



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía

Área de Zooloxía

Posta a punto dun protocolo de fecundación *in vitro* de gametos de lapa *Patella depressa*

Puesta a punto de un protocolo de fecundación *in vitro* de gametos de lapa *Patella depressa*

Development of a protocol for *in vitro* fertilization of gametes of limpet *Patella depressa*

Catalina Pena Roibás

Traballo de fin de grao

Data de defensa: 29 de xuño de 2015

Dirixido pola Dra. Nuria Fernández Rodríguez

RESUMEN

El uso de *Patella depressa* como organismo test en un bioensayo embrio-larvario para ser utilizado en estudios de calidad ambiental del medio costero, hace necesario la puesta a punto de un protocolo de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario para esta especie. Para ello, es necesario estandarizar un protocolo, realizando varias pruebas para optimizar parámetros determinantes en la fecundación y el desarrollo embrionario. En este trabajo hemos determinado, el pH y el tiempo óptimo de alcalinización que necesitan los ovocitos para finalizar la maduración previamente a la fecundación *in vitro*. También hemos estandarizado la concentración de esperma óptima para una fecundación exitosa, ya que una elevada concentración produce poliespermia, dando lugar a larvas anormales. Del mismo modo, hemos determinado la concentración óptima de ovocitos, ya que demasiado elevada agotaría el oxígeno disponible, provocando la mortalidad de los embriones y larvas. Una vez establecidos estos parámetros, hemos utilizado el bioensayo estandarizado para estudiar la toxicidad de los metales pesados, cobre y cadmio, sobre el desarrollo embrionario de *Patella depressa*, exponiendo los embriones a diferentes concentraciones de estos metales. Hemos concluido que la alcalinización de los ovocitos debe hacerse a pH 9.0 durante 10 minutos. La mejor combinación de concentración esperma/ovocitos para una fecundación exitosa es añadir esperma “sin diluir” a 194.45 ovocitos/mL. Finalmente hemos determinado que el Cu y el Cd reducen un 50% el éxito en el desarrollo embrionario, a partir de 64µg/L y 150µg/L, respectivamente.

SUMMARY

The use of *Patella depressa* as a test organism in an embryo-larval bioassay to be used in studies of environmental quality of the coastal environment, makes necessary to develop a protocol for *in vitro* fertilization and embryo development for this species. For this, it is necessary to standardize a protocol, by conducting several tests to optimize key parameters in fertilization and embryo development. In this work we determined the optimum pH and time of alkalization to finalize oocyte maturation prior to *in vitro* fertilization. We have also determined the optimal sperm concentration for successful fertilization, since high concentration produces polyspermy, resulting in abnormal larvae. Likewise, we have determined the optimal concentration of oocytes, since too high concentration decreases the available oxygen, causing the mortality of embryos and larvae. Once these parameters have been determined, we used the standardized protocol to study the toxicity of heavy metals, copper and cadmium, on embryonic development of *Patella depressa*, by exposing the embryos to different concentrations of these metals. We have concluded that alkalization of oocytes should be at pH 9.0 for 10minutes. The best combination of concentration sperm/oocytes for successful fertilization is adding sperm undiluted to 194.45oocytes/mL. Finally, we have determined that Cu and Cd reduced 50% of success in embryonic development from concentrations of 64µg/L and 150µg/L, respectively.

INDICE

1. Introducción.....	7
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1. Muestreo e identificación de especies en el campo.....	9
3.2. Determinación del sexo y estado de madurez gonadal, y selección de los reproductores para la fecundación <i>in vitro</i>	10
3.3. Protocolo general para la fecundación <i>in vitro</i> y desarrollo embrionario.....	11
3.4. Pruebas realizadas para optimizar el protocolo.....	12
3.5. Determinación de la toxicidad de metales pesados sobre el desarrollo embrionario de <i>P.depressa</i>	14
4. Resultados y discusión.....	15
5. Conclusiones	22
6. Conclusions	22
7. Bibliografía.....	23

1. Introducción

El objetivo de este trabajo fue poner a punto un protocolo de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario de *Patella depressa* y evaluar la toxicidad de algunos metales pesados sobre el desarrollo embrionario de esta especie.

