es potencial para ser usada como biomarcador para monitorear contaminación en ambientes marinos. NUSSETTI *et al.* (2004) evaluaron las respuestas inmunológicas y enzimas antioxidantes en *P. imbricata* expuesta a concentraciones subletales de fuel oil N° 6, concluyendo la presencia de sensibilidad de las enzimas antioxidantes de la glándula digestiva y manto lo que sugiere un incremento en el flujo de oxiradicales y posibles manifestaciones bioquímicas perjudiciales, asociadas con estrés oxidativo en ambos tejidos.

Ciertas patologías oxidativas se pueden desencadenar ante condiciones de estrés, cuando se sobrepasa la capacidad de defensa antioxidante celular y uno de los blancos moleculares más sensibles al ataque de EROs, son los lípidos de las membranas. El daño oxidativo causa la alteración de la estructura de las membranas celulares, produciendo

cambios estructurales en las proteínas intracelulares, oxidación de las lipoproteínas plasmáticas y aceleración del envejecimiento celular (LUSHCHAK 2011).

En este contexto tales respuestas permiten diagnosticar la salud de los ecosistemas, y son consideradas en su conjunto como biomarcadores. Los biomarcadores se han definido como respuestas biológicas, a diferentes niveles de organización, que permiten revelar variaciones significativas sobre la fisiología de los organismos y extrapolarlas a la calidad ambiental (HAMZA-CHAFFAI *et al.* 2003; REGOLI *et al.* 2004; LOJÁN-AVELLÁN *et al.* 2021). Otros biomarcadores de importancia son los índices moleculares de condición por los cocientes entre el contenido de ARN y proteínas con el ADN (ARN: ADN y Proteína: ADN), los cuales indican la condición metabólica, tasa molecular de crecimiento y de síntesis de proteínas en los tejidos. Estos son usados para estimar la condición nutricional en eventos biológicos que demanden alto gasto energético y posibles efectos de contaminantes, tales como síntesis de biomoléculas destinadas a la división y crecimiento celular, condición nutricional del organismo, cambios de la temperatura y presencia de tóxicos (MOSS 1994; ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2015; 2017; 2018). Los índices moleculares han sido considerados como indicativos de la condición fisiológica en bivalvos y otros organismos (BRACHO *et al.* 2000; BECKER *et al.* 2005). Los índices que relacionan las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas son biomarcadores bioquímicos aplicados para estimar la tasa de crecimiento, condiciones fisiológicas y de salud en organismos acuáticos (FOLEY *et al.* 2016) y son especialmente sensibles a la disponibilidad de alimento en el medio, disminuyendo en los periodos de estivación (YEUNG & LEUNG 2013). Por lo que pueden ser afectados por la condición nutricional del organismo, cambios temperatura (LEMUS & CHUNG 2006) y presencia de tóxicos (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2015).

La topografía del Golfo de Cariaco corresponde a una depresión, que abarca una extensión de 70 km aproximadamente, con características propias de los sedimentos en los márgenes norte, sur y el sector del este que tiene el mayor contenido de materia orgánica (LEMUS 2014). La ostra perla tradicionalmente ha formado bancos en el Golfo de Cariaco sobre sustratos duros, praderas de *Thalassia testudinum*, rocas, corales y arena en medios someros. La franja costera comprendida entre Punta Arenas y Laguna Grande del Obispo, posee poblaciones que son estables y explotadas para consumo local. Muchas de estas comunidades se han establecido a poca profundidad, donde están más expuestas a las oscilaciones temporales de temperatura del agua debido a la surgencia, y la estratificación que produce el calentamiento del agua y la menor productividad primaria del lapso. Así mismo los vientos alisios que son constantes entre diciembre – marzo, remueven el sedimento aportando nutrientes. De modo que estos organismos se desarrollan en un medio cambiante de estresante a óptima para el crecimiento y la reproducción (MÁRQUEZ *et al.* 2011).

Cambio Climático

El cambio climático está ocasionando modificaciones físicas y biológicas en la distribución de las especies marinas y de agua dulce, con consiguientes cambios en el tamaño y productividad de sus hábitats (F.A.O 2012).

Este fenómeno global se ha evidenciado en los océanos por el aumento de la temperatura del agua, la acidificación y el aumento del nivel del mar (IPCC, 2013). Según las proyecciones, el cambio climático repercutirá ampliamente en los ecosistemas, las sociedades y las economías y aumentará la presión sobre los medios de vida y el suministro de alimentos, además estas acciones están afectando los procesos físicos, biológicos y

químicos en el medio ambiente marino (SHUKLA *et al.* 2019). Estas alteraciones químicas provocan acidificación en los océanos afectando los organismos marinos en múltiples niveles, como calcificación, control interno de pH, respiración, absorción de nutrientes y reproducción (SOSA-ÁVALOS *et al.* 2023).

Los cambios oceanográficos sin precedentes debidos al cambio climático pueden afectar los procesos fisiológicos, con importantes implicaciones para la reproducción sexual (GRAZER & MARTIN 2012). Lo que repercute en la alta productividad acuícola, que cada vez más, es usada para restauración de poblaciones naturales (F.A.O 2020). El calentamiento de las aguas marinas ha tenido diversos efectos en las comunidades ecológicas marinas, en particular en los organismos y ecosistemas marinos, costeros y estuarinos (ROJAS- HIGUERA & PABÓN- CAICEDO 2015). Así mismo, el pH del agua de mar está relacionado con diversos factores, entre los cuales las concentraciones de CO₂ atmosférico y de CO₂ disuelto en el agua desempeñan un papel importante. La absorción oceánica de CO₂ atmosférico proveniente de la quema de combustibles fósiles podría generar grandes cambios del pH en el agua de mar en los próximos siglos, comparado con los registros geológicos de los pasados 300 millones de años (ROJAS-HIGUERA & PABÓN –CAICEDO 2015).

El aumento de la cantidad de dióxido de carbono en los océanos provoca cambios en la composición química de estos, alterando el movimiento de nutrientes y otros compuestos, causando la acidificación y afectando de manera general los ecosistemas y la vida marina. Esto pone en peligro a organismos marinos capaces de crear caparazones y esqueletos de carbonato de calcio, dentro de ellos los moluscos bivalvos. Además, afectará las tasas de crecimiento, reproducción, resistencia a enfermedades y otros

procesos biológicos y fisiológicos (NARANJAN *et al.* 2006).

Estudios realizados en el Caribe y Pacífico colombiano evidencian el efecto del cambio climático en las poblaciones marinas. Según ROJAS-HIGUERA & PABÓN –CAICEDO (2015), los resultados obtenidos sugieren calentamiento y acidificación de las aguas marinas, lo que constituye una amenaza para los ecosistemas.

El pH de la superficie del océano ha caído 0,1 unidades, lo que representa un aumento del 30% de la acidez. A finales de este siglo, si las emisiones actuales continúan, el pH podría caer otras 0,3 unidades, lo cual significaría un aumento de la acidez de casi el 100%. Según estudios realizados por GAZEAU *et al.* (2007), al aumentar los niveles de dióxido de carbono, la capacidad de calcificación de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y el mejillón común (*Mytilus edulis*) disminuyó de forma lineal (Figura 6), y concluyen que, si las concentraciones de carbono de la atmósfera alcanzan los 740 ppm, la capacidad de calcificación de estas especies disminuiría en un 10% y 25% respectivamente.

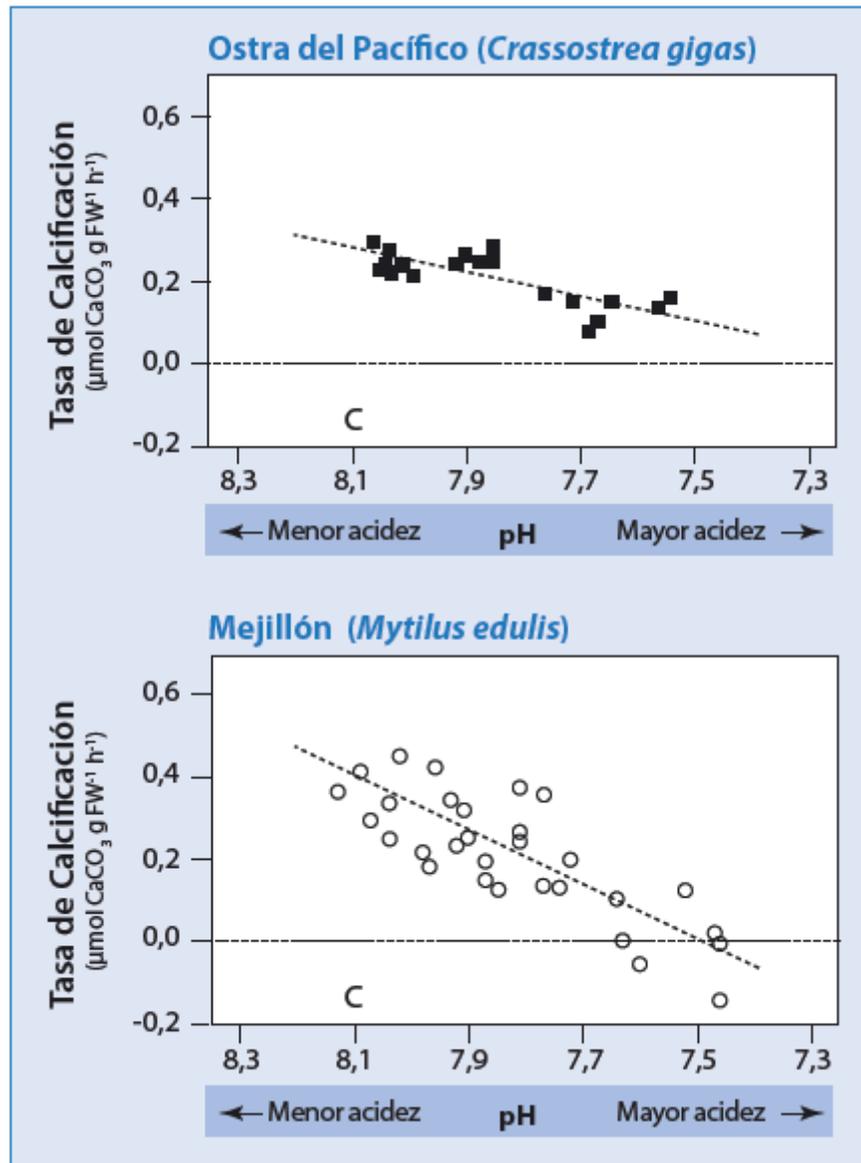


Figura 6. Efecto de la áidez del océano sobre la tasa de calcificación de *Crassostrea gigas* y *Mytilus edulis* (Créditos:GAZEAU *et al.* 2007).

Estudios recientes con el objetivo de determinar los impactos de la acidificación de los océanos en los organismos marinos y estuarinos, concluyen una alta probabilidad de consecuencias graves, para los organismos calcificados, especialmente los moluscos, los cuales son los principales productores de CaCO_3 y constituyen el segundo filo animal más

grande del mundo (*PARKER et al.* 2013).

Entre los Pteridos mayormente se han realizado estudios en *Pinctada fucata*. *WELLADSEN et al.* (2010), al exponer a agua de mar acidificada producen malformaciones y/o disolución en comparación con los controles; *Li et al.* (2017), demostraron que el bisco *P. fucata*, es afectado por la acidificación de los océanos (AO). La AO alteró la abundancia y la estructura secundaria de las proteínas del bisco y afectó el contenido de iones metálicos en los hilos distales, lo que en conjunto redujo el diámetro del bisco y amplificó la nanocavidad, provocando reducciones en las propiedades mecánicas (resistencia y extensibilidad); *LIU et al.* (2017), observaron que la longitud de la concha y el índice de peso total no variaron significativamente entre las ostras cultivadas a pH 8,10 y 7,70, pero si a pH 7,40, así mismo el contenido de calcio y la dureza de la concha, la cual exhibió una microestructura nacarada mal organizada y una aparente pérdida de integridad estructural en la capa nacarada.

Venezuela no escapa de la influencia de este fenómeno y en los últimos años se ha hecho más vulnerable. El ascenso de la temperatura está ocasionando modificaciones en los patrones hídricos, disminución de la biodiversidad, alteración de los ecosistemas y tasa acelerada de aumento de nivel del mar (*OLIVO-GARRIDO & SOTO-OLIVO* 2012). Como respuesta a esta situación, desde 1980 se han venido concretando en Venezuela investigaciones tendientes a comprender la problemática, para promover el diseño y aplicación de medidas de mitigación y adaptación (*MAYTIN et al.* 2020).

La metodología aplicada para este capítulo se basó en la revisión y valoración de diferentes publicaciones científicas, informes técnicos y biológicos. La mayor parte de estas fuentes se han generado en estudios y

proyectos de investigación y extensión auspiciados por la Universidad de Oriente y sus diferentes dependencias, así como por organizaciones asociadas, ello con el fin de desarrollar una investigación científica documental de carácter crítico.

HIPÓTESIS

Hipótesis: Influirán los factores ambientales sobre las concentraciones de algunos compuestos y enzimas antioxidantes en distintos órganos de *P. imbricata*.

Hipótesis: Si las condiciones ambientales futuras se modifican, se modularán las defensas antioxidantes de *P. imbricata*.

Hipótesis: Existirá relación entre los índices de condición y los ajustes de defensas antioxidantes de *P. imbricata*.

Hipótesis: Se observarán características representativas en los tejidos de *P. imbricata* de acuerdo a su sistema de defensa antioxidante y sus índices de condición.

OBJETIVOS

General

Evaluar la influencia de factores ambientales sobre el sistema de defensa antioxidante de la ostra perla *Pinctada imbricata*.

Específicos

- Cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), en distintos tejidos de *P. imbricata*.
- Determinar los niveles de glutatión reducido, daño lipoperoxidativo y proteínas en distintos tejidos de *P. imbricata*.
- Estimar los coeficientes moleculares de condición (ARN: ADN y Proteína:ADN) en el tejido blando de *P. imbricata*.
- Relacionar los coeficientes de condición fisiológica y parámetros biométricos en *P. imbricata*.
- Describir histológicamente la glándula digestiva, gónadas y manto de *P. imbricata*.
- Asociar el efecto de los factores ambientales, sobre las enzimas antioxidantes e índices de condición molecular en *P. imbricata*, bajo condiciones naturales *in situ*.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE ALGUNOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E ÍNDICES MOLECULARES DE LA OSTRA PERLA *Pinctada imbricata* (Röding, 1758)

Longart R. Yelipza del C. 2024. **Evaluación De Algunos Indicadores De Estrés Oxidativo e Índices Moleculares de la Ostra Perla *Pinctada Imbricata* (Röding, 1758)**. Trabajo especial de grado. Universidad de oriente, Núcleo de Sucre. pp. 44-81.

RESUMEN

Pinctada imbricata (Röding, 1758) es un bivalvo perteneciente a la familia pteriidae, abundante y forma densos bancos en el Mar Caribe, donde es explotada por las perlas, y en el nororiente de Venezuela por su carne. Su hábitat en la zona costera lo somete a cambios ambientales, que pudieran afectar la condición fisiológica. Siendo el propósito de este trabajo, evaluar el sistema antioxidante enzimático y la condición fisiológica por medio de biomarcadores de estrés oxidativo e índices moleculares de condición en la glándula digestiva y músculo aductor. Se colectaron 91 ejemplares con un peso promedio de $16,54 \pm 8,35$ g, en una zona costera del nororiente de Venezuela, entre abril 2017 y enero 2018. Se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes; catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S-transferasa (GST), se cuantificaron el ARN, ADN y proteínas para obtener los índices moleculares ARN/ADN y Proteína/ADN. Las enzimas antioxidantes (CAT, GST y SOD) mostraron valores dentro del rango normal, sin diferencias estadísticamente significativas entre los meses. Los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN, evidenciaron niveles de macromoléculas entre los rangos de normal crecimiento para especies de moluscos. La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste metabolismo aerobio-energético e integración funcional de los tejidos. Además, los promedios observados en los índices moleculares se evidencian un estado fisiológico óptimo para los organismos.

Palabras Claves: *Pinctada imbricata*, Enzimas antioxidantes, Índices moleculares

INTRODUCCIÓN

El incremento de las descargas de productos químicos en los cursos de los ríos con la esorrentía de actividades agrícolas e industriales, así como los desechos urbanos que desembocan en el mar, ha generado un grave problema ambiental global, los cuales se ha reportado que están relacionados con el desbalance oxidativo de diversos organismos acuáticos (LIVINGSTONE 2003, ALONSO-ÁLVAREZ & PÉREZ- RODRÍGUEZ 2023).

Se ha demostrado que los xenobióticos activan las defensas antioxidantes como primer mecanismo de defensa de los sistemas celulares debido al estrés oxidativo, y se usan como biomarcadores de exposición a contaminantes, agentes estresores, condiciones ambientales extremas y envejecimiento celular, algunas de las cuales son responsables de graves causar daño a células y tejidos (OCHOA & GONZÁLEZ 2008; CARVAJAL 2019).

Es necesario controlar la producción y la acción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) para evitar el daño celular al organismo, que dispone de mecanismos de tipos enzimático y no enzimático. Dentro de los mecanismos no enzimáticos se incluyen moléculas antioxidantes de bajo peso molecular hidrosolubles y/o liposolubles. Entre los cuales se encuentra la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La catalasa (CAT) es una enzima tetramérica, dependiente del grupo hemo, que reduce el peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno y que requiere de la presencia de NADPH para llevar a cabo su función. La glutatión peroxidasa (Gpx) requiere del selenio para reducir el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos (ROOH) a agua o alcohol (ROH), respectivamente, utilizando glutatión reducido (LESSER 2010; CARVAJAL 2019; AMORIM *et al.* 2020). Las enzimas antioxidantes han sido

propuestas como biomarcadores de contaminación mediada por estrés oxidativo (OCHOA & GONZÁLEZ 2008), y se usan para determinar la salud de ecosistemas marinos costeros (STOREY 1996; RECABARREN-VILLALÓN *et al.* 2004).

Los índices de condición de los bivalvos son aplicados para entender aspectos poblacionales, la conservación de poblaciones, actividad metabólica, acumulación de reservas, el estado de bienestar y reproductivo con fines de consumo tanto para poblaciones naturales, en cultivo y en la conservación del medio ambiente. Los criterios biométricos y morfométricos de la masa y el tamaño del individuo son relativamente accesibles, descriptivos de las respuestas ante el medio ambiente y del ciclo de vida, a diferencia de los biomarcadores metabólicos que alertan de un posible efecto inmediato y se tomen medidas de protección a los organismos marinos y a los seres humanos, con la limitación del empleo de mayor cantidad de recursos que limitan su uso a laboratorios como los sistemas de cultivo y son más adecuados para investigación.

Los biomarcadores moleculares con los ácidos ribonucleicos y nucleícos, destacan por la sencillez del fundamento de realización. Los índices moleculares son biomarcadores bioquímicos aplicados para estimar la tasa de crecimiento, condiciones fisiológicas y salud en organismos acuáticos (Foley *et al.*, 2016). Siendo el propósito de este trabajo evaluar las oscilaciones de las enzimas antioxidantes CAT, TBARS e índices moleculares, de la glándula digestiva y la gónada, de manera comparativa entre los meses y los periodos de surgencia y estratificación.

METODOLOGÍA

Se colectaron ejemplares de *P. imbricata* durante 8 meses (desde abril 2017 hasta enero 2018) en la zona de Merito municipio Cruz Salmerón Acosta, localizado bajo las coordenadas 10°36'00''N, 64°08'00''O (Figura 7). La colecta se hizo en ambientes naturales, manual y directamente de las raíces del mangle rojo *Rizophora mangle* y fueron trasladados al laboratorio en recipientes con agua de mar. Donde se pesaron en balanza analítica de 0,001 g. de precisión y midieron con un vernier de 0,01 mm de precisión, para registrar los parámetros biométricos.



Figura 7. Ubicación geográfica del área de estudio. Merito municipio Cruz Salmerón Acosta. Estado Sucre. Venezuela.

Luego de disecados los ejemplares de *P. imbricata* fueron separados la glándula digestiva y el músculo, trabajados en frío, rotulados, congelados en nitrógeno líquido (N₂) y guardados en congelación (-70°C) hasta su posterior ensayo enzimático, para lo cual se usó el protocolo propuesto por ZAPATA-VÍVENES (2001). Se pesó 0,1 g de tejido, se colocó en 2 ml de buffer de extracción pH 7,6 el cual consiste en Tris- HCl (hydroxymetil-metilamina) 20 mM, ácido etilendiamino- tetracetato (EDTA) 1 mmol/l, Ditioneitol (DTT) 4 mmol/l, sacarosa 500 mmol/l, KCl 150 mmol/l y 20 µl de ácido fenil metilsulfónico (PMSF) en alcohol isopropílico 1mmol/l, para homogenizar a 13500 rev min⁻¹ (4°C) en un homogeneizador IKA T25 Basic. Se centrifugó a 4000rpm a 4°C por 20 min en una centrifuga Eppendorf 5702R, y se colectó el sobrenadante para procesar inmediatamente las enzimas antioxidantes, cuyas actividades fueron medidas en un espectrofotómetro Perkin- Elmer UV/VIS Lambda 2S basado en el programa cinético Lambda 2. Las actividades máximas de las enzimas se determinaron según procedimientos descritos por NUSETTI *et al.* (2004), como sigue a continuación.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

La actividad de la catalasa se determinó en base a la cinética de degradación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de la enzima, según el método de AEBI (1984). La mezcla de incubación estuvo constituida por buffer fosfato KH₂PO₄/K₂PO₄ 50mmol/l (pH 7,5). Para esto se colocó en una cubeta de cuarzo 970 µl de buffer fosfato, 20 µl de la muestra y 10 µl de H₂O₂ para dar inicio a la reacción y realizar la lectura a 240 nm durante 90 segundos. La primera lectura de absorbancia después de mezclar se considera cero (0), luego se tomó a 10, 20, 30 y 40 s.

Superóxido Dismutasa (SOD, EC 1. 15. 1.1)

Se determinó según la cinética de la reacción de formación de citocromo reducido (MC CORD & FRIDOVICH 1969), colocando en la cubeta 800µl de buffer fosfato 43 mmol/l, 25µl de citocromo C 0,4 mmol/L, 50 µl de cianuro de potasio (KNC) 0,4 mmol/l, 10µl de xantina oxidasa y 50µl del extracto enzimático; agregando seguidamente 100 µl de hipoxantina 0,5 mmol/l y se leyó a 500 nm cada 20 segundos durante 1 minuto.

Glutación S-Transferasa (GST, EC 1.11.1.9)

La actividad fue medida por el método de HABIG *et al.* (1974) usando glutati3n reducido (GSH) y 1- cloro – 2,4 dinitrobenceno (CDNB) como sustrato. Para ello se coloc3 en la cubeta 900 µl buffer de incubaci3n (pH=7,5), 20 µl de CDNB, 30 µl del extracto enzimático, inmediatamente antes de hacer la lectura se agreg3 50 µl de GSH siguiendo la formaci3n del complejo dinitrofenil-glutaciona a 340 nm. La mezcla de incubaci3n consisti3 en Na₂HPO₄ 100 mmol/l pH 6,5, CDNB 2,5 mmol/l disuelto en etanol, glutati3n reducida (GHS) 67 mmol/l. La actividad fue expresada en unidades por gramo de masa h3meda (U/g masa h3meda).

