

Cultivo primario de células de manto de la madreperla *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae), con probable aplicación en el cultivo de perlas

Primary culture of mantle cells of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae), with possible application to pearl farming

Pedro E. Saucedo*, Alex Olivera, Arturo Sierra-Beltrán, José M. Mazón-Suástequi y Héctor Acosta-Salmón

Recibido: 10 de febrero de 2017 .

Aceptado: 11 de diciembre de 2018

Publicado: abril de 2019.

RESUMEN

Antecedentes. La técnica para inducir la producción de perlas en moluscos, que se basa en el injerto de un núcleo esférico y una pieza de manto de un donador en la góndola de un receptor, genera altas tasas de mortalidad y rechazo de injertos. **Objetivos.** Desarrollar bases metodológicas para el cultivo primario de células de manto de la madreperla *Pinctada mazatlanica*, con aplicación potencial en el cultivo de perlas. **Métodos.** Se evaluaron cinco formas de disagregación enzimática celular, tres medios de cultivo, dos sustratos celulares y cuatro osmolaridades del medio. Se estudió también la absorción *in vitro* de calcio por parte del manto mediante técnicas histoquímicas y de espectrofotometría de absorción atómica. **Resultados.** La adición de collagenasa I (414 U/mg), a 37 °C incrementó la viabilidad y desempeño de las células cultivadas en medio RPMI-1640 con poli-D-lisina. Bajo estas condiciones, las células cambiaron a la forma de fibroblasto desde el tercer día y se mantuvieron viables durante 25 días. El cultivo de explantes resultó mejor en medio RPMI-1640, a 37 °C, sin poli-D-lisina y a 0.6 M NaCl, donde la absorción de calcio por parte del manto fue evidente. **Conclusiones.** Estos resultados sientan las bases de las futuras investigaciones dirigidas a reformular nuevos medios de cultivo, evaluar factores de crecimiento e identificar las moléculas y genes más importantes por su implicación en la biomineralización y síntesis de CaCO₃, calcita y aragonita.

Palabras clave: Calcio, cultivo celular, cultivo de perlas, enzimas, explantes, osmolaridad

ABSTRACT

Background. The technique for inducing pearl production in mollusks, which relies on the grafting of a round nucleus and a piece of mantle tissue from a donor within the gonad of a recipient, generates high mortality and rejection rates. **Goals.** To develop methodological basis for *in vitro* primary cultivation of mantle cells in the pearl oyster *Pinctada mazatlanica*, with potential application to pearl production. **Methods.** Five methods for enzymatic dissociation, three different culture media, two cell substrates, and four osmolarities of the culture medium were evaluated. *In vitro* intake of calcium by mantle tissue was also quantified through histochemistry and atomic absorption spectrophotometry. **Results.** The addition of collagenase I (414 U/mg), at 37°C increased viability and performance of disaggregated cells, which grew better in RPMI-1640 cell medium with poly-D-lysine. Under these conditions, the cells changed from the round-type cell to the fibroblast-type cell at third day and were maintained until day 25. Culture of explants resulted better with RPMI-1640 medium, at 37 °C, without poly-D-lysine, and at 0.6 M NaCl, where calcium absorption was evident. **Conclusions.** These results set the basis of future investigations reformulating new culturing media, evaluating growth factors, and identifying molecules and genes related to biomineralization and synthesis of CaCO₃, calcite and aragonite.

Key words: Calcium, cellular culture, pearl culture, enzymes, explants, osmolarity

INTRODUCCIÓN

En biotecnología y medicina, el cultivo *in vitro* de células animales (vertebrados) se encuentra muy desarrollado y mayormente orientado al tratamiento y cura de padecimientos como el cáncer, enfermedades degenerativas y autoinmunes, etc. (Rinkevich, 1999, 2005). En invertebrados de fila como Porífera, Mollusca, Crustacea y Echinodermata, la tecnología de cultivo celular *in vitro* es más reciente y reporta resultados mucho más modestos (Odintsova et al., 1994; Awaji & Machii, 2011). En moluscos, por ejemplo, los pocos estudios relativos a esta tecnología se han llevado a cabo en grupos productores de perlas, como ostras perleras (Zhang et al., 2006; Gong et al., 2008), almejas de agua dulce (Barik et al., 2004; Van Phuc et al., 2011), almejas marinas (Endoh & Hasegawa, 2006), y abulón (van der Merwe et al., 2010; Pichon et al., 2013; Kim et al., 2014). Estos estudios surgen como una necesidad de reducir las altas tasas de mortalidad y rechazo de injertos (30–50%) derivados de la cirugía de inserción de un núcleo esférico y una pieza de manto de un molusco donador en la gónada de un molusco receptor, con el fin de provocar su irritación y la secreción de nácar para formar la perla (Taylor & Strack, 2008). La mayoría de estos estudios reportan la capacidad de algunas células somáticas, particularmente del manto, para regenerarse y proliferar *in vitro*, a expensas de moléculas y genes involucrados en el proceso de biominerización y síntesis de cristales de aragonita y calcita. Sin embargo, la definición de una línea celular estable ha sido difícil de lograr en moluscos, básicamente por problemas de contaminación microbiana (Mirjalili et al., 2005) y por el escaso entendimiento sobre la interacción de los principales factores que regulan la viabilidad e integridad del cultivo celular (Rinkevich, 2005).