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio, cuyo objetivo final es estandarizar un bioensayo embrio-larvario con *Patella* spp. para ser utilizado como una herramienta en estudios de evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas costeros.

Las lapas son moluscos gasterópodos clave en los intermareales rocosos, ya que determinan el grado de cobertura de macroalgas. La fecundación en las lapas es externa, y se produce con la liberación de gametos masculinos y femeninos al medio. Se forma un embrión a partir del cual surge una larva de vida planctónica, primero trocófora y después veliger. Posteriormente pasa a fijarse a la roca.

En los intermareales rocosos de Galicia habitan tres especies de lapa, *Patella vulgata*, *Patella depressa* y *Patella ulyssiponensis*, que presentan diferentes ciclos reproductivos (Ribeiro *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2015). En general, *P. vulgata* presenta un periodo de madurez gonadal restringido a otoño/invierno (de noviembre a enero). Para *P. depressa* pueden encontrarse individuos maduros todo el año, excepto en los meses de verano (de julio a septiembre) y *P. ulyssiponensis* presente individuos maduros a lo largo de todo el año, con un mínimo en mayo/junio. Es importante tener estas características en cuenta ya que, la realización de fecundaciones *in vitro* requiere tener individuos maduros para obtener los gametos.

Los bioensayos son herramientas complementarias a los análisis químicos en los estudios de calidad ambiental, ya que permiten estimar el potencial tóxico de un contaminante sobre los seres vivos (O'Connor y Paul, 2000). Estos consisten en exponer un organismo a diferentes concentraciones de la sustancia o muestra del medio natural, cuya toxicidad se quiere evaluar, y posteriormente medir una respuesta biológica. El empleo de embriones y larvas de invertebrados marinos en bioensayos, es recomendable, puesto que estos presentan una alta sensibilidad a los contaminantes químicos. Por otra parte, también presentan un inconveniente, puesto que en muchos invertebrados de nuestras latitudes el período de reproducción se limita a una época del año, generalmente a primavera y verano, no estando disponibles sus gametos, fuera de esta época, impidiendo por tanto la realización de bioensayos. La alternancia del ciclo reproductivo en las distintas especies de *Patella*, hace de la lapa un organismo ideal, en principio, para realizar bioensayos embrio-larvarios, puesto que podríamos encontrar individuos maduros durante todo el año. Otra ventaja que presenta es la facilidad para recogerla, ya que se hace a mano y con un coste muy bajo. Estudios realizados con otros invertebrados marinos que también pasan por estadios de larva trocófora, como el mejillón y la ostra, demostraron que son muy sensibles a contaminantes químicos (His *et al.*, 1999; Mhadhbi *et al.*, 2010), por lo que, podemos pensar que los embriones y larvas de lapa, también serán sensibles.

2. Objetivos

Para desarrollar este protocolo se llevaron a cabo diferentes pruebas con el objetivo de optimizar algunos parámetros determinantes para la fecundación *in vitro* y el desarrollo larvario, hasta el estado trocófora, de la lapa *Patella depressa*.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. Determinar el pH y el tiempo de alcalinización óptimos para la maduración artificial de los ovocitos. Por trabajos previos (Hodgson *et al.* 2007) sabemos que, previamente a la fecundación, es necesario madurar artificialmente los ovocitos mediante exposición a una solución alcalina (el pH y tiempo de exposición han de ser suficientemente altos para activar la maduración, sin llegar a destruir los ovocitos).
2. Comparación del éxito en la fecundación con diferentes concentraciones de esperma/ovocitos.
3. Determinación de la toxicidad de metales pesados (Cu y Cd) sobre el desarrollo embrionario de *P. depressa*.

3. Material y métodos

3.1. Muestreo e identificación de especies en el campo.

Para realizar las fecundaciones *in vitro* necesitamos reproductores que muestreemos en O Portiño (A Coruña) y en Cangas (Pontevedra). Los ejemplares fueron recogidos con marea baja y con ayuda de un cuchillo, posteriormente fueron envueltos en una toalla mojada con agua de mar, y guardados en una bolsa de plástico y en una nevera hasta la realización de la prueba (máximo 24 horas).