Peroxidaci3n de L3pidos

El principio de este ensayo consiste en medir la producci3n de uno de los principales productos de la peroxidaci3n de l3pidos, el malondialdehido (MDA). Se utiliza para cuantificar la magnitud de la peroxidaci3n lip3dica, producida por diversas causas, midiendo el producto formado entre los aldeh3dos generados y el 3cido tiobarbit3rico (TBA) (GUTTERIDGE & HALLIWELL 1990). Una vez homogeneizados los 3rganos en fr3o (0,1 g), en 2 ml soluci3n salina al 9%, fueron centrifugados a 4 3C, 3000 rpm por 10 min. Se estim3 seg3n protocolo propuesto por OHKAWA *et al.* (1979). Se coloc3 en tubo de

ensayo 250 μ l de sobrenadante en 250 μ l stop-Mix en hielo por 10 min y se hizo reaccionar con 800 μ l de TBA. Esta mezcla se mantuvo en baño de agua a ebullición con constante agitación durante 60 min, posteriormente fue colocado en baño de hielo por 10 min, volviéndose a centrifugar a 1000g. por 10 min. Se tomó la lectura a 532 nm en el espectrofotómetro. La concentración de lipoperóxido se expresó en nanomoles de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), por miligramo de proteína.

Tioles Totales

Se realizó siguiendo el protocolo propuesto por ELLMAN (1959). Se pesó 0,1 g. de tejido y se homogeneizó en 2 ml de buffer fosfato (pH 7,5 100mmol/l). Se centrifugó a 3000rpm por 15 min. Seguidamente se añadió en la cubeta 500 μ l de DTNB (5,5'- Dithio-bis 2- nitrobenzoi-ác), 250 μ l de agua destilada, 200 μ l de buffer tris EDTA, 50 μ l de la muestra, y se registró la absorbancia a 412 nm.

Índices Moleculares de Condición

Se estimaron los cocientes de Proteína:ADN y ARN:ADN como índices moleculares de condición. Para ambos coeficientes se obtuvo un gramo de tejido muscular y de la glándula digestiva respectivamente, se homogeneizaron con 10 ml de buffer salino ($\text{NaHPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$). Se tomó 1 ml del extracto y se le añadió 1 ml de ácido perclórico (HClO_4) al 2N para luego dejar reposar por una hora a 8°C. El precipitado fue lavado con ácido perclórico al 1N y disuelto con KOH al 2 N a 37°C durante una hora. Después se extrajo una alícuota para determinar proteínas.

El ARN y ADN fueron separados por precipitación con 1 ml de ácido perclórico al 1 N con centrifugación a 4°C. Como resultado de la

centrifugación, el ARN quedó en el sobrenadante y el ADN en el precipitado. Este se calentó nuevamente con ácido perclórico a 80°C por un período de 20 minutos. El ARN se determinó por el método de revelación de orcinol (CAMBELL & SARGENT 1967) y el ADN mediante la reacción de difenilamina (BURTON 1956). Se empleó como sustancia referencial ARN de levadura *Saccharomyces cereviceae* y ADN de timo de bovino. Luego, se colocó 1 ml de cada solución problema con 4 ml de difenilamina, fue llevado a baño caliente durante 10 minutos, se dejó enfriar y se midió la absorbancia a 595 nm.

Para el ARN se colocó 1 ml de cada solución problema con 4 ml de orcinol y fue llevado a baño caliente durante 20 minutos, se dejó enfriar y se registró la absorbancia a 665 nm. Se estimaron las cantidades de ADN y ARN por gramos de masa húmeda.

Proteínas Totales

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Biuret (ROBINSON & HOGDEN, 1940). Se tomaron 200 µl del extracto y mezclado con 3 ml de Biuret. Se procedió a realizar una curva patrón con albúmina de suero de bovino (BSA; 1 mg/ml). Los tubos fueron agitados suavemente y se dejaron en reposo por 20 minutos. Luego se midió la absorbancia a 540 nm. Los resultados fueron expresados en gramos de masa húmeda.

Análisis Estadísticos

Los datos se analizaron estadísticamente se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas por métodos de Shapiro- Wilk y Levene (SOKAL & ROHLF 2012), y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con la ayuda del paquete estadístico StatGraphics Plus 5.1, para determinar diferencias entre las respuestas bioquímicas en los

meses de colecta y entre los periodos de surgencia y estratificación. Se aplicó una prueba a *posteriori* de Scheffé. Se realizó análisis de componentes principales (ACP) para reconocer las asociaciones entre las variables ambientales, bioquímicas y biométricas.

RESULTADOS

Los organismos presentaron un peso promedio de $16,54 \pm 8,35$ g. En la glándula digestiva se observan oscilaciones de la actividad enzimática durante el lapso de estudio. Se observó la mayor actividad de la catalasa (CAT) en abril y agosto de 2017 (Fig. 8). La superóxido dismutasa (SOD) presentó la máxima actividad en diciembre 2017 (Fig. 9). La glutatión S-transferasa (GST), presentó un ascenso hasta agosto, seguido de una caída con su valor máximo en enero de 2018, detectándose diferencias significativas entre los meses (Fig. 10).

En el músculo entre agosto y noviembre se cuantificó la mayor actividad de CAT (Fig. 8). La SOD presentó los valores máximos en abril y octubre, y mínimos en agosto y noviembre (Fig. 9). La actividad de la GST fue máxima en junio y diciembre. Entre los meses se detectaron diferencias significativas (Fig. 10).

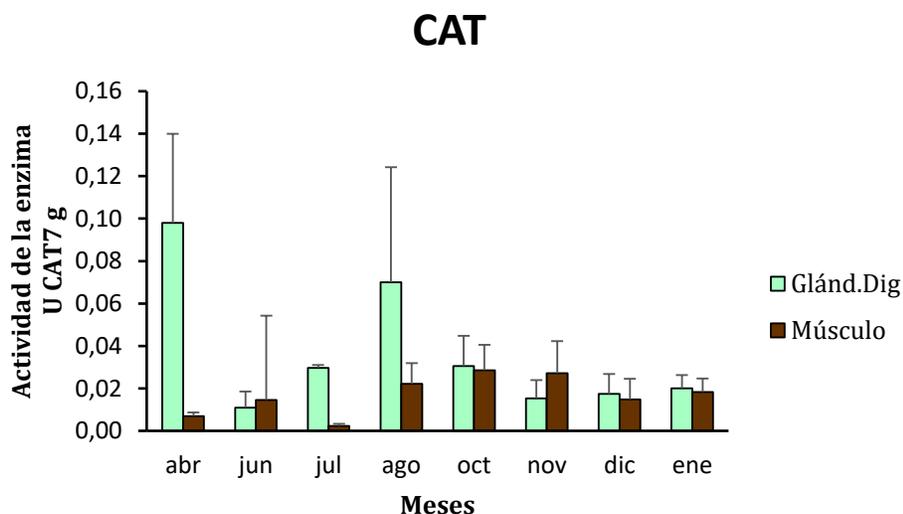


Figura 8. Actividad mensual de la enzima catalasa (CAT), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla *P. imbricata*, en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

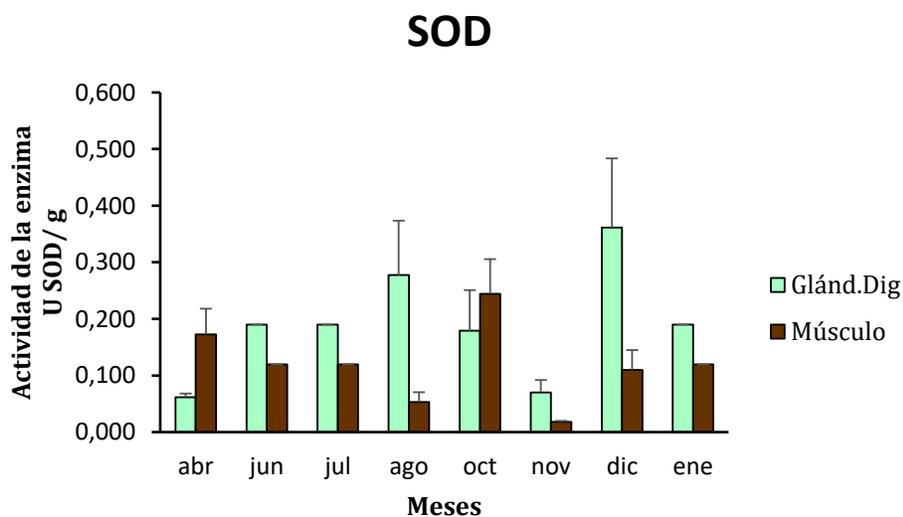


Figura 9. Actividad mensual de la enzima superóxido dismutasa (SOD), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla *P. imbricata*, en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

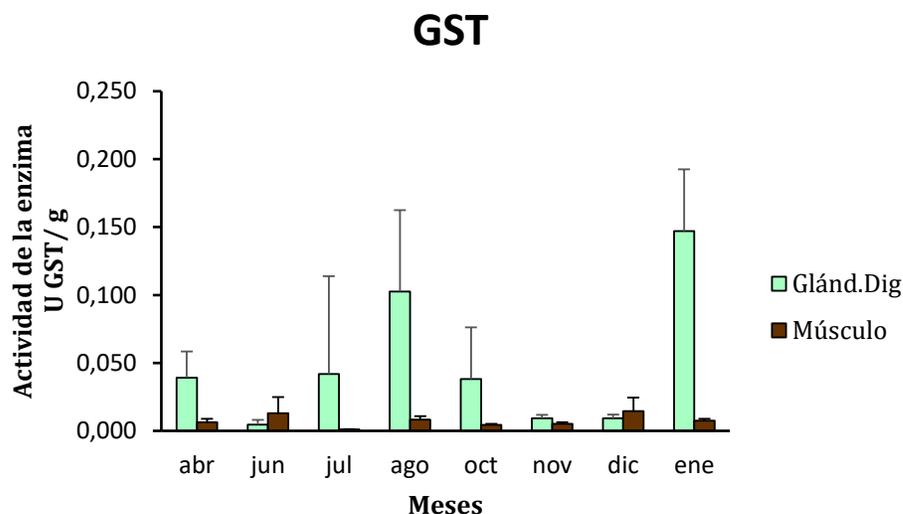


Figura 10. Actividad mensual de la enzima glutathione transferasa (GST), en la glándula digestiva y músculo de la ostra perla *P. imbricata*, en Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

Los valores de TBARS en glándula digestiva fueron mayores respecto al tejido muscular, con cambios significativos en los niveles de lípidos peroxidados. La concentración de TBARS en la glándula digestiva mostró un incremento para el mes de diciembre (1840 ± 452 nmoles/mgP), con respecto a agosto (75 ± 27 nmoles/mgP). En el músculo incrementó progresivamente alcanzando el valor máximo durante noviembre (1294 ± 519 nmoles/mgP) (Fig. 11). Los contenidos de TBARS en la glándula digestiva y músculo presentaron diferencias significativas entre los meses ($P < 0,05$), con valores mayores en la glándula digestiva con respecto al tejido muscular.

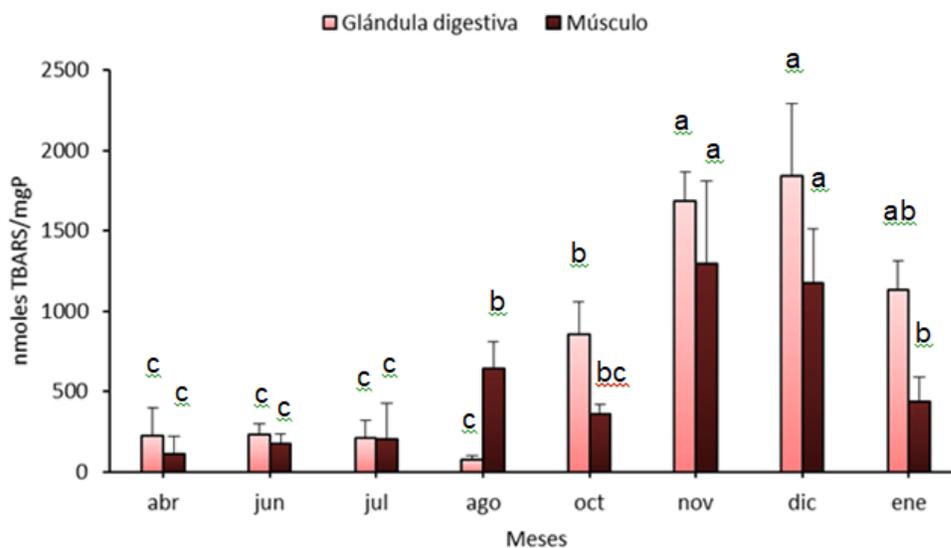


Figura 11. Variación mensual de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS (U TBARS/ mgP), en la glándula digestiva y músculo de *P. imbricata*, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. TBARS expresada en nmoles/mg de tejido húmedo. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.

Los máximos promedios de tioles totales se presentaron en octubre y enero de 2018, para la glándula digestiva y el músculo respectivamente. El contenido de tioles totales en los dos tejidos presentó un patrón mensual de oscilaciones parecido y se detectaron diferencias significativas entre los meses ($P < 0,05$) (Fig. 12).

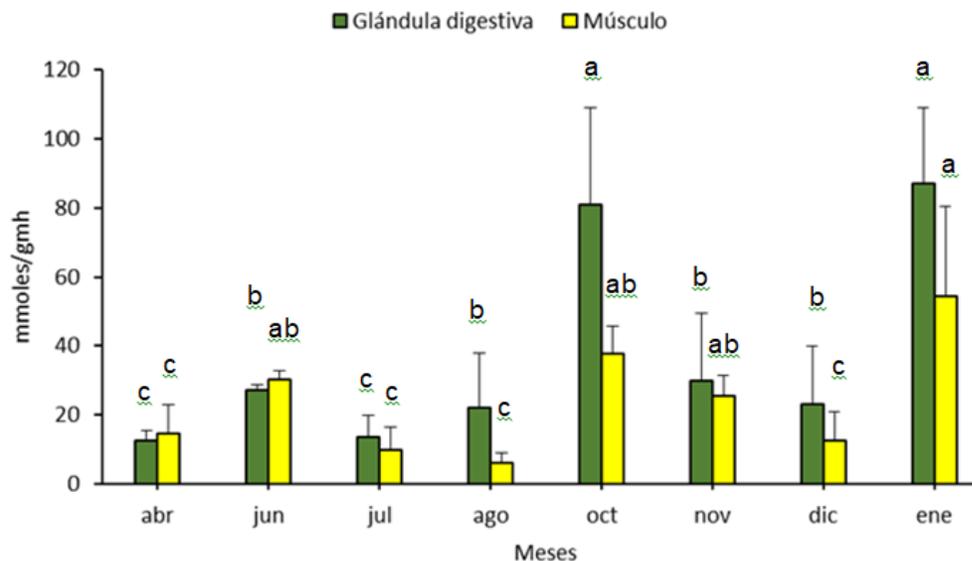


Figura 12. Niveles de tioles totales en muestras de glándula digestiva y músculo de *P. imbricata*, durante los meses de muestreo, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Datos expresados en mmoles de $-SH/g$ de tejido húmedo. (abr-dic 2017; ene-2018). Los índices indican grupos comunes de cada tejido.

Las concentraciones de ADN de la glándula digestiva y el músculo incrementaron durante abril, junio y julio y mostraron diferencias significativas durante los meses ($P < 0,05$). El ARN incrementó durante agosto, octubre, noviembre, con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Figs. 13, 14).

Se observó de abril a julio baja actividad catabólica durante la época de surgencia y producción de gametos. *P. imbricata* presentó promedios elevados en el índice ARN:ADN durante el periodo de surgencia (agosto a noviembre 2017 y en enero- 2018) (Fig. 15).

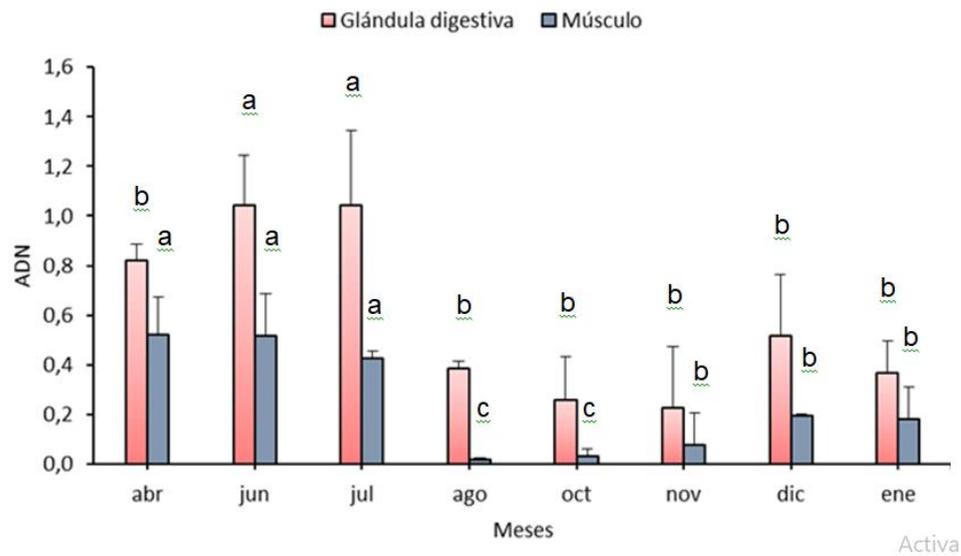


Figura 13. Variación mensual del ADN en *Pinctada imbricata*, en la localidad de Merito municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.

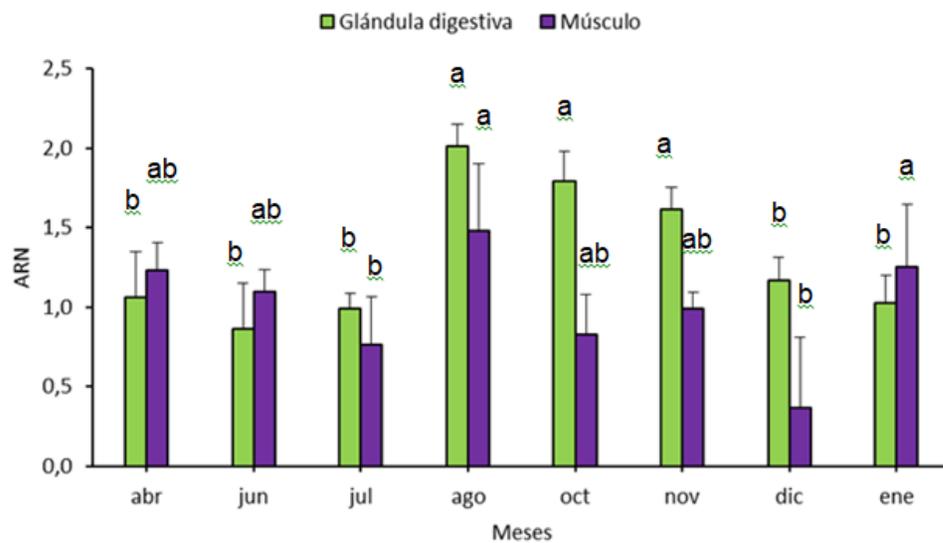


Figura 14. Variación mensual del ARN en *Pinctada imbricata*, en la localidad de Merito municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.

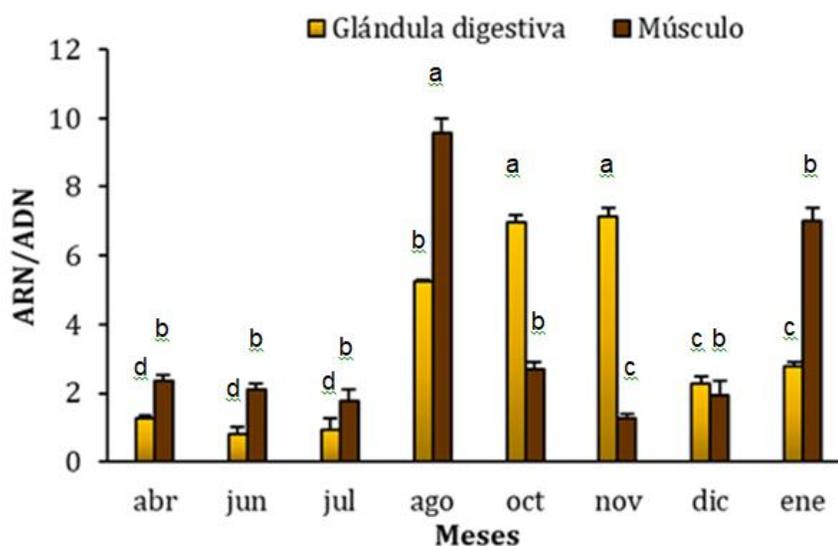


Figura 15. Variación mensual del índice ARN/ADN observado en la glándula digestiva y músculo de *P. imbricata*, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. Los índices indican grupos comunes de cada tejido.

Las proteínas totales (PT) en la glándula digestiva oscilaron entre 250 ± 33 y 1089 ± 236 mgPT/gmh durante noviembre y enero respectivamente. En el músculo osciló entre 206 ± 78 y 915 ± 5540 mgPT/gmh respectivamente en julio y octubre. No hubo diferencias significativas entre los niveles de proteínas por meses (Fig. 16).

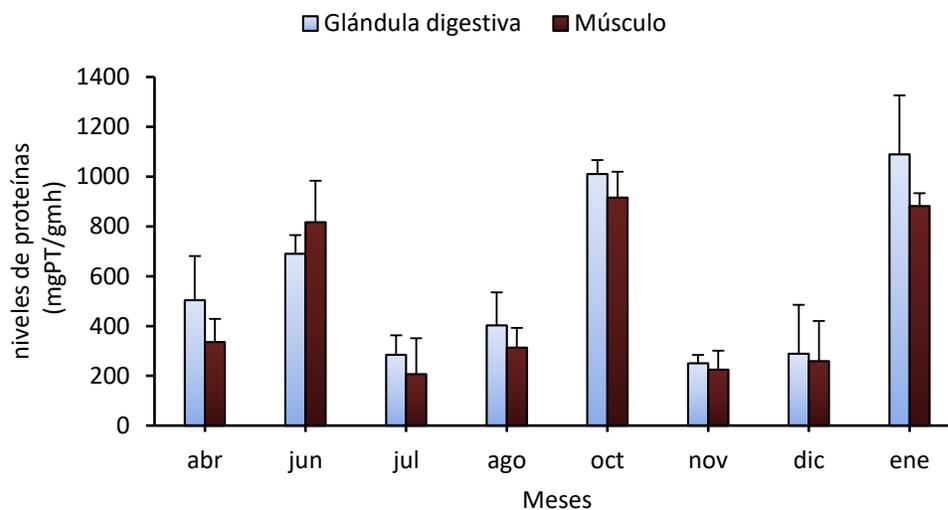


Figura 16. Variación mensual del contenido de proteínas (mgPT/gmh) en la glándula digestiva y músculo de *P. imbricata*, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

En cuanto a los niveles de PT:ADN en la glándula digestiva oscilaron entre 79 ± 11 y 157 ± 41 mgPT/gmh durante octubre y abril respectivamente. En el músculo osciló entre 20 ± 13 y 207 ± 40 mgPT/gmh respectivamente en octubre y junio. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los meses (Fig. 17).

