

**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN Y BIOLOGÍA COMPARATIVA DE LOS OJOS PALEALES  
DE LOS PECTÍNIDOS  
*ZYGOCHLAMYS PATAGONICA Y ARGOPECTEN PURPURATUS***

ALEJANDRA DOMINIQUE DIAZ VALDIVIA

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Tutor Dr. Oliver Schmachtenberg

2020

## Abstract

The visual system of the Pectinidae family (bivalve molluscs) has aroused the interest of many studies, mainly because of the complexity of their eyes with morphological and functional adaptations to their habitat. The non-cephalic eyes of the scallops are composed of a cornea, lens, pigmentary epithelium, a double inverted retina and a concave mirror. Prior studies have described the retina, lens and mirror from the scallop eye, however, the cellular components have not been explored in detail, so there is a gap in our understanding of how the eye works in these animals, and in what way the ultrastructural components support the functional and optical properties. It has been described that the morphology of the eye varies between sessile species compared to mobile species. The peruvian scallop *Argopecten purpuratus* and the patagonian scallop *Zygochlamys patagonica* are two important hydrobiological resources which inhabit two different latitudes in Chile (5°S to 33°S and 40° to 48°S, respectively). The objective of this study was to compare and characterize the components of pallial eyes of these two species using optical and TEM microscopy, with thin (20 µm) and ultra-thin sections (90 nm). Ultrastructural analysis of the eyes in the two species indicates most of the cellular components are conserved between the two species. However, structures such as the cornea and the lens vary between *Z. patagonica* and *A. purpuratus*. In addition, the presence of actin filaments was detected mainly between different structures of the optic vesicle in *A. purpuratus*, which would explain the pupillary response previously described in scallops in scenarios of different light intensities. These structural adaptations reaffirm the refined morphology and the importance of vision for this bivalve family, despite having a limited system for neuronal processing.

## Resumen

El sistema visual de la familia Pectinidae (moluscos bivalvos) ha despertado el interés de muchos estudios, principalmente debido a la complejidad de sus ojos con adaptaciones morfológicas y funcionales a su hábitat. Los ojos no cefálicos de los ostiones están compuestos por una córnea, lente, células epiteliales pigmentadas, una retina doble invertida y un espejo cóncavo. Estudios anteriores han descrito la retina, el lente y el espejo del ojo del ostión, sin embargo, los componentes celulares no se han explorado en detalle, por lo que existe una brecha en nuestra comprensión de cómo funciona el ojo en estos animales y de qué manera los componentes ultraestructurales apoyan las propiedades funcionales y ópticas. Se ha descrito que la morfología del ojo varía entre las especies sésiles en comparación con las especies móviles. El ostión *Argopecten purpuratus*, y el ostión patagónico *Zygochlamys patagonica* corresponden a dos recursos hidrobiológicos importantes que habitan en Chile en dos latitudes (5°S a 33°S y 40° a 48°S), respectivamente. El objetivo de este estudio fue comparar y caracterizar los componentes de los ojos paleales de estas dos especies utilizando microscopía óptica y TEM, con secciones delgadas (20 µm) y ultrafinas (90 nm). El análisis ultraestructural de los ojos en las dos especies indica que la mayoría de los componentes celulares se conservan entre las dos especies. Sin embargo, estructuras como la córnea y el lente varían entre las especies estudiadas. Además, se detectó la presencia de filamentos de actina mayoritariamente entre diferentes estructuras de la vesícula óptica en *A. purpuratus*, lo que explicaría la respuesta pupilar previamente descrita en pectínidos ante escenarios de diferentes intensidades de luz. Las adaptaciones estructurales reafirman la morfología refinada y la importancia de la visión para esta familia de bivalvos, a pesar de tener un sistema limitado para el procesamiento neuronal.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1. Visión en pectínidos .....	- 1 -
1.2. Fotorreceptores en pectínidos .....	- 1 -
1.3. Cascada de fototransducción y opsinas .....	- 3 -
1.4 Sistema sensorial en Pectínidos.....	- 4 -
1.5. Morfología del ojo en Pectinidae .....	- 4 -
1.6. Relación comportamiento-hábitat .....	- 5 -
1.7. <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 6 -
1.8. <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 7 -
2. OBJETIVOS .....	- 8 -
3.1. General .....	- 8 -
2.2. Específicos.....	- 8 -
3. HIPOTESIS .....	- 8 -
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 9 -
4.1. Animales y mantenimiento .....	- 9 -
4.2. Criosección e inmunomarcaje .....	- 9 -
4.3. Microscopía electrónica de transmisión .....	- 10 -
5. RESULTADOS .....	- 11 -
5.1. Morfología sensorial externa .....	- 11 -
5.2. Ojo paleal .....	- 12 -
5.1.1. Células epiteliales pigmentadas.....	- 14 -
5.1.2. Córnea.....	- 17 -- 21 -
5.1.3. Lente .....	- 22 -
5.1.4. Doble retina invertida .....	- 26 -
5.1.5. Espejo y capa pigmentada.....	- 36 -
6.DISCUSIÓN.....	- 40 -

7. CONCLUSIONES .....	- 47 -
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	- 48 -
9. ANEXOS.....	- 52 -
9.1 Ensayo adicional con imágenes de calcio .....	- 52 -
9.2. Reactivos utilizados.....	- 53 -

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético de la ocurrencia de ojos cefálicos y ojos paleales en bivalvos según Morton (2008) .....	- 2 -
<b>Figura 2.</b> Vista anterior y transversal del manto en pectínidos.....	- 5 -
<b>Figura 3.</b> Órganos sensoriales de <i>Zygochlamys patagonica</i> y <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 11 -
<b>Figura 4.</b> Musculatura del manto medio e interno de <i>Argopecten purpuratus</i> y <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 12 -
<b>Figura 5.</b> Tuft of cilia del epitelio de <i>Z. patagonica</i> previo al comienzo de las células epiteliales pigmentadas del ojo. ....	- 13 -
<b>Figura 6.</b> Mediciones de las células epiteliales pigmentadas en <i>Zygochlamys patagonica</i> y <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 14 -- 15 -
-	
<b>Figura 7.</b> Ultraestructura de las células epiteliales pigmentadas de <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 15 -
<b>Figura 8.</b> Ultraestructura de las células epiteliales pigmentadas de <i>Argopecten purpuratus</i> . ....	- 16 -
<b>Figura 9.</b> Fibras de actina que corren por las células ubicadas en la interfaz de la retina y las células epiteliales pigmentadas en <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 17 -
<b>Figura 10.</b> Córnea de <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 18 -
<b>Figura 11.</b> Ultraestructura de la córnea de <i>Zygochlamys patagonica</i> .. ....	- 19 -
<b>Figura 12.</b> Córnea de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 20 -
<b>Figura 13.</b> Ultraestructura de la córnea de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 21 -
<b>Figura 14.</b> Lente de <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 22 -
<b>Figura 15.</b> Ultraestructura del lente de <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 23 -
<b>Figura 16.</b> Lente de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 24 -
<b>Figura 17.</b> Ultraestructura del lente de <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 25 -
<b>Figura 18.</b> Fotorreceptor ciliado en <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 27 -
<b>Figura 19.</b> Ultraestructura del fotorreceptor ciliado en <i>Zygochlamys patagonica</i> -	28 -
<b>Figura 20.</b> Fotorreceptor ciliado en <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 29 -
<b>Figura 21.</b> Ultraestructura del fotorreceptor ciliado en <i>Argopecten purpuratus</i> ...	- 30 -
<b>Figura 22</b> Nervio óptico retina distal en <i>Zygochlamys patagonica</i> . ....	- 31 -
<b>Figura 23.</b> Fotorreceptor rabdomérico en <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 32 -

<b>Figura 24.</b> Ultraestructura del fotorreceptor rabdomérico en <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 33 -
<b>Figura 25.</b> Fotorreceptor rabdomérico en <i>Argopecten purpuratus</i> . .....	- 34 -
<b>Figura 26.</b> Ultraestructura del fotorreceptor rabdomérico en <i>Argopecten purpuratus</i> .....	- 35 -
<b>Figura 27.</b> Ultraestructura del espejo y capa pigmentada de <i>Zygochlamys patagonica</i> .....	- 36 -
<b>Figura 28.</b> Ultraestructura del espejo y capa pigmentada de <i>Argopecten purpuratus</i> .. .....	- 37 -
<b>Figura 29.</b> Esquema de una sección sagital de un ojo paleal de <i>Zygochlamys patagonica</i> . .....	- 38 -
<b>Figura 30.</b> Esquema de una sección sagital de un ojo paleal de <i>Argopecten purpuratus</i> . .....	- 39 -

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Visión en pectínidos

La destacable configuración morfológica que reside en el ojo de los pectínidos hace de este órgano uno de los más complejos dentro del grupo de los moluscos (Morton 2001). La familia Pectinidae comprende alrededor de 264 especies reconocidas, distribuidas ampliamente por diversos hábitats marinos, desde aguas costeras de poca profundidad, hasta los 7000 m de profundidad (Alejandrino et al 2011). La diversidad en ecotipos generados en los pectínidos permite que sean un grupo muy utilizado para estudiar el sistema visual en términos evolutivos (Salvini-Plawen 2008, Malkowsky & Götze 2014).

Una de las primeras características notables es que poseen dos tipos de retinas que se encuentran apiladas una sobre otra y que presentan respuestas electrofisiológicas con polaridad contraria. De esta manera en la retina distal se genera una respuesta hiperpolarizante en los fotorreceptores, mientras en la retina proximal produce una respuesta del tipo despolarizante en los fotorreceptores (Land 1965).

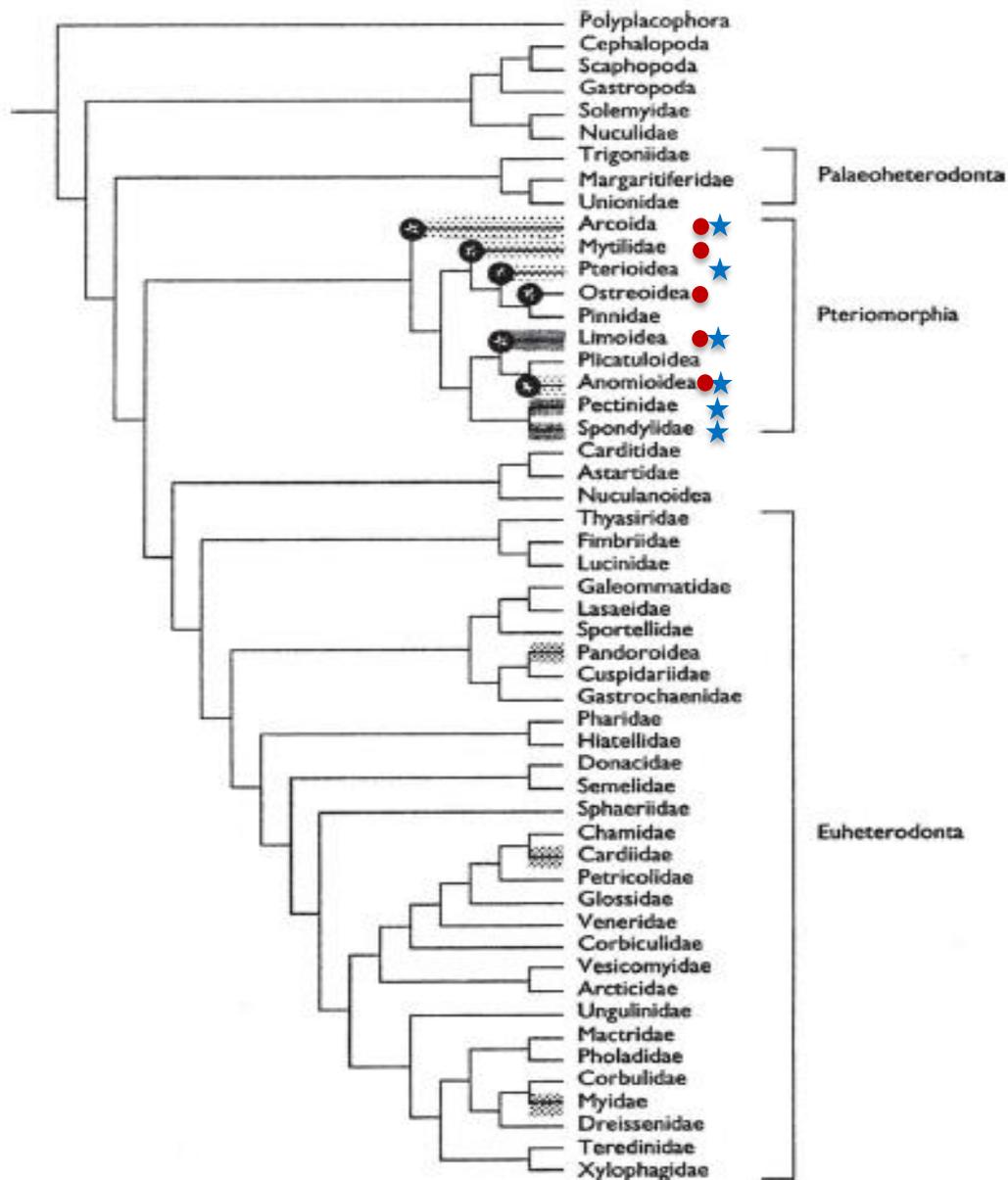
Otra característica relevante en el ojo de los pectínidos es la formación de una imagen por reflexión de un espejo cóncavo esférico ubicado al fondo de la cámara del ojo por debajo de la retina (Land 1965). El espejo compuesto por cristales de guanina (Land 1966) forma una imagen funcional de baja aberración óptica que es enfocada en la retina distal o proximal según la longitud de onda que ingresa al ojo (Palmer et al 2017).

### 1.2. Fotorreceptores en pectínidos

El órgano del ojo en los moluscos ha divergido al menos en 13 linajes diferentes, siendo los de mayor variedad los encontrados en moluscos bivalvos (Pairett & Serb 2013). Los moluscos bivalvos aparecieron en el cámbrico temprano colonizando diversos tipos de hábitats alimentándose en un principio de pequeños depósitos utilizando los palpos labiales en lugar de la filtración como lo hacen los actuales bivalvos al alimentarse de fitoplancton (Parkhaev 2008).

En los bivalvos se han reconocido seis líneas de órganos fotorreceptivos, dentro de los que se incluyen una línea de ocelos cerebrales y cinco líneas de fotorreceptores

extraretinales /ectópicos/extraoculares que se originan en el manto (Salvini-Plawen 2008). Así mismo Pelseneer (1911) sugiere la presencia de dos categorías de ojos, los ojos cefálicos o branquiales, y los ojos ectópicos o paleales (Figura 1). En los ojos paleales se encuentran dos subcategorías de ojos marginales: los que poseen una cavidad cerrada, representados por la familia Arcidae, y los ojos con una cavidad abierta, encontrados en los bivalvos de la familia Pectinidae.



**Figura 1.** Árbol filogenético de la ocurrencia de ojos cefálicos (círculo) y ojos paleales (estrella) en bivalvos según Morton (2008). Los ojos cefálicos se presentan en pares sobre el extremo anterior de las branquias, mientras que los ojos paleales se encuentran en el manto externo (Arcoidea, Pterioidea y Anomioidea), manto medio (Pectinoidea y Limoidea) o manto interno (Cardioidea, Tridacnoidea y Laternulidae).

A nivel celular los dos tipos de fotorreceptores más comunes encontrados en el grupo de los invertebrados corresponden a los fotorreceptores ciliados y fotorreceptores rabdoméricos, siendo estos últimos los más comunes dentro del grupo de los invertebrados (Eakin 1965, Arendt 2003). Sin embargo, elementos de ambos fotorreceptores coexisten en algunos invertebrados (Fernald 2006), como por ejemplo en el poliqueto ragworm (*Platynereis dumerilii*), que presenta fotorreceptores ciliados en el cerebro y fotorreceptores rabdoméricos en el ojo (Arendt & Wittbrodt 2001). Otro ejemplo claro de la coexistencia de estos dos fotosistemas es la configuración presente en la retina de los pectínidos los cuales poseen ambos tipos celulares en el ojo (Barber et al 1967).

En pectínidos, los fotorreceptores ciliados que conforman la retina distal poseen una respuesta hiperpolarizante siendo responsables de la percepción de movimientos rápidos del ambiente, mientras que los fotorreceptores rabdoméricos de la retina proximal son los responsables de detectar la variación en intensidades de luz en el ambiente, como por ejemplo posibles cambios en la turbidez del agua (Morton 1980).

### 1.3. Cascada de fototransducción y opsinas

Los fotorreceptores ciliados actúan gracias al cambio conformacional producido en la proteína transmembrana que produce la activación de una fosfodiesterasa (PDE) específica para Guanosin Monofosfato Cíclico (GMPc), induciendo su hidrólisis en 5'-Guanosin Monofosfato. Por el contrario, en los fotorreceptores rabdoméricos el cambio conformacional inducido por la luz en la proteína G induce la activación de una fosfolipasa C (PLC) (McKay et al 1995), la cual hidroliza al fosfolípido fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se une a receptores del retículo endoplasmático permitiendo la liberación de calcio aumentando la concentración de calcio citosólica (Brown & Blinks 1974).

En estudios moleculares se ha demostrado que ambos modelos de fotorreceptores ancestrales poseen cascadas de fototransducción bien diferenciadas, de igual forma se encuentra establecido que los fotorreceptores ciliados utilizan c-opsinas en su funcionamiento, activando la cascada de G<sub>i</sub>/t por medio de GMPc. Por su parte los fotorreceptores rabdoméricos mediante las r-opsinas activan la cascada G<sub>q</sub> mediada por IP<sub>3</sub> (Nasi 1991).

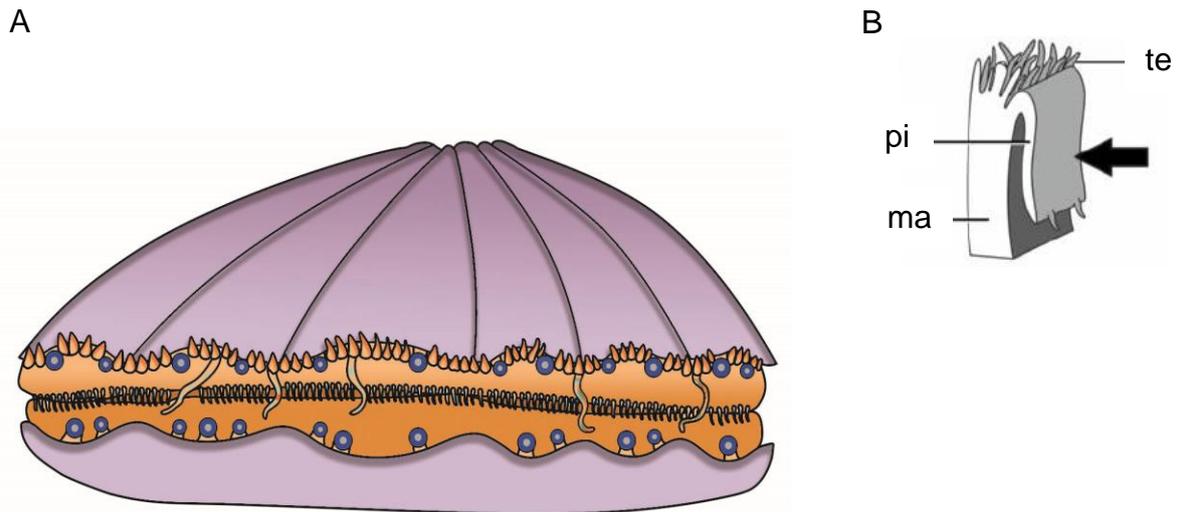
#### 1.4 Sistema sensorial en Pectínidos

El sistema nervioso en pectínidos se compone de dos agrupaciones de ganglios. Los ganglios parietoviscerales (PVG) ubicados en la superficie anterodorsal del músculo aductor, los cuales controlan la parte ventral del manto, parte de las vísceras y el músculo aductor, además es el responsable de recibir la información visual que es enviada por el nervio circumpaleal. Por otra parte, los ganglios cerebrales y pedales se encuentran fusionados en posición ventral a los palpos labiales, innervando el resto del animal, estos ganglios reciben la información de los estatocistos (Beninger & Le Pennec 1991).

La información sensorial recibida por estos ganglios proviene de fuentes mecanosensitivas, quimiosensitivas y fotosensitivas. En el pie de los pectínidos un par de estatocistos le permiten al animal orientarse en el sustrato. Por otra parte, en el epitelio de la cavidad paleal se encuentra un par de osfradios, órgano utilizado para detectar la calidad del agua (Rupert & Barnes 1996). Finalmente, en la cavidad paleal del manto medio se ubican los tentáculos y ojos paleales, estos últimos con la función de detectar estímulos visuales del ambiente (Audino et al 2015).

#### 1.5. Morfología del ojo en Pectinidae

Una gran variedad de genes se expresan y son regulados en el desarrollo del ojo, favoreciendo las transformaciones morfológicas de este órgano durante su desarrollo en un organismo (Fernald 2006). El origen embrionario del ojo en pectínidos resulta en la invaginación lateral del ectodermo a partir del manto medio del animal (Barber et al 1967). Tanto en la etapa larval como en adultos, el manto tiene un rol fundamental en organismos bivalvos. En larvas es la estructura encargada de secretar la concha, mientras que finalmente en adultos se localizará entre ambas valvas y será la responsable de ejercer roles relacionados con la función muscular, sensorial y secretora del animal. De esta manera en adultos el manto medio alojará a los tentáculos sensoriales y los ojos paleales (Audino et al 2015).