A nivel mundial, el cultivo de perlas es una actividad acuática consolidada y muy lucrativa en algunos países de Asia y el Pacífico Sur (Taylor & Strack, 2008). En esta actividad se utilizan comúnmente tres ostras perleras del género *Pinctada*: *P. fucata* (Gould), *P. margaritifera* (Linnaeus) y *P. maxima* (Jameson). En América Latina, el cultivo de perlas fue una actividad muy rentable a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, y aunque después fue un tanto olvidada, vive un gradual resurgimiento en países como México, Chile, Ecuador y Venezuela (Saucedo et al., 2017). En el noroeste de México en particular, existen dos especies que sustentan el cultivo de perlas, la madreperla *P. mazatlanica* (Hanley, 1856) y la concha nácar *Pteria sterna* (Gould) (Kiefert et al., 2004). Dado que las estadísticas de mortalidad y rechazo post-injerto son altas en estas especies, la evaluación de opciones como el cultivo *in vitro* de manto, que representa una etapa previa al cultivo *in vitro* de perlas, resultan interesantes y novedosas para reducir estas cifras. El presente trabajo está dirigido a definir las condiciones básicas para el cultivo primario *in vitro* de células y explantes de manto de la madreperla *P. mazatlanica*, analizando la potencial aplicación de esta técnica en el cultivo de perlas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del sustrato celular y medios de cultivo. Se utilizaron adultos cultivados de *P. mazatlanica* (60 ± 7.8 mm de altura de la concha), los cuales fueron limpiados de epifauna con un cepillo y alcohol etílico al 70% y mantenidos en agua de mar filtrada e irradiada con luz UV para depurar los tejidos. Para el cultivo celular, una solución de Poli-D-lisina (Cat #81358, Sigma, St. Louis, MO) se diluyó en amortiguador estéril de boratos (0.15 M; pH 8.3; 0.1 mg/mL), se agregó en

placas multipozos por triplicado (24 pozos, 6'4; Cat #3526, Corning, NY), y se incubó a 37 °C por 3 h. Para evitar contaminación, cada placa se lavó tres veces con solución estéril de fosfatos bajo condiciones de bioseguridad en una campana de flujo laminar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) (Odintsova et al., 1994; Mirjalili et al., 2005).

Se evaluaron tres diferentes medios de cultivo preparados también bajo la campana de flujo laminar: (1) Medio MegaCell® RPMI-1640 (Cat #3817, Sigma); (2) 50% de MegaCell® Minimun Essential Medium Eagle (Cat #M-4067, Sigma) y 50% de MegaCell® Dulbecco's Modified Eagle's (Cat #M-3942, Sigma); y (3) un medio de cultivo control con solución Hanks (Cat #H-8264, Sigma). Todos los medios se adicionaron con L-Glutamina (4 mM), 0.1% de penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal de bovino (SFB) y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Aislamiento mecánico y disagregación enzimática del manto. Se extrajo una pieza de manto de 40 mm de longitud de la región paleal de cada ostra depurada, la cual se colocó en una caja de Petri con solución Hanks, rojo Fenol y penicilina-estreptomicina (0.1%). Cada pieza se cortó a su vez en piezas más pequeñas (~1 mm) que se disagregaron con seis enzimas comerciales: (1) Tripsina-EDTA (E.C. 3.4.21.4; 1X); (2) Colagenasa I (5U/mg; 0.5%; E.C. 3.4.24.3); (3) Colagenasa I (414 U/mg; (4) Proteasa XIV (0.1%; 3.4.24.31); (5) Proteinasa K (2.5%; E.C. 3.4.21.64); y (6) 1% (p/v) de una enzima proteolítica de *Trichoderma herzianum* (Rifai).

La disagregación del manto se hizo también a tres temperaturas de incubación: 15, 37 y 46 °C. En cada caso se determinó el rendimiento (cel/mL) y viabilidad (%) de los cultivos mediante tinción con azul Tripano 0.4%. El conteo de células viables y no viables se hizo a intervalos de 20 min durante 120 min, utilizando un hemocitómetro (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Siembra de células disagregadas y explantes de manto. Las células disagregadas se centrifugaron (180 g, 15 min, 4°C), se pasaron a través de una columna de fibra de vidrio para su depuración y se sembraron en placas multipozos (24 pozos, 4'6) (Dharmaraj & Suja, 2002). Adicionalmente, dos explantes de manto de 3 mm de longitud se sembraron en cada pozo de nuevas placas de cultivo. Ambos modelos (células disagregadas y explantes) se manejaron por triplicado mediante un diseño experimental que incluyó los tres medios de cultivo (y el control), con sustrato y sin sustrato. Los cultivos se mantuvieron a 23 °C en una incubadora (Thermo Fisher Scientific) con 3% de flujo continuo de CO₂. La observación se hizo a diario bajo un microscopio invertido (Olympus The Americas, Central Valley, PA).

Evaluación de la osmolaridad. Se siguieron los mismos procedimientos arriba descritos, pero utilizando medio Megacell® (RPMI-1640) adicionado con 3% de SFB. Se evaluaron cuatro diferentes osmolaridades del medio de cultivo: 0.15, 0.30, 0.45 y 0.60 M de NaCl. El medio en cada caso se preparó con agua de mar estéril a 4 °C, 0.1% de penicilina-estreptomicina y L-glutamina (4 mM). Después de un periodo de incubación de 48 h, se evaluó el cambio de coloración de cada medio de cultivo por efecto de su acidificación (Perez-Camps & García-Ximénez, 2008).