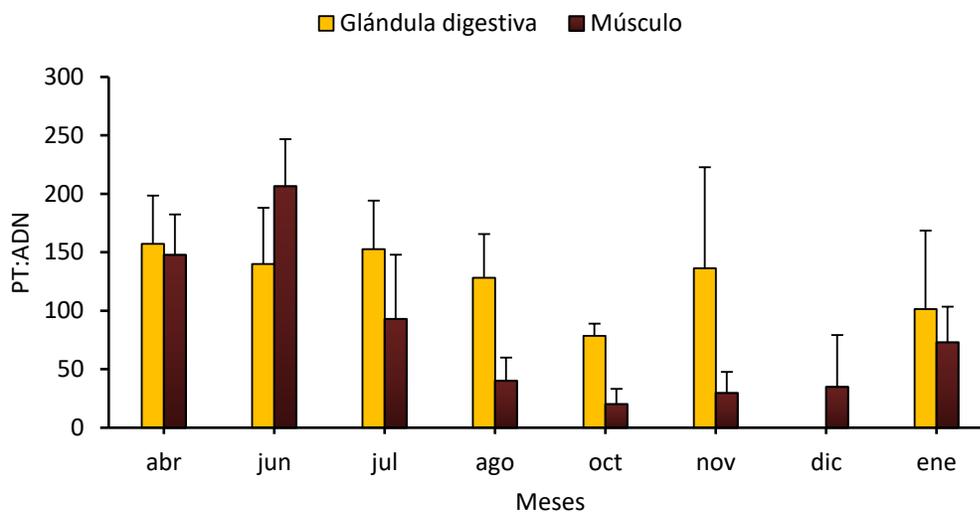


Figura 17. Coeficiente PT:ADN en la glándula digestiva y músculo de *P. imbricata*, en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

El análisis de componentes principales (ACP) aplicado a la temperatura y los biomarcadores demuestran que el ADN y la catalasa (CAT), cumplen una estrecha asociación fisiológica, aunque un ligero número de combinaciones lineales de las 9 variables examinadas explican la mayoría de la variabilidad en los datos. En este caso se han extraído 3 componentes, ya que los mismos tenían valores mayores o iguales a 1,0. Juntos representan el 75 % de la variabilidad de los datos originales. El componente 1 (38,2%) se correlaciona de forma positiva con el ADN y la CAT y de manera negativa con TBARS, temperatura, -SH y proteínas, mientras que el componente 2 (20,5%) se correlaciona positivamente con ARN, GST y SOD (Fig. 18).

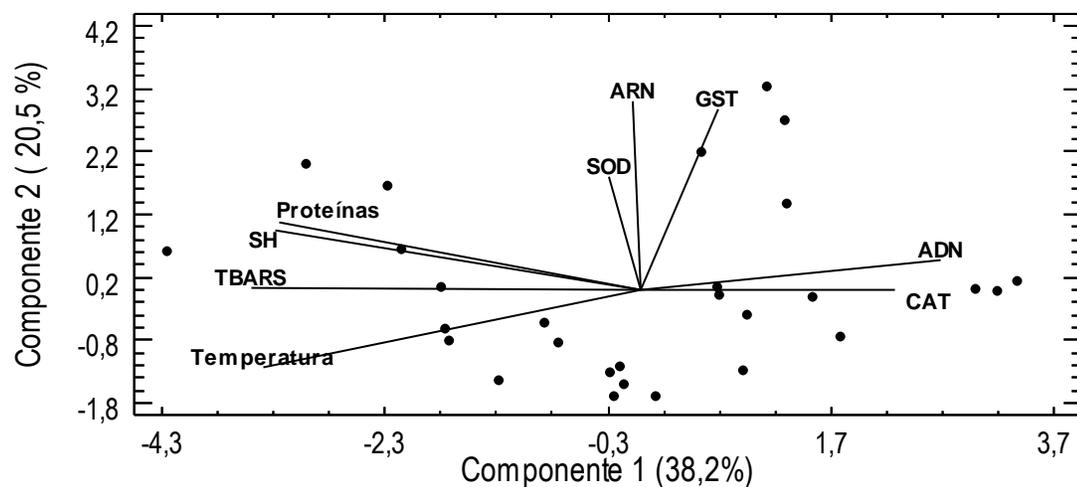


Figura 18. Análisis de componentes principales entre los biomarcadores de *P. imbricata* y la temperatura de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

Al considerar las relaciones de las variables ambientales (temperatura y clorofila), con los índices moleculares y parámetros biométricos, fueron detectadas relaciones positivas de la clorofila y la temperatura con los índices ARN:ADN y PT:ADN, mientras que las variables biométricas mostraron estar asociadas positivamente (Fig.19).

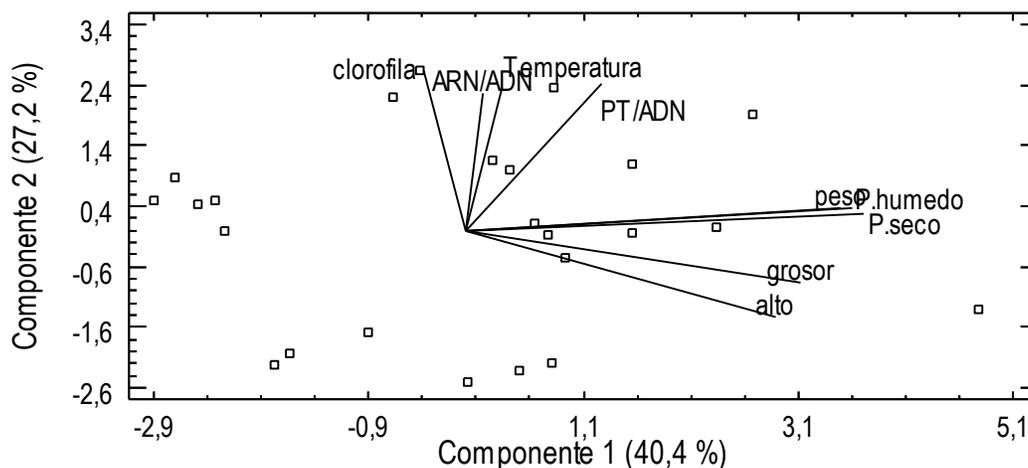


Figura 19. Análisis de componentes principales entre los coeficientes de condición fisiológica de *P. imbricata* (ARN:ADN y PT:ADN), los parámetros biométricos y las variables ambientales (temperatura del agua y clorofila), de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela.

Durante el período de surgencia el ACP generó 3 componentes con una varianza acumulada de 81% del total. En esta época se identificó una correlación positiva en el componente 1 (41%), con: CAT y ADN; siendo fuertemente negativa con la temperatura del agua, ARN y Proteínas. Por su parte el componente 2 (21%) se correlaciona positivamente con TBARS y Temperatura del agua; mientras que las correlaciones fueron negativas con SH, GST y SOD. (Figura 20 A).

En la época de relajación fueron determinados tres componentes con valores propios mayores a 1. La varianza acumulada para los tres primeros componentes fue 72%. En el primer componente (37,2 %) todas las variables se correlacionaron de manera negativa, siendo las más fuertes con: TBARS, ARN y Proteínas. Las demás correlaciones son negativas débiles. En el componente 2 (18,3 %) fue observada una correlación positiva con la

temperatura del agua y la catalasa. Las demás correlaciones positivas fueron débiles, aunque mostraron una correlación negativa con la SOD (Figura 20 B).

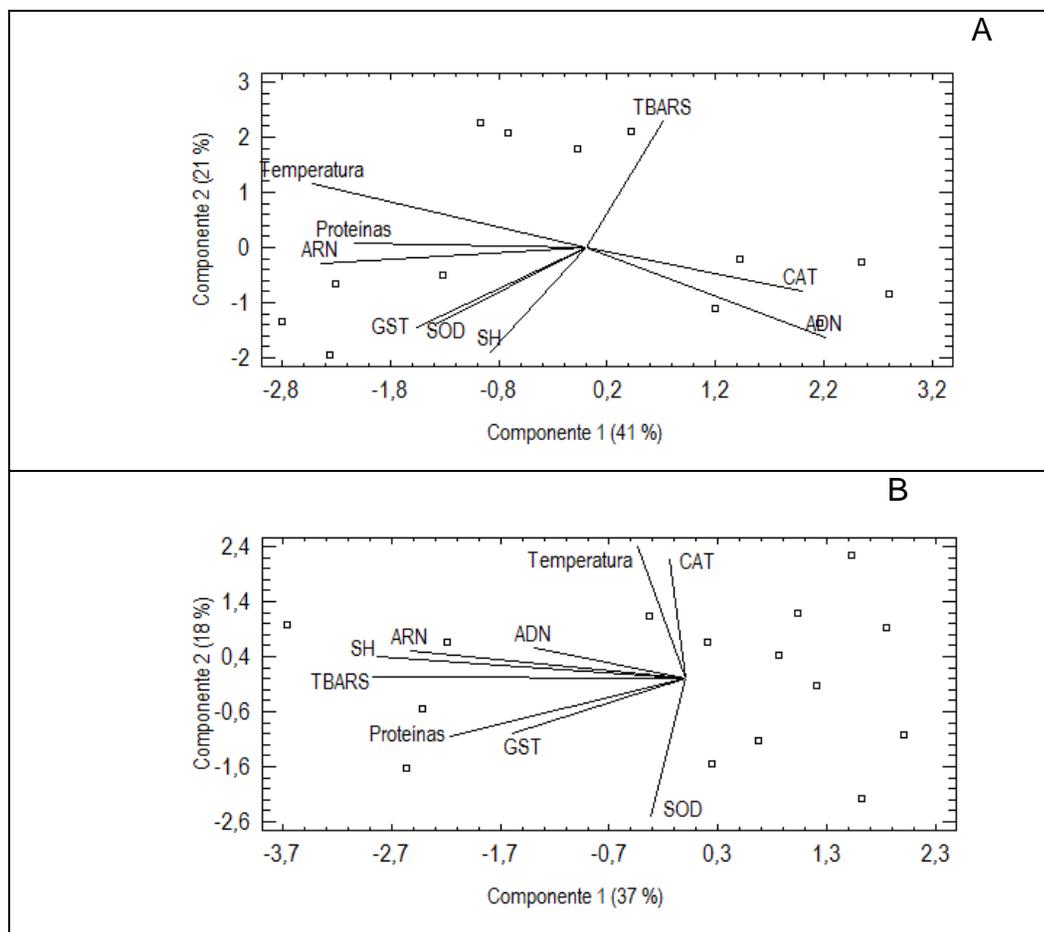


Figura 20. Proyección ortogonal de la temperatura del agua con las variables biológicas en el espacio definido por los dos primeros componentes del ACP para las actividades enzimáticas en poblaciones naturales de *P. imbricata* observada durante el periodo de surgencia (A) y en relajación (B), desde abril 2017 hasta enero 2018. En la Localidad de Merito, Municipio Cruz salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. CAT: Catalasa, SOD: súper óxido dismutasa, GST: Glutación S-Transferasa, -SH: tioles totales, TBARS, ARN, ADN, Proteínas, Temperatura del agua.

Al correlacionar los coeficientes de condición fisiológica y los parámetros biométricos en la época de surgencia, el análisis de componentes principales (ACP) demostró que existe una estrecha asociación fisiológica entre ellos. En este caso se extrajeron 3 componentes, ya que estos tenían valores propios mayores o iguales a 1,0, representando el 94% de la variabilidad de los datos originales. El componente 1 (50,8%) se correlaciona de forma positiva con el peso total, peso seco, peso húmedo, grosor y alto, no existe correlación negativa, mientras que el componente 2 (20,5%) se correlaciona positivamente con ARN:ADN y PT:ADN (Fig.21-A). Durante la época de relajación se extrajeron 2 componentes los cuales cuantifican el 96% de la variabilidad de los datos totales, el componente 1 (71,9%) correlaciona de manera positiva las variables biométricas, siendo más fuerte entre peso total, grosor y peso seco, mientras que en el componente 2 (24,6%) se correlacionan negativamente los cocientes moleculares (Fig. 21-B).

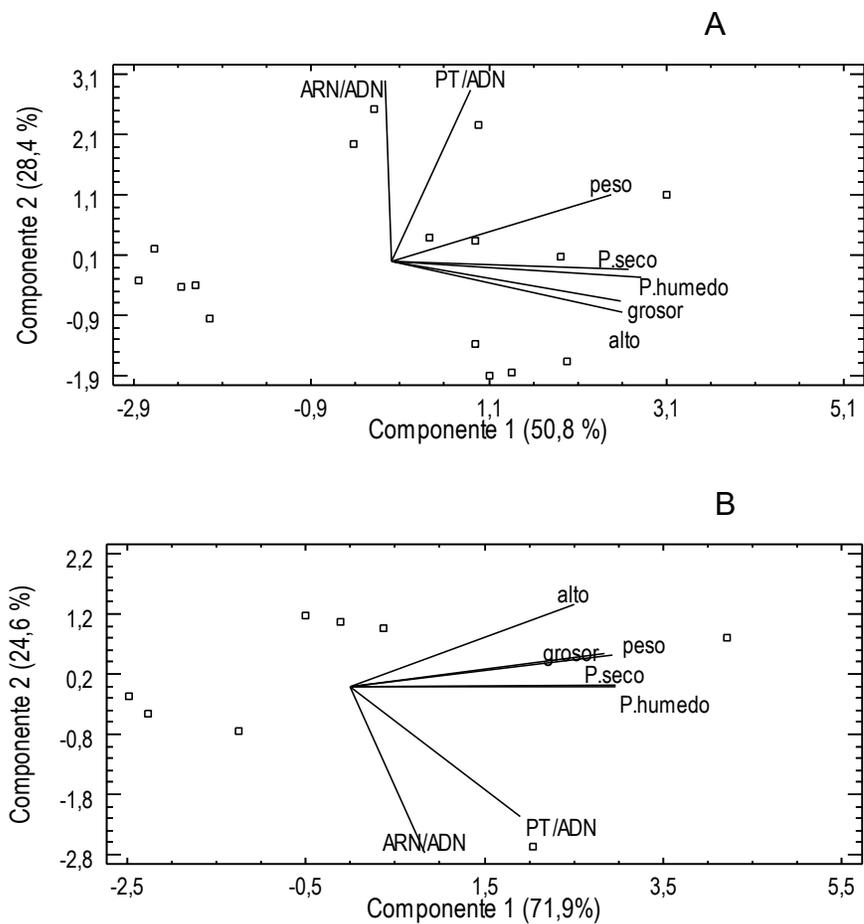


Figura 21. Análisis de componentes principales entre los coeficientes de condición fisiológica de *P. imbricata* (ARN:ADN y PT:ADN) con los parámetros biométricos, de la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre, Venezuela. A: surgencia, B: Relajación.

DISCUSIÓN

La actividad de la CAT es de gran importancia, ya que neutraliza la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una sustancia altamente oxidante. La enzima CAT se encarga de la descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno, evitando así que se forme el radical hidroxilo y el radical superóxido, especies de oxígeno que son muy reactivas, representando una protección del daño lipoperoxidativo (ALVES DE ALMEIDA *et al.* 2007). En nuestro estudio, el incremento de la CAT es un claro marcador de producción de peróxido de hidrógeno (JARAMILLO & VALDIVIA 2016).

Considerando que el ciclo reproductivo de la especie ocurre durante todo el año, lo que la caracteriza como una reproducción continua, esta condición conduce a una diversidad de respuestas fisiológicas debido a la integración funcional de los tejidos en su metabolismo energético. Es bien conocido que la enzima CAT descompone H_2O_2 a $2H_2O$ y O_2 , limitando la sobreproducción de radicales libres de alta toxicidad, tal como OH^* (STOREY 1996).

Aunque un incremento en la catalasa es un claro marcador de producción de EROs (JARAMILLO & VALDIVIA 2016), se conoce que los cambios en las actividades de la CAT pueden sobrevenir como respuesta bioquímica a los ajustes fisiológicos. A partir de los valores en la actividad de la enzima catalasa se puede inferir que no existió un incremento en la producción de ERO en especial H_2O_2 , mediado por el metabolismo de compuestos orgánicos. La mayor actividad en abril se debe posiblemente a restos celulares del desove. La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste metabolismo aerobio-energético e integración funcional de

los tejidos (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2017). Además, los cambios de temperatura que ocurren en el golfo de Cariaco, desde abril (22,82 °C) y hasta en noviembre (28,11 °C), pueden tener incidencia sobre el estatus antioxidante de *P. imbricata*. La capacidad de respuesta de esta enzima forma parte de las respuestas de ajustes fisiológicos por aumento de ERO, vinculado posiblemente con una elevada tasa metabólica y respiración celular (ABELE & PUNTARULO 2004).

NUSETTI *et al.* (2004) reportaron un aumento de la catalasa en la glándula digestiva de *P. imbricata*, cuando fue sometida a contaminantes de hidrocarburos, sugiriendo una respuesta de defensa contra el desarrollo de un estado de estrés oxidativo presumiblemente asociado con una excesiva producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2). La CAT descompone el H_2O_2 en H_2O y O_2 , limitando así la producción celular de OH por reacciones cíclicas redox; la glutatióna reductasa genera glutatióna reducida para su utilización en diversas reacciones antioxidantes, tales como la conjugación con radicales libres, agente reductor de peróxidos orgánicos y H_2O_2 a través de la actividad de GPx, y cofactor de GST (FRIDOVICH, 1998; LIVINGSTONE 2001).

La SOD permite la destrucción del radical anión superóxido mediante dismutación del H_2O_2 tratado por CAT. Las dos enzimas, SOD y CAT tienen la misma localización en la célula, los peroxisomas (MANDUZIO *et al.* 2005; WANG *et al.* 2018). Particularmente, los cambios en las actividades de la CAT en la glándula digestiva y SOD en el músculo pueden sobrevenir como respuesta bioquímica de compensación por la sobreproducción de radicales libres (LIVINGSTONE 2001). La superóxido dismutasa (SOD), es una de las enzimas más activas producidas por los organismos aerobios, lo que refleja su ligero aumento en el músculo, considerando su papel energético

(YAKIMOV *et al.* 2018).

La glutatona S- transferasa (GST) ha sido propuesta como biomarcador de contaminación mediada por estrés oxidativo y su inducción como respuesta ante la exposición de contaminantes (DÍAZ *et al.* 2004), por lo que su baja actividad durante todo el muestreo sugiere una buena aclimatación de *P. imbricata* al medio ambiente donde fue colectada y pudiera indicar una escasa contaminación en el sitio del estudio. La enzima GST, cataliza la conjugación del glutatión (GSH) a una variedad de sustratos y es capaz de convertir xenobióticos hidrofóbicos en compuestos hidrofílicos que pueden ser excretados fácilmente para proteger macromoléculas biológicas. Además, también tiene la función de la eliminación de hidroperóxidos (Jaramillo y Valdivia, 2016). La GST ha sido estudiada en moluscos-bivalvos, y se ha observado que los niveles incrementan en función de la actividad antioxidante del organismo (ALVES DE ALMEIDA *et al.*, 2007).

Los valores de TBARS son indicadores claves de la peroxidación lipídica, están relacionados con la formación de especies reactivas del oxígeno tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo, lo que ofrece información acerca de la generación de peróxidos lipídicos que pueden perturbar la eficiencia antioxidante y causar alteraciones oxidativas (peroxidación) de las membranas biológicas (CÉSPEDES Y CASTILLO 2008; FASSCIANO *et al.* 2012; ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2014).

El incremento de las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) durante los meses de noviembre-diciembre, tanto en glándula digestiva como en músculo de *P. imbricata*, pudiera estar estrechamente ligado con el aumento de la temperatura, ocasionando efectos perjudiciales a nivel celular y bioquímico, lo que sugiere el desarrollo de estrategias bioquímicas de defensa contra la acción de EROs, entre estas, respuestas

compensatorias antioxidantes para proteger la viabilidad funcional del tejido y los procesos fisiológicos (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2017).

Un estudio semejante, señala niveles similares de malondialdehído (MDA) en la glándula digestiva de *P. imbricata* expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles, mostrando un ligero incremento en las concentraciones de MDA, en las ostras expuestas a la concentración más alta, siendo estos desechos contaminantes responsables de ocasionar daños oxidativos en la membrana lipídica (ZAPATA- VÍVENES *et al.* 2024).

De la misma manera, SÁNCHEZ (2013) reportó, incrementos significativos en los niveles de TBARS en *Perna viridis* (mejillón verde), bajo condiciones de anhidrobiosis y anoxia, tales valores pueden ser aumentados con la exposición a metales pesados como Cu y Cd. No obstante, en *P. viridis* no encontraron variabilidad en los niveles de TBARS, bajo exposición aguda de Cd, destacando la tolerancia de esta y otras especies a condiciones de estrés ambiental (ZAPATA- VÍVENES *et al.* 2014).

En estudios realizados por ZAPATA- VÍVENES *et al.* (2017), en el poliqueto *Eurythoe complanata*, también fueron asociadas las variaciones de la temperatura ambiental con incrementos de TBARS. Entre diciembre 2009 a octubre 2010 se produjeron cambios significativos en la peroxidación, con máximos en octubre, asociados al aumento en la temperatura del mar. Por otro lado, los ascensos de la temperatura del agua en los períodos de estratificación o baja productividad, también pueden estimular los procesos reproductivos y regeneración de tejidos en algunos organismos marinos. Al parecer, los procesos fisiológicos donde se vincula una elevada tasa metabólica existe la posibilidad de conllevar a una condición de estrés oxidativo (SCHVEZOV *et al.* 2015).

Uno de los procesos fisiológicos que puede demandar ciertos ajustes metabólicos en el organismo, es la reproducción. Urban (2000) y Marcano (1984) para el Caribe, señalaron que *P. imbricata* presenta dos picos reproductivos (reproducción bimodal) entre enero-junio y septiembre-diciembre. De la misma manera, León *et al.* (1996) en la Isla de Margarita (Venezuela) y Kimani *et al.* (2006) en Kenya reportan que esta especie se reproduce todo el año, con un máximo en noviembre-diciembre, coincidiendo con el aumento de las TBARS reportado en esta investigación, lo que apunta que estos ajustes metabólicos pueden estar correlacionado con el estadio reproductivo del organismo. Es decir, el estrés oxidativo se desarrolla independientemente de la magnitud del factor de estrés, ya sea por la falta de oxígeno, los cambios de temperatura, la salinidad, el pH, el efecto de los contaminantes, o periodo reproductivo (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2014).

Es bien conocido que los radicales tioles (-SH) forman parte fundamental del sistema de defensa antioxidante molecular, maquinaria bioquímica encargada de mantener los niveles de radicales libres u oxiradicales a condiciones fisiológicamente aceptables (GORBI *et al.* 2008). Estos grupos funcionales, contentivos tanto en proteínas como en el glutatión reducido (GSH), son sustancias con potencialidades antioxidantes, las cuales actúan como amortiguadores redox (KOVÁČOVÁ & SVOBODOVÁ 2009). La contribución de estos grupos tioles, en conjunto con las enzimas antioxidantes ayudan a mantener la homeostásis en condiciones de vida estresantes (estrés por temperatura, variación de los niveles de oxígeno ambiental, variación de la salinidad, contaminación química, etc.). Estas condiciones de estrés requieren energía adicional para la síntesis de protección antioxidante, así como para la recuperación, degradación y síntesis de componentes celulares que han sufrido daño oxidativo. No obstante, el gasto de energía para mantener los procesos vitales en

condiciones de estrés ralentiza los procesos de crecimiento y reproducción (SOKOLOVA *et al.* 2012).

De esta manera, se puede evidenciar inducción en los valores de -SH para enero-2018, en respuesta al incremento en TBARS, (que indica que las membranas celulares pueden verse comprometidas), mostrado en los meses anteriores (noviembre y diciembre 2017), pudiendo deberse esto como resultado del proceso de recuperación y adaptación a las variantes en la temperatura y cambios reproductivos. Además, se detectaron mayores contenidos de tioles en la glándula digestiva que en el músculo.

En concordancia con este estudio, se han hallado diferencias significativas en las concentraciones de -SH en glándula digestiva del mejillón *P. viridis*. ZAPATA-VÍVENES *et al.* (2014) hallaron concentraciones elevadas de grupos -SH en este tejido, en mejillones colectados en San Antonio del Golfo, contrario al incremento en niveles de TBARS, detectados en los mejillones de Chacopata-Guayacán y Rio Caribe en Venezuela. Posiblemente esta situación se corresponda a un desajuste de las respuestas moleculares. De la misma manera, *P. viridis* sometido a diferentes condiciones experimentales: exposición a metales, cambios de oxigenación (anoxia y anhidrobiosis) y recuperados en normoxia, mostraron diferencias significativas en las concentraciones de grupos -SH en la glándula digestiva (SÁNCHEZ 2013).