**Figura 2.** Representación de la vista anterior (A) y transversal del manto (B) en pectínidos. A- Luego de la metamorfosis se desarrolla el manto medio, donde se ubican los órganos sensoriales lo que incluye a los ojos y tentáculos. B- En la región auricular el manto interno permanece fusionado. C. Tres márgenes del manto: interno, medio y externo, relacionados con la función muscular, sensorial y secretora, respectivamente. Abreviaciones: te, tentáculo; pi, pliegue interno; ma, manto (Modificado de Audino et al 2015).

El ojo de los pectínidos está conformado por una córnea, células epiteliales pigmentadas, una lente, dos retinas apiladas verticalmente, un espejo y una capa de pigmentos, estas dos últimas ubicadas en la cámara posterior del ojo. Todas estas estructuras están conectadas por tejido conectivo (Dakin 1910). La diversidad de especies de pectínidos y su relación especie-hábitat ha permitido que se encuentren una gran variedad de configuraciones morfológicas y funcionales del ojo paleal (Morton 2001, Speiser & Johnsen 2008a, Speiser et al 2011, Malkowsky & Götze 2014, Malkowsky & Jochum 2014).

#### 1.6. Relación comportamiento-hábitat

Los pectínidos se distribuyen en una gran variedad de hábitats, que están relacionados con los requerimientos ecológicos y a propiedades asociadas a su comportamiento (Alejandrino et al 2011). El sistema visual depende de la disponibilidad de luz en el hábitat del animal, por tanto, estudiar el tipo de vida que presentan y el comportamiento relativo su hábitat resulta relevante. Los pectínidos, a diferencia de otros bivalvos, poseen capacidad de locomoción, lo que permite diferenciar diversos hábitos de vida que según Alejandrino et al (2011) pueden ser

clasificadas en 6 categorías: *nestle* (asentados y atados por el biso), *cement* (adheridos de forma permanente al sustrato a medida que se genera una nueva concha), *byssal attach* (atados temporalmente por el biso), *recess* (capaces de excavar en sedimentos blandos), *free living* (se depositan sobre el sustrato blando o duro) y *gliding* (capaces de nadar más de 5 metros).

Especies que se distribuyen batimétricamente a diferentes profundidades tendrán diferentes sensibilidades espectrales en sus retinas, es así como Speiser et al (2011) determinó que el pectínido *Pecten magellanicus* posee un máximo de absorción de 513 nm en la retina distal y 488 nm en la retina proximal, mientras que *Argopecten irradians* tiene un máximo de 535 nm y 506 nm en la retina distal y proximal, respectivamente.

La línea base de la alimentación en pectínidos corresponde a *POC* (carbón orgánico particulado) (Kumari & Mohan 2018), lo que incluye zooplancton, fitoplancton, bacterias y detrito (Thébault et al 2008). Se ha demostrado que los pectínidos pueden discriminar ambientes favorables para su alimentación al ser capaces de detectar visualmente el tamaño y velocidad de una partícula en movimiento (Speiser & Johnsen 2008b). La búsqueda de nuevos espacios también se relaciona con la agudeza visual en especies no sésiles (Speiser & Johnsen 2008b, Malkowsky & Götze 2014), lo que influye de forma directa en las adaptaciones morfológicas del ojo.

Debido a que las potenciales adaptaciones funcionales se explican por cambios fisiológicos y morfológicos, algunos estudios han documentado una tendencia hacia una evolución específica de subgrupos de pectínidos con estructuras que componen el ojo paleal, tales como la córnea y el lente (Malkowsky & Götze 2014).

### 1.7. *Zygochlamys patagonica*

El ostión patagónico *Zygochlamys patagonica* (King 1832) es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Pectinidae del subgrupo Chlamydinae que se distribuye en el Océano Atlántico (Brasil, Uruguay, Argentina, Islas Malvinas) y Océano Pacífico desde la Región de los Lagos (42°S) hasta el Canal Beagle (56°S) (Valladares & Stotz 1996). Esta especie habita fondos blandos y se han reportado poblaciones que fluctúan entre los 40 m hasta los 100 m de profundidad, siendo este último el sitio más recurrente encontrado en el Océano Atlántico, donde se describe la presencia de “camas” de *Z. patagonica* cercanas a la pendiente continental (Botto et al 2006). Por

otro lado, en el Océano Pacífico se encuentran en aguas relativamente poco profundas (Ciocco et al 2006), siendo reportados en fiordos entre los 5 y 25 m de profundidad (Valladares & Stotz 1996).

La madurez sexual es alcanzada a los 45 mm (altura de la concha) (Waloszek & Waloszek 1986). Su alimentación corresponde a diatomeas como *Paralia sulcata*, *Nitzschia coarctata* y *Thalassiosira* spp. y en menor medida dinoflagelados como *Dinophysis mawsonii* y *Dinophysis rotundata* (Schejter et al 2000).

Los depredadores de *Z. patagonica* incluyen estrellas de mar, gasteropodos y peces demersales (Bremec et al 2000).

### 1.8. *Argopecten purpuratus*

El ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819) es un molusco bivalvo de la familia Pectinidae perteneciente al subgrupo Aequipectini. Se distribuye latitudinalmente desde Perú hasta la Región de Valparaíso, Chile (Avendaño 1993). Los adultos de esta especie habitan en sustratos arenosos, en aguas someras entre los 5 m hasta los 40 m de profundidad (Cantillánez 2000).

El ciclo biológico incluye una fase larval, juvenil o semilla y de adulto. Los individuos adultos liberan los gametos secuencialmente, alternándose entre óvulos y espermatozoides, por lo que son denominados hermafroditas simultáneos funcionales (Bermúdez et al 2004). Una vez fecundados los ovocitos, se forma una larva ciliada llamada trocófora, que da paso a una larva véliger o larva "D", en la cuál es posible observar una mancha ocular. Luego, el desarrollo continúa para convertirse en una larva pediveliger, que se reconoce por tener un pie que le permitirá adherirse al sustrato en el proceso denominado asentamiento. Finalmente, el juvenil ya metamorfoseado continúa su crecimiento hasta convertirse en adulto (Le Pennec et al 2003).

Las poblaciones principales de *A. purpuratus* se localizan entre Paita, Perú (5°S, 81°W) y la bahía de Tongoy, Región de Coquimbo (30°S, 71°W). La dinámica poblacional en estas regiones ha sido modelada de forma periódica por el efecto de El-Niño, causando aumento de la población y mayor colonización de esta especie en ciertos periodos de tiempo, y la sucesiva disminución poblacional una vez terminado el efecto de El-Niño (Wolff & Mendo 2000).

Los depredadores de *A. purpuratus* en la bahía de Antofagasta se han descrito como *Thais* sp, *Bursa* sp y *Priene* spp (Osorio 2002).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Caracterizar y comparar los componentes del ojo paleal en *Z. patagonica* y *A. purpuratus*.

### 2.2. Específicos

- Determinar la morfología y organización de las diferentes estructuras que conforman el ojo paleal en *Z. patagonica* y *A. purpuratus*.
- Comparar la morfología ultraestructural de los distintos componentes del ojo paleal en *Z. patagonica* y *A. purpuratus*.
- Determinar la respuesta del fotorreceptor rabdomérico de *A. purpuratus* ante un estímulo extracelular *in vivo*.

## 3. HIPOTESIS

La morfología del ojo en los pectínidos está influenciada por factores ambientales como la profundidad y componentes filogenéticos. Se espera que las dos especies de pectínidos estudiadas existan diferencias morfológicas en las estructuras que conforman el ojo paleal.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Animales y mantenimiento

Todos los ensayos fueron realizados en dos especies de pectínidos, el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) y el ostión patagónico *Zygochlamys patagonica* (King 1832). Los individuos de ostión patagónico (n=5) fueron recolectados desde la localidad de Quinched, Región de los Lagos (coordenadas UTM 601976 E, 5285274 S), respetando la talla mínima de extracción del recurso (5 cm).

Por otra parte, cinco individuos de ostión del norte (*Argopecten purpuratus*) fueron recolectados desde la Región de Coquimbo, de un *hatchery* comercial de la empresa Scallop S.A. y trasladados al laboratorio para ser mantenidos en acuarios de 40 L con aireación constante, fotoperiodo de 12:12 y alimentados con *Isochrysis galbana*.

Para los ensayos de tejido celular los animales fueron disectados inmediatamente cortando el músculo aductor y extrayendo una porción de manto donde se situaba el ojo. El tejido fue fijado inmediatamente a la extracción en solución de Karnovsky para los ensayos de microscopía electrónica, y paraformaldehído (PFA) 4% para microscopía óptica, por dos horas a temperatura ambiente en ambos casos.

Las muestras fueron lavadas en la solución buffer cacodilato, que además contenía sacarosa al 8%, para luego ser trasladadas al laboratorio.

### 4.2. Criosección e inmunomarcaje

Los animales recolectados fueron disectados inmediatamente cortando el músculo aductor y extrayendo una porción de manto que contuviera al ojo. El tejido fue fijado por 2 horas en PFA al 4% a pH 7,4. Una vez lavado, se sumergió en sacarosa al 15% y 30%, por dos horas y 30 minutos, respectivamente. Para los cortes se utilizó un criostato Leica ajustado a -25 °C, embebiendo el tejido en medio criopreservante OST y realizando cortes sagitales del ojo y manto de 10 µm y 20 µm de grosor en un criostato (Leica). Las secciones fueron depositadas en un portaobjetos con polilisina.

El tejido fue marcado según el protocolo convencional de inmunomarcaje (Delgado et al 2010). En primer lugar, las secciones fueron permeabilizadas a temperatura ambiente con 3 lavados en PBS 1X por 10 min. Posteriormente se utilizó una solución bloqueo a temperatura ambiente por 1 hora (1% BSA, 1% horse serum, 0,1% Triton). Las secciones fueron incubadas a 4 °C durante la noche utilizando como anticuerpo

primario Tubulina acetilada diluido previamente en solución de bloqueo. Se realizaron 5 series de lavados con PBS 1X por 10 min y una incubación con anticuerpo secundario (1:1000) temperatura ambiente por 1 hora en oscuridad. Se realizaron 5 lavados en PBS 1X por 10 min y una incubación con Faloidina (2 µg/mL) por 40 min en oscuridad y finalmente DAPI (Sigma-Aldrich, Argentine) 0,25 µg/mL por 10 min y 3 lavados en PBS 1X por 10 min.

Las muestras fueron montadas en Fluomount (Dako Industries). Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio confocal Nikon C1 plus. Contraste y brillo fueron ajustados con Adobe Photoshop CS6.

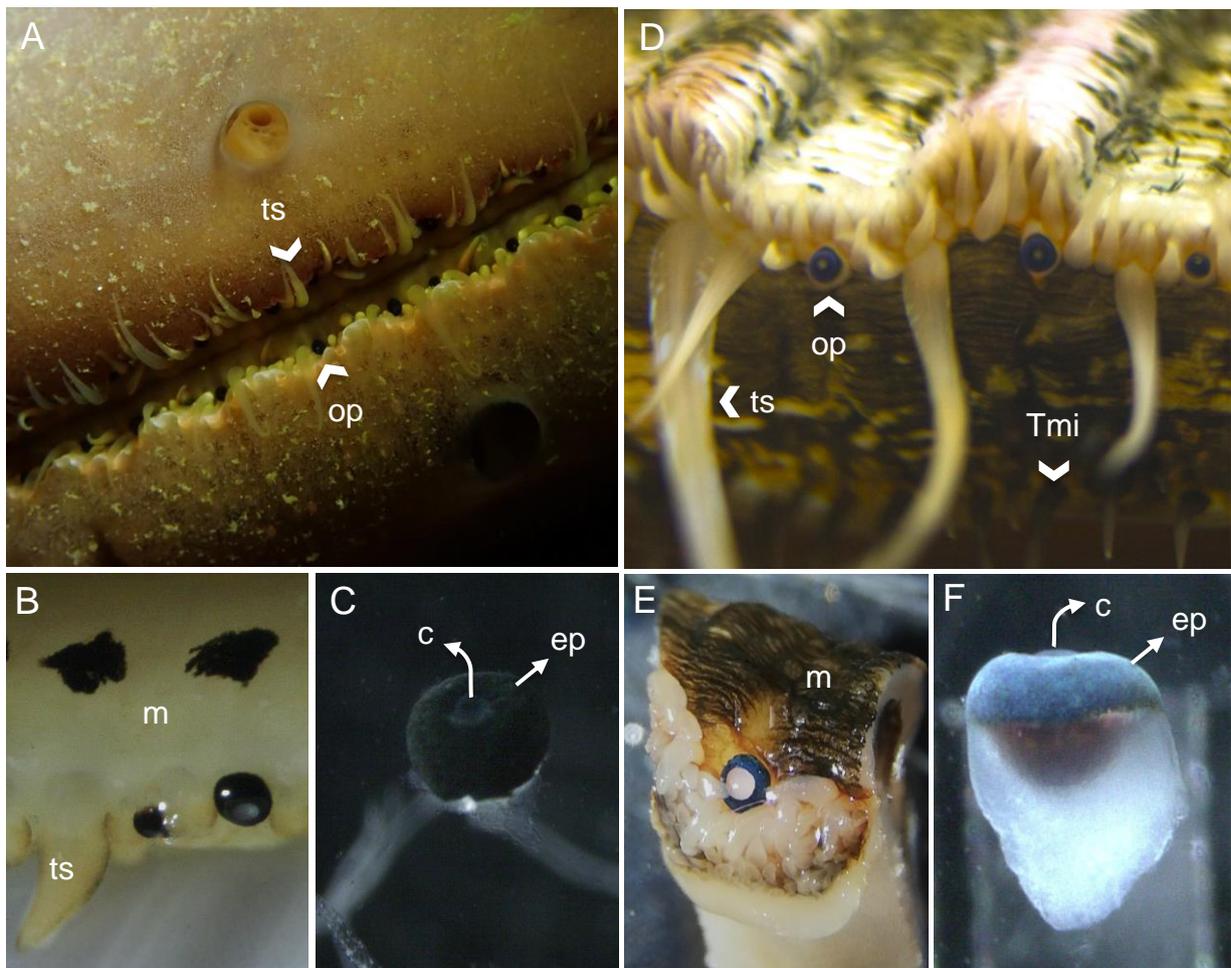
#### 4.3. Microscopía electrónica de transmisión

Otra cantidad de tejido que contuviera el ojo se fijó por 2 horas en solución de Karnovsky (paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2,5% de glutaraldehído) y se lavó en buffer cacodilato 0,1 M con sacarosa 8%. Se realizó una post-fijación con OsO<sub>4</sub> y ferrocianuro de potasio por 2 horas. Para la infiltración se utilizó una batería de alcoholes graduados, cambiados cada 15 minutos y lavados en acetona los que finalmente fueron embebidos en Epon. Finalmente se dejaron en una estufa a 60 °C por 72 horas. Las secciones delgadas fueron teñidas con una solución que contenía en partes iguales azul de metileno, azul de toluidina y bicarbonato; mientras que las secciones ultradelgadas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo por 4 min cada uno y depositados en una grilla de malla tamaño 300. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM1400 plus utilizando un voltaje de 60 kV o 80 kV con una magnificación de entre 100x y 10.000x.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Morfología sensorial externa

Los ojos paleales de *Argopecten purpuratus* y *Zygochlamys patagonica* se alojan en el manto medio (Figura 3). En el manto medio de *A. purpuratus* se encuentran dos tipos de tentáculos sensoriales: los largos tentáculos móviles con pigmento y los tentáculos de menor tamaño inmóviles que recubren todo el manto medio y se intercalan con los ojos paleales. En *Z. patagonica* los tentáculos sensoriales son más cortos y no poseen pigmento visible. En el manto medio de ambas especies se encuentran tentáculos de tamaño medio.

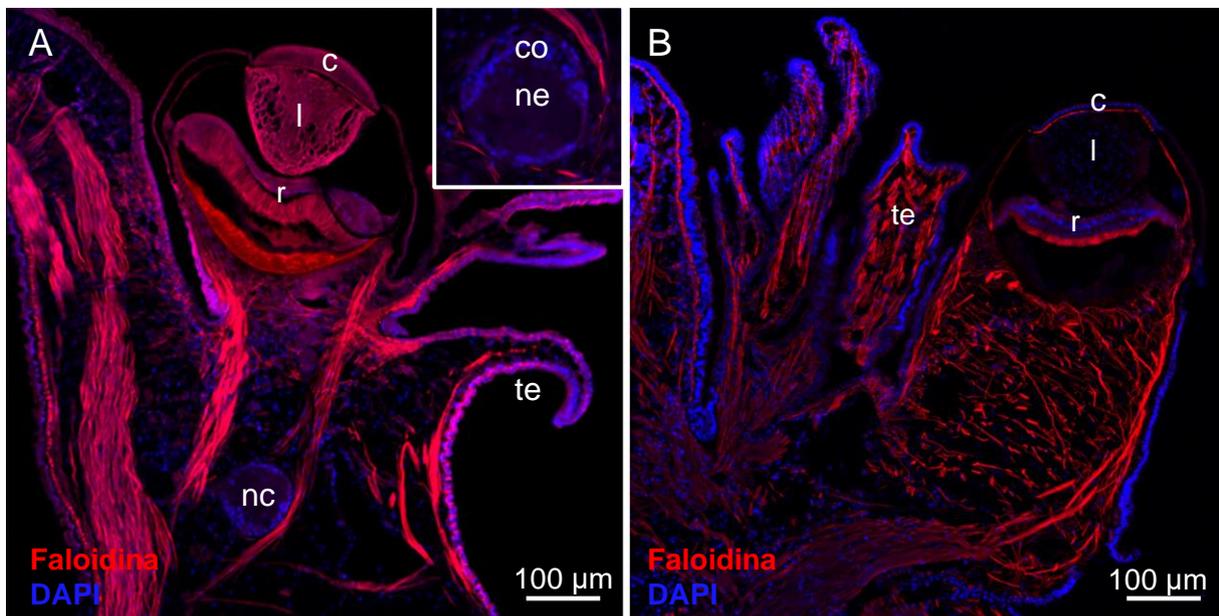


**Figura 3.** Órganos sensoriales de *Zygochlamys patagonica* (A) y *Argopecten purpuratus* (B). Tentáculos y ojos que se alojan en el manto medio en *Z. patagonica* (B-C) y *A. purpuratus* (E-F). Abreviaciones: ts, tentáculo sensorial; op, ojo paleal; Tmi, tentáculo manto interno.

## 5.2. Ojo paleal

En ambas especies a partir del manto se forma el tallo ocular, que está conformado principalmente de tejido conectivo. Hacia la porción distal el tallo ocular se transforma en el globo ocular, que se encuentra revestido por células epiteliales pigmentadas que comienzan a la altura de la capa pigmentada y finalizan en la córnea (Figura 4). En la base del tallo ocular el nervio óptico diverge en dos ramificaciones, una se dirige a la retina distal compuesta por fotorreceptores ciliados, y la otra, por el extremo opuesto de la cámara del ojo, converge en la retina proximal conformada por fotorreceptores rabdoméricos, recopilando así la información de las retinas por separado.

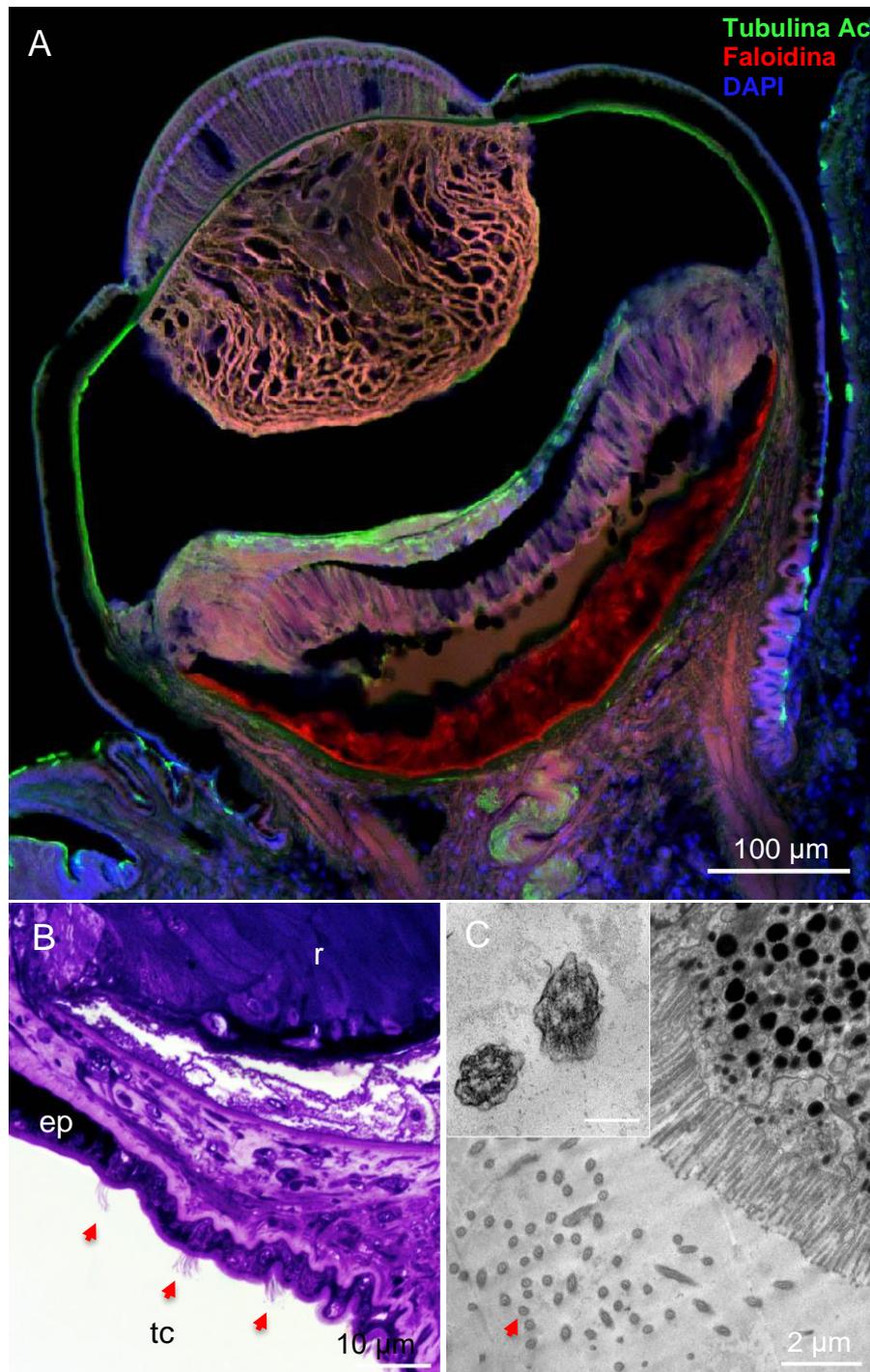
En el manto interno se observan fibras estriadas, típicas de la región muscular, lo que confirma el patrón de tres pliegues del manto de los pectínidos. Las fibras musculares estriadas y lisas recorren en grandes haces radiales (externos e internos) el margen del manto, y se proyectan hacia la base del ojo, rodeando el nervio circumpaleal (Figura 4 A).