Evaluación de la absorción de calcio. Para evaluar la absorción de calcio por parte del manto a cada osmolaridad, se siguió el mismo procedimiento anterior, sembrando dos explantes en placas de cultivo (24 pozos, 4'6), sin recubrimiento, con poli-D-lisina. Cada día se retiraron y se fijaron en formol al 10% dos explantes por tratamiento para evaluar

la acumulación de calcio mediante la técnica histoquímica de rojo de Alizarina S (McGee-Russell, 1958). Este procedimiento se repitió en tres ocasiones tuvo una duración de siete días. El nivel de absorción de calcio por parte del manto se analizó también por medio de espectrofotometría de absorción atómica, según la norma NMX-AA-051-SCFI-2001.

RESULTADOS

Rendimiento y viabilidad celular. No se presentó contaminación del sustrato ni los medios de cultivo durante la preparación y almacenamiento. El rendimiento de la colagenasa I (5 U/mg) y la enzima de *T. harzianum* fue muy pobre y no promovieron la liberación de células viables a ninguna de las tres temperaturas evaluadas (datos no mostrados). A 15 °C, un mayor número de células viables se liberaron con la colagenasa I a 414 U/mg (~100·10³ cel/mL) y la proteasa XIV (~60·10³ cel/mL) a los 60 min (Fig. 1a); la tripsina y proteinasa K liberaron muy pocas células (20 y 40·10³ cel/mL). La mayor viabilidad celular se obtuvo durante los primeros 40 min con la proteasa XIV (70-100%) y la tripsina y proteinasa K (50-100%) y la menor viabilidad celular con la colagenasa I (5 y 414 U/mg) (20-70%) (Fig. 2a).

A 37 °C, el número de células viables obtenidas con la colagenasa I fue del 100% (Fig. 1b) y el rendimiento de 120·10³ cel/mL a los 60 min (Fig. 2b). La proteasa fue ineficiente bajo estas condiciones (<20·10³ cel/mL), aunque mantuvo una elevada viabilidad celular (100%). El número de células liberadas con la tripsina y proteinasa K osciló entre 40 y 80·10³ cel/mL, aunque con valores de viabilidad muy dispares, dependiendo del periodo de exposición a la enzima (0-100%).

A 46 °C, las cuatro enzimas promovieron una buena viabilidad celular durante los primeros minutos de exposición (Fig. 1c), pero con rendimientos mínimos (Fig. 2c). La colagenasa I promovió la liberación del mayor número de células a los 40 min (222·10³ cel/mL), pero disminuyó su viabilidad (~40%).

Adhesión y proliferación celular. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio RPMI-1640, con poli-D-lisina, a 37 °C. Bajo estas condiciones, las células disgregadas comenzaron a adherirse a la placa y a cambiar de la forma redonda a la típica de fibroblasto a partir de tres días (Fig. 3a). Aquí la viabilidad celular se mantuvo por 25 días sin contaminación y fue posible observar células en mitosis y proliferación celular continua. Por el contrario, los medios de cultivo restantes no permitieron obtener resultados satisfactorios en términos de adhesión y proliferación celular.

En los explantes se observó proliferación celular solo en el medio RPMI-1640, sin poli-D-lisina, a 37 °C. Bajo estas condiciones, la parte central del explante se regeneró, cubrió la totalidad del fondo y paredes del pozo y se mantuvo viable biológicamente hasta por 20 días. Incluso fue posible observar fibras musculares transversales y longitudinales en proceso de proliferación con abundante tejido conectivo (Fig. 3b).

Osmolaridad del medio de cultivo. Se trabajó con explantes de manto cultivados en el medio RPMI-1640, a 37 °C, sin sustrato, dado que estas variables arrojaron mejores resultados de los ensayos previos. El mayor crecimiento y migración de conglomerados de células hacia fuera del tejido ocurrió a partir del tercer día de siembra a 0.6 M, en comparación con las restantes osmolaridades. Estas células llegaron a cubrir casi la totalidad del pozo al cuarto día de cultivo (Fig. 3c), sin registro de crecimiento microbiano en ningún tratamiento.