Sin embargo, en otros organismos, no se observaron diferencias entre los niveles de tioles totales (-SH). En *Eurythoe complanata*, las concentraciones de -SH en la pared corporal del poliqueto no mostraron diferencias significativas, tanto colectados en el ambiente como los expuestos a distintas temperaturas (24 y 28°C) y entre meses (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2017). Al parecer, este marcador molecular presenta poca

variación estacional, aunque pueden ser modificados por otros factores externos o fisiológicos. De igual manera, en el gasterópodo *P. patula*, este marcador en tejido blando, no varió significativamente, la condición antioxidante que posee en la defensa de contaminantes y especies reactivas de oxígeno (YSTAMBOULI 2019).

ISTOMINA *et al.* (2021) encontraron que los niveles de GSH de *Mytilus edulis* recolectadas en hábitat natural estaban cerca o eran más altos en la glándula digestiva que en branquias, destacando que la distribución tisular específica de los antioxidantes es un fenómeno relativo que puede variar ampliamente según la estación y el estado reproductivo de la especie.

Los niveles de ADN, ARN y proteínas y sus cocientes relacionados han sido considerados como indicativos del estado de la condición fisiológica en bivalvos (BECKER *et al.* 2005). El contenido de ADN es estable e indicativo del número de células o del crecimiento por proliferación celular, el índice ARN/ADN, indica actividad metabólica asociada a la síntesis de proteínas, reflejado en un crecimiento por aumento de volumen (CLEMMESSEN *et al.* 1997).

La relación ARN/ADN genera un índice del metabolismo celular y ha sido empleado como una medida de la tasa de crecimiento, condición nutricional de los individuos, tasa metabólica del tejido y de la condición fisiológica del organismo (ZAPATA-VÍVENES *et al.* 2020; ANTÓN *et al.* 2008; HAIDER *et al.* 2020). El cociente ARN/ADN es un buen predictor de la tasa de crecimiento, y es especialmente sensible a la disponibilidad de alimento en el medio, disminuyendo en los periodos de estivación (YEUNG & LEUNG 2013).

P. imbricata presentó promedios elevados en el índice ARN:ADN durante el periodo de surgencia (agosto a noviembre y enero), lo que indica

una condición de salud y crecimiento asociado a la temporadas de mayor disponibilidad de alimento. Los cocientes ARN/ADN y Proteína/ADN, evidenciaron niveles de macromoléculas entre los rangos de normal crecimiento para especies de moluscos. Los valores obtenidos confirman la condición de salud y crecimiento normal de los organismos estudiados, es decir poseen condiciones fisiológicas y corporales óptimas. En otros casos, Villegas *et al.* 2015, destacan la adaptación que tiene esta especie a condiciones de contaminación, encontrando que la relación ARN/ADN no mostró efectos significativos, aun estando expuesta al Cd.

P. viridis expuestos a Cd, se reportó un descenso significativo del índice de condición fisiológica ARN/ADN, a la concentración más elevada del metal. A diferencia de los mejillones no expuestos al cadmio, los cuales presentaron los niveles mayores de ARN/ADN, acompañado por síntesis de proteínas, sugiriendo mejor condición fisiológica con respecto a los organismos expuestos (ACOSTA *et al.* 2013). De la misma manera, en *Donax denticulatus*, disminuyó la concentración de ARN y el cociente ARN/ADN expuestos a dosis subletales de cadmio, ambos parámetros, asociados con el aumento de la concentración del metal al que fueron expuestos (ANTON *et al.* 2008).

El índice PT:ADN muestra un aumento continuo de división celular e incremento constante en la síntesis de proteínas, durante los meses de estratificación, en contraste, fue observado un incremento de la síntesis de proteínas al descender la temperatura (surgencia). La temperatura es un factor determinante sobre la actividad metabólica y las biomoléculas implicadas en el crecimiento (PT, ARN y ADN).

Las respuestas antioxidantes y de marcadores de estrés oxidativos de la ostra perla *P. imbricata* indican que tiene una alta capacidad de síntesis de macromoléculas asociadas con el crecimiento y regeneración de tejidos, los

cuales mantienen la homeostasis y capacidad de compensación a las condiciones ambientales y respuestas fisiológicas. Considerando las condiciones ambientales normales, se puede justificar la alta capacidad de síntesis de macromoléculas, aunado a que los promedios se mantienen similares durante todo el período de estudio, en ambos tejidos.

Estudios como el de ZAPATA-VIVENES *et al.* (2015) muestran cambios en los niveles de macromoléculas energéticas e índices moleculares ARN/ADN y PT/ADN que evidencian ajustes bioquímicos de importancia en el manto de *Lima scabra*, asociados a un incremento en la síntesis de proteínas como respuesta de defensa molecular.

La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste metabolismo aerobio- energético e integración funcional de los tejidos. Además, los promedios observados en los índices moleculares se evidencian un estado fisiológico óptimo para los organismos.

Los factores ambientales pueden influenciar directamente sobre los cambios de las respuestas bioquímicas de los organismos y variar considerablemente entre los períodos de surgencia costera y relajación, como una respuesta a los cambios mostrados por la temperatura del agua y la clorofila, las cuales a su vez están estrechamente relacionadas con los coeficientes de condición fisiológica. La época de surgencia se caracterizó por temperaturas entre (22,82 – 23,77 °C, mientras que el período de relajación (25,25- 28,11°C), destacando la relación inversa entre la clorofila y la temperatura. La asociación entre los factores ambientales estudiados y los índices de condición fisiológica, sugiere dependencia. La asociación inversa entre la CAT y la temperatura, además de la baja actividad de la enzima, sugiere la ausencia de estrés oxidativo.

CAPÍTULO III

**GAMETOGÉNESIS Y ANÁLISIS HISTOQUÍMICO DE LAS
GÓNADAS Y GLÁNDULA DIGESTIVA DE LA OSTRA PERLA**

***Pinctada imbricata* (Röding, 1758)**

Longart R. Yelipza del C. 2024. Gametogénesis y Análisis Histoquímico de las Gónadas y Glándula Digestiva de la Ostra Perla *Pinctada imbricata* (Röding, 1758). **Trabajo especial de grado. Universidad de oriente, Núcleo de Sucre. pp. 83-109.**

RESUMEN

Pinctada imbricata (Röding, 1798), conocida como ostra perla, es un recurso pesquero de la región nor oriental de Venezuela, con gran importancia económica por la producción de perlas, consumo humano y usos en acuicultura. Es abundante en las costas Nororientales de América del Sur y se distribuye en el Océano Atlántico desde Carolina del Norte hasta Brasil, su tiempo de vida es de aproximadamente tres años, y se reproduce a partir del octavo mes de fijación con varios desoves al año. Con propósito de analizar la histoquímica y el ciclo reproductivo de la especie, se describen las oscilaciones de las reservas de lípidos y carbohidratos en la glándula digestiva durante la primera madurez sexual de la ostra perla usando microscopía de luz de alta resolución y tinción con azul de toluidina, en relación con el índice ARN/AND. Se disectaron muestras de la glándula digestiva y la gónada de 41 ejemplares provenientes de El Merito (Golfo de Cariaco). Se estimó el área de cobertura de los lípidos (índice lipídico, IL) y carbohidratos (índice glucídico, IG), Los ácidos nucleicos se cuantificaron en la glándula digestiva por métodos espectrofotométricos. Se identificaron hembras en los estadios de gametogénesis (II), madurez (III) y desove (IV), y machos en gametogénesis (II); en ambos sexos los acinos están entremezclados con el tejido conjuntivo, presentando escasos gametos en diferentes estadios de desarrollo; en los machos las espermatogonias y espermatocitos secundarios se identificaron en acinos dilatados; en hembras se observaron ovogonias, ovocitos pedunculados, ovocitos y ovocitos atrésicos. El índice de lípidos y ARN/ADN presentaron un patrón similar con valores máximos en el estadio de madurez (III) seguido de una caída en el desove (IV), mientras que el índice de glucídicos disminuyó con los estadios de madurez, detectándose diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre estadios de maduración y sexos. Se demostró que los índices histoquímicos y el biomarcador de actividad celular (relación ARN/ADN), son buenos indicadores de la condición fisiológica en ambos sexos y entre los estadios de maduración sexual, con aplicaciones en programas de producción acuícola para la engorda y obtención de gametos, donde la transferencia de energía entre la glándula digestiva y la gónada integran activamente sus rutas metabólicas.

Palabras Claves: *Pinctada imbricata*, histoquímica, ciclo reproductivo, biomarcador.

INTRODUCCIÓN

Los bivalvos marinos constituyen un grupo de invertebrados de distribución cosmopolita, que tienen con un rol importante en las comunidades marinas. Es un recurso que es usado con diferentes propósitos como una fuente de proteína animal para la población humana que no requiere piensos, representan el principal ingreso y medio de vida de muchas comunidades. La concha, al igual que todo el Phylum Mollusca, adquiere alto valor para coleccionistas; siendo la materia prima en procesos industriales por el alto contenido de carbonato de calcio; es usada con fines artesanales, ornamentales, bisutería y en el oriente de Venezuela es usado en tradiciones religiosas como la Cruz de Mayo (SALAYA 1999).

Se tienen reportes de uso como recurso alimenticio por las civilizaciones Persa, Egipcia y Griega, antes del imperio Romano, donde fueron usados como herramienta en la industria cerámica del Oeste mediterráneo y en la llamada fase Cardinal del Neolítico inicial (CARGNINFERREIRA & SARASQUETE 2008). Desde los inicios de la civilización, el mercado internacional se basó en la extracción de perlas naturales, y posteriormente se desarrollaron los métodos de cultivo para la producción de perlas, mabe y uso del nácar.

La zona nororiental de Venezuela posee una gran riqueza de especies de bivalvos, con bancos naturales de Venéridos, Arcidos, Mytilidos, Pectínidos y Pteridos, que son explotados artesanalmente. Estos han sido estudiados en aspectos como los ciclos biológicos, ecología, reproducción y algunas se han usado para el desarrollo de las técnicas de cultivo, como el mejillón marrón *Perna perna*, el mejillón verde *Perna viridis*, los pectínidos *Euvola ziczac*, *Nodipecten nodosus* y las ostras perleras *Pteria colymbus* y

Pinctada imbricata (SEMIDEY *et al.*2010).

Las ostras productoras de perlas pertenecen a la familia Pteridae, y se encuentran distribuidas en ambientes tropicales y subtropical, con especies que pueden ser aprovechadas integralmente para la obtención de la carne y del nácar. La industria perlífera se basa de la extracción y en el cultivo orientado para la obtención de perlas de alta calidad (BONDAD-REANTASO *et al.* 2007). El nácar es utilizado en la industria cosmética y farmacéutica para la elaboración de cremas, mientras que, en las especies del Pacífico el músculo abductor se destina para el consumo fresco o procesado, y el resto del cuerpo para la alimentación y engorda de animales de importancia comercial (MONTEFORTE 1996; SAUCEDO *et al.* 2001).

La ostra perla *Pinctada imbricata* pertenece al orden Pteroida, familia Pteriidae. Son organismos gonocóricos, y pueden presentar hermafroditismo protándrico, en respuesta de factores endógenos y variaciones en las condiciones ambientales, tanto de poblaciones naturales como en cultivo (SAUCEDO & SOUTHGATE 2008). Generalmente, presentan conchas redondeadas, frágiles, nacaradas en el interior, y el exterior el periostraco tiene colores que varían desde marrón, amarillo y verde, con una longitud total de la concha que oscila entre 38 y 98 mm. Es abundante en la costa nororiental de América del Sur, forman densos bancos en el Mar Caribe, tanto en Colombia como en Venezuela. Se distribuye en el Océano Atlántico desde Carolina del Norte (Estados Unidos) hasta Brasil, a poca profundidad en zonas de rocas, corales, conchas y praderas de *Thalassia* sp. (LODEIROS *et al.* 1999). En el oriente de Venezuela se consume el organismo completo, siendo un subproducto de la pesca de arrastre de la pepitona *Arca zebra*. La especie fue muy importante en el Caribe debido al interés que históricamente despertó la producción de perlas, no obstante, ofrece un interés dual por el

consumo de la carne y la producción de perlas en el medio ambiente (MACKENZIE *et al.* 2003).

La posibilidad y el éxito del cultivo de un bivalvo dependen del conocimiento del ciclo reproductivo, lo cual resulta esencial para la comprensión de la historia vital de la especie, así como para proveer información para la gestión de pesquerías y el desarrollo de la acuicultura (LODEIROS & FREITES 2008; MÁRQUEZ *et al.* 2011). En los bivalvos marinos, la reproducción es cíclica y comprende una secuencia de estadios de desarrollo de los gametos (DANIEL-LEMUS *et al.* 2014), mostrando ciclos de duración e intensidad de la actividad reproductora según la interacción con factores exógenos como la temperatura, alimento, fotoperiodo y salinidad, y endógenos de tipo endocrino y neuronal (SUÁREZ- ALONSO *et al.* 2007).

Conocer el ciclo reproductivo de los bivalvos permite predecir los periodos de reclutamiento, estimar la mejor época para la obtención de semilla, hasta conformar la población adulta, establecer vedas y determinar la talla mínima de captura. En Venezuela, el ciclo reproductivo de *P. imbricata* es continuo todo el año, lo cual permite reclutar juveniles para ser utilizados como semilla en los cultivos (LODEIROS *et al.* 2011).

El ciclo reproductivo de los bivalvos ocurre por la interacción entre la disponibilidad, almacenamiento y uso de energía de los tejidos de reserva, en respuesta a factores endógenos como la liberación de hormonas, receptores intracelulares, expresión de genes y exógenos asociados a cambios en el medio ambiente que varían intra e inter específicamente y entre poblaciones de la misma especie (EPP *et al.* 1988; BARBER & BLAKE 2006).

El desarrollo gonádico se inicia a partir de un epitelio germinal de origen mesodérmico, que permanece latente en el tejido conjuntivo después de

cada período reproductivo. El ciclo reproductivo comprende en ambos sexos estadios de desarrollo gonadal, que se basan en las características de los acinos y el desarrollo de los gametos en los estadios: indiferenciado (I), desarrollo activo (II), madurez (III), desove (IV) y regresión (V) (SOUTHGATE & LUCAS 2008).

Los tejidos de almacenamiento de energía se encuentran sujetos a variaciones estacionales, tanto en su composición bioquímica, como en su estructura celular, por lo general en relación con el ciclo sexual. La actividad de los tejidos de reserva puede ser dividida en dos fases: (1) almacenamiento de nutrientes y, (2) movilización de los nutrientes. Los mecanismos involucrados en estas dos fases, así como la naturaleza bioquímica del material almacenado, varían también entre las especies y poblaciones de una misma especie (MATHIEU & LUBET 1993). Además de la utilización directa y movilización de los principales componentes para satisfacer la demanda metabólica y estructural, se dan procesos de transformación y síntesis de estos metabolitos, como es el caso de la lipogénesis a partir de carbohidratos (glucógeno) del músculo (GABOTT, 1983; RACOTTA *et al.* 1998).

Entre los tejidos de almacenamiento, el músculo aductor es el órgano más importante en cuanto almacenamiento de glucógeno y proteínas en Pectínidos, mientras que la glándula digestiva funciona como sitio de almacenamiento de lípidos en grupos como Venéridos, Arcidos, Mitilidos, Pteridos (BARBER & BLAKE 2006, RACOTTA *et al.* 1998). Igualmente se ha sugerido que el manto puede tener un rol secundario como tejido de reserva en algunos bivalvos (BAYNE *et al.* 1982; GABOTT 1983; GABOTT & PEEK 1991). En términos de almacenamiento de nutrientes, en la mayoría de los bivalvos, los carbohidratos son las macromoléculas encargadas del suministro

inmediato de energía. El almacenamiento de proteínas es importante también, particularmente para la construcción del vitelo durante la gametogénesis (MACKIE 1984). Los lípidos tienen funciones importantes como elementos estructurales de las membranas celulares, así como metabolitos que contribuyen a la viabilidad de los gametos y el éxito del desarrollo embrionario y larvario (GALLAGER & MANN 1986).

Estructuralmente, en la gónada y en la glándula digestiva se han identificado dos tipos de células encargadas de hacer la transferencia de metabolitos de los tejidos de reserva a los gametos (MATHIEU & LUBET 1993). Las células adipogranulares (ADG) y las células vesiculares del tejido conectivo (CVT) integran el tejido conectivo de la glándula digestiva y la gónada están encargadas de acumular reservas y transferir a los órganos; la ADG contiene glucógeno, gránulos de proteínas e inclusiones lipídicas, y las CVT están especializadas en la acumulación de glucógeno y lípidos (MATHIEU & LUBET 1993). BENINGER *et al.* (2003) demostraron en *Pecten maximus* que en el asa intestinal ocurre la transferencia de nutrientes del intestino hacia los hemocitos, que a su vez se asociaron con fibras de tejido conectivo de la base del epitelio intestinal hacia los acinos gonadales. La transferencia de nutrientes de los órganos de reserva o de transformación de los nutrientes ha sido estudiado en algunas especies de bivalvos, tales como *Pinctada imbricata*, *P. mazatlanica*, *Euvola ziczac* entre otros (GABBOT 1983, LUBET *et al.* 1987, GÓMEZ 2008, ROMERO-FERREIRA *et al.* 2016).

La glándula digestiva es el órgano encargado de la digestión intracelular y extracelular de los nutrientes. En su citoarquitectura posee un tejido conectivo, que ocupa los espacios del sistema digestivo y está formado por dos tipos de células; las células cilíndricas de naturaleza acidófila son las más comunes, estas poseen microvellosidades apicales e inclusiones

lipídicas, y las células piramidales que son basófilas, y se localizan solas o en grupos de dos o tres células y no están en contacto con el lumen (LOBO DA CUNHA 2000). Las células digestivas están integradas en túbulos en contacto con el estómago por túbulos primarios y secundarios ramificados ciegos, separados del tejido conectivo y músculo por una membrana basal (TAÏEB 2000).

Es posible determinar la condición reproductiva de los bivalvos, así como la movilización de las reservas energéticas durante la gametogénesis, mediante técnicas bioquímicas, histológicas e histoquímicas de una variedad de sustratos como; enzimas, glucógeno, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, lípidos y carbohidratos (ARRIECHE *et al.* 2002; CASTILLO *et al.* 2013). Los ácidos nucleicos representan a biomarcadores de actividad metabólica (ARN/ADN), que contribuyen a la comprensión del estado fisiológico y nutricional de los organismos en su ambiente natural, lo cual resulta de utilidad en la evaluación del crecimiento de organismos acuáticos. El contenido de ADN es un factor biológico estable que indica el crecimiento por proliferación celular, mientras que la relación ARN/ADN indica la actividad metabólica asociada a la síntesis de proteínas, donde se refleja en un crecimiento por aumento de volumen (GIL & TOMÉ 2004; CHÍCHARO & CHÍCHARO 2008).

Sobre *P. imbricata* se ha estudiado el crecimiento, supervivencia, ciclo reproductivo y gametogénesis (URBAN 2000; LODEIROS *et al.* 2002; ROMERO-FERREIRA *et al.* 2016), almacenamiento, utilización y transferencia energética entre la gónada y la glándula digestiva, los cuales son tejidos que mantienen una estrecha relación funcional y metabólica (MATHIEU & LUBET 1993), donde la acumulación de energía es continua con oscilaciones estacionales (ROMERO-FERREIRA *et al.* 2016). MOUKRIM *et al.* (2008) observaron que las

células vesiculares y las células adipogranulares tienen un ciclo estacional según la gametogénesis. En *Crassostrea gigas* la escasez de carbohidratos durante la gametogénesis afecta la formación de gametos y la mortalidad natural (JOUAUX *et al.* 2013).

El propósito de este trabajo consiste en estudiar y asociar las oscilaciones de las reservas energética de la gónada y la glándula digestiva de la ostra perla *Pinctada imbricata*, mediante el estudio de los indicadores de la actividad metabólica expresados en los diferentes estadios de maduración sexual de ambos sexos. Esta información es propicia para dilucidar los mecanismos de transferencia de energía, que son fundamentales para la producción de gametos y la maduración sexual, como un aporte al conocimiento de las estrategias reproductivas que beneficiarían a desarrollar planes de cultivo, obtener mayor beneficio para el consumo fresco y proponer estrategias de conservación para la protección del recurso.

METODOLOGÍA

Área de Estudio

El sitio donde se desarrolló este estudio se encuentra ubicado en la localidad de Merito, municipio Cruz Salmerón Acosta del golfo de Cariaco, Sucre, Venezuela. Se recolectaron ejemplares de *P. imbricata* del medio ambiente en el lapso abril -2017 - enero 2018, por medio de buceo libre y se trasladaron en contenedores isotérmicos al laboratorio de Histología del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas.

Recolección y Procesamiento de Muestras Biológicas

En el laboratorio los ejemplares se mantuvieron en agua de mar aireada. Para obtener los tejidos, se realizó una incisión con un cuchillo de hoja plana para separar el músculo aductor de la concha, sin romper los órganos; los tejidos se extrajeron en una cubeta con hielo triturado para mantenerla a baja temperatura. Esta se separó de la glándula digestiva, que está en la porción posterior del organismo, y la misma tiene forma de saco alargado con un color característicos marrón verdoso. Seguidamente se conservó en congelación (-4°C) en viales rotulados hasta su procesamiento. De cada organismo se cortó con un bisturí una porción de la glándula digestiva/gónada para estabilizar los componentes celulares en glutaraldehído (2,5%), previamente preparado en amortiguador fosfato salino (0,5 M; pH 7,8; 1 020 mOsmol; 90 min, 4°C), seguido de post-fijación en tetróxido de osmio (1%), y finalmente procesada por las técnicas convencionales de microscopía de luz visible de inclusión en resina epóxica (TURNER & BOYLE 1975).

Técnicas Histológicas para Microscopía de Luz Visible

Para microscopía de luz visible: los tejidos una vez fijados se lavaron 3 veces con agua destilada, continuando con la deshidratación en una serie de alcoholes crecientes (70, 80, 90, 95, 100, 100%), seguido de la sustitución del agente deshidratante por el agente de transición óxido de propileno (OP). Este último es miscible en el medio de inclusión en las proporciones, 3:1, 1:1, 1:3 y OP con el objetivo función de sustituir el alcohol. Seguidamente los tejidos fueron mezclados con resina Embed 812 en tres proporciones crecientes de resina, 3:1, 1:1, 1:3, por 30 minutos cada uno. Para la infiltración de la resina se realizaron varios cambios durante 18-24 horas, para luego colocar las muestras en moldes de silicón, cubriendo cada una con resina epóxica, y se polimerizó en la estufa a 60°C por 48 horas. Los bloques de resina se tallaron en un ultra micrótopo Reichert-Jung Ultracut E, eliminando el exceso de resina hasta exponer el tejido en un área aproximada de 1mm³. Se obtuvieron cortes de 700nm de grosor que fueron recogidos en láminas portaobjetos, y se fijaron con calor en una plancha de calentamiento (60-70°C), y se tiñeron con azul de Toluidina (1%). Para identificar los sustratos energéticos se obtuvieron varias láminas portaobjetos con cortes de cada muestra (MERCER & BIERBECK 1979).

Técnicas Histoquímicas

Para evaluar las reservas energéticas se observaron los adenómeros de la glándula digestiva teñidas con azul de toluidina que es un colorante metacromático y tiene las propiedades de identificar las estructuras celulares por su afinidad y carga eléctrica, que permite identificar grupos lipídicos de bajo peso molecular por su tinción azul tenue uniforme, además de identificar carbohidratos del tipo del glucógeno por su tinción roja. Las secciones teñidas se digitalizaron usando una cámara acoplada al microscopio,

obteniendo las imágenes en las mismas condiciones de iluminación (apertura de diafragma) y exposición.