**Figura 4.** Musculatura del manto medio e interno de *Argopecten purpuratus* y *Zygochlamys patagonica* (A-B). El nervio circumpaleal está compuesto de cuerpos basales en la periferia y el neurópilo al centro. Este nervio conecta con el nervio óptico que luego diverge en cada retina. Abreviaciones: c, córnea; l, lente; r, retina; nc, nervio circumpaleal; te, tentáculo sensorial; c, córtex; ne, neurópilo.

El nervio circumpaleal recorre el margen del manto del animal y se compone de cuerpos celulares ubicados en la periferia (región cortical) y fibras neuronales al centro (neurópilo) (recuadro Figura 4 A).

En el tallo ocular de *Z. patagonica*, previo a las células epiteliales pigmentadas, se encuentran células epidérmicas cuboidales simples sin presencia de pigmento con agrupaciones de cilios (“*tufts of cilia*”) en polo negativo de la célula, los cuales se proyectan al medio extracelular (Figura 5).



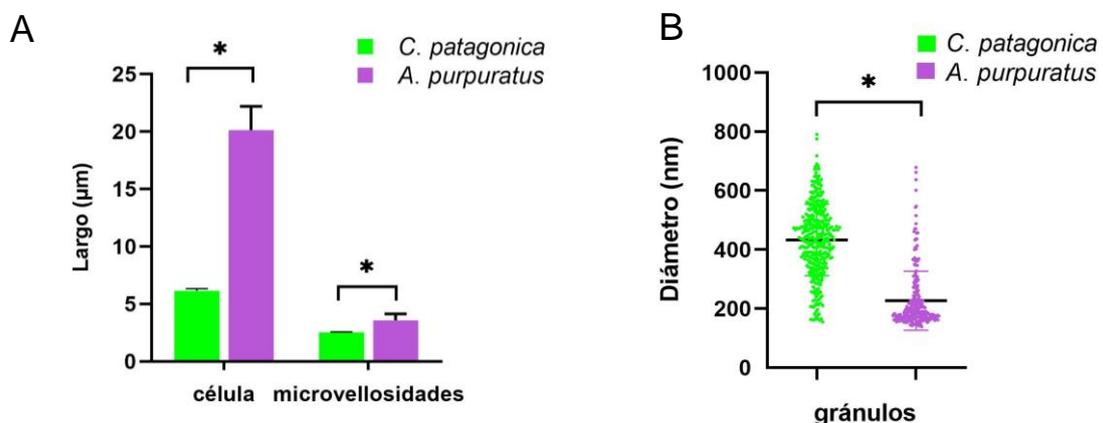
**Figura 5.** *Tuft of cilia* del epitelio de *Z. patagonica* previo al comienzo de las células epiteliales pigmentadas del ojo. A. Corte sagital del ojo y parte del manto (20 µm), marcaje de tubulina acetilada, filamentos de actina y núcleos con marcaje fluorescente. B. Tinción con azul de metileno en corte sagital fino del ojo (1 µm). C.

Ultraestructura de un corte transversal de un cilio en configuración 9x2+2. Abreviaciones: tc, *tuft of cilia*; ep, células epiteliales pigmentadas; r, retina.

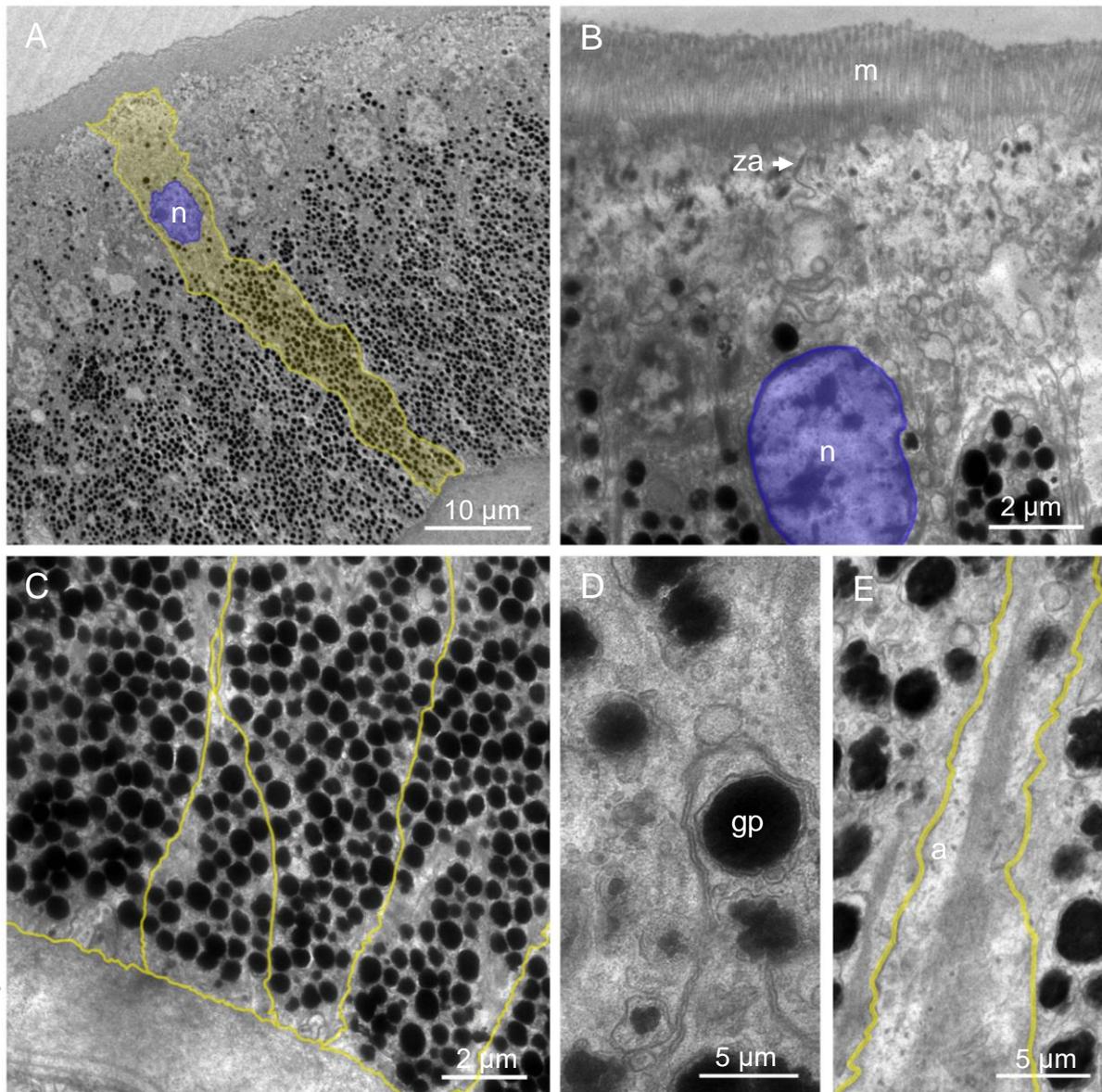
### 5.1.1. Células epiteliales pigmentadas

La cámara del ojo se encuentra cubierta por células pigmentadas en ambas especies, las que le otorgan una coloración negra al ojo de *Z. patagonica* y azul claro en *A. purpuratus* (Figura 3 C-F). Las células tienen la configuración típica de células epiteliales columnares con 6,1  $\mu\text{m}$  de alto y 0,7  $\mu\text{m}$  de ancho promedio en *Z. patagonica*; mientras que en *A. purpuratus* 20,9  $\mu\text{m}$  de alto y 4,1  $\mu\text{m}$  de ancho en promedio (Figura 6 A), desde la membrana basal hasta las microvellosidades.

La tonalidad azul de las células está dada por los gránulos de pigmento que varían en tamaño y distribución al interior de la célula de acuerdo con la especie. En *Z. patagonica* se distinguen dos regiones: La capa externa, conformada por microvellosidades de 2,5  $\mu\text{m}$  y la capa interna con numerosos gránulos de pigmento de 0,43  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, las células epiteliales pigmentadas de *A. purpuratus* se dividen en tres zonas: la capa externa con microvellosidades (3,7  $\mu\text{m}$ ) la capa media o central conformada por nanoesferas y la región interna donde se encuentran los gránulos de pigmento (0,2  $\mu\text{m}$ ) (Figura 8 C,D). Los gránulos de pigmento de *Z. patagonica* poseen mayor tamaño en comparación con los gránulos de *A. purpuratus*, a su vez, las nanoesferas de este último son aún más pequeñas (Figura 6 B).

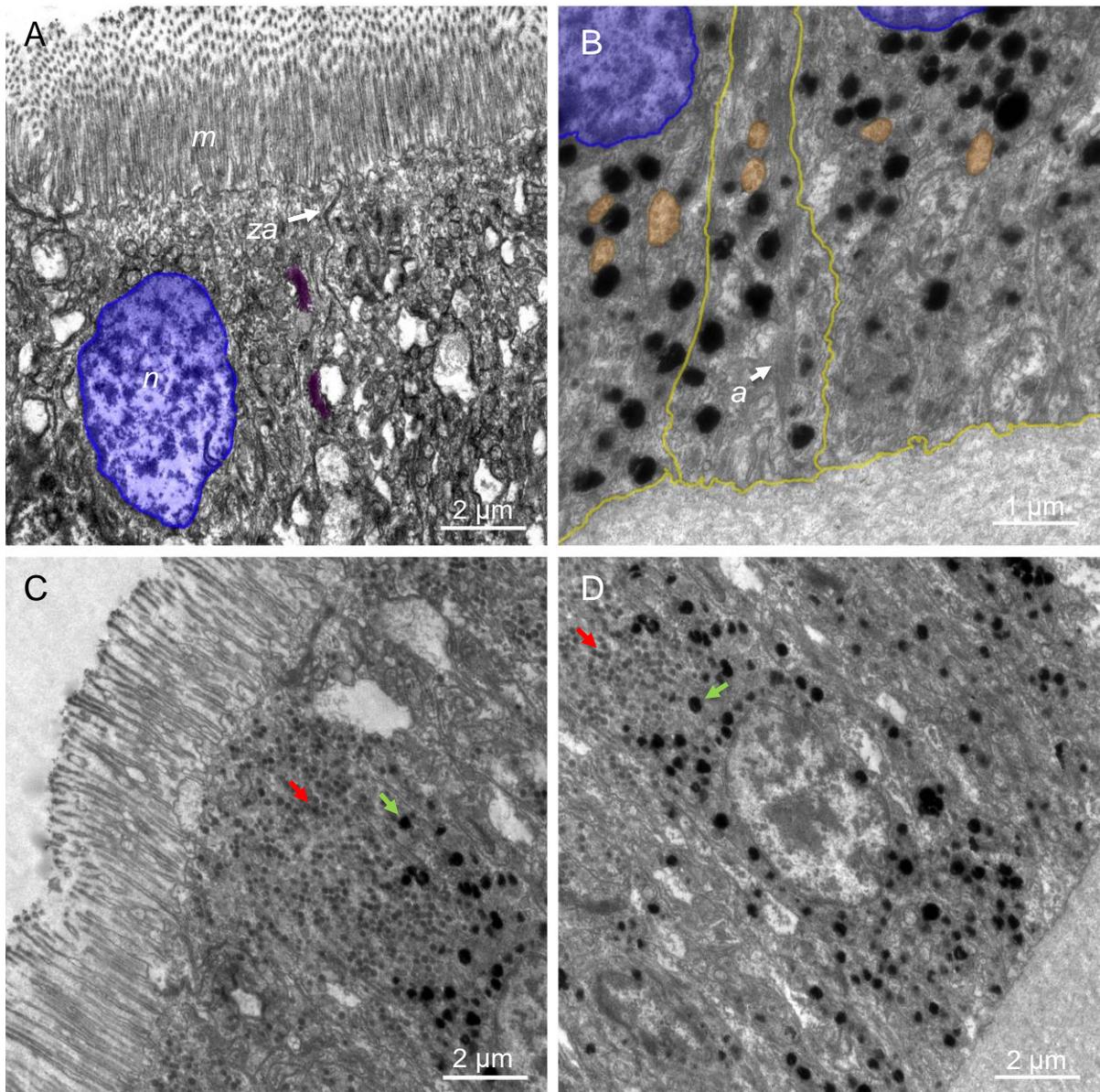


**Figura 6.** Mediciones de las células epiteliales pigmentadas en *Zygochlamys patagonica* y *Argopecten purpuratus*. A. Largo celular incluyendo la célula desde la membrana basal hasta las microvellosidades y el largo de las microvellosidades. B. Diámetro de los gránulos pigmentados. La variación en tamaño de gránulos en *A. purpuratus* está representada por la presencia de nanoesferas de menor tamaño que los gránulos de pigmento encontrados en ambas especies de pectínidos. Test estadístico de Mann Withney, A: \* $p < 0,0095$ , \*\* $p < 0,0022$ . B:  $p < 0,0001$ .



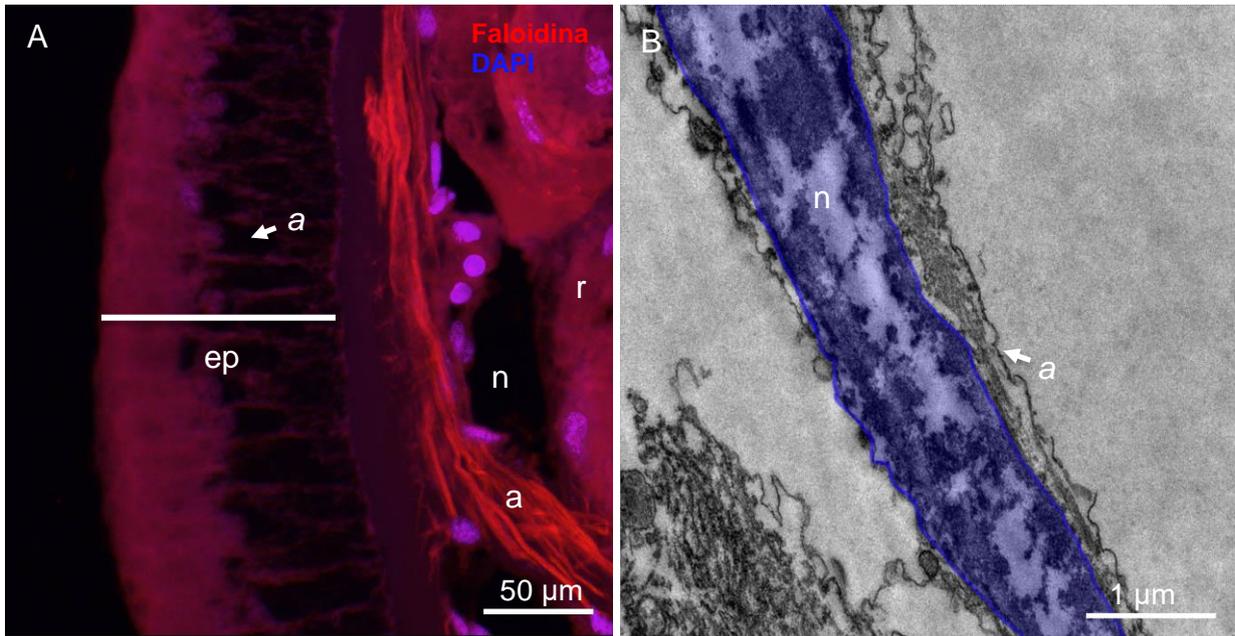
**Figura 7.** Ultraestructura de las células epiteliales pigmentadas de *Zygochlamys patagonica*. A. Células epiteliales; se distingue la región externa con microvellosidades e interna con gránulos. B. Detalle de las microvellosidades y los componentes celulares al interior de las células. C. Membrana basal donde se ubican los gránulos de pigmento empaquetados. D. Detalle de los gránulos de pigmento. E. Filamentos de actina entre células. Abreviaciones: m, microvellosidades; n, núcleo (azul); za, zona adherente, a, filamentos de actina.

Al interior de las células epiteliales pigmentadas se encuentran microfilamentos de actina que recorren el interior de la célula (Figura 7E y 8B).



**Figura 8.** Ultraestructura de las células epiteliales pigmentadas de *Argopecten purpuratus*. A. Microvellosidades, se observa la zona adherente de las células (flecha); B. Microfilamentos de actina entre las células. C,D. Las tres regiones de la célula son distinguibles: microvellosidades, nanoesferas (flecha roja) y los gránulos de pigmento (flecha verde). Abreviaciones: za, zona adherente m, microvellosidades; a, filamentos de actina; n, núcleos (azul); lb, lámina basal (verde).

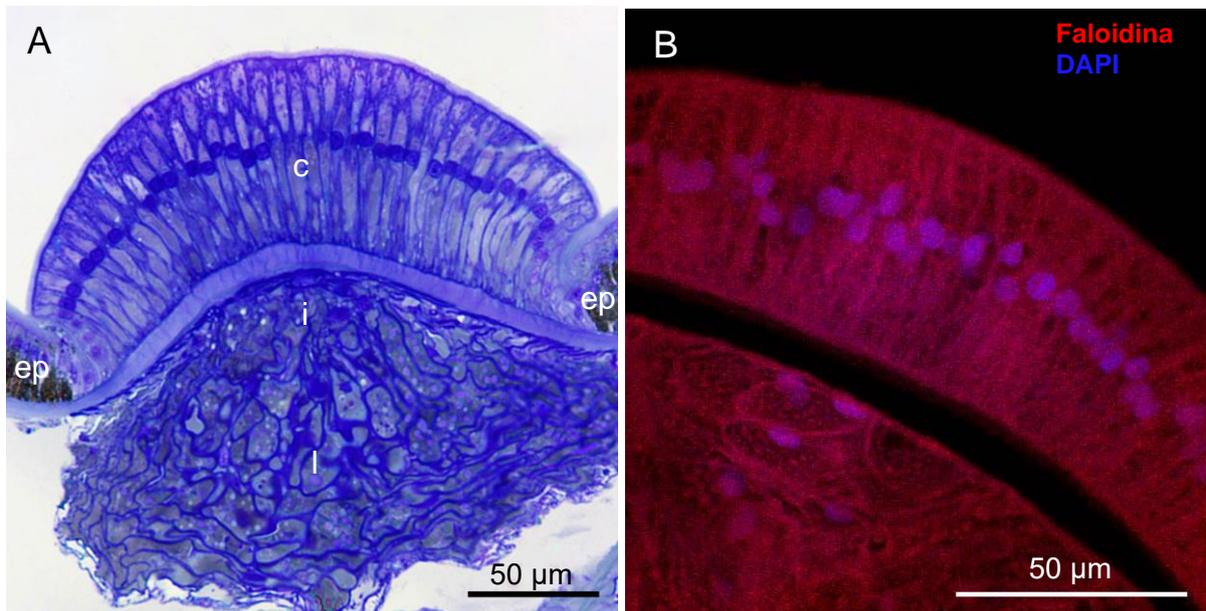
Por los bordes internos de la vesícula óptica y paralelo al eje de las células epiteliales pigmentadas se encuentran microfilamentos de actina (Figura 9). Estos filamentos se encuentran en el córtex de células columnares en *A. purpuratus*.



**Figura 9.** A. Fibras de actina que corren por las células ubicadas en la interfaz de la retina y las células epiteliales pigmentadas en *Argopecten purpuratus*, marcaje fluorescente. Se observan en detalle las células alargadas contráctiles con actina. Abreviaciones: ep, células epiteliales pigmentas; a, actina, n, núcleo; r, retina.

