



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Trabajo de
fin de grado

Fecundación *in vitro* de gametos de
lapa

Pablo R. González Novoa

Nuria Fernández

Luis Fernández

Grado en Biología

2014

Facultad de ciencias
Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología
Área de Zoología

TRABAJO FIN DE GRADO

Nuria Fernández Rodríguez y Luis Fernández Rodríguez autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Fecundación *in vitro* de gametos de lapa” presentado por Pablo R. González Novoa para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 21 de julio de 2014

Asdo.:

Resumen

La evaluación de *Patella depressa* Pennant, 1777 como organismo indicador de la calidad ambiental de los ecosistemas marinos, mediante su uso como organismo prueba en un bioensayo embriolarvario, hace necesario un primer paso de puesta a punto de un protocolo estandarizado de fecundación *in vitro* de los gametos. En el presente estudio se analizaron los valores óptimos de diferentes variables para obtener el mayor porcentaje de éxito en la embriogénesis. En primer lugar es necesaria la exposición de los óvulos a una solución de agua de mar alcalinizada para producir su maduración. Los resultados sugieren un mayor éxito cuando son sometidos a un pH mayor de 9.0 durante 10 minutos utilizando hidróxido amónico (NH₄OH) como base alcalinizadora. La tasa de fecundación también se ve afectada por el tiempo de fecundación, siendo mayor cuando el contacto entre los gametos tiene lugar durante 90 minutos y el esperma ha sido extraído directamente de la gónada masculina.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, Nuria Fernández y Luis Fernández, sin los cuales no sería posible la realización de este trabajo. Muchas gracias por brindarme esta oportunidad.

De la misma forma, agradezco a Sara Pérez su inestimable ayuda, paciencia, comprensión y por compartir sus conocimientos conmigo; y a Pedro Ribeiro por guiar los primeros pasos de este trabajo.

Aprovecho para dar las gracias a todas esas personas que son un apoyo constante: a mis amigos y compañeros de la facultad por aguantarme durante todos estos años, y a mis padres, por confiar en mi y por concederme la oportunidad de llegar hasta aquí.

Índice

Introducción	6
Objetivo	9
1. Metodología	10
1.1 Recogida de organismos en el intermareal.....	10
1.2 Selección de individuos maduros.....	10
1.3 Fecundación <i>in vitro</i>	12
1.3.1 Procedimiento general para la fecundación <i>in vitro</i>	12
1.3.2 Estandarización de variables	14
2. Resultados.....	17
2.1 Prueba 1 (15/04/2014).....	17
2.2 Prueba 2 (23/04/2014).....	19
2.3 Prueba 3 (5/05/2014).....	21
2.4 Conclusiones derivadas de las pruebas anteriores	24
2.5 Otras pruebas (30/04/2014)	25
Conclusiones generales.....	29
Bibliografía.....	31

Introducción

Patella depressa Pennant, 1777 es un molusco gasterópodo perteneciente a la familia Patellidae, orden Archaeogastropoda. Habita en los intermareales rocosos del noroeste de Europa y del Mediterráneo llegando incluso a encontrarse en costas africanas (P. Ribeiro 2008), apareciendo en zonas con diferentes grados de exposición al oleaje. Tiene un papel clave en la estructura de las comunidades intermareales, ya que se trata de un herbívoro que regula la cobertura de macroalgas puesto que se alimenta de ellas (Moore *et al.* 2007).

En las costas gallegas aparecen tres representantes del género *Patella*: *P. vulgata* (L.), *P. depressa* y *P. ulyssiponensis* (Gmelin), distribuidas en la franja intermareal sin un patrón espacial concreto.

Patella depressa posee las siguientes características morfológicas que permiten distinguirlas con facilidad de las otras especies:

- Concha: en *P. depressa* la concha por la parte externa es cónica, de forma redondeada, de poca altura y con bordes irregulares, presenta un ápice desplazado del centro que bajo el agua adquiere una coloración anaranjada, y costillas marcadas en un color más oscuro.

Por la parte interna de la concha, *P. depressa* es iridiscente, brillando en tonos azules.

- Pie: los ejemplares de *P. depressa* cuentan con un pie de color gris oscuro y el borde del manto presenta cilios de color blancos visibles a simple vista.



Ilustración 1. Fotografía de dos ejemplares de *Patella depressa* donde se pueden observar los cilios y el pie negro (en el individuo de la izquierda, es el color más común) y la morfología externa de la concha (individuo de la derecha).

Los individuos de *P. depressa* se encuentran sexualmente maduros desde abril hasta agosto (Orton y Southward 1961; Bowman y Lewis 1985; Brazão *et al.* 2003), lo que supone que se trata de una especie de cría primaveral aunque se han observado picos reproductivos también en Enero, (Brazão *et al.* 2003).

La fecundación se produce de forma externa, cuando los gametos del macho y de la hembra son liberados al agua, tras lo que se forman larvas que pasan por un estadio de trocófora y veliger formando parte del plancton (P. Ribeiro 2008) hasta que sufren una metamorfosis y se fijan al sustrato en los intermareales rocosos.

El estudio que a continuación se redacta, forma parte de un proyecto de investigación cuyo objetivo es evaluar el uso de la lapa como organismo indicador de la calidad ambiental de los ecosistemas costeros, puesto que se trata de una especie clave desde el punto de vista ecológico, abundante y ubicua en la costa. Será evaluada su utilidad como organismo centinela (para determinar la presencia de contaminantes en la costa) y como organismo prueba en un

bioensayo embriolarvario (con el fin de evaluar los efectos tóxicos de la contaminación sobre los organismos). El primer paso para la puesta a punto de este bioensayo es establecer un protocolo estandarizado de fecundación *in vitro* de gametos de *Patella depressa*.

Objetivo

El objetivo general del presente trabajo es diseñar un protocolo experimental para la realización de fecundaciones *in vitro* de gametos de una de las especies de lapa más común de las costas de Galicia, *Patella depressa*, con el fin de poder utilizar esta especie como organismo indicador de la calidad ambiental del ecosistema costero.

Este objetivo se aborda mediante la realización de diferentes ensayos en los que se fijan las condiciones óptimas para la obtención del mayor porcentaje posible de éxito en el desarrollo embrionario.

1. Metodología

1.1 Recogida de organismos en el intermareal

Los ejemplares fueron recogidos en el intermareal de la playa de O Portiño durante la marea baja con ayuda de un cuchillo, e inmediatamente fueron envueltos en un paño humedecido con agua de mar con el fin de evitar su desecación y muerte. Posteriormente, se almacenaron en bolsas de plástico etiquetadas. Se conservaron en frío (4°C) un máximo de 24 horas hasta la realización de las pruebas.