Índices Moleculares

Se obtuvo un gramo de tejido la glándula digestiva y se homogeneizó con 10 ml de buffer salino ($\text{KHPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) sobre hielo picado (4°C). Se centrifugó la suspensión a 5 000 rpm por cinco minutos, y se trasvasó el sobrenadante para la cuantificación de ARN y ADN. Se resuspendió el sedimento en NaCl 2 mol/l, hasta obtener un volumen de 1 ml, se homogeneizó y centrifugó (5 000 rpm por 5 minutos), se descartó el precipitado y el sobrenadante que contiene el ADN se colocó en un tubo con 1 ml de agua destilada.

Cuantificación de ARN

El ARN se determinó por el método de revelación de orcinol (CAMPBELL Y SARGENT 1969). Se empleó como patrón de referencia ARN de levadura (*S. cereviceae*). Se colocó 1 ml de cada muestra con 4 ml de orcinol y se llevó a baño caliente ($\sim 90^\circ\text{C}$) durante 20 minutos, se dejó reposar y se midió la absorbancia a 595 nm. Se estimó en μg de ARN por gramo de masa húmeda.

Cuantificación de ADN

El ADN se determinó mediante la reacción de difenilamina (BURTON 1956). Se empleó ADN de timo de bovino como sustancia de referencia. Se colocó 1 ml de muestra con 4 ml de difenilamina y se llevó a baño caliente ($\sim 90^\circ\text{C}$) durante 30 minutos, se dejó reposar y se midió la absorbancia a 595 nm. Se estimó en μg de ADN por gramo de masa húmeda.

Análisis Digital de Imágenes

Las secciones histológicas se examinaron usando un fotomicroscopio Zeiss con cámara digital acoplada a una computadora de mesa con el programa AxioVision LE Cannon Modul. De cada lente objetivo se obtuvo una barra de escala que se registró con la imagen histológica, con esta información las mediciones se expresaron en micrómetros (μm).

Las imágenes se analizaron con el programa Sigma Scan Pro 5. El análisis digital de las imágenes se realizó manualmente, calibrando a cada barra de escala, y midiendo el contorno de la estructura con el ratón de la computadora finalizando al unir los extremos, automáticamente se registró la medida en una tabla Excell. Se realizaron medidas en ambos sexos del área de los folículos de la glándula digestiva y de los ovocitos en las hembras. Se cuantificó el área de las sustancias que reaccionaron para carbohidratos y lípidos en los folículos de la glándula digestiva.

Índices de Glúcidos y Lípidos

El índice de glúcidos (IG) e índice lipídico (IL) se obtuvieron por la relación porcentual de la suma del área ocupada de las estructuras que reaccionaron para carbohidratos y lípidos en relación al área del adenómero de la glándula digestiva, según la fórmula de RODRÍGUEZ-JARAMILLO *et al.* (2008):

$$\text{IG} = (\Sigma \text{Área de cobertura carbohidratos} / \text{Área del adenómero}) * 100$$

$$\text{IL} = (\Sigma \text{Área de cobertura lípidos} / \text{Área del adenómero}) * 100$$

Análisis Estadístico

Los datos de los índices de cobertura de lípidos, glúcidos e índices moleculares se agruparon por sexo y estadio de maduración sexual. Se

realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y las diferencias significativas se estimaron por una prueba de Wilcoxon (SOKAL Y ROHLF 2012), Las diferencias estadísticas se establecieron al 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Descripción Histológica

Gónada

La gónada de la ostra perla se caracterizó por estar, en la mayoría de los ejemplares, en la etapa inicial de la formación de gametos, siendo esta etapa del ciclo de vida el de formación de las primeras estructuras gonadales o gonadogénesis, la cual comparte características similares a las descritas en los métodos del ciclo gametogénico, tomando como punto de referencia el desarrollo de los gametos.

El tejido gonadal y la glándula digestiva están separados por una membrana basal prominente; los acinos gonadales son de forma irregular, con escasos gametos por lo general en el mismo estadio de desarrollo, los ovocitos están separados y no ocupan todo el espacio.

Los acinos gonadales de los machos, son de forma irregular puede estar aislado o formar grupos; en el lumen se acumulan reservas energéticas de naturaleza lipídica, con espermatogonias periféricas, espermatocitos primarios, espermatocitos secundario y espermátidas, los acinos conforman grupos aislados (Fig. 22).

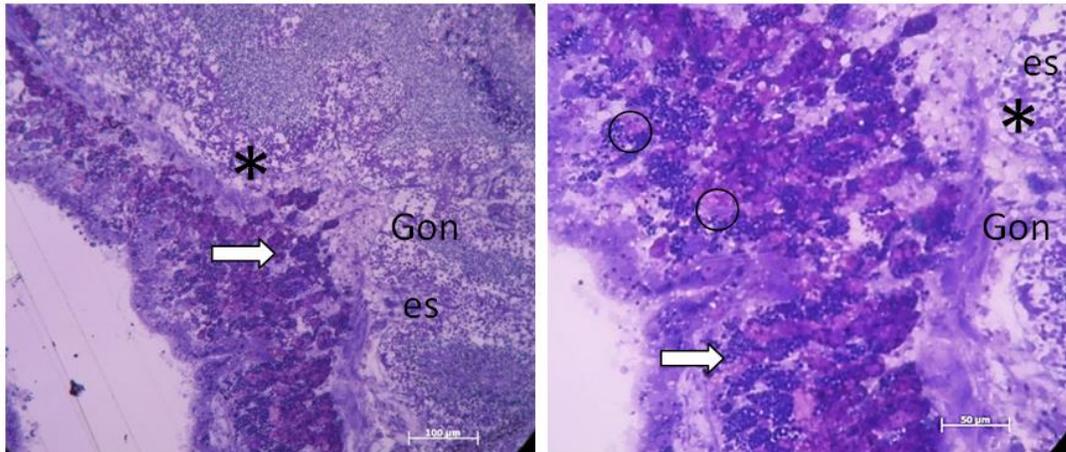


Figura 22. Tejido conectivo y gónada masculina (Gon) en estadio de gametogénesis. El tejido conectivo periférico está cargado de células de reserva con abundantes gránulos de secreción de aspecto refringente de naturaleza lipídica (círculo), y gránulos discretos glicoproteicos (flecha). La gónada presenta una capa prominente de células germinales periféricas (*), y espermatocitos (es).

En el estadio inicial del desarrollo gametogénico los gametos presentan un desarrollo en sincronía, con predominio de ovocitos pedunculados que forman grupos discretos de pocas células, en acinos o entremezclados con tejidos de soporte (Fig. 23). El ovocito pedunculado es de citoplasma denso con un material granular fino, la membrana celular es de perfil recto hasta alargado con aristas, según la orientación del corte se pueden identificar a las células auxiliares que tienen la función de llevar nutrientes al gameto en desarrollo.

La proliferación del tejido gonadal femenino se observó en secciones con ovocitos ($2011 \pm 738 \mu\text{m}^2$) rodeados de una masa compacta de células, que asemejan a fibroblastos con gránulos de reserva de posible naturaleza glucídica. Intercaladas hay fibras de músculo liso interfolicular que se tiñen con un tono turquesa claro, formando haces dispersos. Entre los grupos de

fibras, se aprecia la membrana del acino que es delgada, y la distribución lineal de los gametos le dan una forma acuminada. Los gametos se ubican ordenados en forma compacta, casi simétrica con tendencia a presentar una forma polihédrica y ocasionalmente son de perfil ovalado. Alrededor de los gametos dentro del acino se observa una fina malla de membranas, intercaladas con abultamientos de los núcleos de las células acompañantes, que tienen la función de proveer nutrientes, probablemente de naturaleza lipídica, a los gametos. Estos se caracterizan por estar rodeados por una delgada membrana y presentar un contenido uniforme ligeramente denso.

Gametogénesis Activa

Una de las características principales es que el tejido epitelial de los acinos gonadales, las membranas son de perfil de contornos irregulares, y de tamaño variable debido a que se observan proyecciones que dan la impresión de estructuras vacías, por lo general con espacios por la incipiente diferenciación de los gametos con un material granular fino en el lumen, pero hay una clara distinción con el tejido de la glándula digestiva adyacente. El acino gonadal puede ser inconspicuo, cuando se desarrolla entre el epitelio de soporte de la glándula digestiva; los gametos están ordenados en fila, en grupos compacto de pocas células, que tienen el aspecto de rectangular que indica que pueden estar unidos a la pared del acino por el pedúnculo. Los ovocitos pedunculados se pueden conseguir en grupos más numerosos, que incrementa el área del acino (Fig. 23).

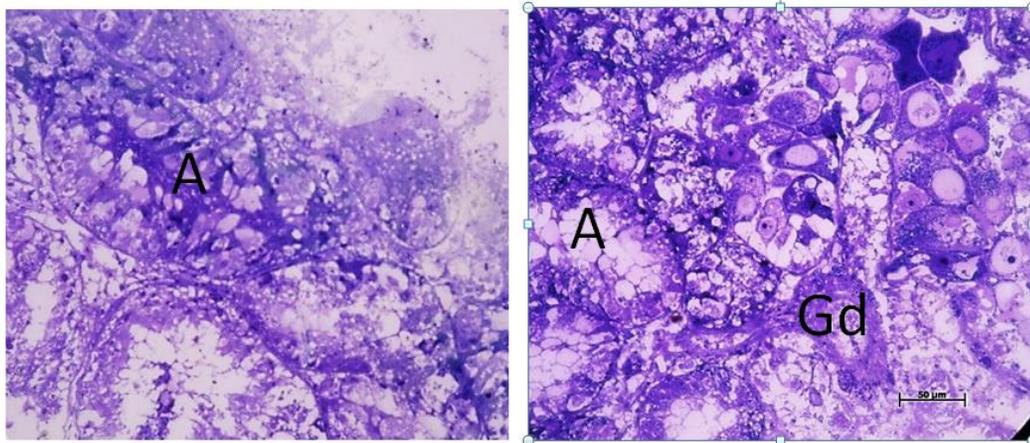


Figura 23. Gónada femenina en gametogénesis activa. A.- Adenómero (A) en sección longitudinal, con abundantes células secretoras periféricas de perfil fusiforme con una vacuola distal. B.- Adenómeros y acinos gonadales con ovogonias (doble flecha) pegada a la membrana del acino, ovocito pedunculado (flecha gruesa) de citoplasma denso y ovocito maduro de aspecto oval y citoplasma denso. Gonoducto (Gd).

En los acinos los ovocitos pedunculados se observan en un estadio avanzado de maduración. Los ovocitos pedunculados son de forma irregular, por lo general con una porción del citoplasma alargada, con el área nuclear en el otro extremo, donde el citoplasma es denso y uniforme. En estos no se aprecian granulaciones citoplasmáticas, tampoco vestigios de sistemas de membranas, con un área promedio de $818 \pm 429 \mu\text{m}^2$. El núcleo se localiza hacia el lumen, es de forma circular con un nucléolo prominente, localizado en el centro del núcleo. En los acinos se puede ubicar los ovocitos, siendo difíciles de distinguirse porque a veces forman grupos compactos con porciones del citoplasma, siendo la densidad citoplasmática el mejor indicador de su presencia.

Madurez Gonadal

A medida que el tejido epitelial del acino prolifera, ocupa mayor espacio

en la periferia de la glándula digestiva, hasta formar un tejido compacto con escaso espacio intercelular. Estos adquieren mayor volumen, y están integrados por un grupo de células reproductivas heterogénea, que conservan el ordenamiento de acuerdo al grado de desarrollo junto con la ovogonia que está en la pared del acino, y a medida que crece se va separando para formar el ovocito pedunculado y finalmente la ovogonia, que está libre en el lumen de (Fig. 24).

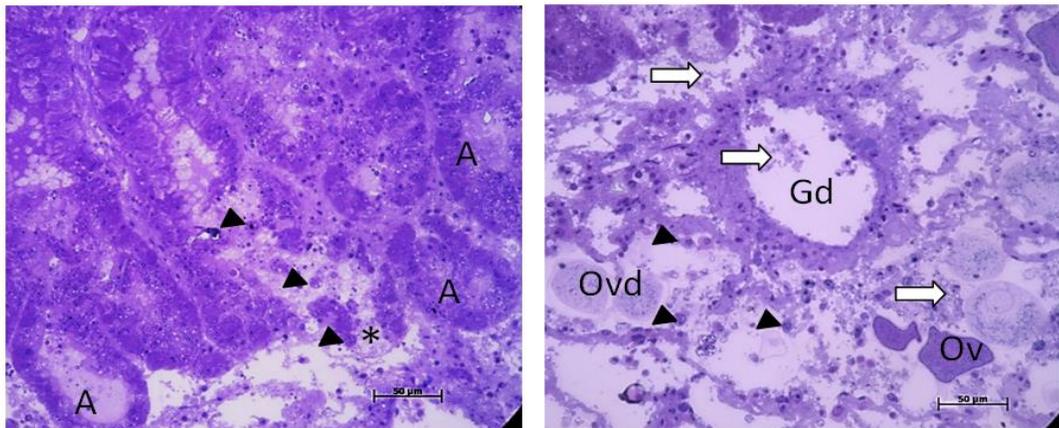


Figura 24. Gónada femenina en estadio de regresión gonadal. A.- Glándula digestiva de hembra en estadio de regresión gonadal. Adenómeros (A) en contacto con el tejido gonadal. Destaca la presencia de macrófagos (punta de flecha) y la pérdida de la integridad del tejido (*). B.- La membrana del acino gonadal presenta sitios de ruptura, con ovocitos de citoplasma disperso (Ovd), restos celulares (doble flecha) y macrófagos (punta de flecha). Debris celular (flecha). Gonoducto (Gd). Ovocito (Ov).

En estadio de desarrollo avanzado, los acinos gonadales están cargados de gametos en grupos compactos en ambos sexos .

Durante la gametogénesis el folículo de la glándula digestiva presenta un engrosamiento de las células periféricas, reduciendo el lumen a pocos

micrómetros de diámetro, conservando un aspecto ligeramente denso (Figura 25).

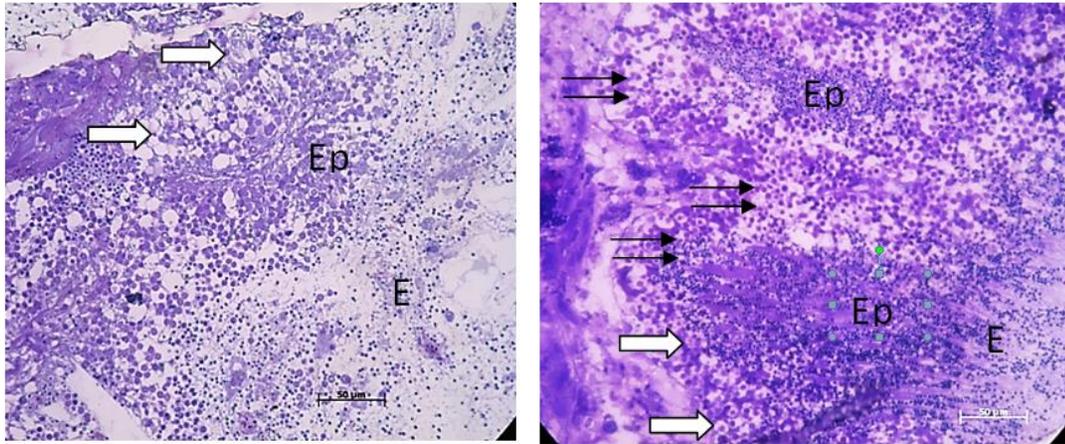


Figura 25. Acino de gónada masculina en el estadio de gametogénesis. A. Se observa predominio de espermatidas (flecha) de núcleo grande dispuestos en una franja periférica, seguida de las espermatidas (Ep), con los espermatozoides (E) menos abundantes y dispersos característicos del estadio de maduración. B. Gónada masculina con abundantes espermatogonias (flecha), espermatocitos (doble flecha), espermatidas (Ep) y espermatozoides (E) ordenados en hileras.

Atresia Gonadal

No es frecuente la atresia gonadal, posiblemente se trata de gametos que no lograron ser desovados. El citoplasma presenta desorganización con vacuolización periférica, separación de la membrana celular, y restos celulares o debris en el acino.

Machos

En los machos sólo se observaron ejemplares en estadio de gametogénesis activa. Los acinos gonadales de los machos durante el

desarrollo gonádico, poseen pocos gametos, estando el acino lleno de un material denso de posible naturaleza lipídica y células dispersas. Se caracteriza por presentar en la periferia las espermatogonias que es una célula redondeada con un núcleo central y citoplasma claro. Hacia el lumen se localizan los espermátocitos primarios y secundarios que tienen núcleo denso y citoplasma escaso. Las espermátidas se aprecian formando hileras de núcleos hacia el lumen del acino, encontrándose ordenados sobre un material de posible naturaleza glucogénica. Se obtuvieron pocos machos con espermatozoides. Los acinos gonadales de los machos adquieren un desarrollo pronunciado con grupos compactos y bastante volumen. Por lo general la proliferación de gametos está sincronizada, presentando un patrón uniforme de células por ejemplar examinado.

Glándula Digestiva

Fases de actividad. La glándula digestiva es el órgano de mayor tamaño que poseen los bivalvos, se extiende a lo largo del aparato digestivo hasta la región posterior donde es prominente, con una coloración café-verdoso, se encuentra rodeado de una fina membrana epitelial a partir de la cual se diferencian los tejidos gonadales. El folículo de la glándula digestiva presenta al menos dos fases de actividad. En los individuos con escaso desarrollo gonadal el folículo es redondeado u ovalado. En la periferia hay una capa de células de citoplasma granular, siendo el lumen bastante amplio y de aspecto denso con inclusiones claras. Sin embargo, el aspecto característico consiste de estructuras ovales o alargadas, con una membrana externa con poco espacio interfolicular, sobre la que se ordenan células de citoplasma claro con un núcleo central, en las que se engranan capas de células de aspecto romboidal con proyecciones del citoplasma al lumen, ocasionalmente el lumen de los folículos de mayor tamaño muestra un

material granular conformado por el alimento destinado a la digestión.

Índices Histoquímicos y Metabólicos de Crecimiento

Se analizaron un total 41 ejemplares entre abril de 2017 y enero 2018, obteniendo en promedio ocho porciones de tejido de cada ejemplar, para un aproximado de 300 bloques que fueron procesados para poder clasificar cada bloque de resina por tejido (glándula digestiva y gónada), sexo y maduración sexual, obteniendo áreas representativas que se registraron fotográficamente, y fueron analizadas digitalmente cerca de 2000 estructuras, resumidas en la Tabla 1.

El índice de lípidos (IL) osciló con un patrón de curva Gausiana, fue máximo en la gametogénesis activa, con el mínimo en la madurez, e incremento durante el desove. El índice de glúcidos (IG) presentó tendencia similar al IL sin diferencias significativas entre los estadios de madurez ($P>0,05$). Mientras el índice de glúcidos (IG) tiende a disminuir entre la gametogénesis activa y el desove. En los machos los índices (IL, IG) presentaron valores similares al estadio de madurez de las hembras (Tabla 1).

Índice ARN/ADN. Los valores promedio de las hembras presentaron un patrón de distribución normal, con el máximo en el estadio de madurez de las hembras y mínimo en el estadio de desove, detectándose diferencias significativas entre los tres estadios de maduración sexual (Tabla 1).

Entre sexos los IL e IG no se detectaron diferencias significativas. Mientras que el índice ARN/ADN presentó diferencias significativas entre los machos y hembras en gametogénesis activa y madurez ($P<0,05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis morfométrico de los índices de cobertura y moleculares en los estadios de maduración sexual de *Pinctada imbricata* en ambos sexos

SEXO	M	LÍPIDOS		CARBOHIDRATOS		ARN/ADN μg/g
		ÁREA	I L	ÁREA	I G	
		(μm ²)	%	(μm ²)	%	
HEMBRA	II	352,45 ± 1,38	± 1,38	38,56 ± 0,42	± 0,42	2,47 ± 0,31
		498,63	0,17 ^{a, A}	14,72 ^a	0,22 ^a	a,A
	III	32,50 ± 2,69	± 2,69	7,20 ± 2,84	0,17 ± 2,84	3,76 ± 0,57
		30,74	1,72 ^b	b	0,07 ^a	b,A
	IV	122,18 ± 1,41	± 1,41	7,55 ± 2,94	0,09 ± 2,94	0,95 ± 0,42
		121,92	0,28 ^{a, A}	b	0,05 ^b	c
MACHO	II	258,24 ± 2,51	± 2,51	16,53 ± 0,19	± 0,19	1,69 ± 0,29
		363,61	1,41 ^B	13,89	0,04	B

Se indica el área promedio de las estructuras de naturaleza lipídica (μm²), índice lipídico (%), área promedio de las estructuras de carbohidratos (μm²), índice de glúcidos (%), proteínas totales (mg/g), relación ARN/ADN (μg/g proteína) en los folículos de la glándula digestiva. M - madurez. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre estadios de maduración se indican con superíndices en minúscula y en mayúscula entre sexos.

DISCUSIÓN

Los estudios con organismos marinos son complejos por la alta variabilidad de los ciclos de desarrollo gametogénico de esta región tropical, donde tienden a solaparse los estadios de maduración, por la ocurrencia de desoves continuos durante el año. En la mayoría de los bivalvos se presenta la dificultad de distinguir a simple vista el sexo y estadio de madurez sexual. La información obtenida en este trabajo permite relacionar aspectos de la fisiología reproductiva y energética, desde una perspectiva que reporta las características morfológicas con la acumulación de reservas energéticas y la relación ARN/ADN. Los índices de crecimiento por lo general expresan una medida en términos de una estructura, órgano o tejido que cambia sus dimensiones en el tiempo o edad del ejemplar (ACOSTA *et al.* 2011). El índice ARN / ADN, refleja la condición fisiológica del estado de actividad metabólica de síntesis para el crecimiento, así como de la formación de tejidos como el reproductivo, que oscila de acuerdo a ciclos propios de la biología del espécimen o debido al efecto de factores externos, como la temperatura o la disponibilidad de alimentos entre otras causas (ARRIECHE *et al.* 2002).

El uso de las técnicas de procesamiento de muestras para microscopía de luz de alta resolución, es superior al procedimiento convencional de inclusión en parafina, obteniendo mejor preservación de las estructuras, aunado a la coloración metacromática con azul de toluidina que tiene afinidad a las estructuras de acuerdo a la carga eléctrica que le permite teñir estructuras celulares de carga positiva, negativa y neutra, resaltando los sistemas de membranas celulares y componentes citoplasmáticos, que son característico de cada estadio del desarrollo gonadal.

Con el examen visual externo de la gónada del ejemplar fresco, además

se pudo apreciar una zona bien diferenciada más oscura entre café y verdoso que corresponde a la glándula digestiva, mientras que el tejido gonadal es de aspecto más cremoso y abarca una delgada capa de tejido, de la cual se tomaron porciones de un milímetro cúbico para el procesamiento histológico.

KIMANI *et al.* (2006) mostraron que la proporción sexual de la población estudiada de la ostra perla *P. imbricata* mostró un predominio de machos sobre las hembras en las etapas iniciales del desarrollo, contrastando de esta manera con los ejemplares examinados en el presente estudio, donde se obtuvo una mayor cantidad de hembras. Sobre ésta especie se han reportado cambios de sexo a medida que los ejemplares aumentan su talla, que no hemos podido confirmar por métodos histológicos. La cantidad de ejemplares colectados no es adecuada para describir la estructura poblacional y el ciclo gametogénico, puesto que para lograr una muestra representativa es recomendable aumentar y procesar más ejemplares durante un lapso determinado, de modo que los modelos de la estructura poblacional sean robustos estadísticamente.