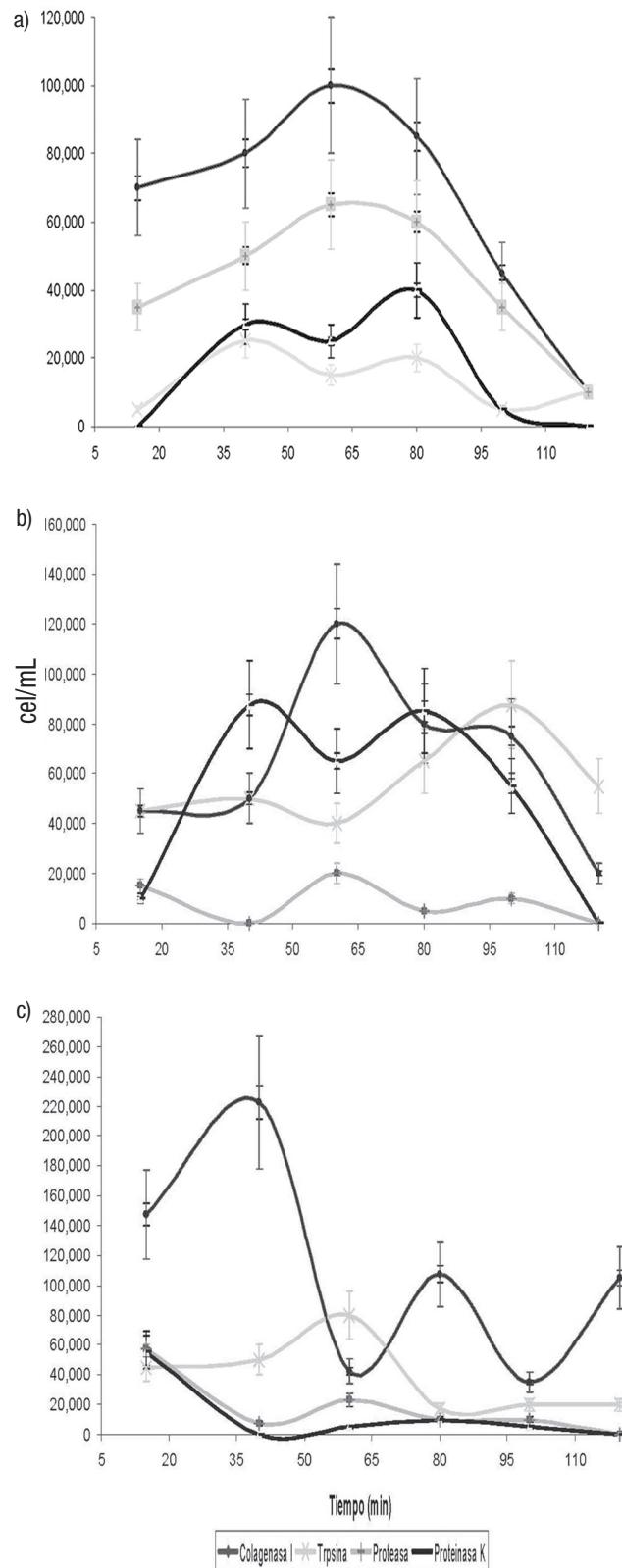
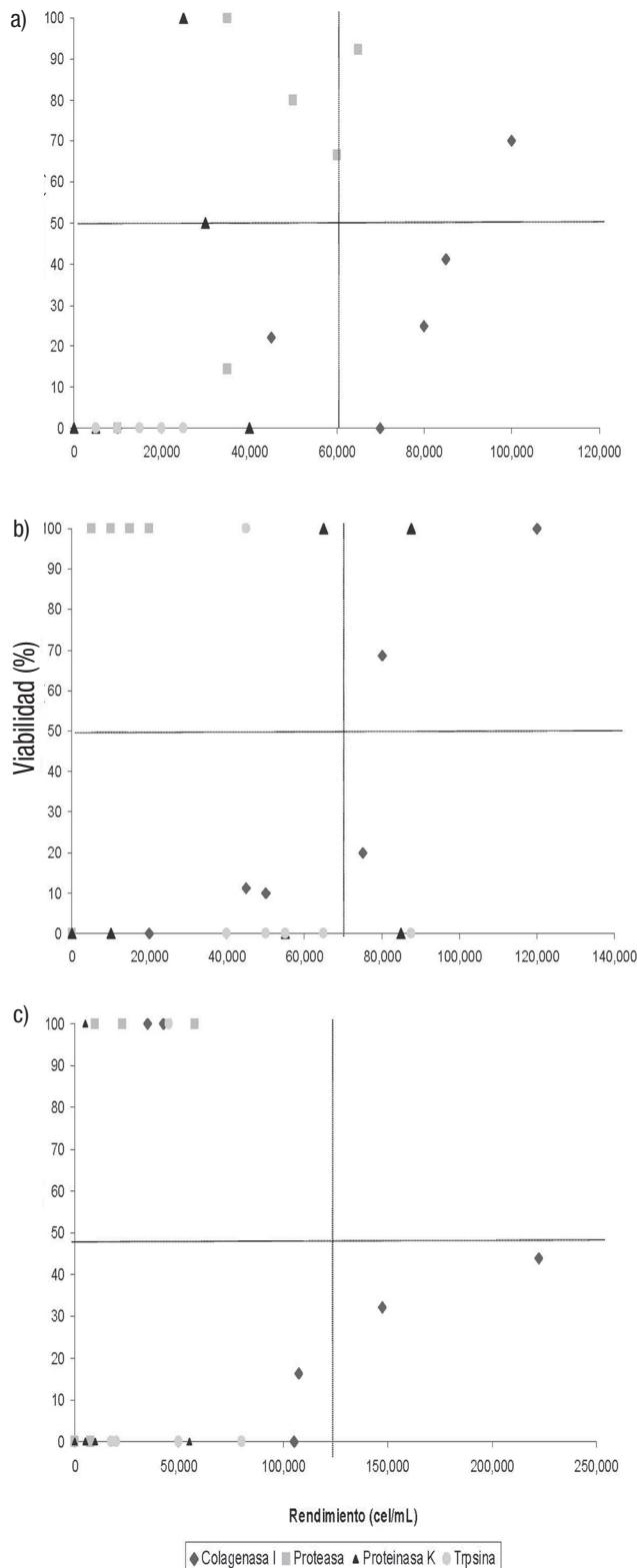


Figura 1a-c. Rendimiento *in vitro* (cel/mL) de células de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* disgregadas con cuatro enzimas a cuatro diferentes temperaturas de incubación: 15 °C (a), 37 °C (b), y 46 °C (c).



Figuras 2. Viabilidad *in vitro* (%) de células de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* incubadas a cuatro diferentes temperaturas: 15 °C (a), 37 °C (b), y 46 °C (c).