1.2 Selección de individuos maduros

La evaluación del estado de madurez de las gónadas se realizó siguiendo la metodología de Orton *et al.* (1956). Se basa en la determinación macroscópica del estado de desarrollo gonadal en función del tamaño de la gónada, es decir, de la porción de cavidad corporal que ocupa. El sexo se determina por la coloración de la gónada: color blanquecino o anaranjado en el caso de que se trate de un macho, y verde o rojizo si es hembra. Se establecen 6 estadios, de 0 (gónada inmadura o vacía) a V (gónada completamente desarrollada). La ilustración 2 describe las características de la gónada en cada uno de los estadios:

Estado	Descripción de la gónada	
0 (o N)		Inactiva o neutra (virgen o en reposo tras la liberación de los gametos). Color castaño-rojizo, sexo no distinguible
I		Inicio del desarrollo. Sexo identificable: gónada femenina castaña-verdusca, masculina de color crema, naranja o rosa
II		Gónada desarrollada hasta un tercio del tamaño máximo, alcanzando los márgenes externo y posterior de la masa visceral
III		Entre un tercio y dos tercios del tamaño máximo. Se observa un crecimiento significativo en espesor
IV		Hasta dos tercios del tamaño máximo. Se acentúa el crecimiento en espesor
V		Gónada completamente desarrollada, recubriendo toda la cara ventral y gran parte de la cara dorsal de la masa visceral

Ilustración 2. Imagen extraída de Ribeiro *et al.* (2009). Descripción de los estadios gonadales y diferenciación de sexo en función del tamaño de la gónada y su color respectivamente.

La gónada se encuentra bajo el pie, por lo que es necesario diseccionar los organismos. Para ello, se coloca la lapa con el pie hacia arriba y utilizando un bisturí se corta alrededor del manto. De esta forma, conseguimos levantar el pie sin dañar la gónada. Si el individuo es hembra, se corta totalmente el pie para dejar la gónada al descubierto; pero si se trata de un macho, entonces el pie no es diseccionado por completo para evitar que la gónada quede expuesta demasiado tiempo al aire, lo que produciría una pérdida de la calidad del esperma. Para realizar las fecundaciones se seleccionan solo los individuos con las gónadas en estadios IV y V (preferiblemente V).

Este procedimiento debe ser realizado en una sala que mantenga la temperatura constante (23°C) y las lapas han de ser mantenidas en frío para conservar los gametos en

condiciones adecuadas para la fecundación (esto último se consigue colocando las lapas sobre una bandeja con hielo).

1.3 Fecundación *in vitro*

1.3.1 Procedimiento general para la fecundación *in vitro*

Todo el proceso de fecundación se realizó con agua de mar filtrada a 0.35 μ (FSW) proporcionada por el *Aquarium Finisterrae* de A Coruña.

Las distintas pruebas de fecundación *in vitro* se realizaron siguiendo el protocolo general descrito por Aquino de Souza *et al.* (2003). Este procedimiento requiere, previamente a la fecundación, una maduración artificial de los óvulos por exposición a una solución alcalina.

Tras abrir todos los ejemplares y seleccionar los individuos maduros, se prepararon, en vasos de precipitados de 100ml, las soluciones que serán probadas para madurar artificialmente los óvulos (ver apartado 1.3.2).

Usando el bisturí se practicó una pequeña incisión en la gónada y se procedió a la extracción de óvulos utilizando una pipeta Pasteur (para facilitar la tarea, se hidratan los óvulos con unas gotas de FSW usando la pipeta). Todos los óvulos se llevaron a un cristizador con agua de mar donde se dejan decantar para eliminar restos de tejidos gonadales. Con ayuda de la pipeta, se recogieron del fondo y se pasaron a unas placas Petri de modo equitativo.

Los óvulos de las placas se pasaron a los vasos de precipitados en los que se encuentran las distintas soluciones alcalinas a probar, dejando las soluciones actuar diferentes tiempos (ver tiempos de exposición probados en el apartado 1.3.2).

Mientras la solución alcalina está actuando sobre los óvulos, se prepararon los machos para la fecundación. Se escogieron los 3 machos más maduros y de cada uno se pipeteó una

mínima cantidad de esperma directamente de la gónada empleando una pipeta Pasteur de vidrio. Se comprueba la movilidad del esperma al microscopio, y posteriormente se añade a los recipientes donde se llevará a cabo la fecundación.

Pasado el tiempo de exposición de los óvulos, se procedió a la recogida y lavado de los mismos, filtrando la suspensión de huevos cuidadosamente a través de un tamiz de 50 μ . Este tamiz se introduce en un cristalizador con FSW para lavar los óvulos. Este paso se repite otra vez para garantizar que no han quedado restos de solución alcalina. Tras el lavado, los óvulos se pasaron a vasos de precipitados enrasando a 100ml con FSW.

El esperma se añadió a los vasos en los que se encuentran los óvulos y se esperó a que se produjese la fecundación. Tras esto, se filtraron y lavaron los óvulos con el tamiz, dos veces, para eliminar el esperma sobrante.

El contenido de cada vaso de precipitados se repartió entre vasos de 20ml (tres réplicas por tratamiento) y se pusieron a incubar a 18°C.

La lectura de los viales se realizó a las 19 horas, tiempo que fue seleccionado siguiendo el análisis del desarrollo embrionario de Pedro Ribeiro (2008), según el cual a este tiempo y a esta temperatura se debería observar larvas trocóforas.

Se realiza el conteo *in vivo* del número de huevos y de larvas de cada uno de los vasos. Para ello, el contenido de los mismos es homogenizado y se pipetea 1ml en una placa Petri que es llevada a la lupa. Este paso se realiza tres veces de manera que se obtienen tres subréplicas de cada vaso.

Dentro de las larvas observadas, se puede hacer una distinción entre larvas normales y larvas anormales. Las normales son aquellas que presentan una estructura típica y bien definida de larva trocófora (ilustración 3), mientras que las anormales son las que presentan algún tipo de malformación (protuberancias, carencia de alguna estructura, etc.).