Se obtuvieron hembras y machos en diferentes condiciones de desarrollo gonadal, que se caracterizaron por la proliferación de los gametos en sitios focalizados en la periferia de la glándula digestiva. En los ejemplares de la ostra perla, donde predominaron los acinos con ovocitos pedunculados, así como de abundante tejido epitelial en la periferia de la glándula digestiva, indican que se encuentra en una fase activa de producción de gametos y diferenciación del tejido gonadal.

Entre sexos no se aprecian diferencias en cuanto al área ocupada por los acinos gonádicos, lo que puede significar que ambos sexos presentan una sincronía reproductiva como resultado de condiciones ambientales

propicias, sin embargo, sería recomendable obtener índices de condición y bioquímicos que puedan explicar las diferencias de tamaño y de madurez sexual que favorecen su desarrollo en el medio ambiente. Los períodos reproductivos prolongados aumentan la probabilidad de que los juveniles sobrevivan y encuentre las condiciones adecuadas para la fijación (PAULET *et al.* 1988).

En los organismos se apreció una secuencia de formación del tejido gonadal, que son característicos de la primera madurez sexual. La gametogénesis en los bivalvos de la zona tropical es un proceso continuo, que se inicia en juveniles, y señala la edad de la primera madurez sexual cuando el 50% de la población ha formado gametos viables. El desarrollo sexual de los bivalvos tropicales comienza a una edad precoz, con variaciones entre especies, pudiendo iniciarse en los primeros meses de vida o como en algunos pectínidos, después de alcanzar un año (PÉREZ-CAMACHO & ROMÁN 1987). A nivel macroscópico, en general el desarrollo de los tejidos gonadales de los juveniles no permite identificar el sexo, aunque los procesos de diferenciación de las líneas celulares que van a formar la gónada se iniciaron desde la gastrulación. El pectínido *Argopecten purpuratus* presenta células auxiliares adheridas a la membrana celular del ovocito, caracterizados por tener un complejo reticular que se encarga de sintetizar moléculas que son transferidas al gameto durante su desarrollo (AVENDAÑO & LE PENEK 1998).

Los índices IL y ARN/ADN oscilaron similarmente entre los estados de madurez sexual, que se corresponde con el desarrollo y desove de los ovocitos; mientras que los glúcidos se agotaron con la maduración sexual, siendo posible que esta especie acumule energía antes de iniciar la gametogénesis.

Se demostró que los índices histoquímicos y el biomarcador de actividad celular (relación ARN/ADN), son buenos indicadores de la condición fisiológica en ambos sexos y entre los estadios de maduración sexual, con aplicaciones en programas de producción acuícola para la engorda y obtención de gametos, donde la transferencia de energía entre la glándula digestiva y la gónada integran activamente sus rutas metabólicas.

Estudios como los de KIMANI *et al.* (2006), realizados en *P. imbricata*, observaron pocas gónadas en etapas de reposo, lo que demuestra que la gametogénesis es continua. Además, esto concuerda con investigaciones que demuestran que la actividad de la gónada y el desove en ostras perleras tropicales y subtropicales, ocurre durante todo el año (POUVREAU *et al.* 2000). En este estudio la predominancia de los acinos con ovocitos pedunculados, así como de abundante tejido epitelial en la periferia de la glándula digestiva, de los ejemplares de *P. imbricata*, de la localidad de Merito, indican que se encuentra en una fase activa de producción de gametos y diferenciación del tejido gonadal, correspondiendo así con los estudios que indican que *P. imbricata* es una especie con reproducción continua

Sin embargo, como afirma URBAN (2000) el desove de *P. imbricata* en el Caribe se intensificó durante la temporada de afloramiento cuando la disponibilidad de alimento era mayor.

En el golfo de Cariaco las temperaturas varían asociadas a eventos de surgencia costera, ocurriendo menores temperaturas (surgencia) con mayor afloramiento fitoplanctónico, para luego observarse un ascenso (no surgencia) (RUEDA-ROA & MULLER-KARGER 2013), En este sistema existe un período de mayor productividad primaria y pulsos de alta productividad intercalados anualmente que influyen en el crecimiento y reproducción de los organismos marinos (FREITES *et al.* 2014). De tal forma, se demuestra que la

actividad gonadal de *P. imbricata* es relativamente continua, ocurriendo desove durante todo el año, sin dejar a un lado la influencia que tienen los factores ambientales en este evento.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

P. imbricata, se distribuye desde la zona litoral hasta 30 m de profundidad, en grupos adheridos por el biso, tiene una longevidad de tres años, y se reproduce a partir del octavo mes de fijación con varios desoves al año asociados al ciclo de nutrientes y una estrategia reproductiva oportunista (LODEIROS & HIMMELMAN 1999; ARSENAULT & HIMMELMAN 1998; ARRIECHE *et al.* 2002).

MARCANO (1984), describe a *P. imbricata* como bivalvo dioico, con individuos inicialmente protándricos, con una proporción de individuos machos con tallas <50. La gónada está estrechamente ligada a la masa visceral y por tanto es difusa.

Se observó reproducción casi continua durante el año, con varios períodos de gametogénesis activa, maduración y desove en condiciones tanto de abundancia como de escasez de alimento y bajas y altas temperaturas, esto implica la combinación de dos tácticas reproductivas (oportunista y conservativa), lo que coincide con investigaciones realizadas por ROMERO- FERREIRA *et al* (2017) en *P. imbricata*, donde señalan a la especie como oportunista en el período de surgencia y de tipo conservador con menor proporción de desoves durante la estratificación. La sincronía de los tipos de células presentes en los estadios iniciales del ciclo gametogénico se corresponden con la proliferación simultánea de las ovogonias y espermatogonias.

Las principales variables ambientales que regulan el ciclo reproductivo de los bivalvos marinos, son la temperatura y la disponibilidad de alimento.

Estas interacciones entre factores endógenos y exógenos, en relación con la evolución de cada especie, generan diferentes tácticas reproductivas (FREITES *et al.* 2014).

Estudios anteriores confirman a *P. imbricata* como una especie con una reproducción casi continua, con una táctica reproductiva oportunista o conservadora en función de la disponibilidad de alimento, lo que implica flexibilidad adaptativa con comportamiento sexual asincrónico (MARCANO *et al.* 2005).

El papel de la disponibilidad de alimento en el momento de la actividad reproductiva de los bivalvos que viven en regiones tropicales, es de gran importancia (SHAFFEE & DAOUIDI 1991). La biología reproductiva de las ostras perleras (familia Pteriidae) en zonas tropicales subtropicales han atraído cada vez más atención recientemente, debido a la rápida expansión del cultivo de ostras para la producción de perlas (SAUCEDO *et al.* 2002).

En las muestras analizadas se observa que el tejido gonadal se forma a partir de un epitelio germinal de origen mesodérmico, que permanece latente en el tejido conjuntivo inmerso en la masa visceral; para su desarrollo son necesarias las reservas energéticas contenidas en células adipo-granulares y en el tejido conectivo vesicular, que proveen nutrientes almacenados como reservas lipídicas y carbohidratos de la glándula digestiva, que es el órgano encargado de la transformación del alimento y reservorio en ésta especie.

Los ciclos reproductivos se encuentran estrechamente ligados con los ciclos de almacenamiento y utilización de energía de los diferentes tejidos, los cuales ayudan a sostener la gametogénesis cuando la disponibilidad de alimento en el medio es baja. Estos varían de acuerdo a la influencia de diversos factores exógenos y endógenos entre especies e incluso entre

poblaciones de la misma especie (BARBER & BLAKE 1991).

En todos los bivalvos el desarrollo gonádico consiste de un crecimiento de la gónada a partir de un epitelio germinal indiferenciado de origen mesodérmico, que permanece latente en el tejido conjuntivo después de cada periodo reproductivo (MORTON 1960; THOMPSON *et al.* 1996). Durante esta etapa, denominada indiferenciada, no se observan gametos y se caracteriza por la intensa actividad metabólica efectuada para almacenar sustancias de reserva (THOMPSON *et al.* 1996).

El ciclo reproductivo del género *Pinctada* varía de acuerdo a la distribución latitudinal (GÓMEZ *et al.* 2008), por lo que el estudio de su biología reproductiva constituye un campo de gran importancia, sobre todo, para suplir el mercado de la producción de perlas (SAUCEDO *et al.*, 2002). Además, permite predecir los periodos de reclutamiento, estimar la mejor época para la obtención de semilla hasta conformar la población adulta, establecer vedas y determinar la talla mínima de captura (ROMERO-FEREIRA *et al.* 2017).

Particularmente, los cambios en las actividades de la CAT (en la glándula digestiva) y SOD en músculo pueden sobrevenir como respuesta bioquímica de compensación por la sobreproducción de radicales libre (LIVINGSTONE 2001). La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes observadas en este estudio, puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste metabolismo aerobio-energético e integración funcional de los tejidos. Con valores máximos asociados a los períodos de alta productividad primaria.

P. imbricata es sugerida como apropiada para realizar estudios de toxicidad en el medio marino; su amplia distribución geográfica es ideal para

interpolar los efectos de xenobióticos en el medio ambiente, su carácter sésil, el mecanismo de alimentación por filtración le da el carácter de bioacumulador, con el riesgo de ser un medio de transporte al humano que lo consuma. Al presentar reproducción continua (Marcano *et al.* 2005), fácil manipulación en el laboratorio, tasa de crecimiento alta para alcanzar la biomasa-producción secundaria y tasa de renovación poblacional, garantiza la continuidad de la especie (URBAN 2000; VÁSQUEZ *et al.* 2015), con un ciclo de cultivo corto que comprende entre 9-10 meses, por lo que es un recurso valioso para la alimentación, producción de nácar y perlas.

Se demostró que los índices histoquímicos y el biomarcador de actividad celular (relación ARN/ADN), son buenos indicadores de la condición fisiológica en ambos sexos y entre los estadios de maduración sexual, con aplicaciones en programas de producción acuícola para la engorda y obtención de gametos, donde la transferencia de energía entre la glándula digestiva y la gónada integran activamente sus rutas metabólicas. Las oscilaciones de las áreas de las estructuras lipídicas, carbohidratos y la relación ARN/ADN se corresponden con las demandas metabólicas para el crecimiento y el ciclo gametogénico. La relación ARN/ADN genera un índice del metabolismo celular y ha sido empleado como una medida de la tasa de crecimiento y condición nutricional de los individuos (O'CONNOR & LAWLER. 2004). Esto se debe a que las concentraciones de ARN varían ampliamente dependiendo de la tasa metabólica del tejido y de la condición fisiológica del organismo, mientras que las concentraciones de ADN tienden a ser constantes (ANTÓN *et al.* 2008).

Una clave para el éxito reproductivo es la disponibilidad de alimento y el aspecto del entorno ambiental que garantice el desarrollo de la población. En nuestro laboratorio se analizó el contenido energético del tejido gonadal y de

la glándula digestiva usando técnicas histoquímicas. Las cuales mostraron una estrecha relación con los estadios de desarrollo y los períodos anuales de surgencia, estratificación y relajamiento. En el trabajo de ROMERO-FERREIRA *et al.* (2016) se usaron técnicas convencionales para microscopia de luz, que producen un decorado más extenso, que tiende a aumentar el área y que en el mismo método usado se pueden cometer errores de apreciación por la dificultad de distinguir las células individuales.

En este trabajo se evidenció que la primera madurez es un proceso difícil de demostrar por las escasas células que están aisladas, que progresivamente se van diferenciando hasta formar los acinos. La glándula digestiva es un órgano que está formado por acinos de varios tipos de células, orientadas concéntricas al lumen, que en conjunto tienen ciclos de actividad sincronizados.

CONCLUSIONES

- Los resultados de la presente investigación llenarán algunos vacíos de conocimiento sobre la biología y fisiología de la ostra perla *Pinctada imbricata* y establecerá una referencia base para el manejo como recurso pesquero y obtención de mejoras en cultivos.
- Los datos obtenidos sobre las enzimas antioxidantes resultan de gran importancia para comprender las respuestas adaptativas de la especie a condiciones ambientales, a su vez que contribuye en la preservación y buena salud de la biodiversidad de los ecosistemas marinos.
- La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste metabolismo aerobio- energético e integración funcional de los tejidos. Los promedios observados en los índices moleculares evidencian un estado fisiológico óptimo para los organismos.
- *Pinctada imbricata* es una especie con reproducción continua, y una producción constante de células germinales en concordancia con las condiciones ambientales lo que se asocia con la combinación de dos tácticas reproductivas (oportunista y conservativa).
- La evaluación histológica y bioquímica de la ostra perla, representa una herramienta valiosa para la formulación de programas de cultivo, y de propuestas para la extracción y conservación del recurso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, D & S. PUNTARULO. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138: 405-415.
- ACOSTA, V., Y. NATERA, C. LODEIROS, L. FREITES & A. VÁSQUEZ. 2010. Componentes bioquímicos de los tejidos de *Perna perna* y *P. viridis* (Lineo, 1758) (Bivalvia: Mytilidae), en relación al crecimiento en condiciones de cultivo suspendido. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 38(1): 37-46. DOI: 10.3856.
- ACOSTA, V., A. PRIETO, B. LICETT, Y. LONGART & M. MONTES. 2011. Rendimiento, índice de condición y esfuerzo reproductivo del mejillón verde *Perna viridis* en cultivo de fondo en el Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 29:(4).
- ACOSTA, V., C. LODEIROS, O. NUSETTI & M. LEMUS. 2013. Biocumulación Y Efecto Del Cadmio En Juveniles Del Mejillón Verde *Perna Viridis* (L. 1758) (Mytiloidea: Mytilidae). *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.* 25 (1): 39-45.
- ADZIGBLI, L. Z. WANG, Z. LAI, J. LIA & Y. DENG. 2019. Sex determination in pearl oyster: A mini review. *Aquaculture Reports*, 15.
- AEBI, H. E. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105: 121-126.
- ALBUQUERQUE, M., R. ALVES, A. ZANANDREA, J. FERREIRA, C. MELO & A. MAGALHÃES. 2012. Growth and survival of the pearl oyster *Pteria hirundo* (L., 1758) in an intermediate stage of culture in Santa Catarina, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 72(1): 175-180.
- ALONSO-ÁLVAREZ, C & L. PÉREZ-RODRÍGUEZ. 2023 Estrés oxidativo: medición, manipulación y aplicación en Ecología y Evolución del Comportamiento. *Etología*, 29: 39-69.

- ALVES DE ALMEIDA, E., A. DIAS BAINY, A. DE MELO LOUREIRO, G. MARTINEZ, S. MIYAMOTO, J. ONUKI, L. FUJITA BARBOSA, C. MACHADO GARCIA, F. MANSO PRADO, G. RONSEIN, C. SIGOLO, C. BARBOSA BROCHINI, A. GRACIOSO MARTINS, M. GENNARI DE MEDEIROS & P. DI MASCIO. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146:588–600.
- AMORIM, V.E, O. GONÇALVES, R. CAPELA, S. FERNÁNDEZ-BOO, M. OLIVEIRA, M. DOLBETH, F. ARENAS & P.G. CARDOSO. 2020. Immunological and oxidative stress responses of the bivalve *Scrobicularia plana* to distinct patterns of heatwaves. *Fish and Shellfish Immunology*, 106:1067–1077.
- ANDERSON, R. S. 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in 4 bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol*, 18: 89-96.
- ANTÓN, Y., M. LEMUS & K. CHUNG. 2008. Índice Arn/Adn como indicador de La condición fisiológica en ejemplares de *Donax Denticulatus* expuestos a dosis subletales de Cadmio. *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela. 20 (2): 149-154.
- ARRIECHE, D., B. LICETT, N. GARCÍA, C. LODEIROS & A. PRIETO 2002. Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae), del morro de guarapo, Venezuela. *Interciencia*, (27) 11: 613-619.
- ARSENAULT, D. J. & J. H. HIMMELMAN. 1998. Spawning of the Iceland scallop (*Chlamys islandica* Muller, 1776) in the northern Gulf of St. Lawrence and its relationship to temperature and phytoplankton abundance. *The veliger*, 41: 180-185.
- AUSTIN, K. & K.T. PAYNTER. 1995. Characterization of the chemiluminescence measured in hemocytes of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Exp. Zool.* 273: 461-471.
- AVENDAÑO, M & M. LE PENNEC. 1998. Presencia de células auxiliares en la gametogénesis del ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck,

- 1819). (Mollusca, Bivalvia, Pectinidae). *Estudios Oceanológicos*, 17:13-16.
- BACHÈRE, E., D. HERVIO & E. MIALHE. 1991. Luminol- dependent chemiluminescence by hemocytes of 2 marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 173-180.
- BAQUEIRO-CÁRDENAS, E., L. BORABE, C. GOLDARACENA-ISLAS & J. RODRÍGUEZ-NAVARRO. 2007. Los moluscos y la contaminación. Una revisión. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 1S- 7S.
- BARBER B.J. & N.J BLAKE. 1991. Reproduction. In: Shumway S (ed.) *Scallop. Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp 377-428
- BARBER, B.J & N.J. BLAKE. 2006. Reproductive physiology. In: Shumway SE, Parsons GJ (eds) *Scallop: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier. Amsterdam, pp 357-416.
- BARRACCO, M.A., I.D. MEDEIROS & F.M. MOREIRA. 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellf. Immunol*, 9: 387-404.
- BAYNE, B., P. BUBEL, P. GABBOT, D. LIVINGSTONE, D. LOWE & M. MOORE. 1982. Glycogen utilisation and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Marine Biology Letters*, 3:89-105.
- BEBIANNI, M.J., R. COMPANY, A. SERAFIM, R.P. COSSON & A. FIALA-MEDONI. 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.*, 75: 354–373.
- BECKER, C., D. BREPOHL, H. FEUCHTMAYR, E. ZOLLNER, F. SOMMER, C. CLEMMESSEN, U. SOMMER & M. BOERSMA. 2005. Impacts of copepods on marine seston and resulting effects on *Calanus fimarchicus* RNA/DNA ratios in mesocosm experiments. *Mar. Biol.*, 146: 531-541.
- BEGUEL, J., A. HUVET, V. QUILLIEN, C. LAMBERT & C. FABIoux. 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in

link with its reproductive investment. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicologia & Pharmacology*, 157 (1): 63-71.

BENINGER PG., G. LE PENNEC & M. LE PENNEC. 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205: 83 – 92.

BONDAD-REANTASO, M.G. 2007. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 501. Rome, FAO. 628 p.

BOSS, KJ. 1982. Mollusca. In Synopsis and classification of living organisms. Edited by: Parker SP. New York: McGraw-Hill; 1:945-1166.

BRACHO, M., M. SEGNINI, I. VIÑOLES, & K. CHUNG. 2000. Efectos de la temperatura de aclimatación sobre el crecimiento instantáneo de *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) según el cociente ARN/ADN. *Rev. Biol. Trop.*, 1: 159-170.

BOX, A., A. SUREDA & S. DEUDERO. 2008. Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red microalgae *Lophocladia lallemandii*. *Comp. Biochem. Physiol., Part. C.* doi: 10.1016/j.cbpc.10.107.

BURTON, K.1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical Journal*, 62: 315-323.

CÁCERES- PUIG, J. 2007. Dinámica anual del esfuerzo reproductivo de *Pteria sterna* (Gould, 1851) en Bahía de la Paz, B. C. S., México. Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. México. 88 pp.

CALDERÓN-PEÑA, A., C. ASPAJO-VILLALAZ, O. PRETEL-SEVILLANO. 2018. Estrés oxidativo y especies reactivas. *Rebiol*,38(2): 53 – 65. ISSN: 2313-3171 (En Línea)

- CAMACHO, H. 2008. Mollusca. p.293-322. In Vázquez Mazzini. (ed.) Los Invertebrados fósiles. Tomo I / Horacio Camacho ... [et al.]; dirigido por Horacio Camacho. - 1a ed. - Buenos Aires: Fundación de Historia Natural Félix de Azara: Universidad Maimónides, 2007. 800 p.
- CAMBELL, P. N. & J. R. SARGENT. 1967. Estimation of ARN by orcinol method of mejbum (1939). En: Techniques in protein biosynthesis. Vol. I: Cambell P.N. y J. R. Sargent, (Ed). *Academic Press. London*, pp. 301-302.
- CARBALLAR, M. J., C. LÓPEZ, C. AZEVEDO & A. VILLALBA. 1997. *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk haemocytes. *Fish Shellf. Immunol*, 7: 403-416.
- CARGNIN –FERREIRA, E. & C. SARASQUETE. 2008. Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos. Biblioteca de Ciencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.89 pp.
- CARIÑO, M & M. MONTEFORTE. 2018. *Las minas marinas del Golfo de California: del extractivismo a la sustentabilidad*. Relaciones. Estudios de historia y sociedad, 39 (153):11-39. DOI: <https://doi.org/10.24901/rehs.v39i153.389>
- CARVAJAL, C. 2019. Especies Reactivas Del Oxígeno: Formación, Función Y Estrés Oxidativo. *Revista Medicina Legal De Costa Rica*, 36(1): 91-100.
- CASTELLANOS, C. & N. CAMPOS. 2007. Variación espacial y temporal de juveniles de *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) y *Argopecten nucleus* (Born, 1778) en la región norte del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costera*, 36: 209-227.
- CÉSPEDES, E. & J. CASTILLO. 2008. La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito?. *Rev. Cubana Invest. Bioméd.*, 27 (2): 1561-3011.

- CHICHARO M.A. & L. CHICHARO.2008. RNA:DNA Ratio and Other Nucleic Acid Derived Indices in Marine Ecology. *Int. J. Mol. Sci.*,9(8): 1453-1471. <https://doi.org/10.3390/ijms9081453>
- CLEMMESSEN C., R. SANCHEZ & ROSSI-WONGTSCHOWSKY. 1997. A regional comparison of the nutritional condition of Atlantic anchovy Larvae, *Engraulos anchata*, based on RNA/DNA ratios. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45: 17- 43.
- CRUZ, P., C. RODRÍGUEZ- JARAMILLO & A. IBARRA. 2000. Environment and Population Origin on First Sexual Maturity of Catarina Scallop, *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). *Journal of Shellfish Research.* 19 (1): 89-93.
- CUNHA, R., F. BLANC, F. BONHOMME & S. ARNAUD-HAOND.2011. Evolutionary Patterns in Pearl Oysters of the Genus *Pinctada* (Bivalvia: Pteriidae). *Mar Biotechnol*, 13:181–192 DOI 10.1007/s10126-010-9278-y
- DAFRE, A.L., I.D. MEDEIROS, I.C. MÜLLER, E.C. VENTURA, A.C. BAINY. 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chem. Biol. Interact.* 149: 97–105.
- DANIEL-LEMUS, Y., E. ACOSTA-ORTIZ, F. CUELLO & J. GÓMEZ-LEÓN.2014. Evaluación Del Ciclo Gametogénico de *Argopecten Nucleus* (Pectinidae, Bivalvia) En Sistema De Cultivo Suspendido, En La Bahía De Nenguange, Santa Marta, Colombia. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 43 (2): 363-382.
- DI GIULIO R., W. BENSON, B. SANDER & P. VANVELD. 1995. *Biochemical mechanisms: Metabolism, adaptation and toxicity*. In: *Fundament of aquatic toxicology*. Rand G (Ed.) Taylor & Francis Publisher. Washington DC, 523-561 pp.
- DÍAZ J. & M. PUYANA. 1994. *Moluscos del Caribe Colombiano. Un catálogo ilustrado*. Colciencias. Fundación Natura, Invemar. 291 p.
- DÍAZ, C., M. RODRÍGUEZ, M. FRESNEDA & J. BISSET. 2004. Determinación de la actividad glutatión-S-Transferasa en cepas de *Culex quinquefasciatus*

- de Cuba y otros países de América Latina. *Rev. Cubana. Med. Trop.*, 56: 111-116.
- DOWNNS, C., J. E. FAUTH & C. M. WOODLEY. 2001. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system. *Marine Biotechnology* 3: 380-397.
- DYKSTRA, M. J. 1993. A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum press. New York.
- ELLMAN, G. L. 1959. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74: 443-450.
- EPP, J., V. M. BRICELJ & R.E. MALOUF. 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 121(2): 113-136.
- ERK, M., D. IVANKOVIC & Z. STRIZAK. 2011. Cellular energy allocation in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the stratified estuary as a physiological biomarker. *Marine pollution bulletin*, 62: 1124 – 1129.
- ESPINOSA- DIEZ, C., V. MIGUEL, D. MENNERICH, T. KIETZMANN, P. SANCHEZ-PEREZ, S. CADENAS & S. LAMAS. 2015. Antioxidant responses and cellular adjustment to oxidative stress. *Redox Biology*, 6:183-197.
- Exactitude Consultancy. 2023. *Pearl Extract Market by Type, Application and by región Global Trends and Forecast from 2023 to 2030*. 198 pp. <https://exactitudeconsultancy.com/es/reports/32821/pearl-extract/>
- F.A.O. 2006. Compendium of Food Additive Specifications: Joint FAO/WHO Expert Committee De Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 85 pp.
- F.A.O. 2012. El Estado Mundial De La Agricultura Y La Alimentación. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura. Roma. 180 pp.