Absorción de calcio. La acumulación aparente de calcio no se detectó con la tinción de rojo de Alizarina en ninguna de las osmolaridades durante los siete días del ensayo. Por el contrario, la técnica de espectrofotometría de absorción atómica reveló un 55% de abatimiento en los niveles de calcio a 0.6 M (335 a 210 µg/mL) entre el inicio y final del cultivo de explantes, en contraste con lo ocurrido en las restantes osmolaridades (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La evidencia de este estudio indica que los mejores resultados de disgregación, adhesión y regeneración celular, así como de estructura celular (cambio a la forma de fibroblasto) del manto de *P. mazatlanica* ocurrieron con el medio RPMI-1640, a 37 °C, con poli-D-lisina (células) y sin poli-D-lisina (explantes). Considerando que el manto en los moluscos es responsable de numerosas funciones especializadas, incluyendo la biomineralización y formación de la perla, y que ambos procesos están regulados por una compleja interacción entre componentes orgánicos e inorgánicos (García-Gasca *et al.*, 1994; Levi *et al.*, 1997; Zang *et al.*, 2006), la definición de condiciones óptimas para su cultivo *in vitro* es aún contradictoria dependiendo de la especie y el tejido cultivado. Por ejemplo, la evaluación de medios de cultivo reporta una mayor adhesión, viabilidad y regeneración de las células del manto en el medio DMEN/F12 para el caso de las almejas de agua dulce *Lamellidens marginalis* (Sippi) (Barik *et al.*, 2004) y *Sinohyriopsis cumingii* (Lea) (Van Phuc *et al.*, 2011); el 2'L15 de Leibovitz para el manto de la almeja japonesa *Patinopecten yessoensis* (Jay) (Endoh y Hasegawa, 2006); el L15 y M199 para las células del manto del abulón *Haliotis varia* (Linnaeus) (Suja *et al.*, 2007) y el Pf-CM2.5 (mezcla 1:1 de 2' Leibovitz y M199) con la ostra perlera japonesa *P. fucata* (Gong *et al.*, 2008).

El uso de sustratos celulares y factores de crecimiento también se mantiene como un aspecto controversial en el desarrollo de tecnología para el cultivo *in vitro* de células somáticas en moluscos. Existen reportes de una mejora en la adhesión de diferentes células del mejillón *Mytilus* sp. con el uso de poli-L-lisina y fibronectina (Odintsova *et al.*, 1994), así como de un mejor anclaje de las células de larvas trocóforas del abulón rojo *H. rufescens* (Linnaeus) con poli-D-lisina y fibronectina (Naganuma *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha señalado la inexistencia de efectos claros de estas mismas moléculas en las propiedades de adhesión de las células de glándula digestiva del mejillón *M. galloprovincialis* (Lamarck) (Robledo & Cajaraville, 1997). Algunos autores han sugerido incluso que las diferencias en las propiedades de adhesión, regeneración y estructura celular se deben al efecto de otros factores reguladores, como la temperatura de incubación (Awaji y Machii, 2011), la salinidad (Kim *et al.*, 2014) y molaridad del medio de cultivo (Perez-Camps & García-Ximénez, 2008). Estos resultados hacen necesario investigar más sobre el efecto de estos factores reguladores en la estabilidad e integridad de los cultivos de manto en *P. mazatlanica* y otras especies de moluscos productores de perlas, tanto para confirmar como para mejorar los resultados obtenidos en este estudio.

Todas las células de manto obtenidas mediante disgregación enzimática se adhirieron con éxito al sustrato, y después de iniciar un proceso de proliferación en monocapa, cambiaron de la forma redonda a la típica forma de fibroblasto después del tercer día de cultivo. Sin embargo, la gran variabilidad en la concentración de células libres que se obtuvieron (0–100%) sugiere que las enzimas evaluadas fueron inespecíficas para cultivar células del manto y/o que actuaron sobre sustratos análogos. Bajo estas condiciones, la colagenasa I (ampliada de 5 a 414 U/mg) fue la enzima que claramente incrementó más la viabilidad y rendimiento celular a todas las temperaturas de cultivo, alcanzando una densidad máxima de 120×10^3 cel/mL a 37 °C. Se sabe que la mayoría de las colagenasas degradan hebras helicoidales de colágeno que son abundantes en el tejido conectivo de muchos invertebrados (Engel, 1997; Rinkevich *et al.*, 2005) y García-Gasca *et al.* (1994) confirmaron su presencia en el manto de la madreperla *P. mazatlanica*. Si bien la proteinasa K, proteasa y tripsina hicieron posible la liberación de poblaciones de células viables a todas las temperaturas durante las primeras etapas de la digestión, fueron agresivas en etapas posteriores y las dañaron parcial o totalmente, por lo que su rendimiento final fue pobre. Igualmente, la enzima proteolítica de *T. herzianum* demostró ser ineficiente para liberar células del manto y mantener su viabilidad, probablemente por no existir en este tejido un sustrato específico para la enzima. Se sugiere evaluar con más precisión la temporalidad de la acción benéfica y el posible efecto nocivo de estas enzimas para avanzar en la optimización de una técnica para cultivo *in vitro* de células y explantes de manto de *P. mazatlanica*.