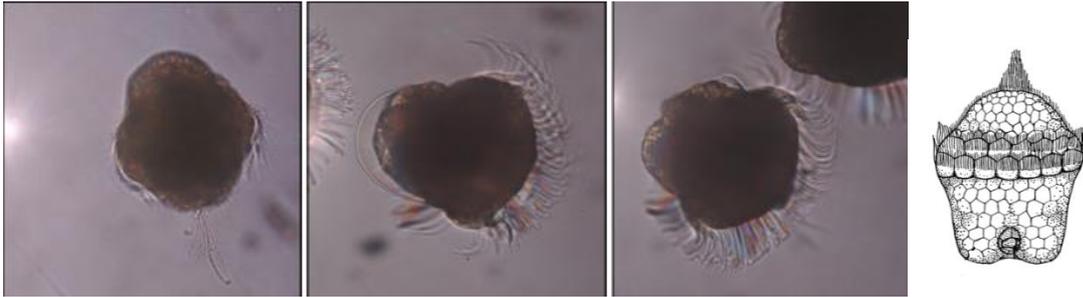


Ilustración 3. Visión al microscopio de larvas trocófora (tres primeras imágenes; Guallart *et al.*, 2010) y representación de dicho estadio larvario (cuarta imagen; Smith, 1935).

1.3.2 Estandarización de variables

Para establecer el protocolo de fecundación *in vitro* debemos definir los valores óptimos de una serie de variables con el fin de conseguir estandarizar el procedimiento.

Basándonos en el trabajo de Aquino de Souza *et al.* (2009), sabemos que previamente a la fecundación de los óvulos es necesario inducir la maduración artificialmente sumergiéndolos en una solución de agua de mar alcalinizada. La bibliografía existente indica que pHs entre 9.0 y 10.0 son los más eficaces. Las bases utilizadas para alcalinizar el medio son NaOH y NH₄OH. Sin embargo, una exposición demasiado prolongada, puede dañar el gameto, por lo que es necesario definir el tiempo óptimo de exposición a la base.

Por lo tanto, vamos a intentar definir el pH óptimo, la base más adecuada para aumentarlo y el tiempo de exposición de los óvulos a esa base para conseguir una fecundación exitosa.

Una vez madurados, los óvulos, es necesario definir cuál es la concentración de gametos y tiempo de fecundación óptimos, así como una vez fecundados los gametos, el tiempo y temperatura adecuadas de incubación para conseguir larvas trocóforas (tabla 1).

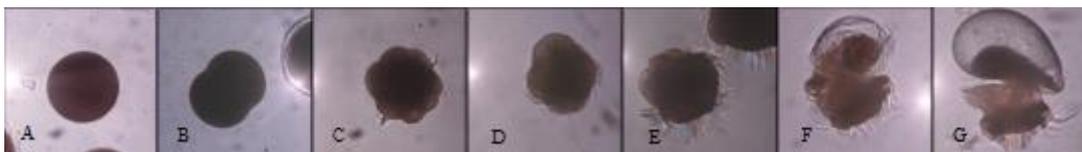


Ilustración 4. Imagen extraída de Guallart *et al.* (2010). Desarrollo embrionario desde huevo hasta larva veliger. A, huevo; B, embrión de dos blastómeros; C, embrión en fase de mórula; D, larva

trocófora; E, larva trocófora (se aprecia el velo); F, larva veliger pretorsional; G, larva veliger postorsional.

La siguiente tabla recoge las variables estudiadas así como los valores que han sido testados para cada una de ellas. Se realizaron 3 pruebas consecutivas, a lo largo de las cuales se determinó el valor definitivo para algunas de las variables y se afinó el valor de otras:

Variable	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
Base alcalinizadora	NH ₄ OH y NaOH	NH ₄ OH y NaOH	NH ₄ OH
pH óptimo para maduración artificial de óvulos	9.0 y 9.5	9.0, 9.5, 10.0	8.5, 8.8, 9.1, 9.4, 9.7, 10.0
Tiempo de exposición de los óvulos a la base	10 minutos	10, 45 y 90 minutos	5, 10 y 20 minutos
Concentración óptima de esperma	Directamente de la gónada, 10 ⁷ , 10 ⁶ y 10 ⁵ espermatozoides/ml	Directamente de la gónada	Directamente de la gónada
Tiempo óptimo de fecundación	30 minutos	30 y 90 minutos, y sin lavar*	90 minutos y sin lavar*
Agitación durante la fecundación	Si	No	No

Tabla 1. Variables y valores que han sido puestos a prueba para determinar cuáles son los que resultan en un mayor éxito de fecundación. *El tiempo de fecundación "sin lavar" se refiere a que no se eliminan el esperma mediante filtración, sino que permanecen junto con los óvulos, por lo que la fecundación sigue teniendo lugar hasta que el esperma pierde su capacidad de fecundación.

Preparación de las distintas concentraciones de esperma

Para preparar las distintas concentraciones experimentales (D1 a D4) se siguió el procedimiento descrito por Hodgson *et al.* (2007):

- Directamente de la gónada (D): se añade esperma directamente de la gónada de los tres machos maduros, cogiendo de cada uno la punta de una pipeta Pasteur.
- 10⁷ espermatozoides/ml (D2): se añade 1ml de la solución madre de esperma a los 100ml donde se encuentran los óvulos.

- 10^6 espermatozoides/ml (D3): se añade 0.1ml de la solución madre a los 100ml donde se encuentran los óvulos.
- 10^5 espermatozoides/ml (D4): se diluye 1ml de la solución madre en 9ml de agua de mar. Se añade 0.1ml de este segundo stock a los 100ml donde se encuentran los óvulos.

La solución madre a partir de la cual se preparan las concentraciones D2, D3 y D4 consiste en llevar a una probeta con FSW las gónadas de los machos.

2. Resultados

2.1 Prueba 1 (15/04/2014)

El objetivo de este primer ensayo fue definir la mejor base para madurar artificialmente los óvulos, probando NH_4OH y NaOH a pH 9 y 9.5, y la concentración de esperma óptima para conseguir éxito en el desarrollo embrionario. También se ha analizado el uso de un agitador para facilitar la fecundación.

Para esta primera prueba fueron recolectados 52 ejemplares de *Patella depressa*, cuyo estadio gonadal puede verse en la tabla 3. Se seleccionaron para las pruebas las 5 hembras con estadios IV y V.

Estadio	Hembras	Machos	TOTAL
I	1	0	1
II	1	4	5
III	9	13	22
IV	4	19	23
V	1	0	1
TOTAL	16	36	

Tabla 2. Estado de las gónadas de las lapas capturadas para el experimento.