Puesto que las tres especies coexisten en el intermareal solapando sus áreas de distribución, es necesario aprender a distinguirlas en el campo para recoger la especie que nos interesa. En la siguiente tabla e ilustración se muestran las características morfológicas que utilizábamos para distinguir *in situ* *P. depressa* de las otras dos especies presentes en el intermareal:

CARÁCTERÍSTICAS	<i>Patella depressa</i>	<i>Patella vulgata</i>	<i>Patella ulyssiponensis</i>
Ápice concha	Anaranjado Desplazado	Blanco Centrado	Siempre cubierta de algas
Forma de la concha	Baja	Alta	
Márgenes	Irregular	Liso	Serrado
Pie	Marrón oscuro	Verde-marrón	Naranja
Interior concha	Oscuro con radios marrón chocolate	Verdoso	Perlado
Manto	Cilios blancos muy visibles en el borde	Cilios poco visibles	Sin cilios visibles
Zona	Intermareal superior y medio	Intermareal (superior, medio e inferior)	Intermareal inferior

Tabla 1: diferencias morfológicas de *Patella depressa* (primera columna), respecto a las otras dos especies, *P. vulgata* y *P. ulyssiponensis*

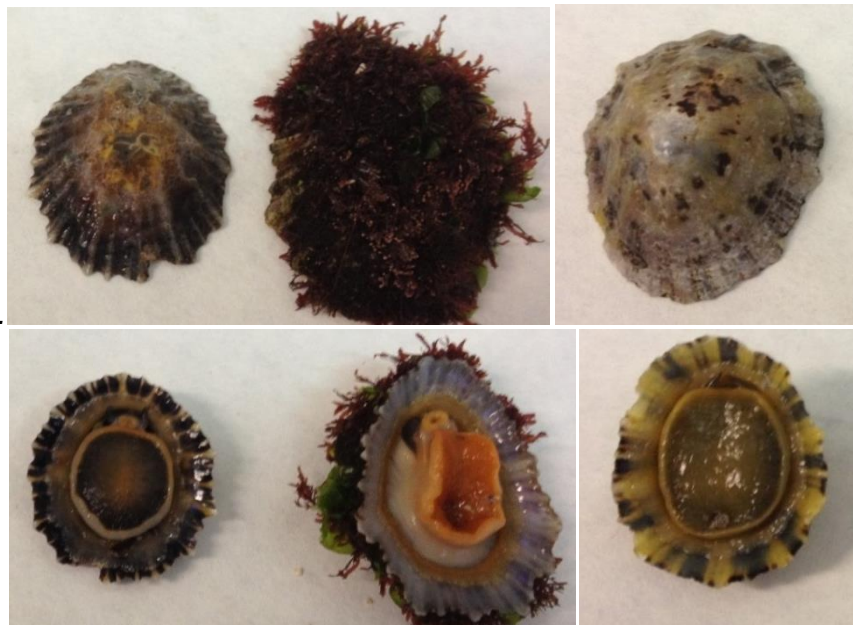


Ilustración 1: visión apical (superior) y basal (inferior) de las tres especies, *Patella depressa*, *Patella vulgata* y *Patella ulyssiponensis*, respectivamente.

3.2. Determinación del sexo y estado de madurez gonadal, y selección de los reproductores para la fecundación *in vitro*.

Una vez en el laboratorio es necesario determinar el sexo y el estado de madurez gonadal, ya que necesitamos seleccionar machos y hembras maduros. El sexo se determina por el color de la gónada, siendo en machos de color salmón, y en hembras verde o roja (Orton *et al.* 1956).

Así mismo, por el tamaño y el volumen de la gónada (ilustración 2) podremos establecer el estado de madurez de la misma (Orton *et al.* 1956):

- Estadío 0: Gónada sin desarrollar. Color amarronado; sexo indistinguible
- Estadío I: Comienza el desarrollo
- Estadío II: Desarrollo de la gónada hasta 1/3 de su tamaño máximo, cubriendo el borde de la masa visceral.
- Estadío III: Entre 1/3 y 2/3 de la talla máxima. Se ve un aumento considerable del volumen de la gónada respecto al estadío 2
- Estadío IV: Crecimiento mayor de 2/3 del tamaño máximo. Comienza a ocupar parte de la parte dorsal de la masa visceral.
- Estadío V: Gónada totalmente desarrollada, cubriendo enteramente la parte ventral y gran parte dorsal de la masa visceral