- F.A.O. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- FASSIANO, A., N. ORTIZ, M. RÍOS DE MOLINA. 2012. Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS. *Acta Toxicol. Argent.* 20 (2): 57-61.
- FISHER, W. S., L.M. OLIVER & P. EDWARDS. 1996. Hematologic and serologic variability of eastern oyster from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shelf. Res.* 15: 555 – 564.
- FOLEY, C. D, BRADLEY, & T. HÖÖK. 2016. A review and assessment of the potential use of RNA:DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. *Ecol. Indic.*, 60: 346–357.
- FOURNIER, M., D. CYR, B. BLAKLEY, H. BOERMANS & P. BROUSSEAU. 2000. Phagocytic activity as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am. Zool.* 40: 412–420.
- FREITES, L., C. LODEIROS, M. GUEVARA, J. ALIÓ & C. GRAZIANI 2012. Experiencias en el cultivo de organismos marinos en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela.24 (1): 5-24.
- FREITES, L., C. LODEIROS, D. ARRIECHE & A. DALES. 2014. Reproductive tactics of marine shellfish species from North-Eastern Venezuela: ecophysiological implications. In: E. Baqueiro-Cardenas (ed.). Spawning: biology, sexual strategies and ecological effects. Nova Science Publication, New York, pp. 73-105.
- [FRIDOVICH](#), I. 1998. Oxygen Toxicity: A Radical Explanation. *J Exp Biol*, 201 (8): 1203–1209.
- GABBOTT, P. 1983. Developmental and Seasonal Metabolic Activities in Marine Molluscs. *The Mollusca. Environmental Biochemistry and Physiology*, 2: 165-217.
- GABBOT, P.A., K. PEEK. 1991. Cellular biochemistry of the mantle tissue of the mussel *Mytilus edulis* L. *Aquaculture*, 94: 165-176.

- GALLENGER, S. M & R. MANN. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea gigas* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56:81 – 103.
- GARCÍA, R. & F. WINKLER. 2012. Asociación del color de la concha de reproductores de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) con la supervivencia, crecimiento y desarrollo larval de sus progenies. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 40(2): 367-375.
- GAZEAU, F., C. QUIBLIER, J.M. JANSEN, J. GATTUSO, J. MIDDELBURG & C. HEIP. 2007. Impact of Elevated Carbon Dioxide on Shellfish Acidification, *Geophysical Research Letters*, Vol. 34.
- GERVIS & N.A. SIMS. 1992. *The Biology and Culture of Pearl Oysters (Bivalvia: Pteriidae)*. M.H Printed in Manila, Philippines Published by the Overseas Development Administration 94 Victoria Street, London SW1E 5JL, United Kingdom and the International Center for Living Aquatic Resources Management, MC P.O. Box 1501, Makati, Metro Manila.
- GIESE, A & J. PEARSE. 1974. *Reproduction of marine invertebrates*. Academic Press, New York. pp. 1-21.
- GIL, G.M. & J. W. THOMÉ. 2004. Descrição do ciclo reproductivo de *Donax hanleyanus* (Bivalvia, donacidae) no sul do Brasil. *Iheringia, Serie Zoologia*, 94:271-276.
- GÓMEZ, A. 1999. *Los recursos marinos renovables del estado Nueva Esparta, Venezuela*. Tomo I. Invertebrados y algas. Organización Gráficas Capriles, Caracas. Venezuela. 208 pp.
- GÓMEZ, M. E. 2008. Evaluación de indicadores cualitativos y cuantitativos de calidad de gónada y tejidos somáticos de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) relacionados con la reproducción (Tesis de postgrado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.
- GORBI, S., C. LAMBERTI, A. NOTTI, M. BENEDETTI, D. FATTORINI, G. MOLTEDO, & F. REGOLI. 2008. An ecotoxicological protocol with caged mussels,

Mytilus galloprovincialis, for monitoring the impact of an offshore platform in the Adriatic sea. *Mar. Environ. Res.*, 65: 34–49.

Grazer V. & O. MARTIN. 2012. Investigating Climate Change and Reproduction: Experimental Tools from Evolutionary Biology. *Biology (Basel)*, 1(2):411–438. doi: [10.3390/biology1020411](https://doi.org/10.3390/biology1020411)

GUTTERIDGE, J.M.C. & B. HALLIWELL. 1990. The measurement and the mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, 15: 129-135.

HABIG, W.H., M.J. PABST & W.B. JAKOBY. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249: 7130–7139.

HAIDER, F., S. TIMMB, T. BRUHNSA, M. NUSRAT NOORA & I. SOKOLOVA. 2020. Effects of prolonged food limitation on energy metabolism and burrowing activity of an infaunal marine bivalve, *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 250.

HAMZA-CHAFFAI, A., J. PELLERIN & J. AMIARD. 2003. Health assessment of a marine bivalve *Ruditapes decussates* from the Gulf of Gabes (Tunisia). *Environ Int*, 28: 609-617.

HE, G., X. LIU, Y. XU, J. LIANG, Y. DENG, Y. ZHANG & L. ZHAO. 2021. Repeated exposure to simulated marine heatwaves enhances the thermal tolerance in pearl oysters. *Aquatic Toxicology*, 239: 181-192.

HELM, M.M., N. BOURNE & A. LOVATELLI. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, FAO. 182 pp.

HELMUTH, B., N. MIESZKOWSKA, P. MOORE & S.J. HAWKINS. 2006. Living on the edge of two changing worlds: forecasting the responses of rocky intertidal ecosystems to climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37:337-404.

HERNÁNDEZ, M., L. ÁLVAREZ, D. MARTÍNEZ, D. MACEIRA, A. FERNÁNDEZ, & J. ESPINOSA. 2018. Capítulo 11. Moluscos terrestres y dulceacuícolas. En

Carlos, M & C. Daryl (Eds.), *Diversidad Biológica de Cuba. Métodos de inventario, monitoreo y colecciones biológicas*. Editorial AMA, La Habana, 164–191.

HOLMSTRUP, M., A. METTE BINDESBØL, G. JANNEKE OOSTINGH, A. DUSCHL, V. SCHEIL, H. KÖHLER, S. LOUREIRO, A. SOARES, A. FERREIRA, C. KIENLE, A. GERHARDT, R. LASKOWSKI, P. KRAMARZ, M. BAYLEY, C. SVENDSEN & D. SPURGEON. 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of The Total Environment*. 408: 3746-3762.

HOWARD D. W., E. J. LEWIS, J. KELLER & C. S. SMITH. 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. *NOOA Technical Memorandum NOS NCCOS5*, 218pp.

HUAYANG, Z. DIANCHANG, J. SHIGUI, L. YOUNING, Z. NAN, W. YU & M. ZHENHUA . 2017. Morphological variations of the winged pearl oyster *Pteria penguin* (Roding, 1798) from South China Sea. *Indian J. Fish.*, 64(1): 9-17, DOI: 10.21077

HUO, S., Z. WANG, S. ZHU, F. CUI, B. ZOU, W. YOU, Z. YUAN & R. DONG. 2014. Optimization of alkaline flocculation for harvesting of *Scenedesmus quadricauda* n°507 and *Chaetoceros muelleri* n°862. *Energies*, 7(9): 6186-6195.

IPCC, 2013. Cambio climático 2013: Bases físicas Resumen para responsables de políticas Informe del Grupo de trabajo I del IPCC Resumen técnico. [THOMAS F. STOCKER, DAHE QIN, GIAN-KASPER PLATTNER, MELINDA M.B. TIGNOR, SIMON K. ALLEN, JUDITH BOSCHUNG ALEXANDER NAUELS, YU XIA, VINCENT BEX, PAULINE M. MIDGLEY (eds.)]. Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, 204 págs.

ISTOMINA, A., O. YELOVSKAYA, V. CHELOMIN, A. KARPENKO & A. ZVYAGINTSEV. 2021. Antioxidant activity of Far Eastern bivalves in their natural habitat. *Marine Environmental Research* 169.

JARAMILLO, J. & A. VALDIVIA. 2016. Fundamento de estrés oxidativo. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. Primera Edición, México.

- JIMÉNEZ, M., C. LODEIROS & B. MÁRQUEZ. 2000. Captación de juveniles de la madre perla *Pinctada imbricata* con colectores artificiales en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Caribb. J. Sci.*, 36: 221-226.
- JOUAUX, A., J. L. BLIN, B. ADELIN, C. HEUDE-BERTHELIN, P. SOURDAINE, M. MATHIEU & K. KELLNER. 2013. Impact of energy storage strategies on gametogenesis and reproductive effort in diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Involvement of insulin signaling. *Aquaculture* 388:173-181.
- KANG, H. Y., L. YOUNG-JAE, C. KWANG-SIK, P. HYUN JE, Y. SUNG- GYU & K. CHANG-KEUN. 2016. Combined effect of temperature and seston concentration on the physiological energetics of the manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Plos one*, 11(13): 1-17.
- KATSANEVAKIS, S. E. LEFKADITOU, S. GALINOUMITSOU, D. KOUTSOUBAS & A. ZENETOS. 2008. Molluscan species of minor commercial interest in Hellenic seas: Distribution, exploitation and conservation status. *Medit. Mar. Sci.*, 9(1): 77-118.
- KIMANI, E., K. MAVUTI & T. MUKIAMA. 2006. The reproductive activity of the pearl oyster *Pinctada imbricata* Röding 1798 (Pteriidae) in Gazi Bay, Kenya. *Tropical Zoology*, 19: 159-174.
- KISHORE, P., & P. C. SOUTHGATE. 2015. Does the quality of cultured pearls from the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*, improve after the second graft? *Aquacultura*, 4(46): 97-102.
- KISHORE, P., G. B. VUIBEQA & P.C. SOUTHGATE. 2018. Developing a national spat collection program for pearl oysters in the Fiji Island supporting pearl industry development and livelihoods. *Aquaculture Report*, 9, 46-52.
- KOVÁČOVÁ, J. & Z. SVOBODOVÁ. 2009. Can thiol compounds be used as biomarkers of aquatic ecosystem contamination by cadmium? *Interdisc. Toxicol.*, 2: 177-183.

- LEGALL, G., E. BACHÈRE & E. MIALHE. 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific rickettsial-like organisms. *Dis. Aquat. Org.* 11: 181-186.
- LEMUS, M & K. CHUNG. 2006. Effect Of Copper On The Rna/Dna Ratio At Different Temperatures In Juveniles Of *Petenia Kraussii* (Pisces: Cichlidae). *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente* 45 (1): 9-15.
- LEMUS, J. 2014. Análisis espacial para el ordenamiento de la zona costera del Golfo de Cariaco, estado Sucre, Venezuela. *Terra*, 30(47), 33-53.
- LEMUS, M., N. ROJAS, K. CHUNG & A. BARCELÓ. 2014. Ajustes Electrolíticos y Relación ARN/ADN en *Perna viridis* (Linnaeus, 1958) Sometido a Cambios de Salinidad. *The Biologist* (Lima), 12(1): 23-32.
- LEÓN, L., T. CABRERA & L. TROCOLI. 1987. Estudio sobre la fijación y el índice de engorde de la ostra perla *Pinctada imbricata* Röding 1798, en tres bancos naturales del nororiente de Venezuela. *Contr. Cient. U.D.O.* 12: 3-44.
- LEÓN, L. & Q. MILLÁN. 1996. Variación del índice de condición y de la condición bromatológica de la ostra perlífera *Pinctada imbricata* Röding 1798 (Mollusca: Bivalvia) en Las Cabeceras, Isla de Cubagua, Venezuela. *Mem. Soc. Cien. La Salle*, 146: 23-41.
- LEÓN, L. 2009. Los ostrales de *Pinctada imbricata* del Edo. Nueva Esparta. II reunión Técnica de la Red Suramericana de Conservación de Moluscos Bivalvos. Centro de Investigaciones Ecológicas Guayacán, Universidad de Oriente- Estación Fidaes-IDEA. 9-12.
- LESSER, M. P., M.A. BAILEY, D.G. MERSELIS & J. R. MORRISON. 2010. Physiological response of the blue mussel *Mytilus edulis* to differences in food and temperature in the Gulf of Maine. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56: 41- 51.
- LI, SH., CH. LIU, A. ZHAN. L. XIE & R. ZHANG. 2017. Influencing Mechanism of Ocean Acidification on Byssus Performance in the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Environmental Science and Technology*, 51(13). doi: [10.1021/acs.est.7b02132](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02132)

- LIU, W., Z. YU, X. HUANG, Y. SHI, J. LIN, H. ZHANG, X. YI & M. HE. 2017. Effect of ocean acidification on growth, calcification, and gene expression in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Marine Environmental Research* 130:174-180.
- LISTA, M., C. VELÁSQUEZ, A. PRIETO & Y. LONGART. 2014. Condición fisiológica de *Arca zebra* por grupos de tallas y su asociación con variables ambientales, en el banco de Chacopata, estado Sucre. *Zootecnia Trop.*, 32 (1): 33-43.
- LIVINGSTONE, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- LIVINGSTONE DR. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Méd. Vét.*, 154(6):427-447.
- LIVINGSTONE, D.R., P. GARCIA-MARTINEZ, M. MICHEL, D. RIBERA & G.W. WINSTON 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis*, and other molluscs. *Funct. Ecol.* 4: 415–424.
- LOBO-DA-CUNHA, A. 2000. The digestive cells of the hepatopancreas in *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): ultrastructural and cytochemical study. *Tissue and Cell*, 32: 9–57.
- LODEIROS, C. 1999. Selección de especies de bivalvos representantes de ambientes marino-costeros con potencialidades para su empleo en evaluaciones de toxicidad. Informe. Servicio INTEVEP S.A., 67 pp.
- LODEIROS C & J. HIMMELMAN. 1999. Reproductive cycle of the bivalve *Lima scabra* (Pterioidea: Limidae) and its association with environmental conditions. *Rev. Biol. Trop.* 47: 411-418.
- LODEIROS, C., B. MARÍN & A. PRIETO. 1999. *Catálogo de moluscos marinos de las costas nororientales de Venezuela. Clase Bivalvia*. APUDONS. Cumaná, Venezuela. 110 pp.

- LODEIROS, C., D. PICO, A. PRIETO, N. NARVAÉZ & A. GUERRA. 2002. Growth and survival of the pearl oyster *Pinctada imbricata* (Röding, 1758) in suspended and bottom culture in the Golfo de Cariaco. Venezuela. *Aquacult. Int*, 10: 327-339.
- LODEIROS C. & L. FREITES. 2008. estado actual y perspectivas del cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela. En: Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 135-150.
- LODEIROS C., FREITES L., GRAZIANI C. ALIÓ J. 2011. Cultivation of bivalve mollusc in Venezuela: Diversity, potencial and infrastructure for see production. In: Lovatelli A., Sarkis S. A Regional shellfish Hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Fisheries and Aquaculture Proceedings. No. 19. Rome, FAO. 2011. pp. 161–170
- LODEIROS, C., L. FREITES, A. MÁRQUEZ, M.E. GLEM, M. GUEVARA & P.E. SAUCEDO. 2016. Comparative growth and survival of spat of the Caribbean Pearl oyster, *Pinctada imbricata*, cultivated indoor with microalgae diets and outdoor with natural diet. *Aquaculture Nutrition*, 23(3): 511-522.
- LODEIROS, C & A. LOVATELLI, 2019. Producción de semillas de la ostra perla *Pinctada imbricata*. Un manual práctico. FAO Documento técnico de pesca y acuicultura. No. 636. Roma, FAO. 88 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- LOJÁN-AVELLÁN, M., E. ZAPATA-VÍVENES, L. TREVIÑO & C. LODEIROS. 2021. Biomarcadores celulares e inmunológicos en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) cultivada en un estuario tropical durante la temporada lluviosa. *La Técnica: Revista de las Agrociencias* e-ISSN 2477-8982 <https://revistas>. Edición Especial (52-68).
- LÓPEZ-ROJAS, V., R. FLORES-GARZA, P. FLORES-RODRÍGUEZ, C. TORREBLANCA-RAMÍREZ & S. GARCÍA-IBÁÑEZ. 2017. La clase Bivalvia en sitios rocosos

de las Regiones Marinas Prioritarias en Guerrero, México: riqueza de especies, abundancia y distribución. *Hidrobiológica*, 27 (1): 69-86.

LOVATELLI A. & S. SARKIS. 2011. A regional shellfish hatchery for the Wider Caribbean: Assessing its feasibility and sustainability. FAO Regional Technical Workshop. 18-21 october. Kingston, Jamaica. FAO Fisheries and Aquaculture Proceeding. No. 19. Rome, FAO. 246 pp.

LUBET, P., J. Y. BERNARD, R. FAVERIS & I. ROBBINS. 1987. Physiologie de la reproduction de la coquille St-Jacques (*Pecten maximus* L.). *Oceanis* 13 (3): 265-290.

LUSHCHAK, V. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 101:13–30.

MAEDA- MARTÍNEZ, A. N. 2011. Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género *Nodipecten*/ editado por Alfonso N. Maeda- Martínez, César Lodeiros Seijo (et al.). México:Limusa: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.400p.

MACKIE, G.L. 1984. Bivalves. In: Tompa, A.S., N.H. Verdonk and J.A.M. Van Den Biggelaas. The Mollusca. Reproduction, 7: 351-402 p.

MACKENZIE, C., L. TROCCOLI & L. LEÓN. 2003. History of the Atlantic pearl-oyster, *Pinctada imbricata*, industry in Venezuela and Colombia, with biological and ecological observations. *Marine Fisheries Review* 65, 1-20.

MANDUZIO, H., ROCHER, B., DURAND, F., GALAP, C., LEBOULENGER, F. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebrate Survival Journal*, 2(2), 91–104.

MARCANO, V. 1984. Aspectos biológicos de la reproducción en la Ostra Perla *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) (Mollusca: Bivalvia) de Punta Las Cabeceras, Isla de Cubagua, Venezuela. Trabajo de Grado, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 74 pp

- MARCANO, J.S. 2001. Evaluación de la pesquería de la ostra perla *Pinctada imbricata* en el oriente de Venezuela. INIA, Informe técnico de gestión anual, 18 p.
- MARCANO, J., A. PRIETO, A. LÁREZ, J. ALÍO & H. SANABRIA. 2005. Crecimiento y mortalidad de *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) en Guamachito, Península de Araya, Sucre, Venezuela. *Ciencias Marinas*. 31(2): 387–397.
- MARQUES, R & E. BARBIERI. 2015. Anatomical Differences Among Specimens of *Pinctada Imbricata* Röding, 1798 From Different South American Localities. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, 41:751-761
- MÁRQUEZ A., C. LODEIROS, D. SEMIDEY, M. CARPIO & C. GRAZIANI. 2011. Crecimiento y supervivencia de la ostra perlífera *Pinctada imbricata* (Röding 1798), bajo diferentes sistemas de confinamiento en cultivo Suspendido. *Zool. Trop.* 29(3): 337-351.
- MATHIEU, M & P. LUBET. 1983. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves- a brief review. *Invertebrate Reproduction & Development*, 23 (2-3): 123-129.
- MAYTÍN, C., R. CARRASCO, R. RODRÍGUEZ & J. LÓPEZ. 2020. “Una aproximación a la historia y situación actual de las investigaciones científicas sobre cambio climático en Venezuela”. Algunos avances y retos temáticos. *Terra*. 36 (60). UCV. Venezuela
- MC CORD, J.M., & I. FRIDOVICH. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049–6055.
- MERCER, E. H & M. S. BIRBECK. 1979. Manual de microscopía electrónica para biólogos (2a ed.). Madrid: H. Blume Ediciones. 134 p
- MONTEFORTE, M. 1996. Cultivo de ostras perleras y perlicultura. In: Estudio de potencial pesquero y acuícola de baja California Sur. México. 572-612 pp.

- MORGAN, M.J. & LIU Z.G. 2011. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res.* 21(1):103-15.
- Moss, S. 1994. Use of nucleic acids as indicators of growth in juvenile white shrimp *Penaeus vannamei*. *Marine Biology*, 120:359-367.
- MORTON, J. E. 1960. Molluscs. New York. Harper & Brothers.
- MOUKRIM, A., M. ID HALLA, A. KAAYA, A. BOUHAIMI, S. BENOMAR & M. MATHIEU. 2008. Pattern of reserves in the two mussels species *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* living on Moroccan coasts: annual variation and effect of pollution. *Sociedad Española de Malacología*, 26(1): 17- 28.
- MURCIA- REQUENA, J., A. TÓRTOLA- SÁNCHEZ, M. TÓRTOLA- GARCÍA, A. GARCÍA-MESEGUER, S. QUIÑONERO-SALGADO & J. LÓPEZ-SORIANO. 2022. Presencia de una población de *Pinctada radiata* (Leach, 1814) (Bivalvia: Margaritidae) en el Mar Menor (Murcia, España). *Spira* 8:43-46
- NAKAMURA, M., K. MORI, S. INOOKA & T. NOMURA. 1985. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). *Dev. Comp. Immunol*, 9: 407-417.
- NAKAYAMA, K. & T. MARUYAMA. 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Dev. Comp. Immunol*, 22: 151-159.
- NAGARAJAN, R., S. LEA & J.D GOSS-CUSTARD. 2006. Seasonal Variations in Mussel, *Mytilus edulis* L. Shell Thickness and Strength and Their Ecological Implications. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 339:241-250
- NÖEL, B., V. BOULO, D. CHAGOT, E. MIALHE, F. PAOLUCCI, C. CLAVIES, E. HERVAUD & R. ELSTON. 1991. Preparation and characterization of monoclonal- antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dis. Aquat. Org*, 10: 51- 58.
- NUÑEZ, P., C. LODEIROS, V. ACOSTA & I. CASTILLO. 2006. Captación de semilla de moluscos bivalvos en diferentes sustratos artificiales en la ensenada

- de Turpialito, Golfo de Cariaco Venezuela. *Zootecnia Trop*, 24: 483-496.
- NUSETTI, O., L. MARCANO, E. ZAPATA, M. ESCLAPÉS, S. NUSETTI & C. LODEIROS. 2004. Respuestas inmunológicas y de enzimas antioxidantes en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Mollusca: Pteridae) expuesta a niveles subletales de fuel oil N° 6. *Interciencia*, 29: 324-329.
- OCHOA DM & JF. GONZÁLEZ. 2008. Estrés Oxidativo En Peces Inducido Por Contaminantes Ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 55: 115-126.
- O'CONNOR, W. & N. LAWLER. 2004. Reproductive condition of the pearl oyster, *Pinctada imbricata*, Roding, in Port Stephens, New South Wales, Australia. *Aquaculture*, 35: 385-396.
- OHKAWA, H., N. OHISHI & K. YAKI. 1979. Assays for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95: 331-358.
- OLIVO-GARRIDO, M. L. & A. G. SOTO-OLIVO. 2012. Impactos potenciales de los cambios climáticos. Universidad, Ciencia Y Tecnología. 16(62):12-22.
- PARKER, L., P. ROSS, W. O'CONNOR, H. PORTNER, E. SCANES & J. WRIGHT. 2013. Predicting the Response of Molluscs to the Impact of Ocean Acidification. *Biology*, 2: 651-692.
- PAULET, Y. M., A. LUCAS & A. GERARD. 1988. Reproduction and larval development in two *Pecten maximus* (L.) populations from Brittany. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, 19 (2): 145-156.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J. 1994. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. *J. Aquat. Ecosyst. Health*, 3: 101-111.
- PÉREZ- CAMACHO, A. & G. ROMÁN. 1987. La reproducción en los moluscos bivalvos. En: Reproducción en Acuicultura. Espinosa, J&U Labarta, U. (eds.): Plan de Formación de Técnicos superiores en Acuicultura. Madrid, España, pp 133-216.