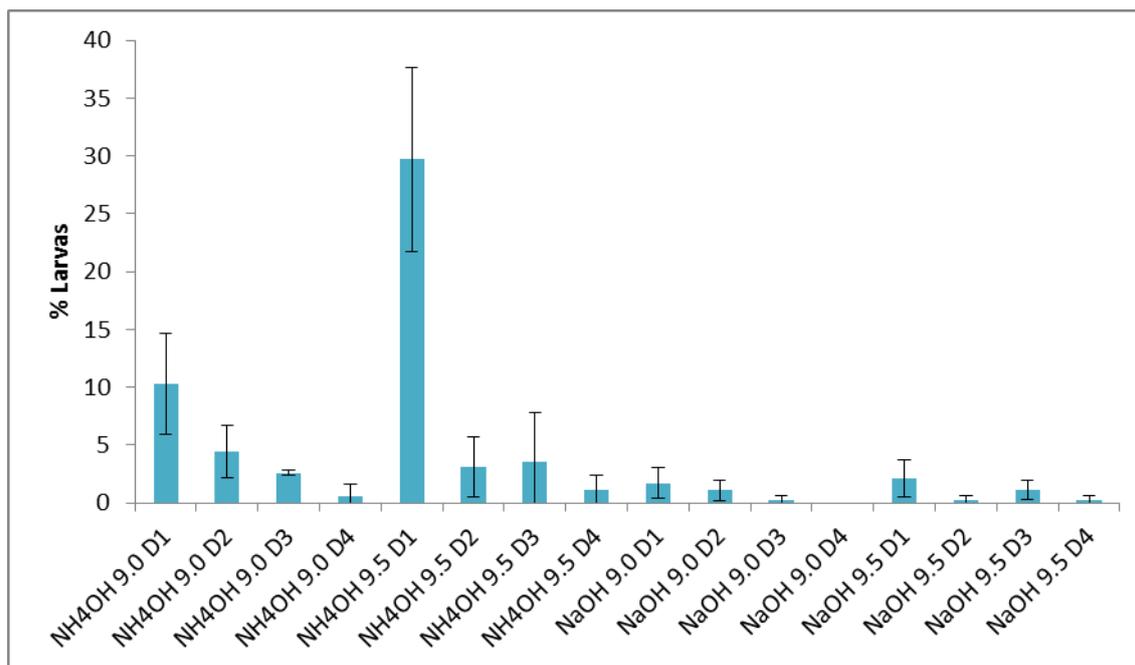


Figura 1. Porcentaje de larvas por tratamiento testado. Cada tratamiento aparece nombrado según el orden base (NH₄OH o NaOH) – pH (9.0 o 9.5) - dilución de esperma (D1-D4).

El estudio de los datos muestra una mayor efectividad de los tratamientos sometidos a NH₄OH como base alcalina. En los casos en los que se ha utilizado NaOH apenas aparecen larvas trocóforas.

Dentro de los tratamientos en los que se ha usado NH₄OH, se ha observado un porcentaje mucho mayor de larvas totales (normales y anormales) cuando se utiliza esperma directamente extraído de la gónada (D1), y dentro de estos, se obtiene claramente un mayor porcentaje de larvas trocóforas cuando la maduración de los óvulos se hace a pH 9.5.. En el caso de otros tratamientos, esta relación no es tan clara debido a la poca concentración de larvas, posiblemente producido por una baja tasa de fecundación debida a la dilución en la concentración de esperma.

Durante la fecundación se utilizó un agitador orbital para facilitar el contacto de los gametos, sin embargo, se observó que en lugar de repartir los huevos como se esperaba, se produjo la acumulación de estos en el centro del matraz o en un borde, por lo que se decidió no utilizar agitación en las siguientes pruebas.

2.2 Prueba 2 (23/04/2014)

El objetivo de esta prueba fue de nuevo definir la mejor base, esta vez analizando un rango más amplio de pHs y probando diferente tiempo de exposición de los óvulos a la solución alcalina. Además, se estudió el tiempo óptimo de fecundación.

Para esta prueba fueron recogidos 90 ejemplares. El examen de los estadios gonadales muestra, al igual que en el experimento anterior, una mayor proporción de machos que de hembras. En este caso, el porcentaje de individuos en los estadios IV y V es mayor que en la PRUEBA 1 (80% de los individuos frente al 46% anterior).

Estadio	Hembras	Machos	TOTAL
I	0	0	0
II	1	3	4
III	6	8	14
IV	15	28	43
V	4	25	29
TOTAL	26	64	

Tabla 3. Estado de las gónadas de las lapas capturadas para el segundo experimento.

Tratamientos con NaOH

Los tratamientos con NaOH presentan de nuevo un porcentaje de menor de éxito en el desarrollo embrionario que con NH_4OH , siendo los más elevados de en torno a un 25% de larvas totales (normales y anormales) (Figura 2).

Parecen tener un mayor éxito los tratamientos en los que no se lavan los embriones después de la fecundación (TF sin lavar). En cuanto al tiempo de exposición a la base (TB), parece que no existe una relación clara entre este y el éxito en el desarrollo embrionario (al contrario de lo que sucede con NH_4OH).

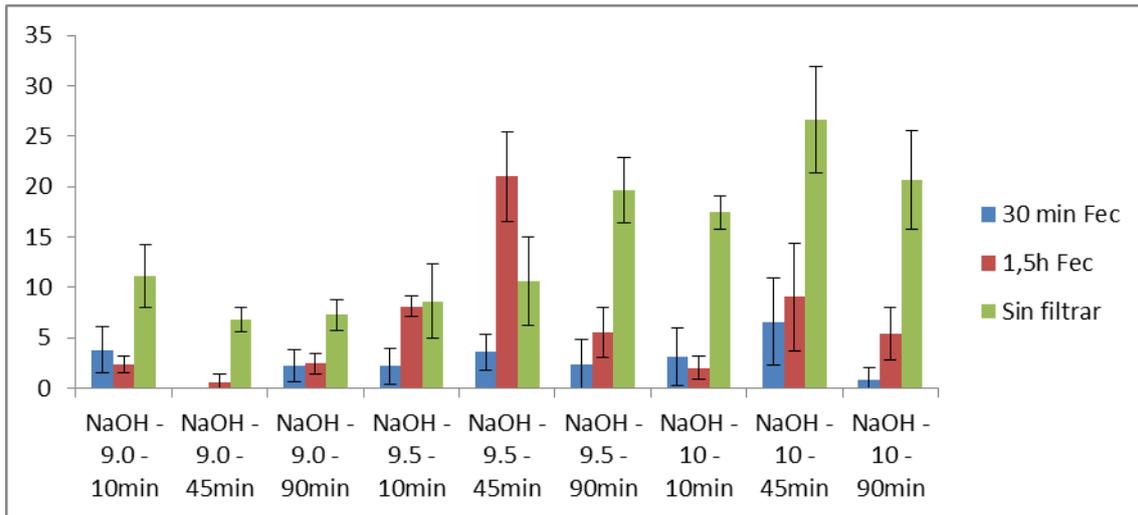


Figura 2. Porcentaje de larvas para cada tratamiento atendiendo al tiempo de fecundación. El pH se presenta como 9.0, 9.5 o 10; el tiempo de fecundación (TF) puede ser 10, 45 o 90 minutos.