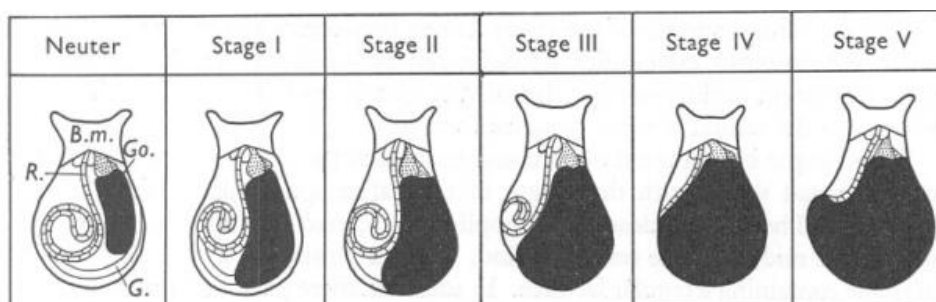


Ilustración 2: diferentes estadios gonadales, descritos por Orton J.H. *et al.* (1956). Representa la masa visceral de lapa, tras la extirpación del pie. La gónada (parte negra) aumenta de tamaño en cada uno de los estadios hasta cubrir la rádula (R).

Para seleccionar los reproductores que serán utilizados en la fecundación *in vitro*, se empieza por la separación de los ejemplares según el sexo. Esto se hace practicando un pequeño corte en el lado derecho del pie, para poder observar el color de la gónada, y por tanto el sexo del individuo. Una vez separados machos de hembras se determina el estado de madurez gonadal, comenzando siempre por las hembras.

Para ello es necesario abrir la lapa, extirpándole el pie con un bisturí, quedando a la vista la gónada. Una vez conseguidas al menos 3 hembras maduras (estadío IV y V), se comienza a abrir los machos. No conviene abrirlos antes, para evitar que el esperma se degrade en contacto con el aire. Del mismo modo seleccionamos 3 machos en estadío IV y V.

3.3. Protocolo general para la fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario.

Todas las pruebas se realizan con agua de mar filtrada (FSW), procedente del *Aquarium Finisterrae* de A Coruña.

A continuación se explican uno a uno los pasos generales que hay que seguir para la fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario de *P. depressa*. Antes de proceder a la fecundación *in vitro* es necesario, por un lado activar el esperma, y por otro, exponer los ovocitos a una solución alcalina (Aquino de Souza *et al.* 2009) para debilitar el corion y para que pueda tener lugar la fase final de maduración (la gametogénesis se para en la profase I. En el medio natural tiene lugar un cambio interno de pH que hace que finalice la maduración, en el laboratorio hay que aumentar artificialmente el pH).

Activación del esperma: Para activar el esperma es necesario que esté en contacto con agua de mar a 18°C durante 45min (estos parámetros ya han sido estandarizados anteriormente). Para comprobar la activación, se observa al microscopio el movimiento del esperma.

Maduración artificial de los ovocitos: Con ayuda de una pipeta se vacían las gónadas de 3 hembras maduras, depositando los ovocitos en un cristizador con agua de mar. Removemos el agua del cristizador para concentrarlos y eliminar los restos de gónada que queden flotando. Este paso se repite varias veces. Los ovocitos seleccionados se exponen a la solución alcalina de hidróxido amónico (se probaron diferentes pH y tiempos de exposición). Una vez terminado el tiempo de alcalinización los ovocitos se recogen y se lavan con FSW utilizando un tamiz de 50 micras y se introducen a un vial de 20mL con FSW. Se hace un recuento de los huevos/mL, ya que la densidad de huevos es un parámetro fundamental para el éxito de la fecundación (se probaron diferentes densidades de ovocitos) y, posteriormente, para el desarrollo embrionario.