La técnica de rojo de Alizarina fue poco sensible a la detección de calcio tisular, no obstante su abatimiento en un 55% a 0.6 M (que es la molaridad más alta y similar a la del agua de mar a 35 g/L), fue confirmada por espectrofotometría de absorción atómica. Este resultado sugiere una posible bio-disponibilidad de CaCO_3 en el medio de cultivo para la proliferación de células y explantes, lo cual a su vez podría favorecer la síntesis de nácar como cimiento de la perla. Al respecto, algunos autores señalan que la síntesis de CaCO_3 y nácar por parte del manto durante la biominerización y formación de una perla puede estar regulada por “moléculas relacionadas con la síntesis del péptido calcitonina” (CGRP) y “proteínas de unión al calcio” en el abulón *H. tuberculata* (Linnaeus) (Auzoux-Bordenave *et al.*, 2007), así como por la proteína “nacarina” y el péptido “p10” en la ostra perlera *P. fucata* (Gong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Estudios dirigidos a la identificación de algunas de estas moléculas se están realizando en *P. mazatlanica* y *P. sterna* en este momento, como una estrategia para implementar gradualmente una tecnología que permita la formación segura *in vitro* del saco perlero, que es la primera capa basal de células de nácar secretada por el manto en 15-21 días para cubrir el núcleo esférico que se coloca durante la cirugía de injerto. El desarrollo de una tecnología de este tipo tiene aplicación directa en las actividades comerciales de producción de perlas, ya que el saco perlero formado *in vitro* podría colocarse en ostras receptoras para ayudar a reducir las altas tasas de rechazo post-injerto que se registran en todo el mundo.

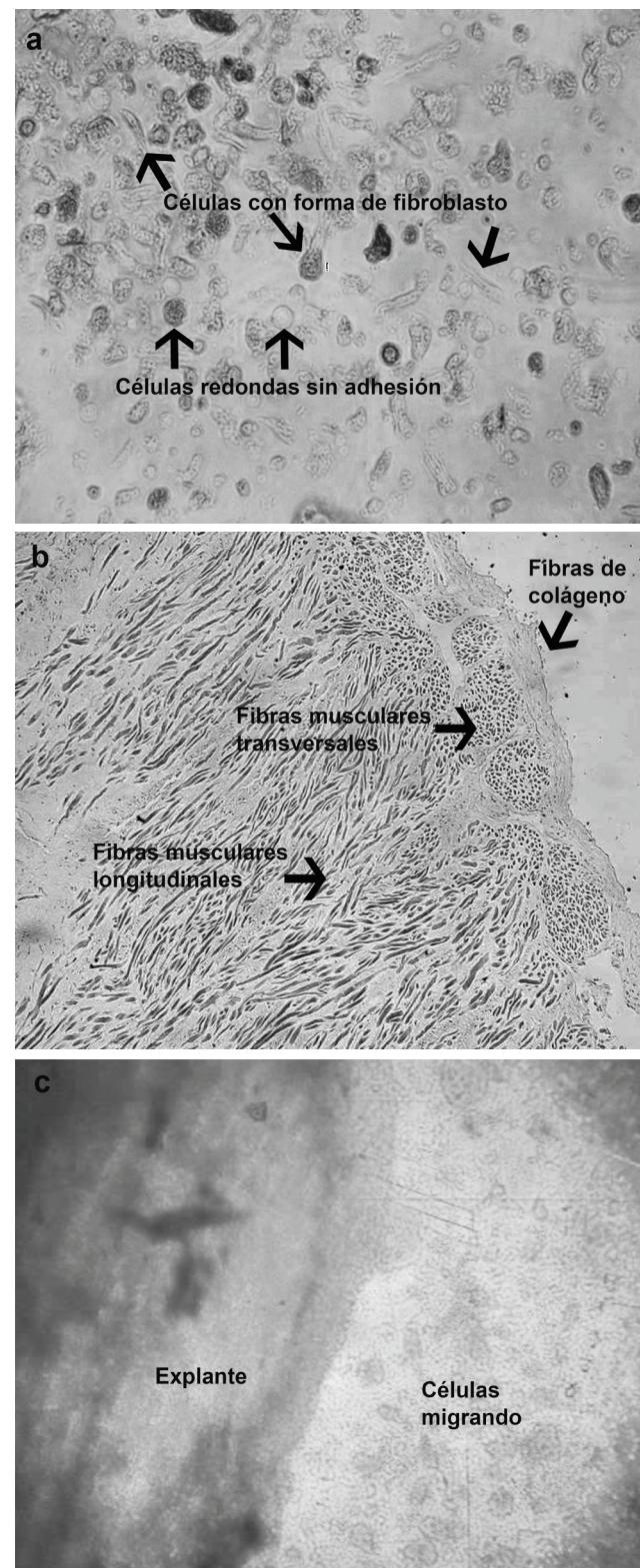


Figura 3. Microfotografías (40×) de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica* cultivados en medio RPM-1640, mostrando células disgregadas cambiando de forma a fibroblastos (a), un explante con la típica estructura del tejido sano (b), y un explante con conglomerados de células migrando hacia fuera a la molaridad de 0.6 M (c).