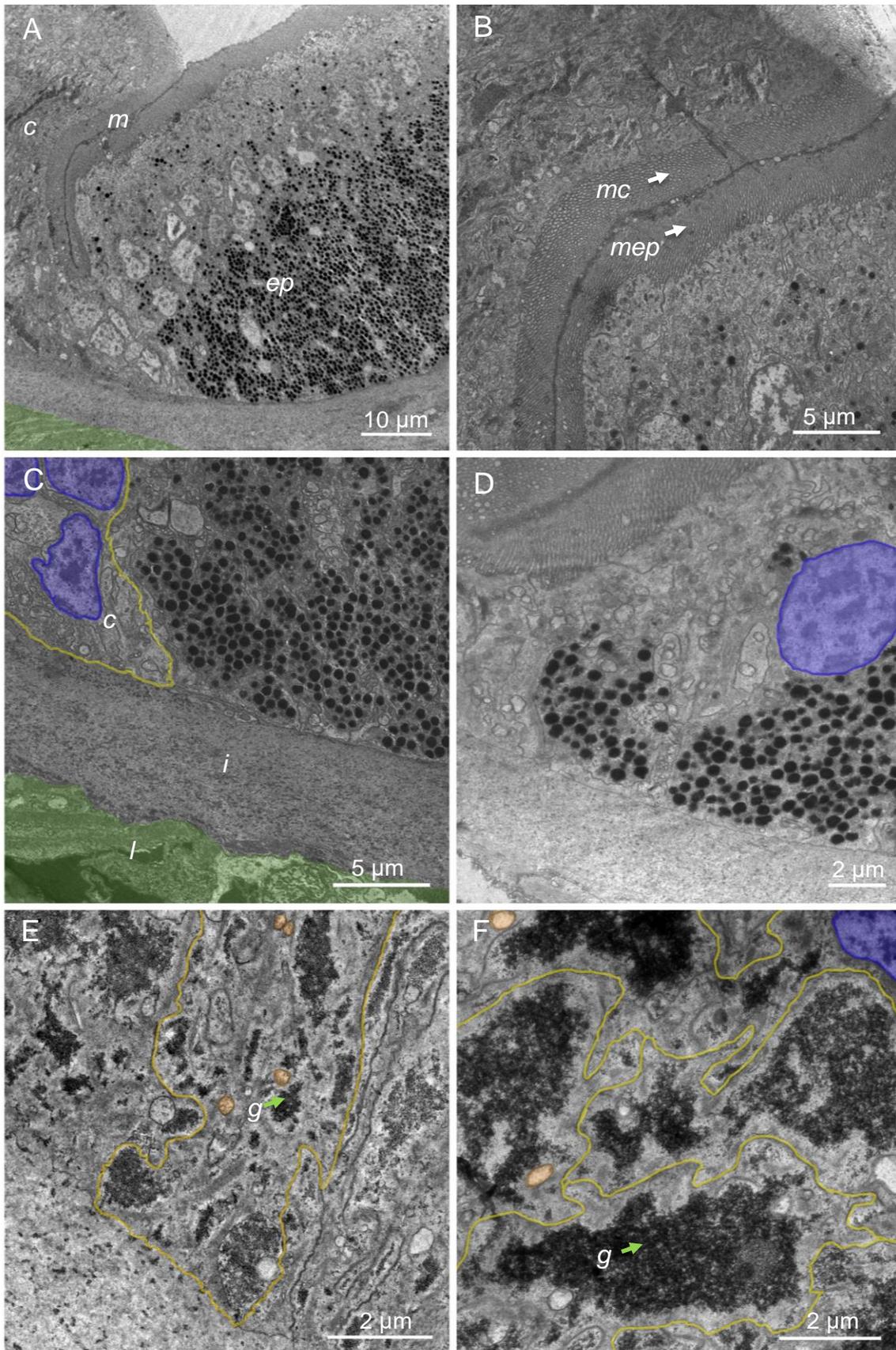
### 5.1.2. Córnea

La córnea en pectínidos se observa como un tejido transparente que es rodeado por las células epiteliales pigmentadas. En el exterior esta estructura es redonda y se abulta ligeramente en el centro (Figura 3 C,F), generando una curvatura que le permite ajustarse al lente biconvexo. En ambas especies las células de la córnea poseen un núcleo central y microvellosidades, las cuales son de menor longitud que las presentes en las células epiteliales pigmentadas. En el caso de *Z. patagonica*, la córnea se compone de células columnares de morfología fusiforme (Figura 10) que son notoriamente más largas justo por sobre el eje central del ojo y disminuyen su longitud a medida que se acercan a la intersección con las células epiteliales pigmentadas (Figura 10 A).



**Figura 10.** Córnea de *Zygochlamys patagonica*. A. La córnea se compone de una monocapa de células fusiformes con un núcleo central. Tinción con azul de metileno en corte sagital fino del ojo (1 µm). B. Entre cada célula se encuentran fibras de actina (flecha). Marcaje fluorescente. Abreviaciones: c, córnea; i, interfase; l, lente; ep, células epiteliales pigmentadas.

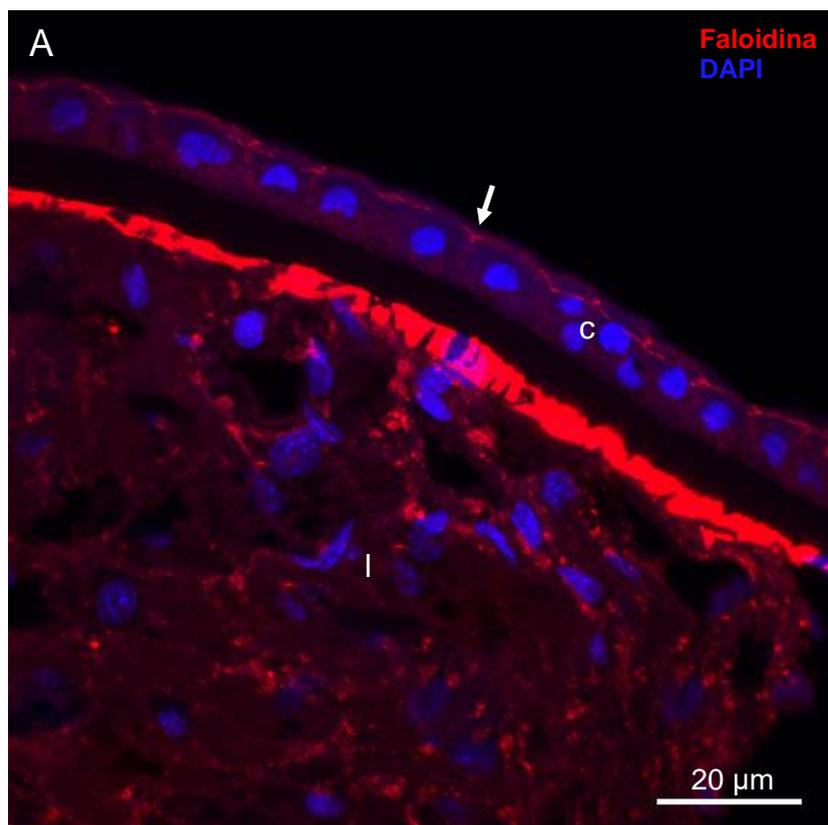
Al interior de las células es posible encontrar material similar a un pigmento distribuido de manera irregular y poco concentrado, además de numerosas mitocondrias (Figura 11).



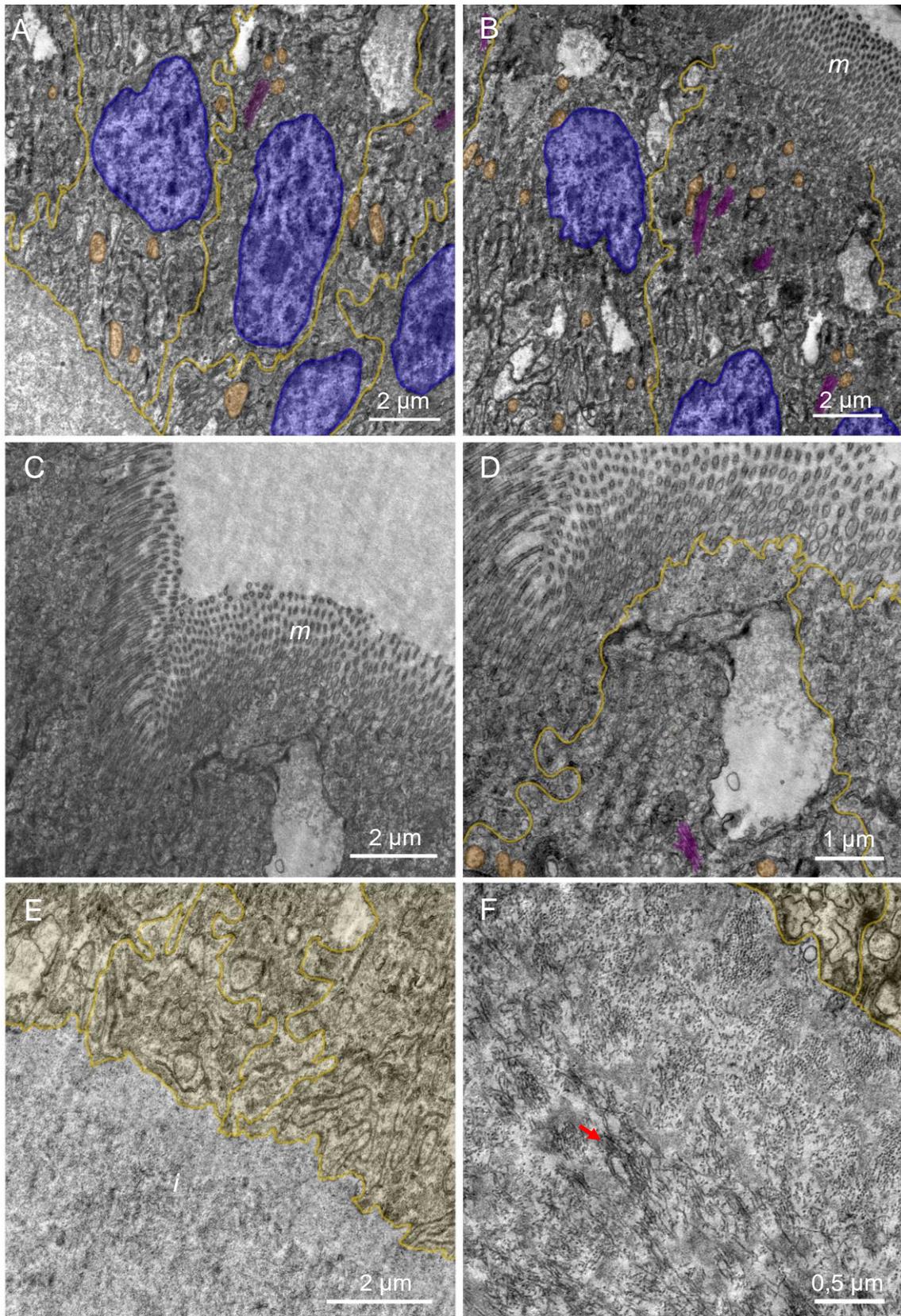
**Figura 11.** Ultraestructura de la córnea de *Zygochlamys patagonica*. Abreviación: c, córnea; m, microvellosidades; ep, células epiteliales pigmentadas; mc, microvellosidades cornea; mep, microvellosidades de las células epiteliales pigmentadas; g, gránulos; a, actina; i, interfase; l, lente.

La córnea de *A. purpuratus* se compone de una monocapa de células cuboidales (Figura 12) que no varían en longitud en toda su extensión, desde el centro hasta la interfase con las células epiteliales pigmentadas. En esta especie no se observan pigmentos al interior de la célula, y al igual que en *Z. patagonica* las microvellosidades de la córnea son de una longitud menor en relación con las microvellosidades de las células pigmentadas epiteliales (Figura 13).

A nivel ultraestructural es posible distinguir en la interfaz que se encuentra entre la córnea y el lente (Figura 13 E,F) fibras de tejido conectivo que posiblemente corresponden a colágeno, entregando soporte al lente.



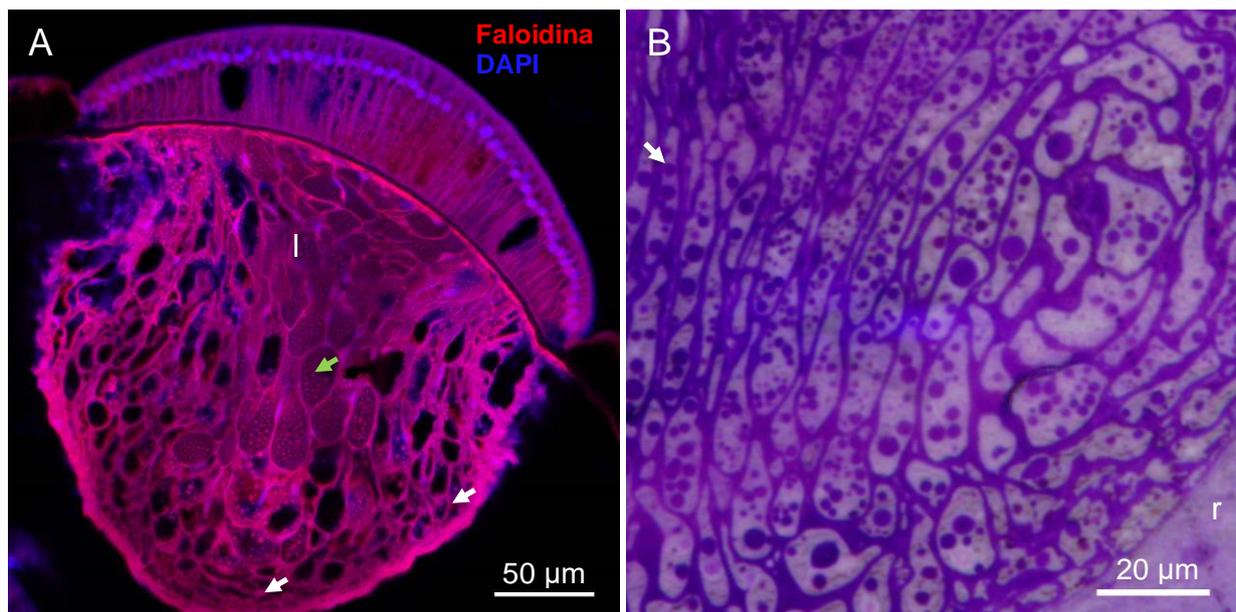
**Figura 12.** Córnea de *Argopecten purpuratus*. A- La células de la córnea poseen forma cuboidal con un núcleo central y fibras de actina entre cada célula (flecha). Abreviaciones: c, córnea; l, lente.



**Figura 13.** Ultraestructura de la córnea de *Argopecten purpuratus*. A,B. Las células que conforman la córnea presentan gran número de mitocondrias (naranja) y aparato de Golgi (rosa). C,D. No se observan diferencias en la morfología de las microvellosidades al compararlas con las células epiteliales pigmentadas. E,F. En la interfase de la córnea y la lente se encuentran pequeños haces de colágeno (flecha roja). Abreviaciones: m, microvellosidades; i, interfase.

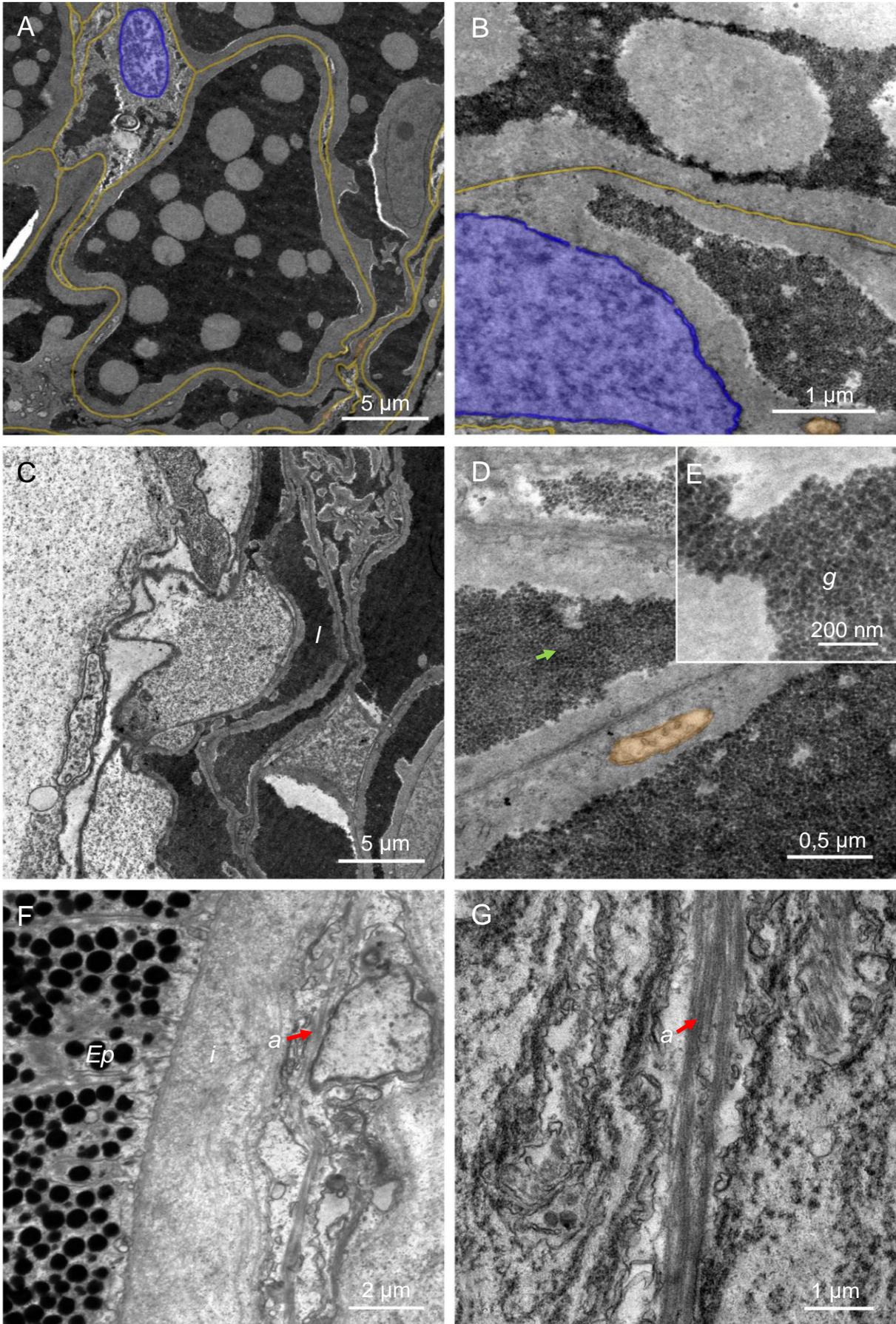
### 5.1.3. Lente

La morfología externa del lente en los pectínidos sigue un patrón general. Se ubica al centro del ojo, es aplanado en la zona próxima a la córnea y con un perfil cónico en su base, en la zona próxima a la retina. Además, en ambas especies se compone de células nucleadas y aparentemente anucleadas con morfología irregular muy compactas entre sí. Las células que se ubican al centro del lente son de mayor tamaño en relación con las que se encuentran en los márgenes que poseen una morfología aplanada, ya sea en la periferia lateral como en la base convexa.



**Figura 14.** Lente de *Zygochlamys patagonica*. A- Vista general, las células del centro del lente (flecha verde) son de mayor tamaño en relación a las células que se ubican en la periferia (flecha blanca). El lente se conforma de células nucleadas y anucleadas B- La morfología celular es irregular. Los límites celulares y los gránulos se tiñen intensamente de tono oscuro con el azul de metileno, zoom 2X. Abreviaciones: l, lente; r, retina.

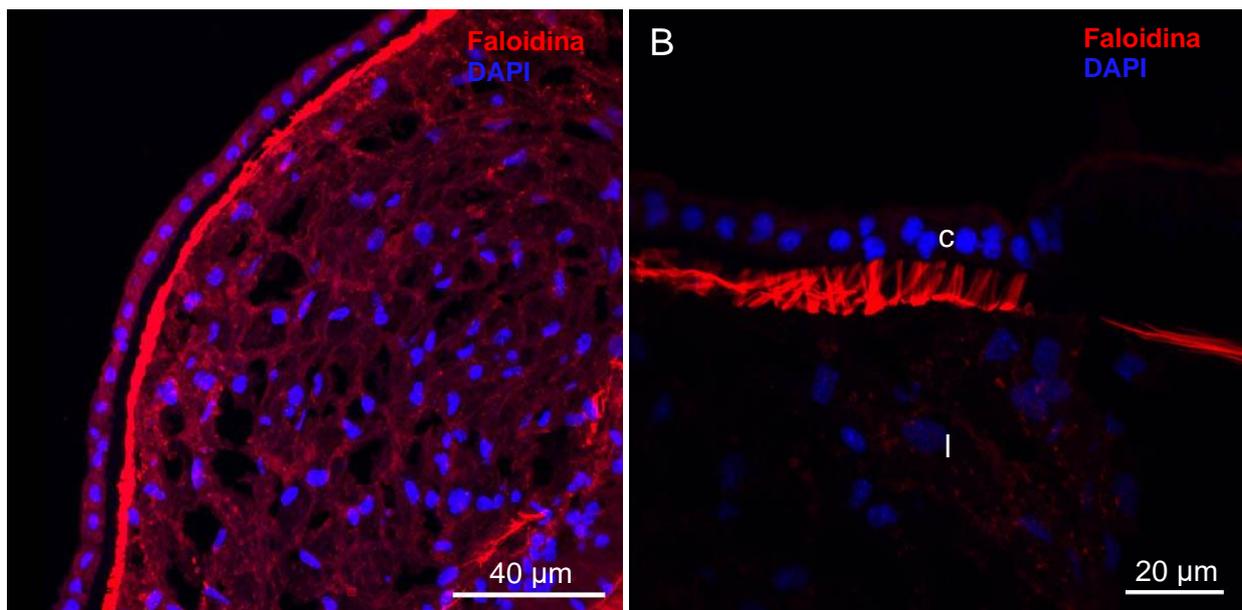
En las dos especies las células que conforman la córnea presentan una morfología poligonal con bordes redondeados y con núcleos excéntricos, los cuales están situados a la periferia de la célula cuando están presentes. En *Z. patagonica* como en *A. purpuratus* el interior de la célula se compone principalmente de gránulos, siendo estos más densamente empaquetados en esta última especie (Figuras 15 y 17).