Fecundación *in vitro*: Una vez maduros los ovocitos y activado el esperma, se realiza la fecundación *in vitro*. Hemos probado varias combinaciones con diferentes concentraciones de esperma y ovocitos. Para que la fecundación sea exitosa, estas concentraciones son determinantes, ya que una concentración muy elevada de esperma, produce un elevado número de larvas anormales, debido a que un ovocito es fecundado varias veces (poliespermia). Del mismo modo, la concentración de ovocitos también es importante, puesto que demasiados ovocitos agotarían el oxígeno y un número muy bajo no sería suficiente. La fecundación se realiza a 18°C durante 180 minutos (esto fue determinado con pruebas anteriores en las que se comprobaron diferentes temperaturas y tiempos de fecundación). Una vez transcurrido este tiempo, los embriones se lavan con agua de mar para eliminar el exceso de esperma, utilizando el mismo tamiz de 50micras y pasándolo a un vial con 20mL de FSW a una densidad de 80embriones/mL.

Incubación y finalización de la prueba: Finalmente los embriones se incuban durante 24 horas a 18°C. Transcurrido este período, se contabiliza en vivo el porcentaje de larvas normales, sobre cuatro réplicas de 20µL. Las larvas normales, tienen un penacho y una corona de cilios muy visible (Figura 3) y un movimiento rápido en

espiral. Por el contrario las larvas anormales, además de tener diferentes formas, giran sobre sí mismas constantemente o presentan un movimiento muy lento.

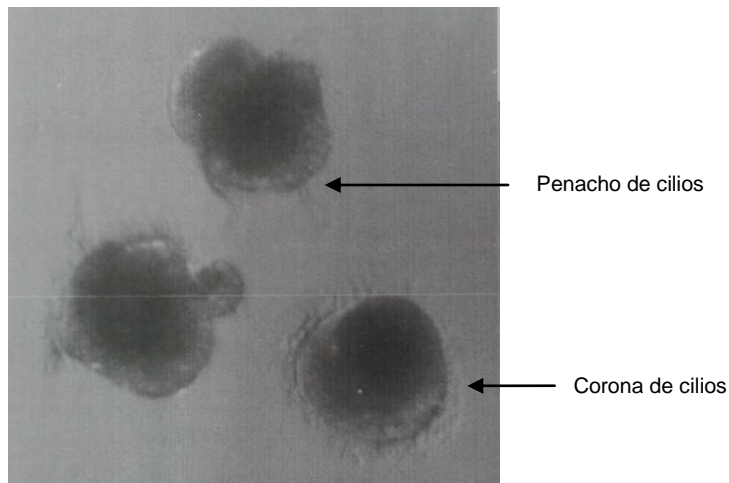


Ilustración 3: diferentes vistas de una larva normal en la que se observa la corona y penacho de cilios.

3.4. Pruebas realizadas para optimizar el protocolo.

Para optimizar el protocolo de fecundación *in vitro* de *P. depressa* y para evaluar la toxicidad de algunos metales pesados sobre el desarrollo embrionario, se desarrollaron tres pruebas.

Prueba 1: Estimación de pH y tiempo óptimos de exposición de los ovocitos a una solución alcalina para su maduración artificial.

Para estandarizar estos parámetros se realizaron 4 pruebas los días: 14, 20 y 28 de abril y 5 de mayo.

Como se explica en el apartado 3.3, previamente a la fecundación *in vitro*, los ovocitos han de ser madurados artificialmente mediante exposición en agua de mar alcalinizada con hidróxido amónico. Una vez obtenidos los ovocitos, siguiendo los pasos descritos en el procedimiento general (apartado 3.3) estos fueron expuestos a distintas combinaciones de pH (8.7, 9.0, 9.5 y 10.0) y tiempos de exposición (5, 10, 20 y 40 minutos). En todos los casos el pH se midió antes y después de introducir los ovocitos, para asegurarnos de que este se mantenía en el valor que queríamos probar. Transcurrido el tiempo de exposición, los ovocitos se lavan con FSW, con ayuda de un tamiz de 50 micras, y se procede a la fecundación, incubación y lectura de los resultados siguiendo el procedimiento general (apartado 3.3).

Prueba 2: Comparación del éxito en la fecundación con diferentes concentraciones de esperma y diferentes concentraciones de ovocitos.

Para la determinación de estos parámetros se realizaron dos pruebas los días 5 y 12 de mayo.