Tratamientos con NH₄OH

Dentro de los tratamientos en los que se ha usado como base alcalina NH₄OH, se observa que el porcentaje de éxito en la embriogénesis es mayor en aquellos en los que los óvulos han estado sometidos menos tiempo a la solución alcalina (10min > 45 min > 90min), independientemente del tiempo de fecundación (Figura 3).

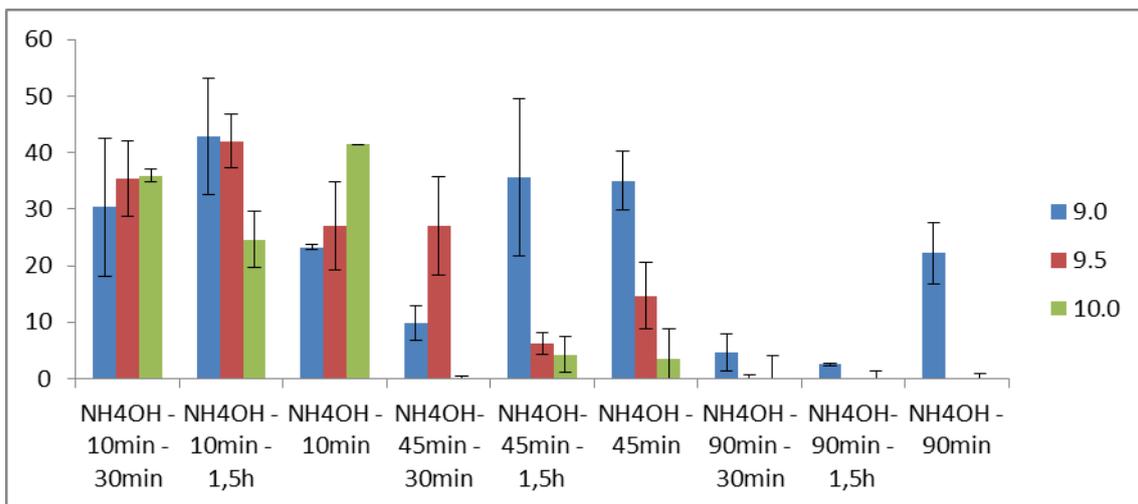


Figura 3. Porcentaje de larvas normales para cada tratamiento atendiendo al pH. El tiempo de exposición a la base (TB) aparece como 10, 45 o 90 minutos; el tiempo de fecundación aparece como 30 minutos, 1,5 horas o en blanco (cuando no se han lavado los ovocitos).

No podemos extraer ninguna conclusión clara en referencia al pH óptimo. A pesar de esto, la combinación de NH_4OH y tiempo de exposición 10 minutos parece ser la más idónea.

2.3 Prueba 3 (5/05/2014)

El objetivo fue “afinar” el pH óptimo de NH_4OH así como el tiempo óptimo de exposición a la base, y determinar la necesidad de lavar los óvulos tras el tiempo de fecundación.

Para esta prueba fueron empleados 72 individuos de *Patella depressa*.

Estadio	Hembras	Machos	TOTAL
I	0	1	1
II	4	1	5
III	19	11	30
IV	15	11	26
V	1	9	10
TOTAL	39	33	

Tabla 4. Estado de las gónadas de las lapas utilizadas para el tercer experimento

Análisis del pH óptimo

Los mayores porcentajes de larvas totales (normales + anormales) fueron registrados a partir de un valor de pH 8.8. En concreto, los pH de 9.1, 9.4, y 9.7 son los que han resultado ser más eficaces.

Los mayores porcentajes de larvas normales se obtuvieron de nuevo con pHs por encima de 8.8, en concreto a 9.4 y 9.7 (Figura 4). Por lo tanto, los valores inferiores quedan descartados para futuras pruebas

En los resultados se han obtenido un número de larvas anormalmente elevado (en relación a los resultados de las pruebas anteriores) en los tratamientos en los que los óvulos

fueron sometidos a una solución de pH 10. Creemos que esto es debido a que a este nivel de alcalinidad, gran parte de los óvulos sufren un proceso degradativo. Aquellos que todavía permanecen en el momento del conteo, representan una pequeña parte del total de óvulos que había al comienzo del tratamiento.

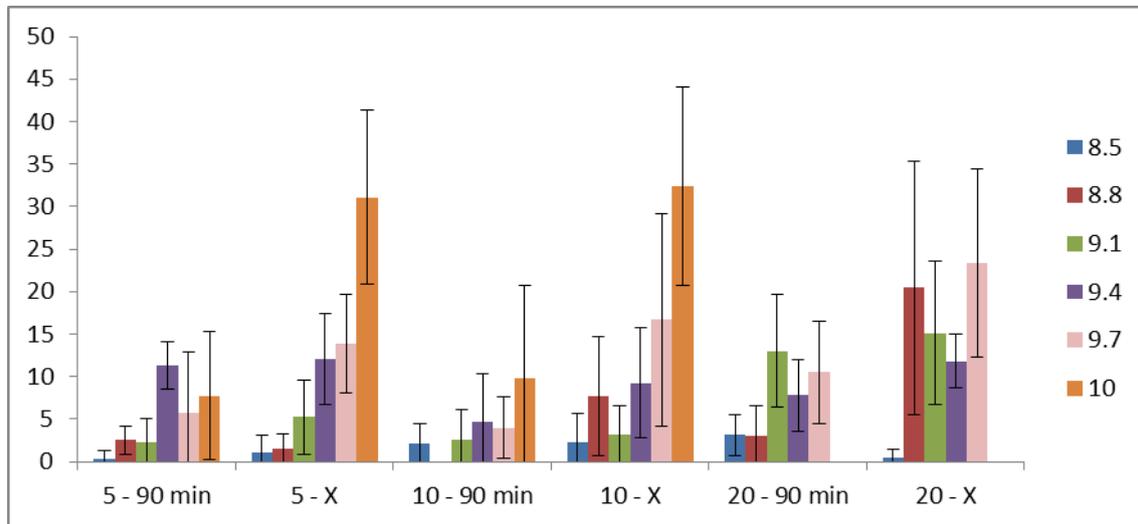


Figura 4. Porcentaje de larvas normales atendiendo al pH. El tiempo de exposición de los óvulos a la base (TB) aparece representado con los valores 5, 10 y 20; el tiempo de fecundación (TF) aparece con los valores 90min y X (sin lavar).