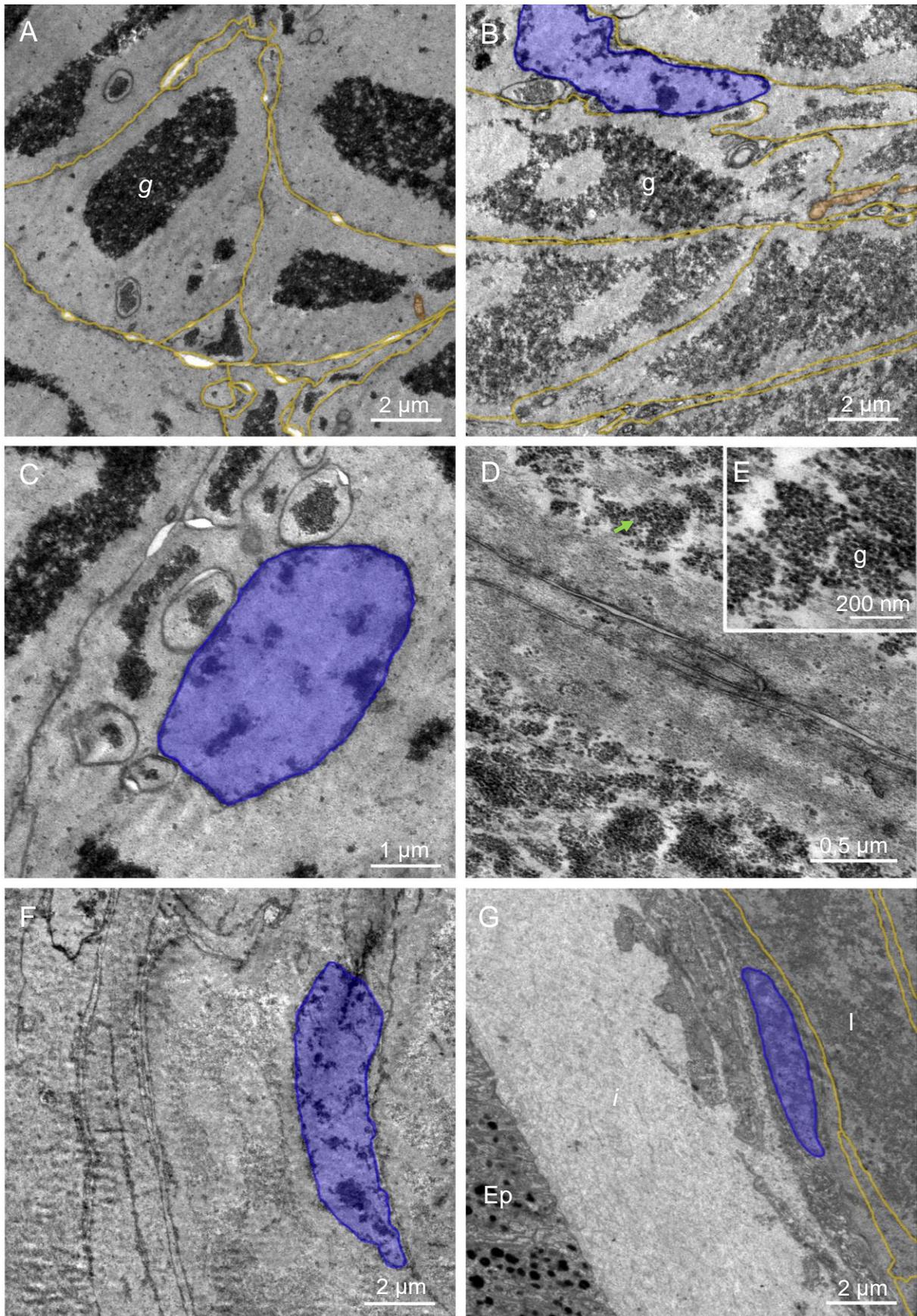
**Figura 15.** Ultraestructura del lente de *Zygochlamys patagonica*. A,B. Células granulares del lente de morfología irregular con núcleos y mitocondrias ocasionales ubicados al centro del lente. C. Región exterior del lente. D,E. Detalle de los gránulos electrón densos. F,G. Actina de las células ubicadas por el borde exterior del lente.

Abreviaciones: g, gránulos; ep, células epiteliales pigmentadas; i, intersticio; a, filamentos de actina.

A diferencia de *Z. patagonica* en *A. purpuratus* parece existir una fuerte presencia de microfilamentos de actina que recorren el borde superior de la lente y conectan con un punto ubicado entre la interfase de la córnea y el lente (Figura 16), y que podrían indicar un posible movimiento de contracción-relajación del iris del ojo.



**Figura 16.** Lente de *Argopecten purpuratus*. A. Vista general del lente con numerosos núcleos distribuidos irregularmente por la estructura. B. Haces perpendiculares de filamentos de actina que conectan la región superior del lente con haces paralelos a la estructura. Abreviaciones: c, córnea; a, filamentos de actina; l, lente.



**Figura 17.** Ultraestructura del lente de *Argopecten purpuratus*. A, B,C. Células granulares del lente de morfología irregular con núcleos y mitocondrias ocasionales ubicados al centro del lente. D. Detalle de los gránulos electrón densos al interior del lente (flecha verde). E, F. Células alargadas de la región exterior del lente, donde luego se da paso al intersticio (i) y posteriormente a células epiteliales pigmentadas

(Ep). Abreviaciones: g, gránulos; ep, células epiteliales pigmentadas; i, intersticio; l, lente.

Junto con lo anterior, la curvatura inferior de la lente genera una cavidad en la retina, generando una interfaz entre la retina y el lente, lugar donde además se encuentra el nervio óptico de la retina distal (Figura 22).

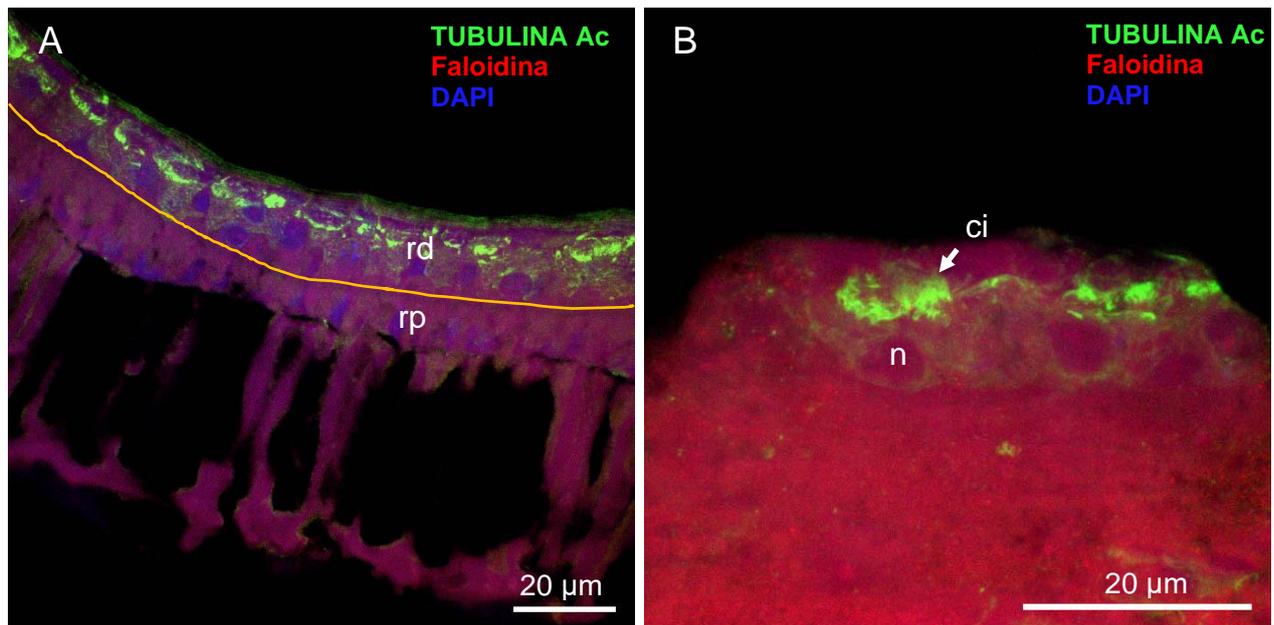
#### 5.1.4. Doble retina invertida

*Z. patagonica* y *A. purpuratus* siguen la configuración típica de la retina en pectínidos, con una retina distal de pequeño tamaño alojada en la cavidad que se forma inmediatamente por debajo del lente, lo que dificulta la diferenciación entre los márgenes de la retina distal y proximal. No se observan diferencias en las estructuras que conforman las células ciliadas de la retina distal entre las especies analizadas.

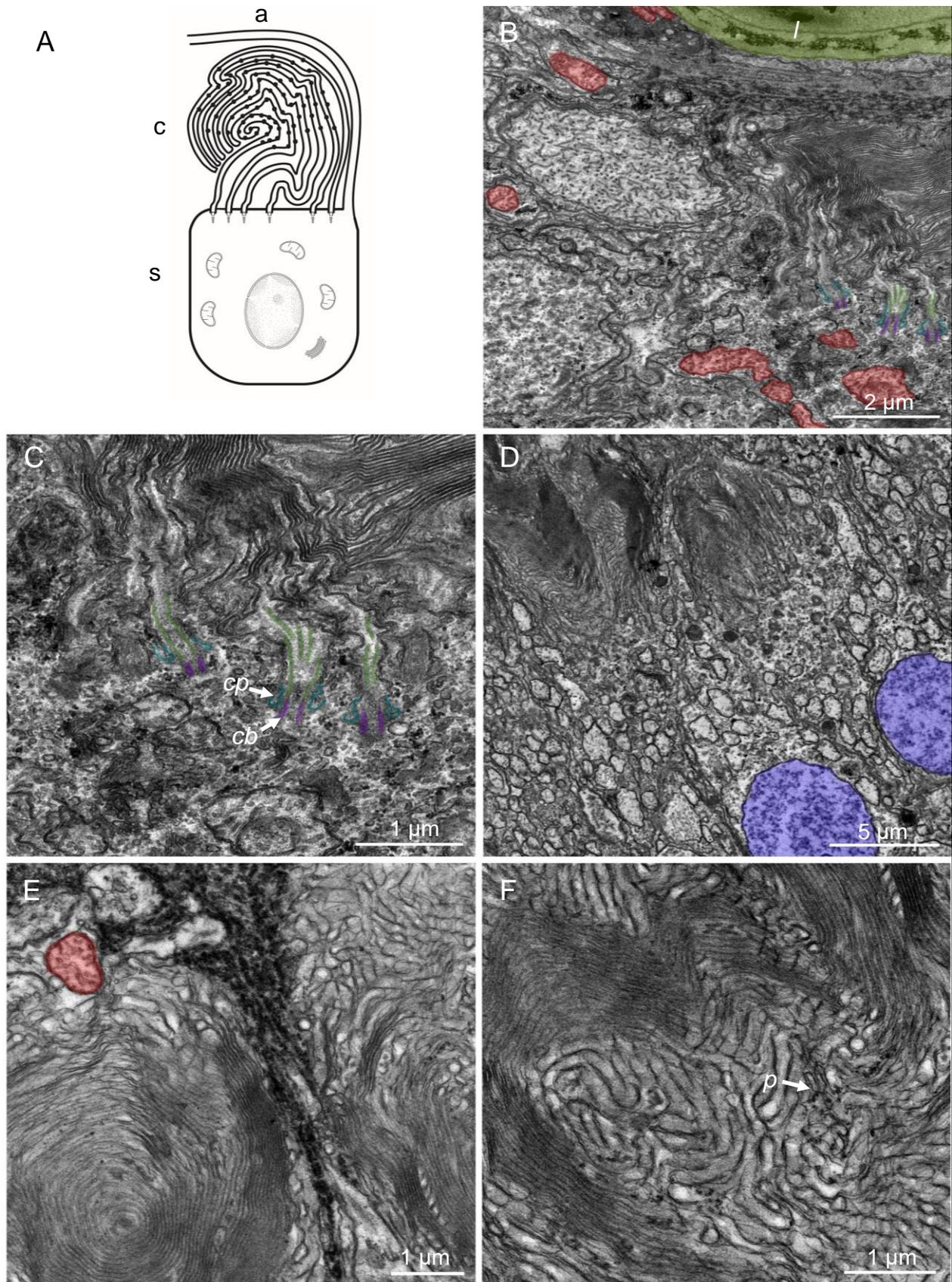
La retina distal se compone de fotorreceptores ciliados. Cada una de estas células posee un complejo ciliar orientado hacia la región superior del ojo, en dirección a la entrada de la luz. Este complejo forma una red de láminas ciliares que se extienden por gran longitud en la retina distal. Algunas de estas células forman un anillo concéntrico de cilios en la retina distal de *Z. patagonica* donde se encuentran los pigmentos de la región fotosensible (Figura 19 D, F).

En su base cada cilio se compone de cuerpos basales insertos en la membrana plasmática de la célula y bolsillos ciliares (“*ciliary pocket*”) (Figura 19 C y 21 E). Los cortes transversales en la base del axonema demuestran una configuración de 9+0 cuyo diámetro aproximado es de 300 nm en el fotorreceptor ciliado de *A. purpuratus* (Figura 21). En esta misma zona se observan gránulos de fotopigmento con un tamaño de 27 nm.

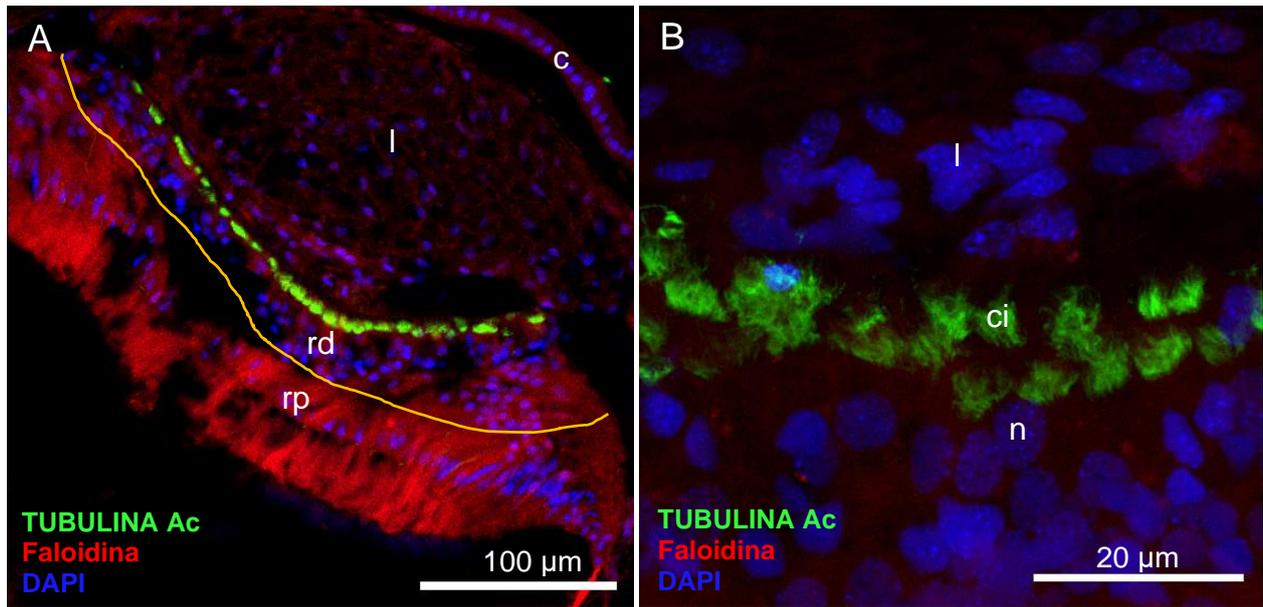
Al interior de la célula ciliada los organelos que se encuentran en mayor número son las mitocondrias y el aparato de Golgi (Figura 19 B y 21 D), además es posible encontrar pequeñas vesículas entre el núcleo y los cilios de *Z. patagonica*.



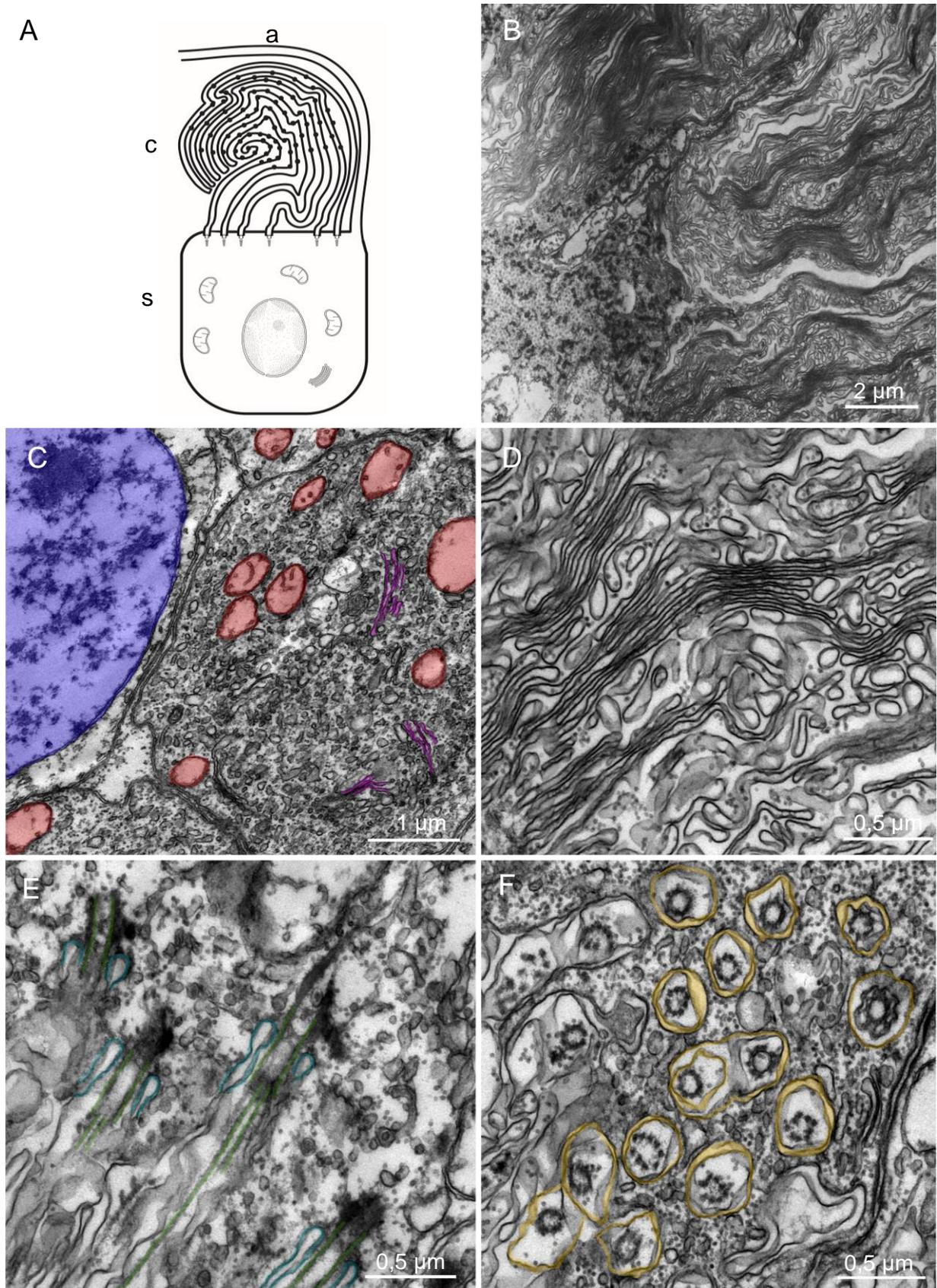
**Figura 18.** Fotorreceptor ciliado en *Zygochlamys patagonica*. A- Retina. B- Los cilios se ubican en la región superior de la célula en dirección de la entrada de la luz. Abreviaciones: rd, retina distal; rp, retina proximal; ci, cilios; n, núcleo.



**Figura 19.** Ultraestructura del fotorreceptor ciliado en *Zygochlamys patagonica*. A. Representación esquemática del fotorreceptor ciliado con los numerosos cilios que contienen los fopigmentos. Los cilios de cada célula confluyen en un anillo concéntrico. La maquinaria ciliar incluye un cuerpo basal y *ciliary pocket*. Las células contienen numerosas mitocondrias. B-C. Ultraestructura de las secciones longitudinales del fotorreceptor. Abreviaciones: a, axón; c, cilios; s, soma; cb, cuerpo basal; cp, *ciliary pocket*; cp, cuerpo basal; p, pigmentos.



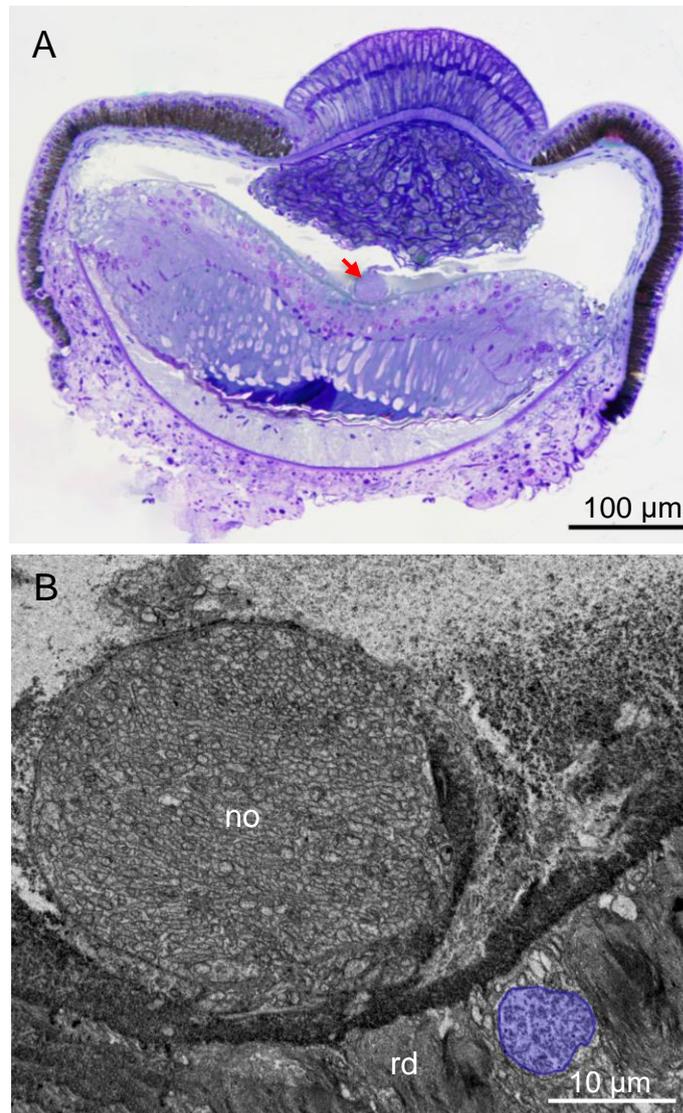
**Figura 20.** Fotorreceptor ciliado en *Argopecten purpuratus*. A. Corte sagital del ojo. B. Los cilios se ubican en la región superior de la célula en dirección de la entrada de la luz. Abreviaciones: c, córnea; l, lente; rd, retina distal; rp, retina proximal, n, núcleo, ci, cilios.