En base a los resultados de las pruebas anteriores, los ovocitos fueron madurados mediante alcalinización a pH 9 durante 10 minutos. Una vez alcalinizados los ovocitos y activado el esperma, se procedió a la fecundación *in vitro* probando diferentes concentraciones de esperma y ovocitos.

Concentraciones de esperma: Para la fecundación en esta prueba se preparan las concentraciones de esperma propuestas por Hodgson *et al.* (2007) (sin diluir, 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5) siguiendo la metodología descrita a continuación:

- ▶ SIN DILUIR: se añade con la punta de una pipeta Pasteur una gota de esperma de cada uno de los tres machos a 20mL de agua de mar.
- ▶ Las demás concentraciones se preparan añadiendo distintos volúmenes de una solución stock de esperma, que se preparan añadiendo a 100mL de FSW las gónadas de los tres machos. Para obtener las distintas concentraciones de esperma se añaden los siguientes volúmenes de la solución stock a los viales que contiene la concentración de ovocitos que estemos probando:
 - 10^8 : 10mL de stock a la solución de ovocitos
 - 10^7 : 1mL de stock a la solución de ovocitos.
 - 10^6 : 0.1mL de stock a la solución de ovocitos.
 - 10^5 : en este caso hay que hacer una dilución previa: se diluye 1mL de la solución stock de esperma en 9mL de agua de mar y se añade 0.1mL de esta dilución, a la solución de ovocitos.

Concentraciones de ovocitos: Partiendo de los ovocitos recogidos de tres hembras maduras, una vez alcalinizados y estimada la densidad (que fue de 4575 huevos/mL), se prepararon diluciones de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 obteniendo, por tanto, las siguientes concentraciones de ovocitos: 388.9, 194.4, 97.22, 48.61 y 24.25huevos/mL.

En la siguiente tabla, se reflejan las diferentes combinaciones de las concentraciones esperma y ovocitos probadas:

ESPERMA		OVOCITOS			
SIN DILUIR*					
10^8					
10^7	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
10^6					
10^5					

Tabla 2: combinaciones realizadas con las diferentes concentraciones de esperma y ovocitos.

Finalmente las combinaciones de esperma/ovocitos se llevaban a un volumen final de 100mL de FSW.

Una vez transcurridos el periodo de fecundación (180 minutos a 18°C), los embriones se lavan con FSW para eliminar el exceso de esperma y se incuban a 18°C durante 24 horas a una densidad de 80huevos/mL.

3.5. Determinación de la toxicidad de metales pesados sobre el desarrollo embrionario de *P.depressa*.

Para determinar la toxicidad de metales pesados, como el cobre y el cadmio, se realizaron dos pruebas los días 25 de mayo y 2 de junio de 2015.

Estas pruebas se realizaron siguiendo el protocolo estandarizado de fecundación *in vitro* en base al procedimiento general descrito en el apartado 3.3, y utilizando los parámetros óptimos obtenidos en las pruebas 1 y 2: los ovocitos deben madurarse artificialmente por exposición a agua de mar alcalinizada con hidróxido amónico a pH 9.0 durante 10 minutos, y la concentración de esperma óptima para la fecundación es “sin diluir” y la de ovocitos, 194,45 ovocitos/mL. Siguiendo todo el procedimiento ya descrito, los huevos fecundados se incuban a 18°C durante 24 horas, a una densidad de 80 huevos/mL, en agua de mar conteniendo las siguientes concentraciones de metales pesados:

Cobre (Cu): 1, 4, 16, 64 y 256 µg/L

Cadmio (Cd): 50, 150, 450, 1350 y 4050 µg/L.

4. Resultados y discusión

Prueba 1: determinación del pH y tiempo óptimo de exposición de los ovocitos a una solución alcalina para su maduración artificial.

Las siguientes gráficas muestran el porcentaje de larvas normales obtenido tras la alcalinización de los ovocitos a los distintos pH y tiempos de exposición estudiados en cada una de las cuatro pruebas realizadas.