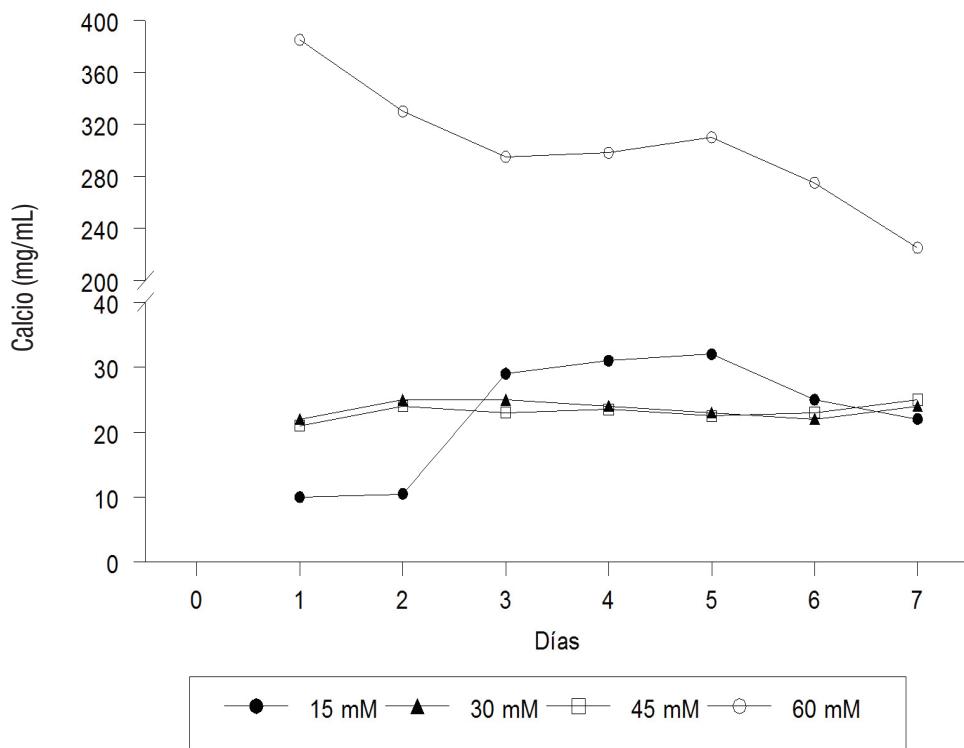


Figura 4. Variaciones en la concentración de calcio en medio de cultivo RPMI-1640 a diferentes molaridades, en explantes de manto de madreperla *Pinctada mazatlanica*.

En su conjunto, los resultados de este estudio cumplieron con el objetivo de definir las condiciones básicas para el cultivo primario de células del manto de *P. mazatlanica*; marcan también con claridad las futuras investigaciones por realizarse en torno a la reformulación de nuevos medios de cultivo, evaluación de factores de crecimiento y análisis del valor del cultivo celular 3D para maximizar la viabilidad y regeneración celular, así como la síntesis de CaCO_3 y cristales de aragonita y calcita. Finalmente, es recomendable cuantificar la expresión de enzimas y genes relacionados con todos estos procesos, lo que en un futuro cercano podría ayudar a definir una línea de cultivo celular de manto, con potencial aplicación en la producción *in vitro* del saco perlero (initialmente) y de perlas (posteriormente).

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (CB-CONACYT #19978), siendo parte de la tesis de maestría de A.O. (Becario CONACYT #24365). Los autores desean expresar su gratitud a Horacio Bervera, Juan José Rosas y Delia Rojas (CIBNOR) por el apoyo durante la recolecta de adultos de *P. mazatlanica* y la preparación de medios de cultivo. Se agradece también a José Luis Díaz de León (Universidad Autónoma de Baja California Sur) y Norma Estrada Muñoz (CIBNOR) por las sugerencias para mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS

- AUZOUX-BORDENAVE, S., M. FOUCHEREAU-PERON, M.N. HELLEOUET & D. DOUMENC. 2007. CGRP regulates the activity of mantle cells and hemocytes in abalone primary cultures (*Haliotis tuberculata*). *Journal of Shellfish Research* 3: 887–894.
- AWAJI M. & A. MACHII. 2011. Fundamental studies on *in vivo* and *in vitro* pearl formation: Contribution of outer epithelial cells of pearl oyster mantle and pearl sacs. *Aqua-BioScience Monographs* 4: 1-39.
- BARIK S. K., J. K. JENA & K. JANAKI-RAM. 2004. CaCO_3 crystallization in primary culture of mantle epithelial cells of freshwater pearl mussel. *Current Science* 86 (March): 1-10.
- DHARMARAJ S. & C. P. SUJA. 2002. Development of technology in *in-vitro* pearl production in India. *Bulletin of the Malacological Society of London* 39: 1-5.
- ENDOH, M. & Y. HASEGAWA. 2006. Culture of mantle epithelial cells expressing shell matrix proteins from scallop *Patinopecten yesoensis*. *Fisheries Science* 72: 1277-1285. DOI: [10.1111/j.1444-2906.2006.01286.x](https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01286.x).
- ENGEL, J. 1997. Versatile collagens in invertebrates. *Science* 277: 1785–1786.