Análisis del Tiempo de Base óptimo

No se observan diferencias claras en los resultados tras exponer los óvulos 5, 10 y 20 minutos a la solución alcalina. Parece que el tratamiento que da mejores resultados es "pH 9.4 sin lavar", independientemente del tiempo de base (Figura 5).

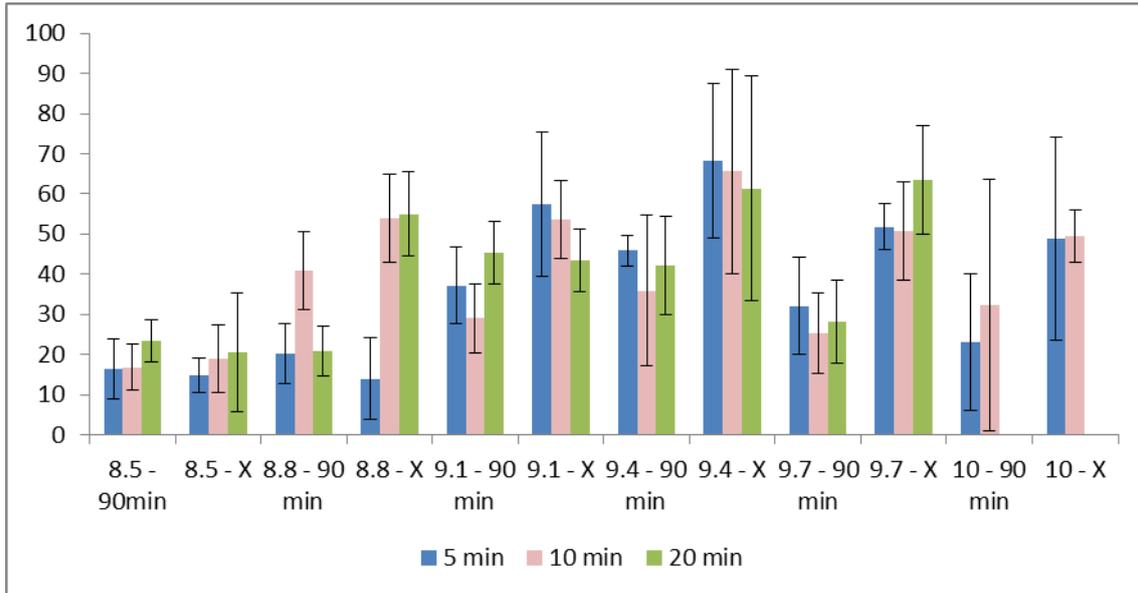


Figura 5. Porcentaje de larvas totales para pH 8.5 a 10.0 y un TF de 90 minutos o sin lavar (X), atendiendo al tiempo de actuación del NH₄OH.

Análisis del Tiempo de Fecundación óptimo

Los tratamientos en los que los embriones no se han lavado tras la fecundación (TF Sin lavar en el gráfico) muestran un porcentaje mayor de larvas totales que los tratamientos lavados (Figura 6).

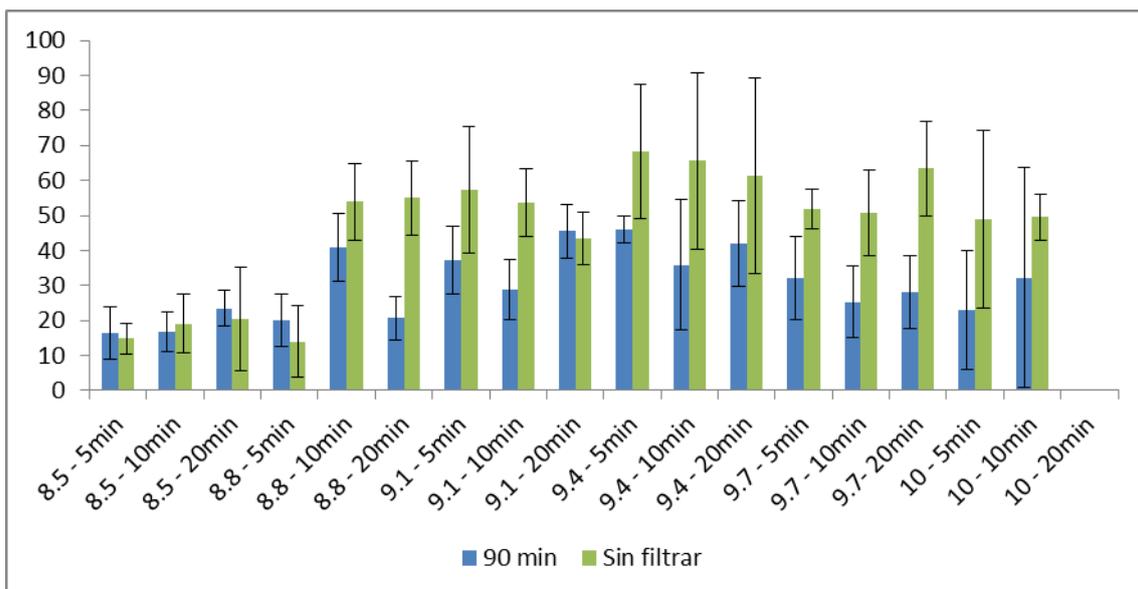


Figura 6. Porcentaje de larvas totales para pH 8.5 a 10.0 y TB de 5, 10 o 20 minutos, atendiendo al tiempo de fecundación.

Sin embargo, gran parte de este porcentaje está representado por larvas anormales (Figura 7).