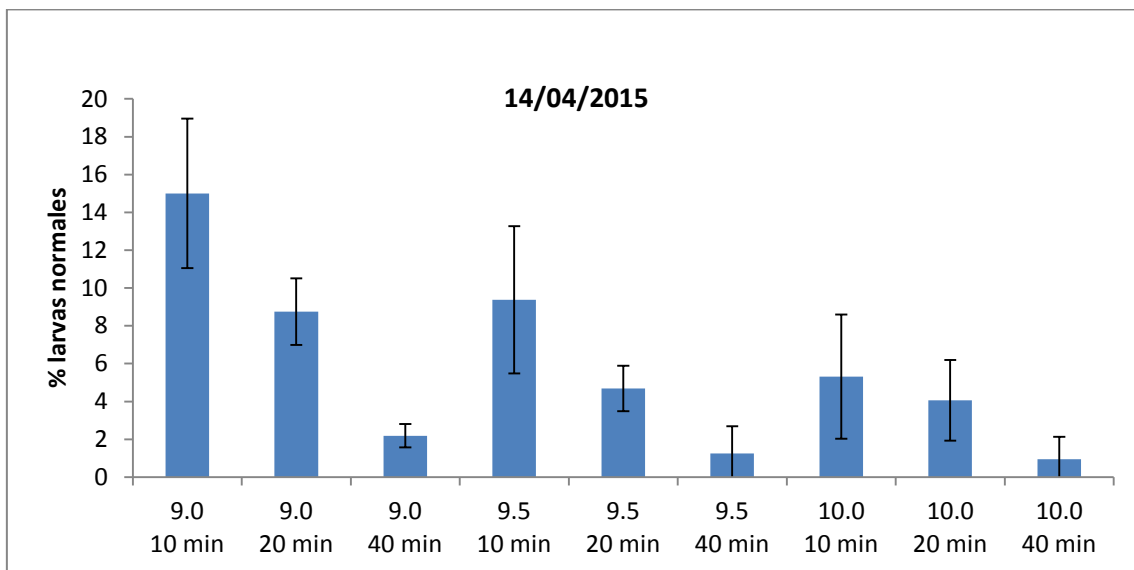


Figura 1: porcentaje de larvas normales obtenidas en los distintos tratamientos de pH (9.0, 9.5 y 10.0) y tiempos de exposición (10, 20 y 40 minutos) en la prueba realizada el 14/04/2015.

En esta prueba, se observa que según se aumentan los tiempos de exposición y el pH disminuye el éxito en la fecundación. Se observa claramente que la mejor combinación es pH 9.0 durante 10 minutos, con un 15% de larvas normales.

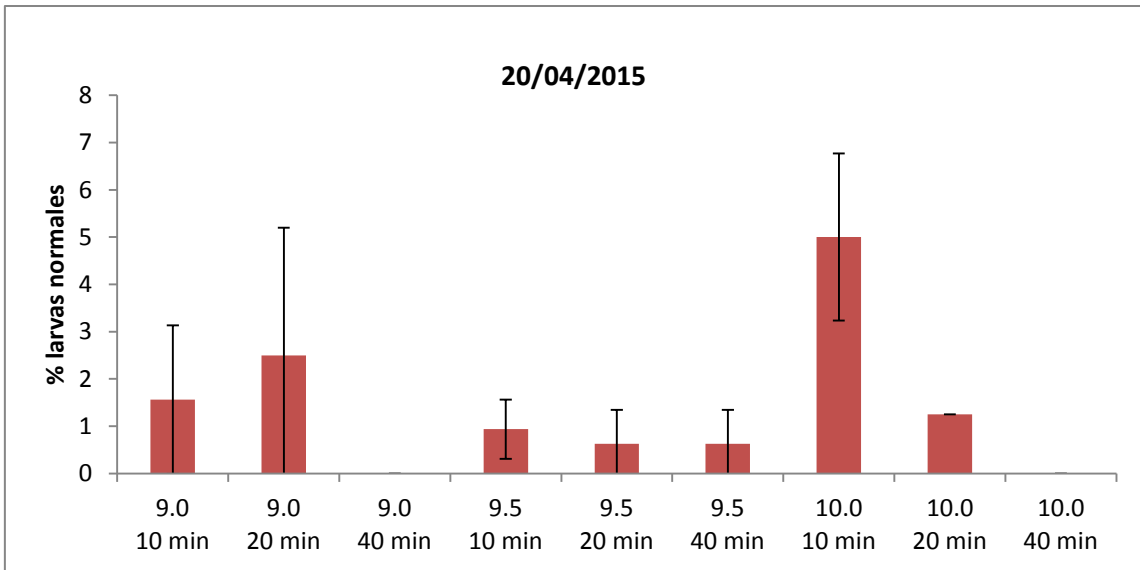


Figura 2: porcentaje de larvas normales obtenidas en los distintos tratamientos de pH (9.0, 9.5 y 10.0) y tiempos de exposición (10, 20 y 40 minutos) en la prueba realizada el 20/04/2015.