**Figura 21.** Ultraestructura del fotorreceptor ciliado en *Argopecten purpuratus*. A. Representación esquemática del fotorreceptor ciliado con los numerosos cilios que contienen los fotopigmentos. C. Las células contienen numerosas mitocondrias, además de Golgi. D. Membrana ciliar y fotopigmentos. E. La maquinaria celular incluye un cuerpo basal y *ciliary pocket*. F. Base de los cilios. Secciones longitudinales (B,D,E) y transversales (C,F) del fotorreceptor. Abreviaciones: a, axón; c, cilios; s,

soma; cb, cuerpo basal; cp, *ciliary pocket*; núcleos (azul); mitocondria (rojo), Golgi (rosado); *ciliary pocket* (cian); membrana ciliar (amarillo); cilios (verde).

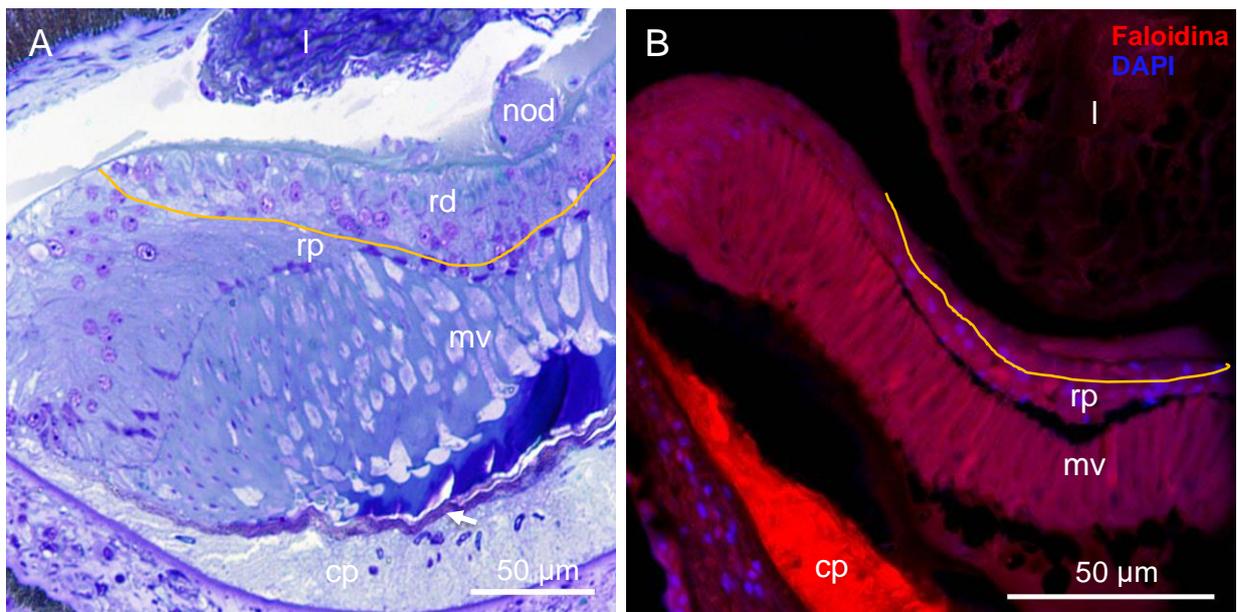
Un axón lateral recopila la información de cada fotorreceptor, la cual es llevada a un nervio óptico ubicado entre el lente y retina distal (Figura 22 A). El nervio óptico de la retina distal se compone de 435 fibras (Figura 22 B).



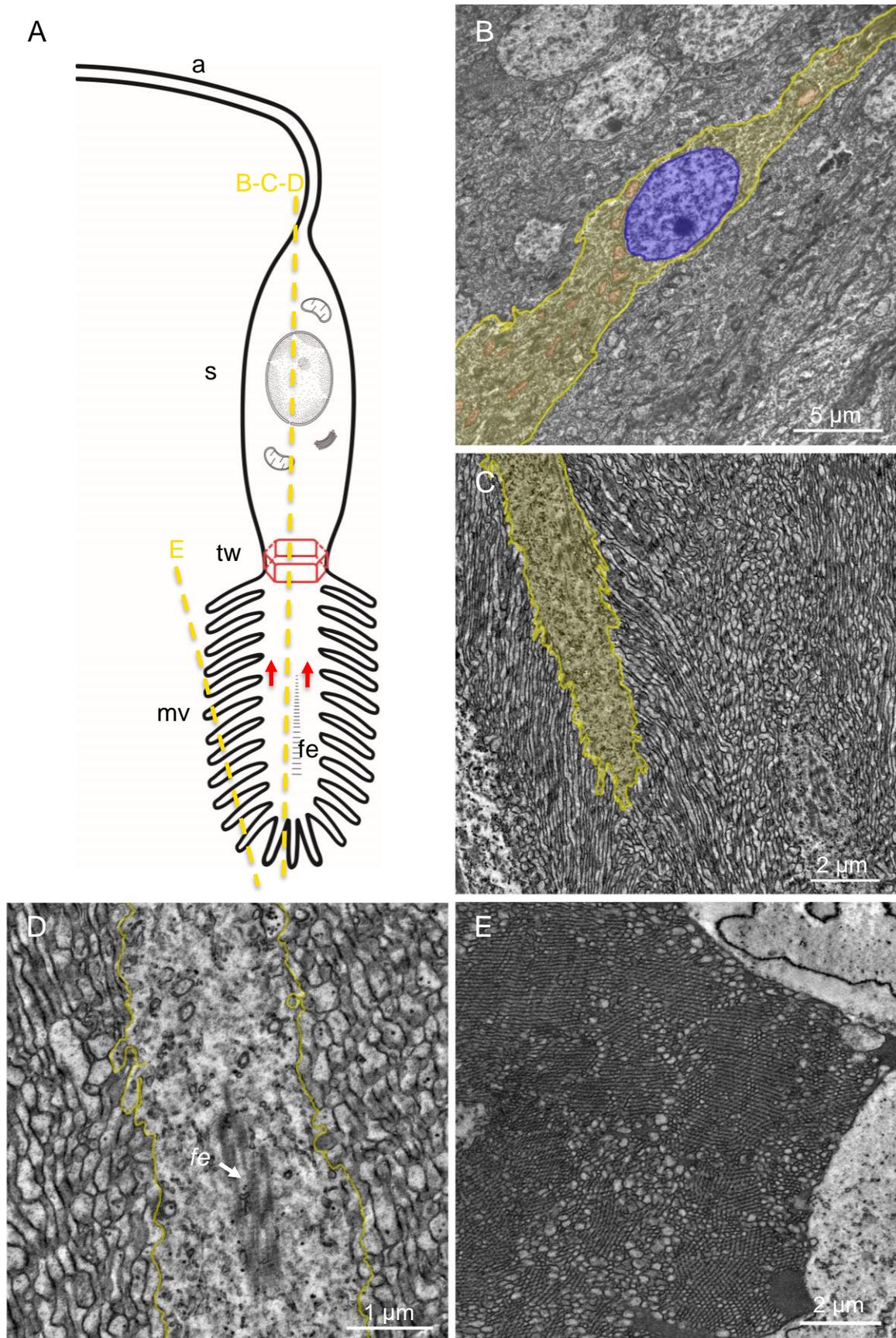
**Figura 22** Nervio óptico retina distal en *Zygochlamys patagonica*. A. Sección sagital del ojo paleal, se observa el nervio óptico de la retina distal (flecha roja) ubicado en la cavidad que se forma entre la lente y la retina. B. Nervio óptico de 32 µm de diámetro. En esta estructura convergen los axones de los fotorreceptores ciliados. Abreviaciones: nod, nervio óptico retina distal; rd, retina distal.

La retina proximal es de mayor tamaño y posee forma de cuenco, aumentando de grosor en el eje central del ojo, donde comienzan las microvellosidades de los

fotorreceptores rabdoméricos. Cada fotorreceptor se divide en una región que contiene al soma, donde se observan las mitocondrias y el aparato de Golgi como organelos principales. En orientación opuesta a la retina distal se ubican las microvellosidades del fotorreceptor, las que en secciones transversales tienen un diámetro promedio de  $0,19 \mu\text{m}$  en *Z. patagonica* y  $0,17 \mu\text{m}$  en *A. purpuratus* (Figura 24 E y 26 E). En *A. purpuratus* fue posible encontrar la red terminal (o “terminal web”) (Figura 25 B) al interior de cada fotorreceptor, esta estructura se ubica entre el soma y las microvellosidades. Por otra parte, en ambas especies, se determinó la presencia de fibras de estrés en la región que alberga las microvellosidades (Figura 24 D y 26 D).

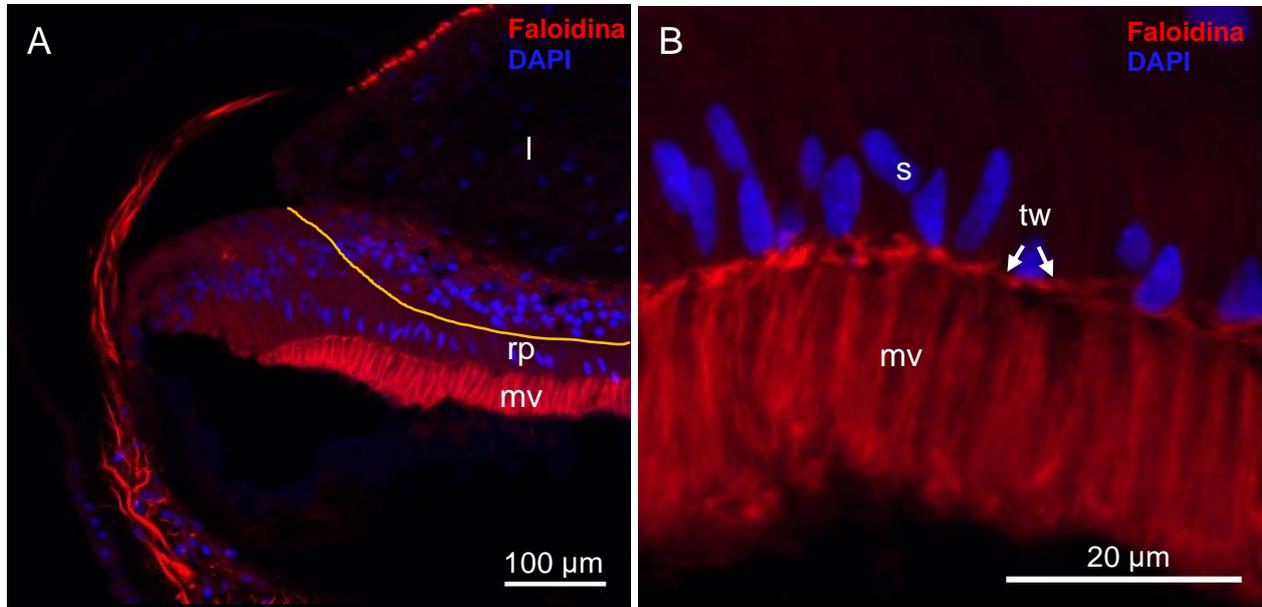


**Figura 23.** Fotorreceptor rabdomérico en *Zygochlamys patagonica*. A. Sección sagital del ojo, se observa la retina distal (superior) y retina proximal (inferior) esta última de mayor extensión. B. Las microvellosidades del fotorreceptor rabdomérico se ubican en la región inferior de la célula. Abreviaciones: l, lente; nod, nervio óptico retina distal; rd, retina distal; rp, retina proximal; mv, microvellosidades; e, espejo; cp, capa pigmentada.

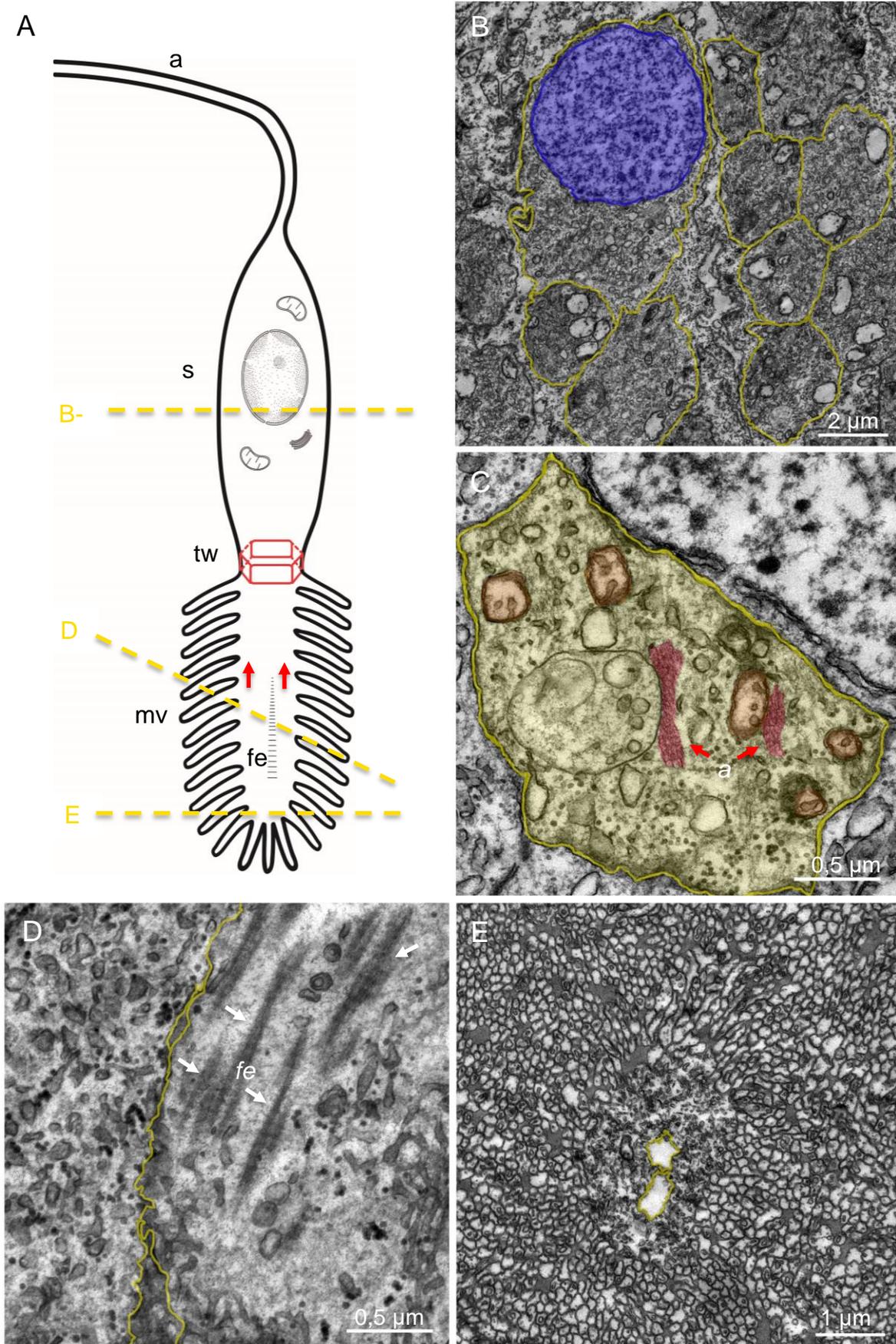


**Figura 24.** Ultraestructura del fotorreceptor rabdomérico en *Zygochlamys patagonica*. A. Representación esquemática del fotorreceptor rabdomérico y la dirección de los cortes realizados en las secciones ultrafinas. El fotorreceptor consiste en una célula alargada con un extremo fotosensible, donde se encuentran numerosas

microvellosidades y fibras de estrés. B,C. Ultraestructura de las secciones longitudinales (B-D) y transversales (C) del fotorreceptor. Abreviaciones: a, axón; s, soma; tw, *terminal web*; mv, microvellosidades; fe, fibras de estrés.



**Figura 25.** Fotorreceptor rabdomérico en *Argopecten purpuratus*. A. Sección sagital del ojo, se observa la retina distal (superior) y retina proximal (inferior). B. La región fotosensible de la célula está compuesta por microvellosidades que se orientan en dirección contraria a la retina distal. El soma de cada fotorreceptor rabdomérico se encuentra en contacto con la membrana celular de los fotorreceptores ciliados de la retina distal. Abreviaciones: l, lente; rd, retina distal; rp, retina proximal, s, soma; mv, microvellosidades; tw, *terminal web*.

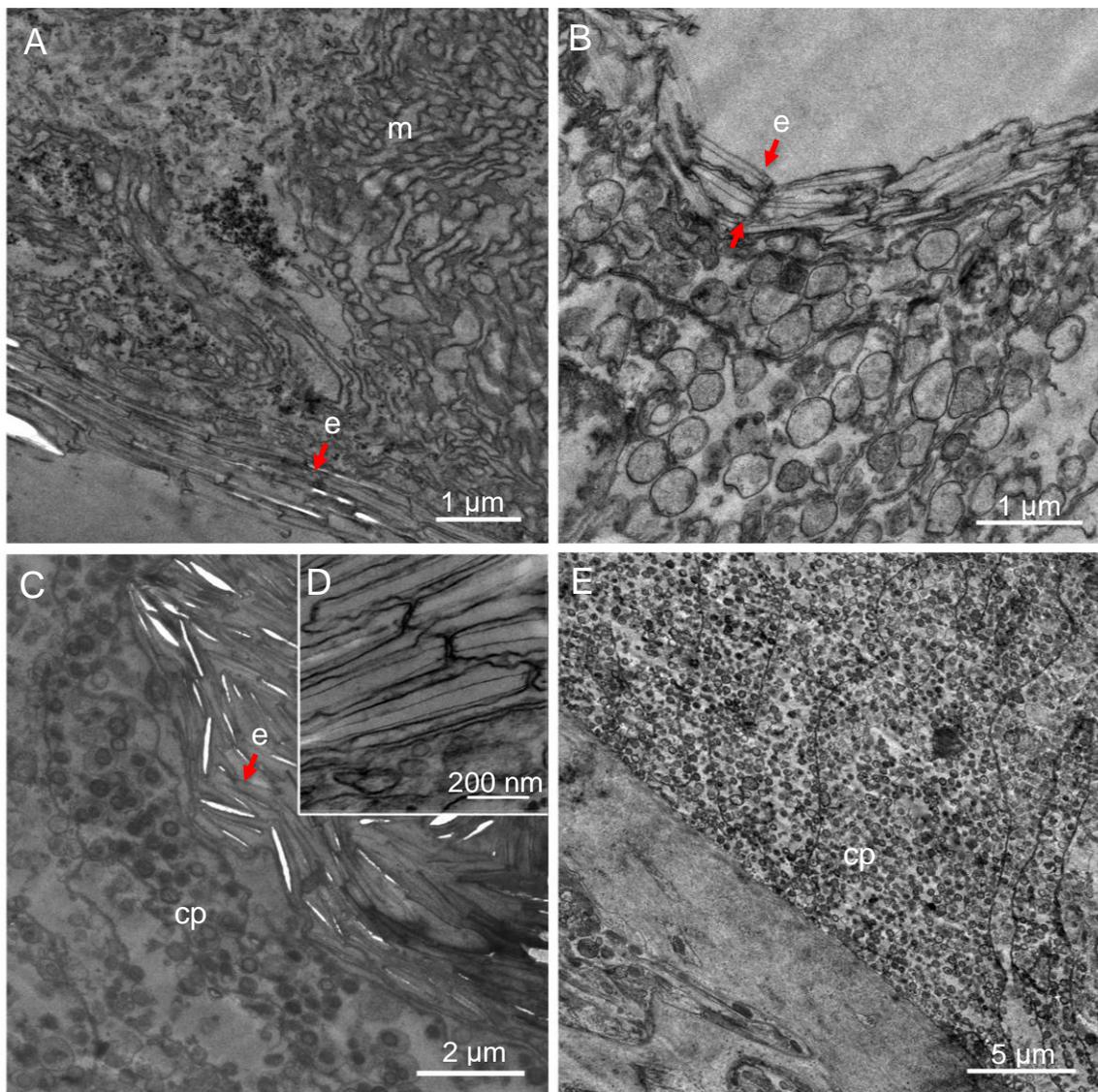


**Figura 26.** Ultraestructura del fotorreceptor rabdomérico en *Argopecten purpuratus*. A. Representación esquemática del fotorreceptor rabdomérico y la orientación de los cortes realizados en las secciones ultrafinas. El fotorreceptor consiste en una célula alargada con un extremo fotosensible, donde se encuentran numerosas