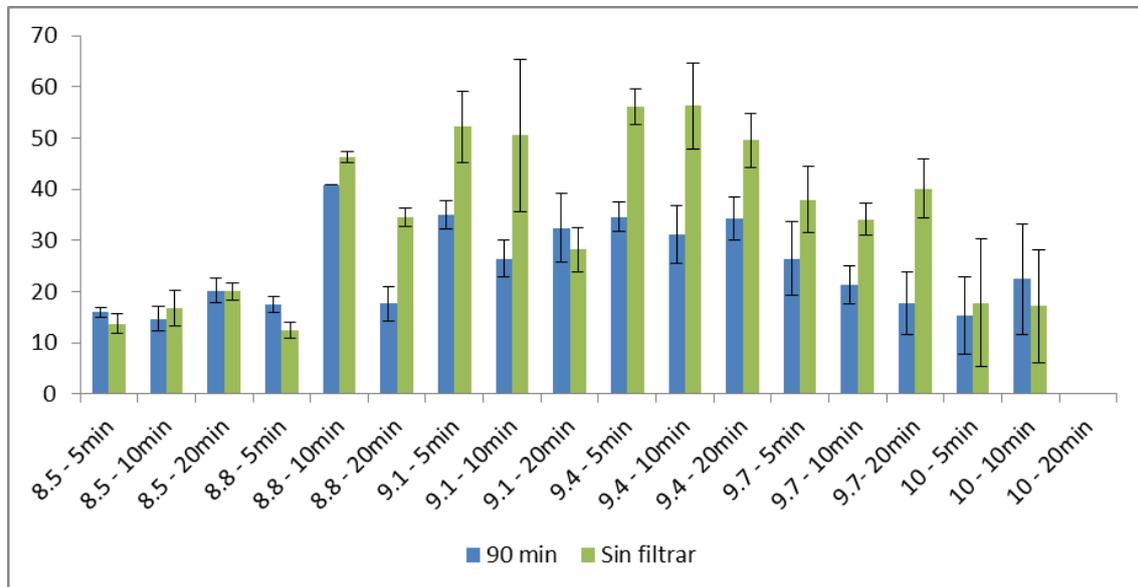


Figura 7. Porcentaje de larvas anormales para pH 8.5 a 10.0 y TB de 5, 10 o 20 minutos, atendiendo al tiempo de fecundación.

2.4 Conclusiones derivadas de las pruebas anteriores

1. La maduración artificial de los ovocitos utilizando una solución alcalina, se produjo de una manera más eficaz cuando se usó NH_4OH como base. El uso de NaOH quedó descartado por el bajo éxito que presenta.
2. De los pH testados, han resultado ser los más satisfactorios aquellos comprendidos entre 9.4 y 9.7
3. En cuanto al tiempo de exposición a la base escogida, ha resultado tener un mayor éxito cuando los óvulos permanecen en la solución durante los tiempos más bajos que se han testado, siendo el TB 10 minutos el que mejor ha funcionado. Tiempos de exposición muy elevados producen la degradación total de los ovocitos.

4. La concentración de esperma que mejor funcionó fue la obtenida al pipetear una pequeña cantidad directamente de la gónada. Cuanto mayor es la dilución, menor es el número de larvas.
5. La agitación mediante el uso de un agitador orbital queda descartada ya que ha tenido el efecto contrario al deseado: en vez de repartir los ovocitos y mantenerlos en suspensión para mejorar el contacto con los gametos masculinos, produjo la concentración de los ovocitos en un único punto.
6. Una mayor tasa de fecundación se consigue cuando los ovocitos no son lavados para eliminar el esperma tras el tiempo de fecundación definido. Sin embargo, esto supone también un incremento del número de larvas anormales con respecto a los tratamientos en los que sí se han lavado los óvulos. Por ello, se considera que para experimentos posteriores la mejor opción es la de lavar a los 90 minutos, ya que lo que se busca son larvas normales.

2.5 Otras pruebas (30/04/2014)

Las pruebas que a continuación se redactan han sido realizadas con el fin de resolver algunas dudas metodológicas que se plantearon durante las pruebas de fecundación *in vitro*.

Comprobación del volumen mínimo de FSW alcalina necesaria

Al preparar las soluciones de FSW de diferentes pH, se observó una variación del mismo tras añadir los huevos (estos van acompañados siempre de FSW para facilitar la extracción). Se busca el volumen mínimo de solución alcalina que no varía su pH al añadir entre 1 y 3ml de FSW.

Para ello, se prepararon 3 vasos de precipitados con FSW con 100ml, 250ml y 500ml respectivamente. Se ajustó el pH de los tres a 9.5 y se le añadió inicialmente 1.5ml de FSW y posteriormente otro tanto utilizando una pipeta Pasteur.

Volumen	pH inicial	pH tras 1,5 ml FSW	pH tras 3 ml de FSW
100 ml	9.45	9.45	9.44
250 ml	9.45	9.45	9.45
500 ml	9.51	9.51	9.51

Tabla 5. Efecto de la adición de una determinada cantidad de FSW sobre el pH de una solución de un volumen concreto.

Ninguno de los tres casos mostró variación (solamente en 100ml tras añadir los 3ml de FSW hay una variación de 0.01 del pH, pero se considera como un cambio ínfimo) por lo que, debido a que utilizar volúmenes pequeños es más cómodo, se pueden realizar las pruebas utilizando los vasos de precipitados de 100ml.

Comprobación de aparición de fragmentos de restos derivados del uso de NH₄OH

En las pruebas de fecundación se observó que en los viales aparecía una especie de partículas esféricas similares a óvulos pero de tamaño más pequeño, siendo su presencia menor en los tratamientos con NaOH que en los de NH₄OH. Además, son más abundantes en los tratamientos en los que los óvulos se han sometido a un mayor tiempo en la base (45 y 90 minutos).

Esto parece indicar que se trata de fragmentos de óvulo que aparecen por el efecto de la base, que ocasiona la rotura de los mismos.

Para probar esta hipótesis, se diseccionaron 15 ejemplares de *Patella depressa* y se utilizan todas las hembras en estadios IV y V para obtener los óvulos y pasarlos a un cristalizador y, posteriormente, a una placa Petri una vez lavados.

La mitad de los óvulos se pasaron a un vaso de precipitados con FSW (control) y la otra mitad, a un vaso con 100ml de solución alcalina (NH₄OH, pH 9,5). Se tomó una muestra de cada y se observó a la lupa el estado de los óvulos: en ambos casos no se vieron restos ni fragmentos de ovulo.