- PÉREZ, E., C. LODEIROS, D. SEMIDEY, E. URIBE & L. FREITES. 2016. Crecimiento, supervivencia e influencia de factores ambientales en tres cohortes de la ostra perla *Pinctada imbricata*, en cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 44(1): 99-112.
- PICO, D. 2000. Crecimiento de la ostra perlífera *Pinctada imbricata* en condiciones de cultivo suspendido y de fondo en el Golfo de Cariaco. Tesis de grado Universidad de Oriente, Venezuela. 56 pp.
- PIPE, R. K. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 111- 122.
- PIPE, R. K., J. A. COLES, M. E. THOMAS, V. U. FOSSATO & A. L. PULSFORD. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. *Aquat. Toxicol.*, 32: 59 – 73.
- PORTE, C. M., M. SOLÉ, J. ALBAIGES & D. R. LIVINGSTONE. 1991. Response of mixed function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus edulis* to organic pollution. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 183-186.
- POUVREAU, S., A. GANGNERY, J. TIAPARI, F. LAGARDE, M. GARNIER & BODOY, A. 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto Atoll (French Polynesia). *Aquatic Living Resources*, 13: 37-48.
- RACOTTA, S., J.L. RAMÍREZ, S. AACUTEVILA & A. M. IBARRA. 1998. Biochemical composition of gonad and muscle in the catarina scallop, *Argopecten ventricosus*, after reproductive conditioning under two feeding systems. *Aquaculture*, 163: 111-122.
- RANGEL-DÁVALOS C. & J. CHÁVEZ- VILLALBA. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la madreperla y la cocha nácar. Secretaría de Pesca. México. 104 pp.
- RECABARREN-VILLALÓN, T., A. C. RONDA & A. H. ARIAS. 2019. Uso de biomarcadores en la evaluación ambiental de ecosistemas marinos en América. *JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático*. 1(2): 1-18. doi 10.26359/52462.0719.

- REGOLI, F., G. FRENZILLI, R. BOCHETTI, F. ANNARUMMA, V. SCARCELLI, D. FATTORINI & M. NIGRO. 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat Toxicol*, 68: 167-178.
- ROBINSON, H.W. & C.G. HOGDEN. 1940. The Biuret reaction in the determination of serum proteins: II. Measurements made by a Duboscq colorimeter compared with values obtained by the Kjeldahl procedure. *J. Biol. Chem.*, 135: 727-731.
- RODRÍGUEZ-JARAMILLO, C., M.A. HURTADO, E. ROMERO-VIVAS, J.L. RAMÍREZ, M. MANZANO & E. PALACIOS. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostera corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *J. Shellfish Res.* 27(5): 1129-1141.
- ROJAS-FIGUERA & J. PABÓN-CAICEDO. 2015. Sobre el calentamiento y la acidificación del océano mundial y su posible expresión en el medio marino colombiano. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 151(39): 201-2017.
- ROMÁN, G., G. MARTÍNEZ, O. GARCÍA & L. FREITES. 2002. *Reproduction*. En: *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. (Ed.) Maeda- Martínez, A.N, Editorial Limusa, México. 27-60.
- ROMERO-FERREIRA, P., D. ARRIECHE, V. ACOSTA, L. PÉREZ & C. LODEIROS. 2016. Histoquímica de la glándula digestiva en la ostra perla *Pinctada imbricata* (Pterioida: Pteriidae) durante su ciclo gametogénico, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 64 (2): 849-858.
- ROMERO- FERREIRA, P., D. ARRIECHE, V. ACOSTA, L. PÉREZ & C. LODEIROS. 2017. Ciclo gametogénico de la ostra *Pinctada imbricata* en cultivo suspendido en el Golfo de Cariaco, Venezuela. *Lat. Am. J. aquat Res*, 45(1): 139-148.
- RUEDA-ROA, DT & FE. MULLER-KARGER. 2013. The southern Caribbean upwelling system: Sea surface temperature, wind forcing and chlorophyll concentration patterns. *Deep-Sea Research I*, 78: 102-114.

- RUFFINI, E. 1984. Desarrollo larval experimental de la ostra perla *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) (Mollusca: bivalvia) y algunas observaciones sobre su reproducción en el banco natural de Punta Las Cabeceras, Isla de Cubagua, Venezuela. Trabajo de Grado. Universidad de Oriente, Cumaná, 51 pp.
- SABATINI, D., K. BENSCH & R.J. BARNETT. 1963. *Cytochemistry Electron Microscopy*. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. 17: 19-58. jcb.rupress.org.
- SABATINI, S., I. ROCCHETTA, D. NAHABEDIAN, C. LUQUET, M. EPPIS, L. BIANCHI & M. C. RIOS. 2011. Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*.154: 391-398.
- SABELLI, B. 1982. *Guía de Moluscos*. Madrid, España: Ed. Grijalbo. 341 pp.
- SALAYA, J .1999. La pesca y el cultivo de moluscos bivalvos en Venezuela, situación y tendencias a nivel de Latinoamerica y el Caribe. Mem. Taller Venezolano sobre aprovechamiento y comercialización de moluscos bivalvos. pp. 5-1
- SÁNCHEZ, G. 2013. Defensas antioxidantes en *Perna viridis* (Bivalvia: Mitilidae) bajo condiciones de anoxia, anhidrobiosis y reoxigenación, previa exposición a metales pesados. Tesis de Magister Scientiarum en Biología Aplicada, mención Ecotoxicología. Universidad de Oriente, Estado Sucre, 102 pp.
- SAUCEDO, P., C. RODRIGUEZ-JARAMILLO, C. ALDANA-AVILES, P. MONSALVO-SPENCER, T. REYNOSO-GRANADOS, H. VILLARREAL & M. MONTEFORTE. 2001. Gonadic conditioning of the calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856), under two temperature regimes. *Aquaculture* 195:103–119.
- SAUCEDO, P., I RACOTTA, H. VILLARREAL & M. MONTEFORTE. 2002. Seasonal changes in the histological and biochemical profile of the gonad, digestive gland, and muscle of the calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856) associated with gametogenesis. *J. Shellfish Res.*, 21(1):127-135.

- SAUCEDO, P. & P. SOUTHGATE. 2008. Reproduction, development and growth. The pearl oyster. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier 131-186.
- SCHVEZOV N, G.A. LOVRICH, O. FLORENTÍN & M.C. ROMERO. 2015. Baseline defense system of commercial male king crab *Lithodes santolla* from the Beagle Channel *Comparative Biochemistry and Physiology A* 181: 18-26.
- SCUDERI, D., P. BALISTRERI & A. GERMANA. 2019. Are *Pinctada radiata* (Leach, 1814) and *Pinctada fucata* (Gould, 1850) (Bivalvia Pteriidae) only synonyms or really different species? The case of some Mediterranean populations. *Biodiversity journal*, 10(4):415-426.
- SEMIDEY, D., A. MÁRQUEZ & C. LODEIROS. 2010. Crecimiento y supervivencia de la madre perla *Pinctada imbricata* (Röding 1798), bajo condiciones de cultivo suspendido, en cuerdas y cestas perleras. *Zootec Trop.* 28(4): 521-533.
- SHAFFEE, M.S. & M. DAOUIDI. 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia), from the Atlantic coast of Morocco. *Aquacult. Fish Manage.*, 22: 203-216.
- SHAN, B., Z. DENG, S. MA, D. SUN, Y. LIU, C. YANG, Q. WU & G. YU. 2023. A New Record of *Pinctada fucata* (Bivalvia: Pterioida: Pteriidae) in Mischief Reef: A Potential Invasive Species in the Nansha Islands, China. *Diversity*, 15, 578. [https:// doi.org/10.3390/d15040578](https://doi.org/10.3390/d15040578)
- SHUKLA, P. R., J. SKEG, E. CALVO BUENDIA, V. MASSON-DELMOTTE, H. PÖRTNER, D. ROBERTS, P. ZHAI, R. SLADE, S. CONNORS, S. VAN DIEMEN, M. FERRAT, E. HAUGHEY, S. LUZ, M. PATHAK, J. PETZOLD, J. PORTUGAL PEREIRA, P. VYAS, E. HUNTLEY, K. KISSICK, M. BELKACEMI & J. MALLEY (eds.) (2019). Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.

- SOKAL R & J ROHLF. 2012. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Fourth edition. WH Freeman and Company. San Francisco.
- SOKOLOVA, I., M. FREDERICH, R. BAGWE, G. LANNIG & A. SUKHOTIN. 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. [*Marine Environmental Research*, 79](#): 1-15.
- SOSA-ÁVALOS, R., J.M. HERNÁNDEZ-AYÓN, K. LOWDER, T.L. ESPINOSA-CARREÓN & C CHAPA BALCORTA. 2023. Efectos de la acidificación en organismos marinos de importancia ecológica y económica hacia futuros escenarios. p. 111-138. En: Rivera-Arriaga E., AzuzAdeath, I. (eds). La Década del Océano en México 2021-2030: La Ciencia que Necesitamos. RICOMAR, Universidad Autónoma de Campeche. 472 p. ISBN 978-607-8907-12-0. doi 10.26359/EPOMEX01202303
- SOUTHGATE, P. 2008. Pearl oyster culture. In: The Pearl oyster. Southgate P. & Lucas, J. (dirs.). *Elsevier*, NY. pp: 231-302.
- SOUTHGATE P & J. LUCAS. 2008. The pearl oyster. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier. 437-471.
- STOREY, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz J Med Biol Res*, 29 (12): 1715-1733.
- STRICKLAND, J. & T. PARSON. 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish.Res.*, 16: 167 – 315.
- SUÁREZ- ALONSO P., C. ÁLVAREZ- GONZÁLEZ, P. MOLIST -GARCÍA & F. SAN JUAN-SERRANO. 2007. Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultivado en la ría de Vigo (noroeste de la península Ibérica), *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 23 (1-4): 3-10.

- TAÏEB, N .2000. Distribution of Digestive Tubules And Fine Structure Of Digestive Cells Of *Aplysia Punctata* (CUVIER, 1803). *Journal of Molluscan Studies*, 67 (2):169-182.
- TËMKIN, I. 2006. Morfological perspective on the classification and evolution of recent Pterioidea (Mollusca; Bivalvia). *Zoological Journal on the Linnean Society*, 148: 253-312
- TËMKIN, I. 2010. Molecular phylogeny of pearl oysters and their relatives (Mollusca, Bivalvia, Pterioidea). *BMC Evolutionary Biology*, 10:342 <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/342>
- THEODOROU, J., C. PERDIKARIS & E. SPINOS. 2019. On the occurrence of rayed pearl oyster *Pinctada imbricata radiata* (Leach, 1814) in Western Greece (Ionian Sea) and its biofouling potential. *Biharean Biologist*, 13 (1): 4-7.
- THOMPSON, R. J., R. I. NEWELL, V. S. KENNEDY & R. MANN.1996. Reproductive processes and early development. In V. Kennedy, R. I. E. Newell, & A. Eble (Eds.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. College Park, Maryland: Maryland Sea Grant Book. pp. 335-370.
- TORREILLES, J. & M. C. GUERIN. 1999. Production of peroxy nitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. *Fish. Shellf. Immunol*, 9: 509-518.
- TRUJILLO, E., G. MARTÍNEZ & L. LEÓN. 2007. Dimensionamiento y configuración teórica de una línea de cultivo de ostra perla (*Pinctada imbricata*, Mollusca: Bivalvia), en la bahía de Charagato, isla de Cubagua, Venezuela. *Lat. Am. J. aquat Res*, 35: 39-54.
- TURNER, R. D. & P. J. BOYLE. 1975. Studies of bivalve larvae using the scanning electron microscope and critical point drying. *Bulletin of the American Malacological Union*, 1974: 59-65.
- URBAN, J. 2000. Culture potential of the pearl oyster *Pinctada imbricata* from the Caribbean. I. Gametogenic activity, growth, mortality and production of a natural population. *Aquaculture*, 189: 361-373.

- VARGAS-ALBORES, F. & M. A. BARRACO. 2001. *Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos*. En: *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. A.N. Maeda-Martínez (Ed.) Cap. 7: 127-146 pp.
- VÁSQUEZ, G., R. CRESCINI, W. VILLALBA, J. MOGOLLÓN & L. TROCCOLI. 2015. Aspectos biológicos básicos de *Pinctada imbricata* (Bivalvia:Pteriidae) en la laguna de La Restinga, isla de Margarita,Venezuela. *Rev. Mar. Cost.* 7: 117-132.
- VERGINELLI, R. & A. PRIETO. 1991. Producción secundaria de *Pinctada imbricata* (Röding, 1798) (Pterioidea: Pteridae) en una población del Golfo de Cariaco, Venezuela. *Acta Cient. Venez.*, 42: 138-144.
- VIARENGO A., L. CANESI, M. PERTICA, G. POLI, M. N. MOORE & M. ORUNESU. 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in tissue of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C: 37-42.
- VILLEGAS L., C. LODEIROS, K. MALAVÉ, J. REVILLA & M. LEMUS. 2015. Efecto Subletal Del Cadmio En La Ostra Perla Del Caribe *Pinctada Imbricata* (Pteroida: Pteriidae) Röding, 1798. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela.27 (1): 39-45.
- WANG, S. Y. & W. B. STICKLE. 1988. Biochemical composition of the blue crab *Callinectes sapidus* exposed to the water-soluble fraction of crude oil., *Mar. Biol.* 98: 23-30.
- WANG, A., Y. WANG, Z. GU, S. LI, Y. SHI & X. GUO. 2011. Development of expressed sequence tags from the pearl oyster, *Pinctada martensii* Dunker. *Mar. Biotechnol.* 13, 275–283. doi: 10.1007/s10126-010-9296-9
- WANG T. & Q. LI. 2018. Effects of Salinity and Temperature on Growth and Survival of Juvenile Iwagaki Oyster *Crassostrea nippona*. *J.Ocean Univ. China* (Oceanic and Coastal Sea Research), 17 (4): 941-946. doi: [10.1007/s11802-018-3536-4](https://doi.org/10.1007/s11802-018-3536-4)
- WANG J., R. REN & C. YAO. 2018. Oxidative stress responses of *Mytilus galloprovincialis* to acute cold and heat during air exposure. *Journal of Molluscan Studies*, 84 (3): 285–292.

- WELLADSEN, H. M., P. C. SOUTHGATE & K. HEIMANN. 2010. The effects of exposure to near-future levels of ocean acidification on shell characteristics of *Pinctadafucata* (Bivalvia: Pteriidae). *Molluscan Research* 30(3):125–130 <http://www.mapress.com/mr/>
- WINSTON G. W. & R. T. DI GIULIO. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol*, 19: 137-161.
- WISTON, G.W., M. N. MOORE, M. A. KIRCHIN & C. SOVERCHIA. 1996. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C: 221- 229.
- XIANG, N.C. ZHAO, X. DIAO, Q. HAN & H. ZHOU. 2017. Dynamic responses of antioxidant enzymes in pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 54:184-190.
- YAKIMOV, L., E. TSVETANOVA, A. GEORGIEVA, L. PETROV, A. ALEXANDROVA. 2018. Assessment Of The Oxidative Status Of Black Sea Mussels (*Mytilus Galloprovincialis* Lamark, 1819) From Bulgarian Coastal Areas With Introduction Of Specific Oxidative Stress Index. *Journal of Environmental Protection and Ecology* 19, No 4, 1614–1622.
- YEUNG, J. & K. LEUNG. 2013. Effects of animal size and nutritional status on the RNA/DNA ratio in different tissues of the green-lipped mussel *Perna viridis*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 93: 217–225.
- YSTAMBOULI, G. 2019. Marcadores De Estrés Oxidativo Y Cocientes Moleculares (Arn/Adn Y Proteína/Adn) En El Gasterópodo *Purpura Patula* Colectado En Güiria, Municipio Valdéz, Estado Sucre, Venezuela. Tesis de grado. Universidad de Oriente, Venezuela.
- YU, K., N. ZHANG, J. HUANG, Y. MAO, L. ZHANG & Y. DONG. 2019. Antioxidant response of *Pinctada imbricata* to sublethal exposure of fuel oil. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(35):358-367.
- ZAPATA- VIVENES, E. 2001. Regeneración tisular y estrés oxidativo en el poliqueto *Eurythoe complanata* (Polichaeta: Amphinomidae) expuestos a concentraciones subletales de una fracción de lubricantes usados de

motores de vehículo. Trab. Grad., Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela, 126 pp.

- ZAPATA-VÍVENES, E., M. TOVAR-SÁNCHEZ, O. NUSETTI, M. LEMUS & G. SÁNCHEZ. 2014. Tolerancia a la anoxia y defensas antioxidantes en el mejillón verde *Perna viridis* (Linneus, 1758) bajo exposición aguda al cadmio. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(3): 514-522.
- ZAPATA-VÍVENES, E., G. SÁNCHEZ & L. MARCANO. 2015. Reservas energéticas e índices moleculares de condición en *Lima (Ctenoides) scabra* expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles. *Zootec Trop*, 33 (1): 37-45.
- ZAPATA-VÍVENES, E., O. NUSETTI & L. MARCANO. 2017. Temporal variations of antioxidant defenses and Protein:DNA and RNA:DNA indices in the polychaete *Eurythoe complanata*. *Rev Biol Mar Oceanogr*, 52: 529-538.
- ZAPATA-VÍVENES, E., L. MARCANO & V. ACOSTA. 2018. Respuestas inmunológicas, estabilidad lisosomal y frecuencia de micronúcleos en *Eurythoe complanata* (Polychaeta: Amphinomidae) expuestos a una fracción acuosa de lubricantes usados de motores de automóviles. *Rev. Int. de Contam. Ambient.*, 33: 297-305.
- ZAPATA-VÍVENES, E., O. NUSETTI, L. MARCANO, G. SÁNCHEZ & H. GUDERLEY. 2020. Antioxidant defenses of flame scallop *Ctenoides scaber* (Born, 1778) exposed to the water-soluble fraction of used vehicle crankcase oils. *Toxicology Reports* 7: 1597–1606.
- ZAPATA-VÍVENES, E., G. SÁNCHEZ, L. MARCANO & M. ANTÓN. 2024. Inmunotoxicidad y daño lisosomal en la ostra *Pinctada imbricata* (Röding) expuesta a lubricantes usados de motores de automóviles. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 53 (1), 9-24.
- Zenetos, A., M. Cinar, M. Pancucci-Papadopoulou, J. Harmelin, G. Furnari, F. Andaloro, N. Bellou, N. Streftaris & Zibrowius, H. 2005. Annotated list of marine alien species in the Mediterranean with records of the worst invasive species *Mediterranean Marine Science*, 6(2):63–118. <https://doi.org/10.12681/mms.186>

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Influencia de factores ambientales sobre el sistema antioxidante de la ostra perla <i>Pinctada imbricata</i> (Röding, 1758)
---------------	---

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código ORCID / e-mail	
Longart R., Yelipza D. C	ORCID	
	e-mail	ylongart@yahoo.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Pinctada imbricata</i>
enzimas antioxidantes
histoquímica
ciclo reproductivo

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Área o Línea de investigación:

Área	Subáreas
Ciencias	Biología Marina
Línea de Investigación: Doctorado	

Resumen (abstract):

Pinctada imbricata (Roding, 1758) es un bivalvo que forma densos bancos en el Mar Caribe, donde es explotada por las perlas y el nácar. Además, en el nororiente de Venezuela es apreciada por su carne. Al habitar la zona costera está sometida a cambios ambientales, que pueden afectar la condición fisiológica, siendo el propósito de ésta investigación evaluar, en una población del Golfo de Cariaco, la condición fisiológica por medio de biomarcadores de estrés oxidativo e índices moleculares en la glándula digestiva y músculo abductor. Los ejemplares se colectaron entre abril 2017 a enero 2018, en Merito, Municipio Cruz Salmerón Acosta. Se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S- transferasa (GST), el marcador de daño oxidativo (TBARS), grupos tioles totales (-SH), la relación ARN/ADN y Proteína/ADN. Se cuantificaron las reservas de lípidos y carbohidratos de la glándula digestiva y gónada por métodos histoquímicos entre los estadios de madurez sexual usando microscopía de luz de alta resolución y tinción con azul de toluidina, y análisis de imágenes. Las enzimas (CAT, GST y SOD) mostraron valores dentro del rango normal, sin diferencias estadísticamente significativas entre los meses. Los índices ARN/ADN y Proteína/ADN, estuvieron entre los rangos normales de crecimiento para especies de moluscos. El ARN/ADN presentó valores máximos asociado con en el estadio de madurez (III) seguido de una caída en el desove (IV). La variabilidad en las respuestas enzimáticas antioxidantes puede estar asociada al ciclo reproductivo continuo, lo que conduce al ajuste del metabolismo aerobio energético e integración funcional de los tejidos. Los promedios de los índices moleculares evidencian un estado fisiológico óptimo para los organismos. Se identificaron hembras en los estadios de gametogénesis activa (II), madurez (III) y desove (IV), y machos en gametogénesis activa (II); en ambos sexos los acinos están entremezclados con el tejido conjuntivo, presentando escasos gametos en diferentes estadios de desarrollo; en los machos las espermatogonias y espermatocitos secundarios se identificaron en acinos dilatados; en hembras se observaron ovogonias, ovocitos pedunculados, ovocitos y ovocitos atrésicos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail		
Dr. Arrieche G. Dwight	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	ORCID		
	e-mail	darrieche@udo.edu.ve	
Dra. Jiménez Mayre	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	ORCID		
	e-mail		
Dra. Licet Berenice	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	ORCID		
	e-mail		
Dra. Salazar Sinatra	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	ORCID		
	e-mail		
Dr. Freitas Luis	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	ORCID		
	e-mail		

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2024	06	28

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo
NSUTDR_LRYC2024.doc

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo: Doctor en Ciencias Marinas**Nivel Asociado con el Trabajo:** Doctorado**Área de Estudio:** Ciencias Marinas**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:** Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Letido el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLAÑOS CUNELG
Secretario

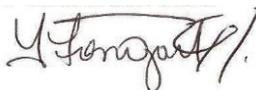
UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30

C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Concejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Concejo Universitario, para su autorización”.



Yelipza Del C. Longart R.
Autor



Dr. Dwight Arrieche
Tutor