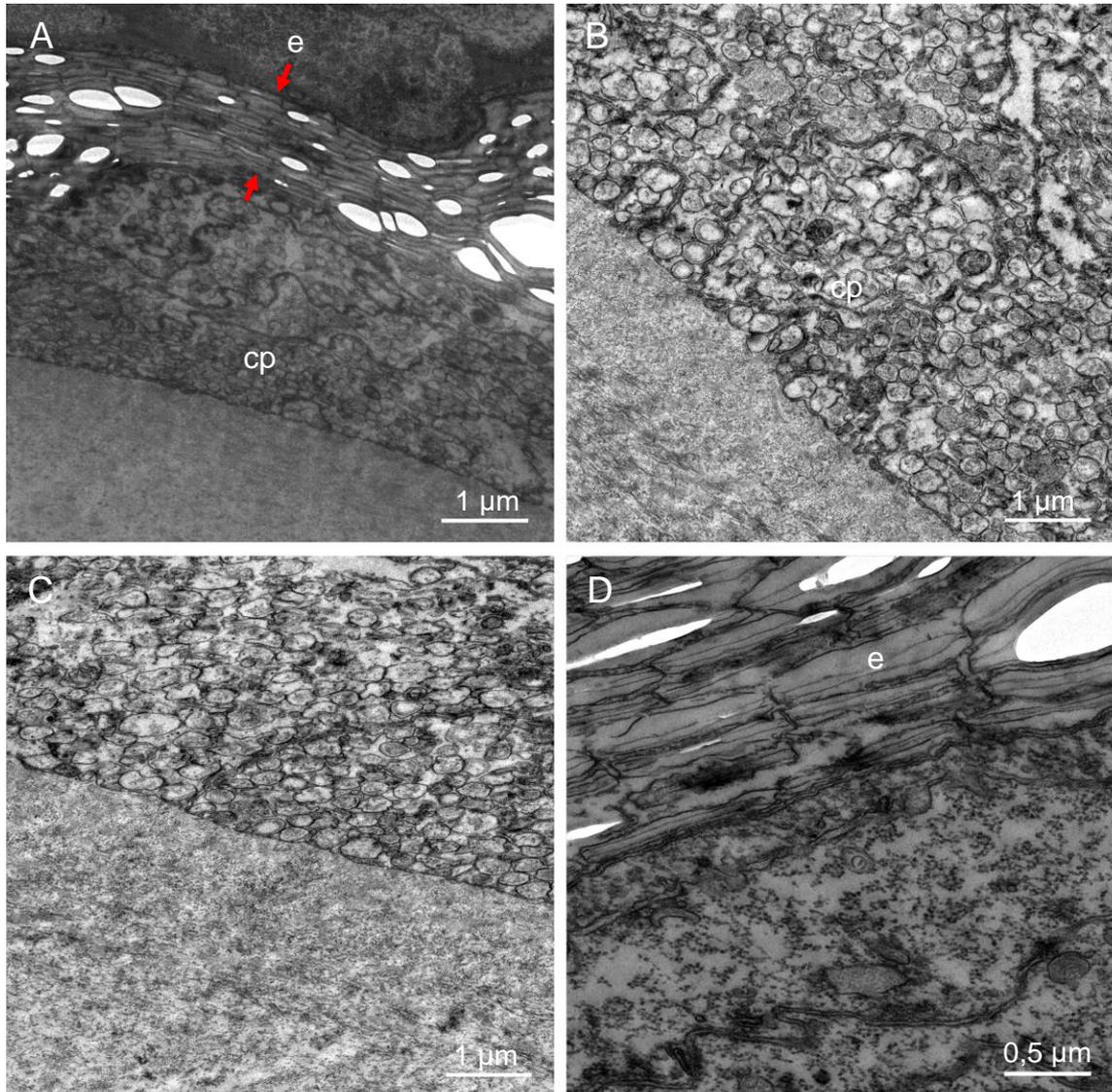
microvellosidades y fibras de estrés. Ultramicrofotografía de las secciones transversales (B-C-E) y oblicuos (D) del fotorreceptor. B. Los fotorreceptores rabdoméricos se encuentran altamente empaquetados. C. Filamentos de actina en el interior del fotorreceptor. D. Fibras de estrés se localizan en la región de las microvellosidades del fotorreceptor. E. Numerosas microvellosidades en corte transversal. Abreviaciones: a, axón; s, soma; tw, *terminal web*; mv, microvellosidades; a, filamentos de actina; fe, fibras de estrés.

#### 5.1.5. Espejo y capa pigmentada

Características adicionales al funcionamiento del ojo paleal en pectínidos son el espejo y la capa pigmentada. Ambas estructuras se ubican en la región proximal de la cámara del ojo, por debajo de la retina. El espejo se compone de cristales cuadrados con un valor promedio de  $1,05 \mu\text{m} \times 0,12 \mu\text{m}$  (de alto x ancho) en *Z. patagonica* y  $1,19 \mu\text{m} \times 0,19 \mu\text{m}$  en *A. purpuratus*.

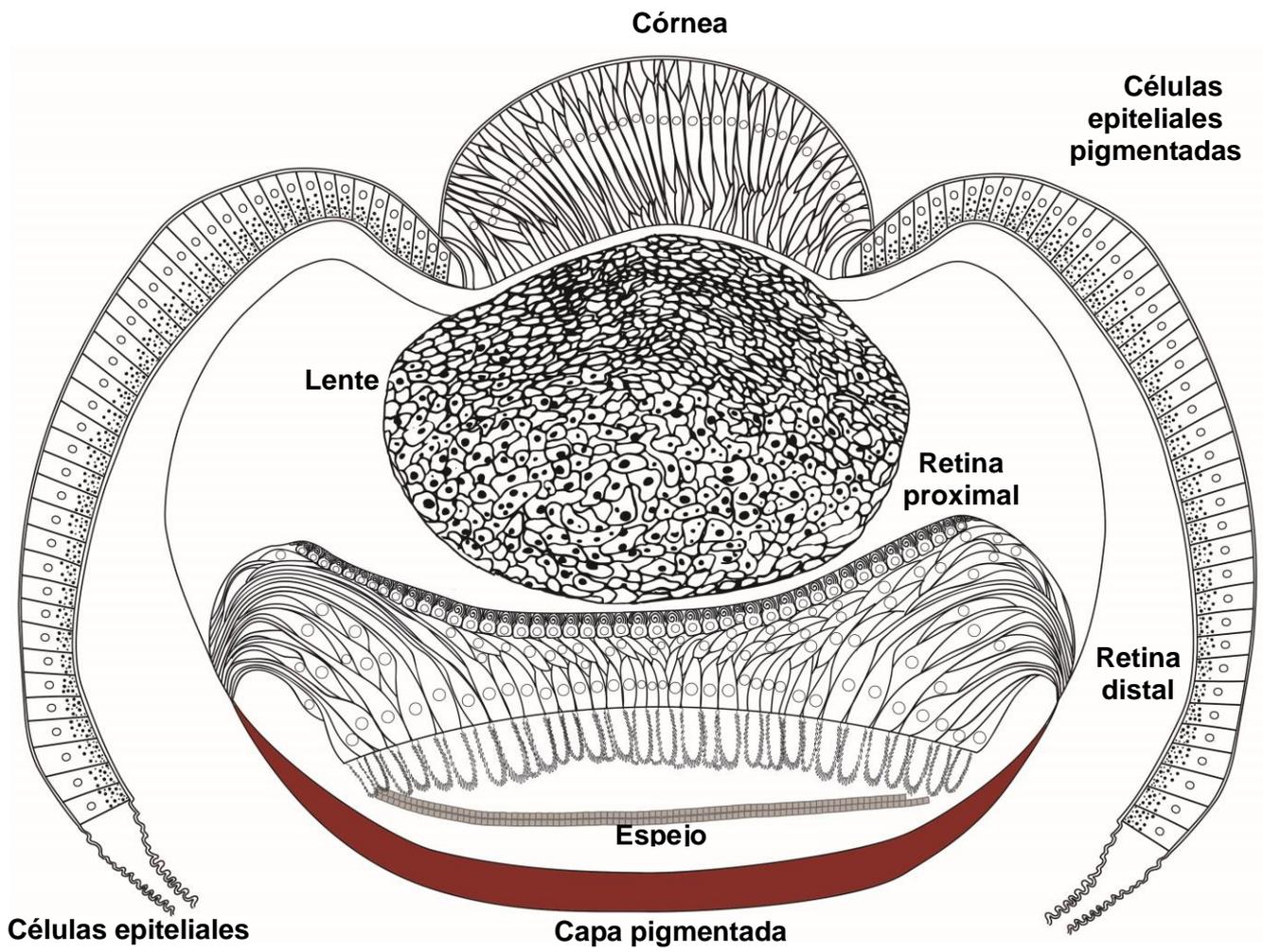


**Figura 27.** Ultraestructura del espejo y capa pigmentada de *Zygochlamys patagonica*. Abreviaciones: mv, microvellosidades; e, espejo; cp, capa pigmentada.

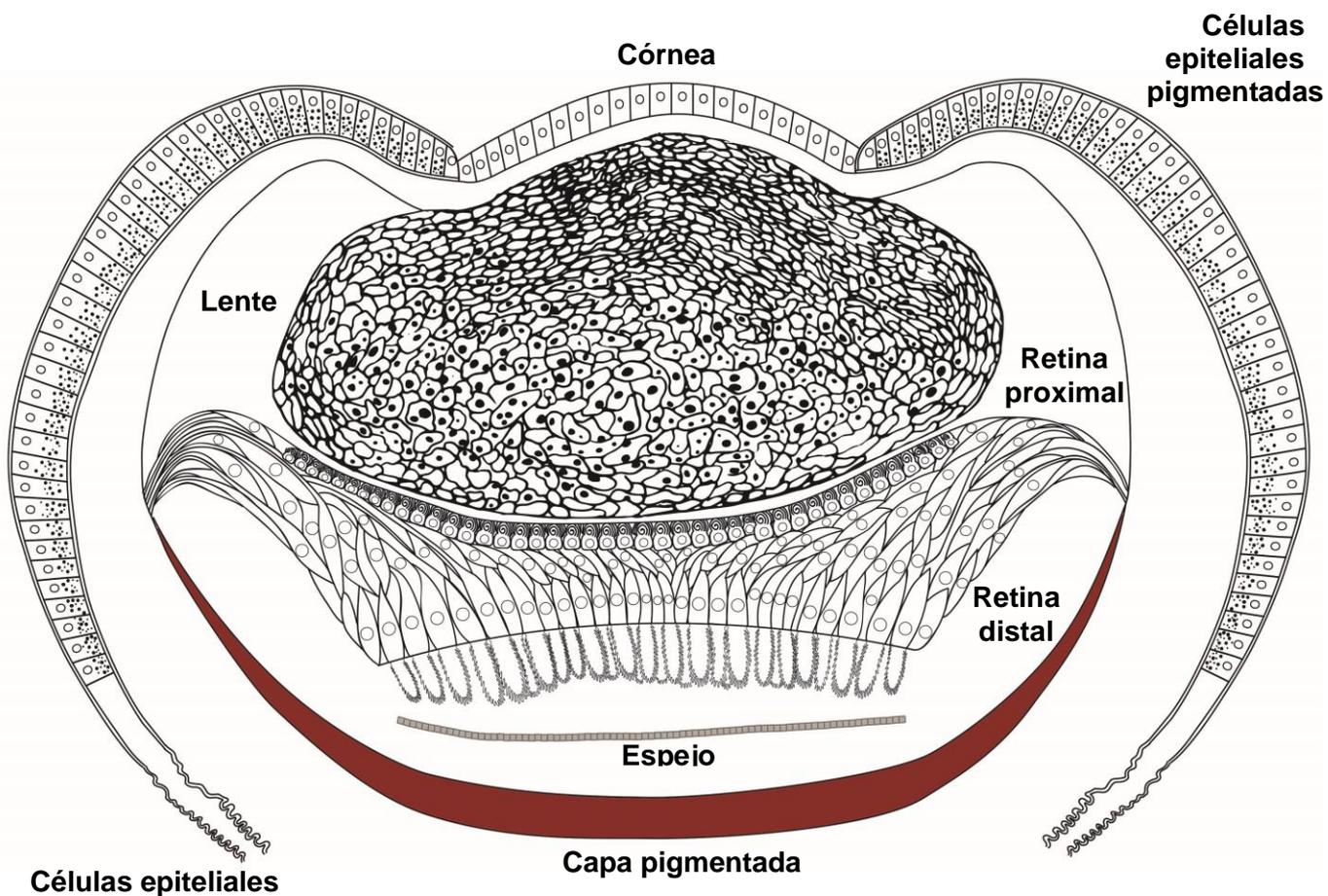


**Figura 28.** Ultraestructura del espejo y capa pigmentada de *Argopecten purpuratus*. Abreviaciones: e, espejo; cp, capa pigmentada.

Resumen de la morfología del ojo paleal observada en *Z. patagonica* (Figura 29) y *A. purpuratus* (Figura 30).



**Figura 29.** Esquema de una sección sagital de un ojo paleal de *Zygochlamys patagonica*.



**Figura 30.** Esquema de una sección sagital de un ojo paleal de *Argopecten purpuratus*.

## 6.DISCUSIÓN

Las secciones de 20  $\mu\text{m}$  obtenidas mediante cortes en frío y secciones ultrafinas de 1 a 90 nm de los ojos paleales de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* demuestran diferencias en la configuración estructural de la córnea y el lente, y ultraestructural de las células epiteliales pigmentadas. Por otra parte, en la retina, el espejo y la capa de pigmento no se determinaron mayores diferencias en términos morfológicos y ultraestructurales.

Comenzando con la anatomía externa del ojo paleal es posible notar una diferencia en el tamaño de los ojos paleales, siendo los de *Z. patagonica* de un menor tamaño (alrededor de 1 mm) en comparación con los de *A. purpuratus* (2,5 mm). Internamente, en la base del tallo ocular se observó una densa composición de fibras musculares en ambas especies, lo que explicaría la capacidad del ojo de retraerse al recibir un estímulo táctil (Dakin 1910).

La coloración de las células epiteliales pigmentadas también es un factor diferencial en las especies estudiadas. Siendo de una coloración negra en *Z. patagonica*, mientras que en *A. purpuratus* las mismas células le otorgan una coloración azulada clara al ojo. La diferencia de tonalidad se explica por los tipos de gránulos de pigmento al interior de las células epiteliales pigmentadas. Se encontró además que los gránulos de pigmento se distribuyen espacialmente en dos sectores de las células epiteliales pigmentadas de *A. purpuratus*, la región media con gránulos de un tamaño promedio de 140 nm, y la región interna con gránulos de pigmento más grandes de 220 nm. Por otra parte, en los ojos de coloración negra de *Z. patagonica* solo se encontraron gránulos de pigmento de en promedio 381 nm, siendo de mayor tamaño que en *A. purpuratus*. La diferencia en la distribución y tipo de gránulos presentes en los ojos de las especies estudiadas coincide con lo descrito recientemente por Miller et al (2019) donde se determinó la presencia de gránulos de pigmento y nanoesferas al interior las células epiteliales pigmentadas de *Argopecten irradians*. Las nanoesferas producen una dispersión eficiente de la luz UV en un ángulo de color brillante y azul, previniendo de esta manera la velocidad de degradación de los pigmentos por efecto de la fotooxidación, ya que, *A. irradians* al igual que *A. purpuratus* habita en aguas poco profundas.

La configuración de la córnea y del lente de *Z. patagonica* se relaciona con las especies del subgrupo Chlamydiae, donde la córnea está constituida por células

fusiformes con un núcleo central, mientras que, la córnea de *A. purpuratus* se compone de células cuboidales simples y un lente elíptico que representan la morfología típica encontrada en representantes del grupo Aequipectini (Morton 2000, Malkowsky & Götze 2014). En pectínidos existe un acople córnea-lente para corregir la aberración esférica producida en el ojo (Speiser & Johnsen 2008a). La córnea y el lente de *Z. patagonica* poseen una curvatura convexa pronunciada, y células fusiformes alargadas en la córnea. En términos taxonómicos esta situación se ha descrito en pectínidos del grupo Chlamynidae y Palliolinae, los cuales presentan un ojo de pequeño tamaño con un lente cónico, por otra parte, en especies que poseen un lente ovalado y de mayor tamaño, la aberración esférica es corregida por el mismo lente, como en los representantes del grupo Aequipectini (Malkowsky & Jochum 2014).

La ultraestructura de la córnea de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* revela la presencia de mitocondrias y aparato de Golgi en el citoplasma de la célula. En la región externa se encuentran las microvellosidades que además de ayudar al movimiento de mucopolisacáridos como protección, podrían contribuir a la transparencia de esta estructura, debido a que se produce un índice de refracción uniforme y en gradiente que reduciría la reflexión entre el agua y el citoplasma de las células de la córnea (Piatigorsky et al 2000).

A diferencia de la córnea, la ultraestructura del lente en *Z. patagonica* y *A. purpuratus*, demuestra la ausencia de organelos en el citoplasma de la célula, en su lugar es posible encontrar numerosos gránulos electrón-densos de pequeño tamaño que cubren gran parte del área de la célula. Es posible que el material que conforma el lente como los gránulos electrón-densos de su interior posean un bajo índice refractivo, debido a que el lente no afecta la trayectoria de la luz hacia el espejo por su índice refractivo casi idéntico al del agua de mar (Land 1965, Barber et al 1967). Los lentes de los pectínidos están compuestos de la proteína dimérica  $\Omega$ -crystallin, una proteína perteneciente al grupo de las aldehído deshidrogenasas (ALDH) que está presente en lentes de vertebrados e invertebrados (Piatigorsky et al 2000). Además, la ausencia de núcleos en algunas de las células puede explicarse por la morfología alargada de la célula (Dakin 1910), donde es posible que los cortes sagitales de 20  $\mu\text{m}$  no contenga el área completa de una sola célula.

En relación con las retinas no se encontraron diferencias en la distribución de los fotorreceptores en *Z. patagonica* y *A. purpuratus*, coincidiendo con lo descrito

anteriormente para la retina distal y proximal en pectínidos (Dakin 1910, Land 1965, Barber et al 1967). El problema de aumentar la superficie de membrana en la región fotosensible se logró en esta familia de moluscos con dos tipos celulares: células con un gran número de cilios (fotorreceptor ciliado) y células con microvellosidades (fotorreceptor rabdomérico) (Arendt 2003).

A nivel ultraestructural los fotorreceptores ciliados de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* evidencian un gran requerimiento energético, representado por las numerosas mitocondrias al interior de la célula. Junto con esto, el aparato de Golgi observado frecuentemente en las preparaciones de este tipo celular puede contribuir a las extensas láminas ciliares del fotorreceptor. Así mismo, en ambas especies son distinguibles los cuerpos basales y bolsillos ciliares en la base de cada cilio, el cual presenta una configuración 9+0 típica dentro de los sistemas sensoriales de invertebrados, y en especial de moluscos (Miller 1958).

Los fotorreceptores más comunes dentro de los invertebrados marinos son los rabdoméricos (Eakin 1965). Al interior de los fotorreceptores rabdoméricos de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* destacan las numerosas mitocondrias en el soma de la célula, además de fibras de estrés en la región que contiene a las microvellosidades. Contrario a lo reportado por Barber et al (1967) en *Pecten maximus*, en el presente estudio no se determinó la presencia de cilios en el fotorreceptor de *Z. patagonica* ni *A. purpuratus*. Este hecho ha sido descrito también en los fotorreceptores de los cefalópodos, cuyos ojos se componen únicamente de fotorreceptores rabdoméricos sin cilios (Dakin 1910). Otro hecho contradictorio es la presencia de raíz del cilio ("ciliary rootlet"), en los fotorreceptores rabdoméricos de *Mimachlamys varia* y *Pseudamussium peslutre* (Salvini-Plawen 2008), no obstante, estas estructuras que se originan únicamente en los cuerpos basales de células ciliadas y tienen por función entregar estabilidad al cilio (Yang et al 2005).

Una estructura relevante encontrada en los fotorreceptores rabdoméricos de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* es la red terminal o "terminal web", correspondiente a un anillo compuesto de microfilamentos de actina que facilita el movimiento de las microvellosidades de la célula. Las fibras de estrés de las microvellosidades posiblemente estén asociadas a este movimiento mecánico que se produce en la célula como se demostró en el ensayo de estimulación extracelular con la sonda fluorescente.

La parte posterior del ojo de *Z. patagonica* y *A. purpuratus* se encuentra recubierta por el espejo y la capa pigmentada. El espejo de estas especies coincide con lo descrito por Land (1965), y más recientemente Palmer et al (2017), como una estructura reflectora compuesta por placas cuadradas regulares de b-guanina sin espacios ni superposiciones entre sí con un grosor promedio de 74 nm en *Pecten maximus*. En *Z. patagonica* y *A. purpuratus* los grosores promedios encontrados fueron de 120 nm y 190 nm. La apariencia y variación en los tamaños del espejo puede estar sujeta a la técnica empleada para preservar el tejido, dado que las constantes deshidrataciones realizadas en tejidos sometidos a microscopia electrónica de transmisión (MET) producen un colapso del citoplasma y pérdida de los cristales de guanina (Malkowsky & Jochum 2014, Palmer et al 2017).

Los factores que influyen en la configuración estructural del ojo se relacionan de forma evidente con el hábitat de cada especie, siendo la profundidad el factor determinante (Speiser & Johnsen 2008a). Además, las adaptaciones morfológicas que se producen en la córnea y el lente están en directa relación, ya que, si uno de ellos cambia su configuración la otra estructura también lo hará (Malkowsky & Götze 2014).