Tras 45 minutos se filtraron ambos vasos de precipitados y se pasaron los óvulos a dos recipientes nuevos con FSW limpia. Se volvió a tomar una muestra y se observó a la lupa: en ninguno de los casos se vieron restos pero sí algunos óvulos rotos (probablemente consecuencia del filtrado).

Se realizó la fecundación y 30 minutos más tarde se volvieron a filtrar ambas muestras, se homogenizó cada vaso y se tomaron 3 réplicas cada una de 0.5ml para contar los huevos y ver si hay restos. Esto se hace tras filtrar y 2 horas después.

En las réplicas del tratamiento con NH_4OH , aparecen tras la fecundación restos que pertenecen a los óvulos rotos, ya que se ha observado un proceso de rotura de los óvulos (abiertos, fragmentándose). El recuento a las 2 horas indica:

- Control: solo un 4% de los huevos aparecen rotos y no hay indicios de fragmentos.
- Tratamiento con NH_4OH : aparecen un 57% de los huevos así como fragmentos pequeños.

Tiempos de activación del esperma

Al realizar esta prueba se buscó, por un lado, comparar la calidad del esperma de dos individuos en igual estado de maduración (estadio V), analizando la evolución de la activación del esperma durante un tiempo de 2 horas en un individuo A* y otro individuo B, y por otro, estudiar el efecto de la exposición al aire de la gónada durante una hora (al extirpar completamente el pie) sobre la calidad del esperma.

El esperma fue observado al microscopio y se estimó una escala de movimiento del esperma valorándolo como bajo, medio o alto. Los resultados indican que:

1. El individuo A presentó una evolución óptima en la activación del esperma en el momento de abrir la gónada. Desde el primer momento ya se observó un ligero movimiento que alcanza un nivel medio a los 10 minutos y máximo a los 45.
2. El individuo B, que se ha utilizado como réplica, mostró una evolución más lenta y no llega a alcanzar un movimiento tan rápido como el individuo A.
3. Tras una hora de exposición de la gónada del individuo A al aire, la activación del esperma mostró una evolución mucho más lenta sin llegar a alcanzar nunca un movimiento medio.

Las diferencias de movilidad del esperma en individuos de estadio gonadal V, sugieren que la mejor opción para las fecundaciones es trabajar con tres machos distintos para garantizar un mayor éxito.

Conclusiones generales

En el presente estudio se probaron diferentes combinaciones de variables, con el fin de encontrar el mejor protocolo estándar que nos permita obtener el mayor porcentaje de larvas trocóforas viables, entendiendo esto como aquellas que presentan un desarrollo normal y potencialmente podrían convertirse en lapas adultas. En los experimentos llevados a cabo hasta el momento, se ha determinado que los mejores resultados se obtuvieron cuando se ha dejado un tiempo de fecundación de 90 minutos tras mantener los huevos durante 10 minutos en una solución de hidróxido de amonio (NH_4OH) a pH comprendido entre 9.4 y 9.7.

Es importante resaltar que el estado de las gónadas no siempre ha sido el óptimo debido a que la especie se encontraba al final del periodo reproductivo y por tanto en algunos casos, en proceso de reabsorción, por lo que en algunas pruebas la calidad de los huevos podría no haber sido la idónea (aunque siempre han sido elegidos los ejemplares mejor desarrollados). Por otro lado, si bien se ha alcanzado un elevado porcentaje de larvas, el número de larvas normales está lejos de ser elevado, encontrándose en torno al 35%, por lo que hay que conseguir reducir el número de larvas anormales.

De cara a mejorar los resultados, es conveniente hacer un conteo de los óvulos que van a ser sometidos a cada tratamiento para que en los resultados quede reflejado el porcentaje de fecundación respecto al número inicial de óvulos y no al final pues, en los casos en los que los huevos se sumergen en una solución a pH 10.0, se produce una degradación de los mismos, lo que no ha quedado reflejado en las gráficas. Además, para canalizar la causa de la elevada

variabilidad que muestran los resultados, conviene repetir los experimentos cuando las lapas estén en el óptimo de su ciclo reproductivo y no al final del mismo.

Bibliografía

- Airolidi L., Hawkins S.J. (2007) Negative effects of sediment deposition on grazing activity and survival of the limpet *Patella vulgata*. *Marine Ecology Progress Series* 332: 235-240.
- Aquino De Souza R., Tyler P., Hawkins S.J. (2009) Artificial oocyte maturation in *Patella depressa* and *Patella vulgate* using NaOH-alkalinized seawater. *Marine Biology Research* 5: 503-510.
- Bowman R.S., Lewis J.R. (1985) Geographical variation in the breeding cycles and recruitment of *Patella* spp. *Hydrobiologia* 142: 41-56.
- Brazão S., Boaventura D., Morais S., Narciso L., Ré P. (2003) Reproduction of *Patella depressa* Pennant, 1777 on the central Portuguese coast. *Europe* 19: 453-460.
- Guallart J., Calvo M., Acevedo I., Peña J. (2010) Desarrollo larvario de la lapa ferruginosa (*Patella ferruginea*) (Mollusca, Patellidae), especie catalogada "en peligro de extinción". Póster presentado en: *XVI Simposio Ibérico de Estudios de Biología Marina*; 6-10 Septiembre 2010; Alicante.
- Hodgson A.N., Quesne W.J., Hawkins S., Bishop J.D. (2006) Factors affecting fertilization success in two species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilization kinetics models. *Marine Biology* 150: 415-426.
- Moore P., Thompson R.C., Hawkins S.J. (2007) Effects of grazer identity on the probability of escapes by a canopy-forming macroalga. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 344: 170-180.

- Orton J.H., F.R.S., Southward A.J., Dodd J.M. (1956) Studies on the biology of limpets. II. The breeding of *Patella vulgata* L. in Britain. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 35: 149-176.
- Orton J.H., F.R.S., Southward A.J., Dodd J.M. (1961) Studies on the biology of limpets. IV. The breeding of *Patella depressa* Pennant on the North Cornish coast. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 41: 653-662.
- Ribeiro P.A. (2008) Dispersal and Connectivity of Northeastern Atlantic Patellid Limpets: A multidisciplinary Approach. Tesis, Universidad de Southampton. 279 pp.
- Ribeiro P.A., Xavier R., Santos A.M., Hawkins S.J. (2009) Reproductive cycles of four species of *Patella* (Mollusca: Gastropoda) on the northern and central Portuguese coast. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 41: 1-7.
- Smith F.G. (1935) The Development of *Patella vulgate*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 225: 95-125.