- GARCÍA-GASCA, A., R.I. OCHOA-BAEZ & M. BETANCOURT. 1994. Microscopic anatomy of the mantle of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Hanley, 1856). *Journal of Shellfish Research* 13: 297-303.
- GONG, N., Z. MA, Q. LI, Q. LI, Z. YAN, L. XIE & R. ZHANG. 2008. Characterization of calcium deposition and shell matrix protein secretion in primary mantle tissue culture from the marine pearl oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology* 10: 457-465. DOI: [10.1007/s10126-008-9081-1](https://doi.org/10.1007/s10126-008-9081-1).
- KIEFERT, L., D. McLARIN, E. ARIZMENDI, H.A. HÄNNI & S. ELEN. 2004. Cultured pearls from the Gulf of California, Mexico. *Gems & Gemology* 40: 26-38.
- KIM, M.S., Y.K. NAM, D.S. KIM & S.P. GONG. 2014. Initial culture conditions for primary cell populations derived from radula tissue in abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries and Aquatic Sciences* 17: 385-390. DOI: [10.5657/FAS.2014.0385](https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0385).
- LEVI, Y., S. ALBECK, A. BRACK, S. WEINER & L. ADDADI. 1998. Control over aragonite crystal nucleation and growth: an *in vitro* study of biomimeticization. *Chemistry European Journal* 4: 389-396. DOI: [10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19980310\)4:3<389::AID-CHEM389>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19980310)4:3<389::AID-CHEM389>3.0.CO;2-X).
- McGEE-RUSSELL, S. M. 1958. Histochemical methods for calcium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 6: 22-42.
- MIRJALILI, A., E. PARMOOR, B.S. MORADI & B. SARKARI. 2005. Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals* 33: 81-85.
- NAGANUMA, T., B.M. DEGNAN, K. HORIKOSHI & D.E. MORSE. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 131-140.
- ODINTSOVA, N.A., A.V. ERMAK & L.G. TSAL. 1994. Substrate selection for long-term cultivation of marine invertebrate cells. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107A: 613-619.
- PEREZ-CAMPS, M. & F. GARCIA-XIMENEZ. 2008. Osmolarity and composition of cell culture media affect development and survival in zebrafish embryos. *Animal* 2: 595-599. DOI: [10.1017/S1751731108001572](https://doi.org/10.1017/S1751731108001572).
- PICHON, D., B. CUDENNEC, S. HUCHETTE, C. DJEDJAT, T. RENAULT, C. PAILLARD & S. AUZOUX-BORDENAVE. 2013. Characterization of abalone *Haliotis tuberculata*-*Vibrio harveyi* interactions in gill primary cultures. *Cytotechnology* 65: 759-772. DOI: [10.1007/s10616-013-9583-1](https://doi.org/10.1007/s10616-013-9583-1).
- RONCET, J. M., A. SERPENTINI, B. THIÉBOT, C. VILLERS, J. BOCQUET, E. BOUCAUD-CAMOU & J. M. LEBEL. 2000. *In vitro* synthesis of proteoglycans and collagen in primary cultures of mantle cells from the nacreous mollusk, *Haliotis tuberculata*: A new model for study of molluscan extracellular matrix. *Marine Biotechnology* 2: 387-398. DOI: [10.1007/PL00021685](https://doi.org/10.1007/PL00021685).
- RINKEVICH, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *Journal of Biotechnology* 70: 133-153.
- RINKEVICH, B. 2005. Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends. *Marine Biotechnology* 7: 429-439.
- ROBLEDO, Y. & M. P. CAJARAVILLE. 1997. Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells *in vitro*. *European Journal of Cell Biology* 72: 362-369.
- SAUCEDO, P. E., A. CASTILLO-DOMÍNGUEZ & C. MELGAR-VALDEZ. 2017. Aprovechamiento de almejas dulceacuícolas en Tabasco para formación de perlas y artesanías. Colección José N. Rovirosa, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, México, 133 pp. ISBN: 978-607-606-396-5.
- SUD, D., D. DOUMEC, E. LOPEZ & C. MILET. 2001. Role of water-soluble matrix fraction, extracted from the nacre of *Pinctada maxima*, in the regulation of cell activity in abalone mantle cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Tissue and Cell* 33: 154-160. DOI: [10.1054/tice.2000.0166](https://doi.org/10.1054/tice.2000.0166).
- SUJA, C. P. & S. DHARMARAJ. 2005. *In vitro* culture of mantle tissue of the abalone *Haliotis varia* Linnaeus. *Tissue and Cell* 37: 1-10.
- SUJA, C. P. N. SUKUMARAN & S. DHARMARAJ. 2007. Effect of culture media and tissue extracts in the mantle explant culture of abalone, *Haliotis varia* (L). *Aquaculture* 271: 516-522. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.04.086](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.086).
- TAYLOR, J. & E. STRACK. 2008. *Pearl production*. The Pearl Oyster. En: Southgate, P.C. J.S. Lucas (Eds.), Elsevier Science, Amsterdam, Holland, pp. 273-302.
- VAN DER MERWE, M., S. AUZOUX-BORDENAVE, C. NIESLER & R. ROODT-WILDERING. 2010. Investigating the establishment of primary cell culture from different abalone (*Haliotis midae*) tissues. *Cytotechnology* 62: 265-277. DOI: [10.1007/s10616-010-9293-x](https://doi.org/10.1007/s10616-010-9293-x).
- VAN PHUC, P., P. QUOC VIET, N. MINH HOANG, N. THANH TAM & P. KIM NGOC. 2011. Research on *in vitro* culture and inducing nacre crystal formation of freshwater pearl mussel mantle epithelial cell *Sinohyriopsis cuminii*. *International Journal of Fishery and Aquaculture* 3: 105-113.
- YOUNBIN, Z., S. ANJING & Z. HONYUAN. 1994. The pharmacological functions of nacrum secreted by the cultured pallium cells of fresh water oyster. *Acta Hydrobiologica Sinica* 18: 327-333.
- ZANG, C., S. LI, Z. MA, L. XIE & R. ZHANG. 2006. A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effect on both CaCO_3 crystal formation and mineralogenic cells. *Marine Biotechnology* 8: 624-633. DOI: [10.1371/journal.pone.0066564](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066564).