Al parecer la disponibilidad de luz en el hábitat de los pectínidos es una variable selectiva respecto a la configuración de la retina. En especies que habitan aguas poco profundas como *Aequipecten opercularis* y *Mimachlamys varia* las microvellosidades del fotorreceptor rabdomérico son cortas, mientras que la retina distal es ancha y aplanada (Malkowsky & Götze 2014). Sin embargo, estas dos especies que corresponden a los subgrupos Aequipectini y Chlamydinae, respectivamente, presentan morfologías diferenciadas en relación con la córnea y lente, por lo que la luz parece ser un factor no determinante en la morfología de estas estructuras.

Un hecho notable es la alta presencia de microfilamentos de actina en el ojo paleal de *A. purpuratus*. Largos haces de filamentos recorren en forma paralela al eje axial los extremos laterales de la cámara óptica en una zona ubicada por debajo de la membrana basal de las células epiteliales pigmentadas. Estos haces se extienden desde el costado superior del lente hasta el borde de la retina proximal. De igual forma se encontraron microfilamentos que nacen en un área bajo la córnea y caen de forma perpendicular al lente formando una especie de anclaje por el borde superior de este. Dakin (1910) describía que el contorno del lente estaba constituido por una vaina de tejido conectivo y que en secciones delgadas paralelas al plano de la córnea era

posible ver los núcleos de estas células de soporte, que además presentaban extremos estirados con largas fibras, las cuales incluso se encontraban en el tejido conectivo que se extiende hacia los costados de la vesícula óptica. La sugerencia de un posible movimiento de las fibras planteado por Dakin en 1910 fue recientemente confirmado mediante estudios funcionales. En ellos se describió la presencia de un reflejo pupilar en el ojo de *A. irradians*. Esto se determinó al estimular el ojo paleal con unas diferentes intensidades de luz brillante (alrededor de 1000 lux) causando la contracción de la pupila en un 60% y la posterior dilatación al someterlos a escenarios con luz tenue (alrededor de 1 lux), confirmando además la presencia de fibras de actina circulares (contracción) y fibras de actina radiales (dilatación) al interior del ojo de esta especie (Miller et al 2019).

Algunas de las diferencias morfológicas encontradas en el presente estudio concuerdan con estudios previos basadas en la morfología de los grupos Chlamidinae y Aequipectinidae realizados en secciones del ojo paleal (Patten 1887, Dakin 1910, Barber et al 1967, Morton 2001, Morton 2008, Speiser & Johnsen 2008a, Malkowsky & Götze 2014). Sin embargo, estos estudios no exploran la morfología ultraestructural de los componentes que conforman el ojo paleal en términos comparativos. Una mirada ultraestructural permite descifrar de mejor manera los mecanismos por los cuales las estructuras le otorgan funcionalidad al ojo y a la vez como esta funcionalidad se encuentra acoplada a los comportamientos establecidos por el hábitat del animal.

Parece ser que estructuras como la córnea y el lente son dependientes de factores filogenéticos, mientras que los componentes fotosensibles del ojo obedecen a elementos proporcionados por el hábitat, como la disponibilidad de luz, y que, por tanto, la evolución en estos componentes se produjo de forma independiente en varios linajes en relación con la profundidad (Malkowsky & Götze 2014).

Morton (2001) menciona que los ojos de los pectínidos son capaces de adaptarse morfológicamente a grandes profundidades, y por lo tanto a las diferencias lumínicas del ambiente. En el caso de *Z. patagonica* y *A. purpuratus*, dos especies pertenecientes a grupos diferentes, que sin embargo habitan en un rango de profundidad que coincide en algunos estratos (20 m a 120 m y 5 a 40 m, respectivamente), no presentaron diferencias en la retina, el espejo o la capa pigmentada, lo que concuerda con lo planteado por Malkowsky & Götze (2014), en relación a la dependencia de la profundidad con las estructuras fotosensibles del ojo

como la retina, en las que se presentan fotorreceptores con microvellosidades más cortas y una retina distal aplanada en especies que habitan aguas costeras de poca profundidad.

Por otra parte, y considerando los factores ambientales que influyen de manera particular en el hábitat de las especies estudiadas, en *A. purpuratus*, destaca la presencia de uno de los principales modeladores ambientales: La corriente de El-Niño en el norte de Chile, la que modula a través de pulsos ambientales factores como la depredación, competidores, tasa de reclutamiento y reproducción de esta especie de pectínido (Wolff & Mendo 2000). A su vez las poblaciones de *Z. patagonica* más estudiadas son las que se encuentran asociadas al talud continental en el Océano Atlántico, donde se han descrito la presencia de altas concentraciones de clorofila-a (Mauna 2013), hacia donde además migran los juveniles una vez que se desprenden del sustrato luego del asentamiento primario (Bremec et al 2008). En el territorio del Océano Pacífico se ha descrito la presencia de esta especie desde la zona costera de la Isla de Chiloé, hasta el Cabo de Hornos (Waloszek 1984), lo que incluiría el mar interior de Chiloé desde donde se obtuvieron los organismos analizados.

Dentro de los factores que influyen como modeladores ambientales de la distribución y el tipo de vida de estas especies en sus respectivos hábitats, existen factores que se han descartado por autores como los responsables de dar una explicación biológica a la morfología del ojo. De esta forma Morton (2001) desestima la responsabilidad de la depredación como agente modelador, esto debido a que los pectínidos no poseen visión espacial, por lo que no pueden reconstruir el ambiente por limitaciones del sistema nervioso dadas por la incapacidad del ganglio parietovisceral de procesar la gran cantidad de información que recogen del ambiente, en lugar de ello, órganos quimiosensoriales serían los responsables de entregar una respuesta ante un potencial depredador.

La biología comparativa resulta útil para explicar la existencia de un ancestro en común entre diferentes organismos, esto a través de la comparación de estructuras u órganos homólogos que permitan establecer este parentesco. En el caso particular de los ojos la comparación de estructuras similares como el lente, córnea, retina, entre otros resulta complejo para lograr establecer una homología entre la vasta diversidad morfológica existente debido a que en los metazoos el ojo ha evolucionado en múltiples ocasiones de forma independiente (Arendt 2003). A pesar de aquello los moluscos al tener una gran diversidad de configuraciones en términos de estructuras

y funciones de este órgano ofrecen una gran oportunidad como modelos para estudiar los pasos intermedios durante la evolución del sistema visual (Serb 2008).

Además, en los moluscos y de manera particular los pectínidos ofrecen múltiples perspectivas de estudio, como lo son la electrofisiología, evolución, ecología, desarrollo y biología celular. En relación con esto último, algunos modelos han permitido el estudio del crecimiento del citoesqueleto, mecanismos de diferenciación y destino celular (Serb 2008).

Futuros estudios debieran incluir morfología comparativa del ojo paleal en pectínidos dentro de un marco filogenético para correlacionar las posibles presiones selectivas del hábitat, tales como profundidad, disponibilidad de alimento, presencia de corrientes, y como aquellas ejercen una directriz evolutiva en el ojo de los pectínidos.

## 7. CONCLUSIONES

- El pectínido *A. purpuratus* presenta dos tipos de gránulos en células epiteliales pigmentadas: Gránulos de pigmento y nanoesferas.
- La ultraestructura entre la córnea, lente, espejo y capa pigmentada es conservada entre *Z. patagonica* y *A. purpuratus*.
- En ambas especies las células del lente y las células epiteliales pigmentadas poseen gránulos electrón-densos.
- Configuración de la retina es similar en ambas especies, y a nivel ultraestructural destacan:
  - a) Fotorreceptores ciliados con numerosas mitocondrias, gran número de láminas ciliares, cilios con configuración 9+0.
  - b) Fotorreceptores rabdoméricos poseen fibras de estrés.
- Estructuras como la córnea y el lente al parecer son dependientes de factores filogenéticos, con *Z. patagonica* con un ojo típico del subgrupo Chlamydinae; y *A. purpuratus* con un ojo típico de los representantes del subgrupo Aequipectini.
- No se detectó una diferencia en la morfología de estructuras fotosensibles del ojo, como la retina, por lo que esta estructura parece estar influenciada por la disponibilidad de luz en el hábitat.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alejandrino, A., Puslednik, L., Serb, JM., 2011. Convergent and parallel evolution in life habit of the scallops (Bivalvia: Pectinidae). *BMC EVOL BIOL.* 11:164
- Arendt, D., 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol.* 47: 563-571.
- Arendt, D., Wittbrodt, J., 2001. Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356(1414): 1545–1563.
- Audino, J., Marian, JE., Wanninger, A., Lopes, S., 2015. Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *Dev. Biol.* 15:22.
- Avendaño, M., 1993. Données sur la biologie de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819), Mollusque Bivalve du Chili. Universidad de Bretaña Occidental, Francia. (Tesis de doctorado).
- Barber, VC., Evans, E., Land, MF., 1967. The fine structure of the eye of the mollusc *Pecten maximus*. *Zeitschrift für Zellforschung.* 76, 295-312.
- Bermúdez, P., 2004. Manual de cultivo suspendido de concha de abanico-Programa Transferencia de Tecnología en Acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas. Acuerdo de Colaboración AECI/PADESPA-FONDEPES. 98 p.
- Beninger, PG., Le Pennec, M., 1991. Functional anatomy of scallops. En: Shumway, S.E. (Ed). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133-223.
- Botto, F., Bremec, C., Marecos, A., Schejter, L., Lasta, M., Iribarne, O., 2006. Identifying predators of the SW Atlantic Patagonian scallop *Zygochlamys patagonica* using stable isotopes. *Fish. Res.* 81 (1) 45–50.
- Bremec, C., Brey, T., Lasta, M., Valero, J., Lucifora, L., 2000. *Zygochlamys patagonica* beds on the Argentinian shelf. Part I: Energy flow through the scallop bed community. *Archive of Fishery and Marine Research.* 48(3): 295-303.
- Bremec, C., Escolar, M., Schejter, L., Genzano, G., 2008. Primary settlement substrate of scallop, *Zygochlamys patagonica* (King and Broderip, 1832) (Mollusca: Pectinidae) in fishing grounds in the argentine sea. *J Shellfish Res.* Vol. 27, No-2: 273-280.

- Brown, J., Blinks, J., 1974. Changes in intracellular free calcium during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin., J. GEN. PHYSIOL 64:643-665.
- Cantilláneez, M., 2000.Reproduction, vie larvaire et pré-recrutement du Pectinidae *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) dans la baie d'Antofagasta (Chili). PhD. Thesis Univ. Brest, France.168 pp.
- Ciocco, NF., Lasta, ML., Narvarte, M., Bremec, C., Bogazzi, E., Valero, JM., Orensanz,. 2006. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. 1251-1292.
- Dakin, WJ., 1910. The eye of *Pecten*. Quart. J. micr. Sci. 55, 49-112.
- Delgado, L., Couve, E., Schmachtenberg, O. 2010. GABA and glutamate immunoreactivity in tentacles of the sea anemone *Phymactis papillosa* (Lesson 1830). J. Morphol. 271(7):845-52.
- Eakin, R. 1965. Evolution of photoreceptors. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 30, 363-370.
- Fernald, R. 2006. Casting a genetic light on the evolution of eyes. Science. 313: 1914-1918.
- Kumari, RK., Mohan, PM., 2018. Review on Dissolved Organic Carbon and Particulate Organic Carbon in Marine Environment. ILMU KELAUTAN. Vol 23(1): 25-36.
- Land, MF., 1965. Image formation by a concave reflector in the eye of the scallop, *Pecten maximus*. J. Physiol. 179(1): 138-153.
- Land, MF., 1966. A multilayer interference reflector in the eye of the scallop, *Pecten maximus*. J EXP BIOL. 45: 433-447.
- Le Pennec, M., Paugam, A., Le Pennec, G., 2003. The pelagic life of the pectinid *Pecten maximus* -a review. ICES J MAR SCI. 60: 211–223.
- Malkowsky, Y., Götze, MC., 2014. Impact of habitat and life trait on character evolution of pallial eyes in Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). ORG DIVERS EVOL. Vol 14 (2):173-185.
- Malkowsky, Y., Jochum, A., 2014. Three-dimensional reconstructions of pallial eyes in Pectinidae (Mollusca: Bivalvia). ACTA ZOOL-STOCKHOLM. 96(2): 1-7.
- Mauna, C., 2013. Reclutamiento de la vieira patagónica, *Zygochlamys patagonica* (bivalvia: pectinidae), en el sector norte de manejo, océano atlántico sudoccidental\*. Rev. Invest. Desarr. Pesq. N° 22: 43-57.

- McKay, R., Chen, D., Miller, K., Kim, S., Stark, W., Shortridge, R., 1995. Phospholipase C Rescues Visual Defect in norpA Muntant of *Drosophila melanogaster*. *The J BIOL CHEM.* 270: 13271-13276.
- Miller, W., 1958. Derivatives of cilia in the distal sense cells of the retina of pecten. *Biophys. Chem.* Vol. 4 (2): 227-301.
- Miller, HV., Kingston, A., Gagnon, Y., Speiser, D., 2019. The mirror-based eyes of scallops demonstrate a light-evoked pupillary response. *CURR BIOL.* 29: R301-R316.
- Morton, B., 1980. Swimming in *Amusium pleuronectes* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Zool.* 190: 375-404.
- Morton, B., 2001. The evolution of eyes in the Bivalvia. *Oceanogr. Mar. Biol.* 39: 165-205.
- Morton, B., 2008. The evolution of eyes in the Bivalvia: New Insights. *Am. Malacol. Bull.* 26(1-2): 35-45.
- Nasi, E., 1991. Electrophysiological Properties of Isolated photoreceptors from the eye of *Lima scabra*. *J GEN PHYSIOL.* Vol (97): 17-34.
- Osorio, C., 2002. Moluscos marinos en Chile. Especies de importancia económica: Guía para su identificación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Imprenta Salesianos, Santiago, 211 pp.
- Palmer, BA., Taylor, GT., Brumfeld, V., Gur, D., Shemesh, M., Elad, N., Osherov, A., Oron, D., Weiner, S., Addadi, L., 2017. The image-forming mirror in the eye of the scallop. *Science.* 358: 1172-1175.
- Parkhaev P. 2008. The early cambrian radiation of Mollusca. Chapter 3: Phylogeny and evolution of the Mollusca. University of California Press, 33-69 pp.
- Pairett, AN., Serb, JM., 2013. De Novo Assembly and Characterization of Two Transcriptomes Reveal Multiple Light-Mediated Functions in the Scallop Eye (Bivalvia: Pectinidae). *PloS one.* 8 (7): 1-12.
- Patten, W., 1887. Eyes of molluscs and arthropods. *Mitth. Zool. Staz.* 6: 542-756.
- Piatigorsky, J., Kozmik, Z., Horwitz, J., Dingi, L., Carosa, E., Robison, WG., Steinbach, PJ., Tamm, E., 2000.  $\Omega$ -Crystallin of the Scallop Lens. *Int. J. Biol. Chem.* Vol. 275 (52): 41064-41073.
- Salvini-Plawen, L., 2008. Photoreception and the polyphyletic evolution of photoreceptors (with special reference to Mollusca) \*. *Am. Malacol. Bull.* 26: 83-100.

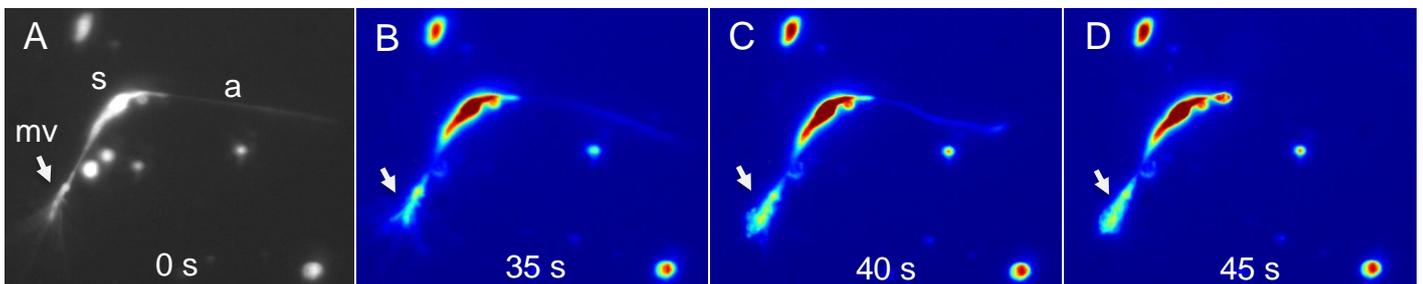
- Serb, J. 2008. Toward developing models to study the disease, ecology, and evolution of the eye in Mollusca\*. Amer. Malac. Bull. 26: 3-18.
- Speiser, D., S, Johnsen., 2008a. Comparative morphology of the concave mirror eyes of scallops (Pectinoidea)\*. Amer. Malac. Bull. 26: 27-33.
- Speiser, D., S, Johnsen., 2008b. Scallops visually respond to the size and speed of virtual particles. J. Exp. Biol. 211: 2066-2070.
- Speiser, D., Loew, E., S, Johnsen. 2011. Spectral sensitivity of the concave mirror eyes of the scallops: potential influences of habitat, self-screening and longitudinal chromatic aberration. J. Exp. Biol. 214, 422-431.
- Thébault, J., Thouzeau, G., Chauvaud, L., Cantillánéz, M., Avendaño, M., 2008. Growth of *Argopecten purpuratus* (Mollusca: Bivalvia) on a natural bank in Northern Chile: sclerochronological record and environmental controls. Aquat. Living Resour. 21:45–55.
- Valladares, C., Stotz, W., 1996. Crecimiento de *Zygochlamys patagonica* (Bivalvia: Pectinidae) en dos localidades de la Región de Magallanes, Chile. Revista Chilena de Historia Natural. 69: 321-338.
- Waloszek, D., 1984 Variabilität, taxonomie und Verbreitung von *Chlamys patagonica* (King & Broderip, 1832) und Abmerkungen zu weiteren *Chlamys*-kritik von der Südspitze Süd-Amerikas (Mollusca, Bivalvia, Pectinidae). Verhandlungen naturwiss. Ver. Hamburg 27: 207-276.
- Waloszek, D. Waloszek, G., 1986. Ergebnisse der Forschungsreisen des FFS 'Walther Herwig' nach Südamerika, LXV. Vorkommen, Reproduktion, Wachstum und mögliche Nutzbarkeit von *Chlamys patagonica* (King and Broderip, 1832) (Bivalvia, Pectinidae) auf dem Schelf von Argentinien. Arch. Fish. Wiss. 37:69-99.
- Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, XH., Pawlyk, B., Zhang, L., Sanderson, MJ., Zuo, J., Makino, C., Li, T. 2005. The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. J. Mol. Cell Biol. 25(10): 4129–4137.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Ensayo adicional con imágenes de calcio

Para la disociación de fotorreceptores de *A. purpuratus*, se utilizó el protocolo descrito por Nasi et al (1991) modificado, que consistió en lavar los ojos extraídos con agua de mar artificial (ASW) e incubarlos en pronasa al 3% por 15 min a 35°C. Para detener la acción enzimática, los ojos fueron lavados en ASW fría por 10 min. El tejido que recubre al ojo fue retirado y se seleccionó la retina para separarla mediante una succión mecánica con la ayuda de una pipeta Pasteur, obteniendo células aisladas.

En los experimentos de imágenes de calcio, los fotorreceptores aislados fueron mantenidos en ASW. Las células fueron incubadas por 1 hora en 5  $\mu\text{M}$  de Fluo 4-AM (F14201, Thermo Fisher Scientific) con 0,04% de ácido plurónico a temperatura ambiente en oscuridad. Se prepararon soluciones individuales de Fluo4 y ácido plurónico. Se diluyeron 50  $\mu\text{g}$  de Fluo4 en 50  $\mu\text{L}$  de DMO al 100% (1 mM). Se prepararon soluciones de ácido plurónico al 20% en DMSO al 100%. Se mezclaron 5 mL de Fluo4 con 2  $\mu\text{l}$  de ácido plurónico. Se les agregó 1 mL de solución extracelular para alcanzar una concentración de 5  $\mu\text{M}$  de Fluo4 y solución de ácido plurónico al 0,04%. Posteriormente, las células fueron lavadas cuidadosamente por perfusión de ASW por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, los fotorreceptores fueron estimulados a 488 nm y las imágenes de fluorescencia se registraron cada 1 s.



**Anexo 1.** Estimulación extracelular con capsaicina 10 mM en el fotorreceptor rabdomérico de *Argopecten purpuratus*. A. Célula aislada mantenida en medio extracelular (ASW), revela la estructura alargada del fotorreceptor rabdomérico. B. Aplicación del estímulo a los 35 s. C,D. Retracción de las microvellosidades. Abreviaciones: mv, microvellosidades (flecha); s, soma; a, axón.

Los ensayos en los que utilizó una sonda fluorescente permitieron cargar el fotorreceptor rabdomérico de *A. purpuratus* aislado previamente con un tratamiento enzimático. La aplicación de un estímulo extracelular de capsaicina 10 mM induce

una retracción de los extremos distales de la célula, tanto de las microvellosidades (mv) como del axón (a) (Figura 10).

## 9.2. Reactivos utilizados

**Tabla 1.** Composición de la solución extracelular o agua de mar artificial (ASW), de acuerdo a Nasi (1991) utilizada para los ensayos de imágenes de calcio. Solución ajustada a pH 7,8 (NaOH).

Reactivo	Concentración (mM)
NaCl	480
KCl	10
CaCl <sub>2</sub>	10
MgCl <sub>2</sub>	49
HEPES	10
Glucosa	5.5

**Tabla 2.** Composición de los elementos utilizados para microscopía electrónica de transmisión (Delgado et al 2010).

Reactivo	Concentración
Cacodilato	0,1 M
ASW	1080 M
Sacarosa	8%
Formaldehído	4%
Glutaraldehído	2.5%
OsO <sub>4</sub>	4 mL
Ferrocianuro de potasio	3%
Acetato de uranilo	2%
Citrato de plomo	2%