En este caso, no se hay una tendencia clara al aumentar el pH y el tiempo de exposición. Se observa que la mejor combinación es a pH 10.0 durante 10 minutos, pero el porcentaje de éxito es del 5%, que es muy bajo para que se pueda considerar un buen resultado. Puede ser debido a que los ejemplares recogidos para esta prueba estuvieron 48 horas en la nevera, antes de la realización de la misma, y además no había individuos en estadio V.

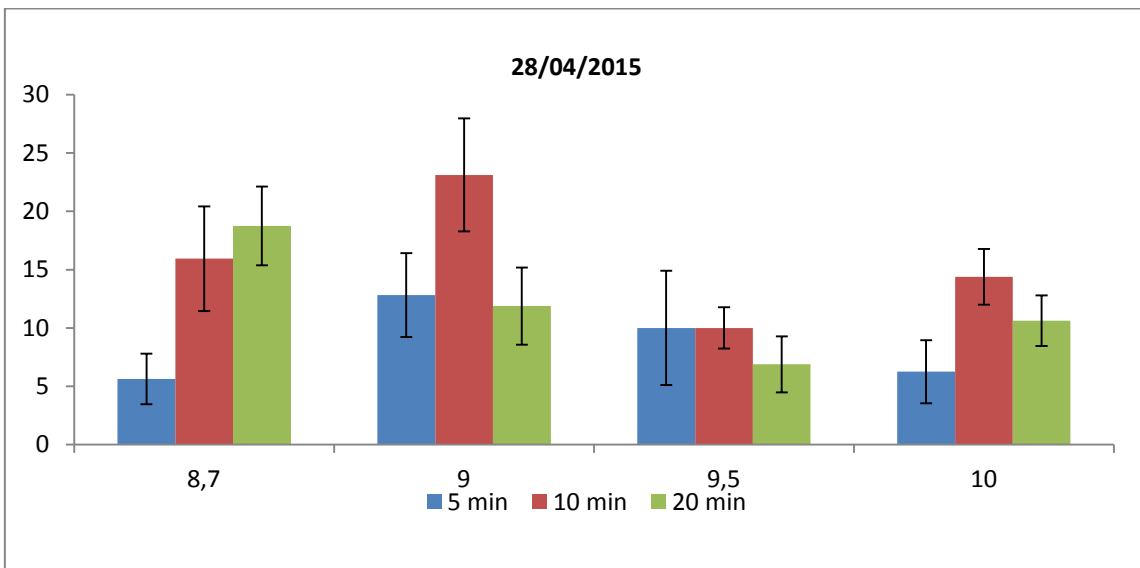


Figura 3: porcentaje de larvas normales obtenidas en los distintos tratamientos de pH (9.0, 9.5 y 10.0) y tiempos de exposición (10, 20 y 40 minutos) en la prueba realizada el 28/04/2015.

En esta prueba se añadieron un pH y un tiempo de exposición inferiores (8.7 y 5 minutos, respectivamente). Se observa que a pH 8.7 hay un mayor éxito de

fecundación al aumentar el tiempo de exposición, teniendo su máximo aproximadamente en 20% de larvas normales tras un tiempo de exposición de 20 minutos. Al aumentar el pH a 9.0 observamos que los porcentajes de éxito aumentan hasta el 25% tras 10 minutos de exposición (esta es la mejor combinación en este experimento), pero que con 20 minutos ya disminuye considerablemente hasta menos del 15%. Al seguir aumentando el pH y los tiempos de exposición los porcentajes de éxito disminuyen y se mantienen entre el 10 y el 15%.

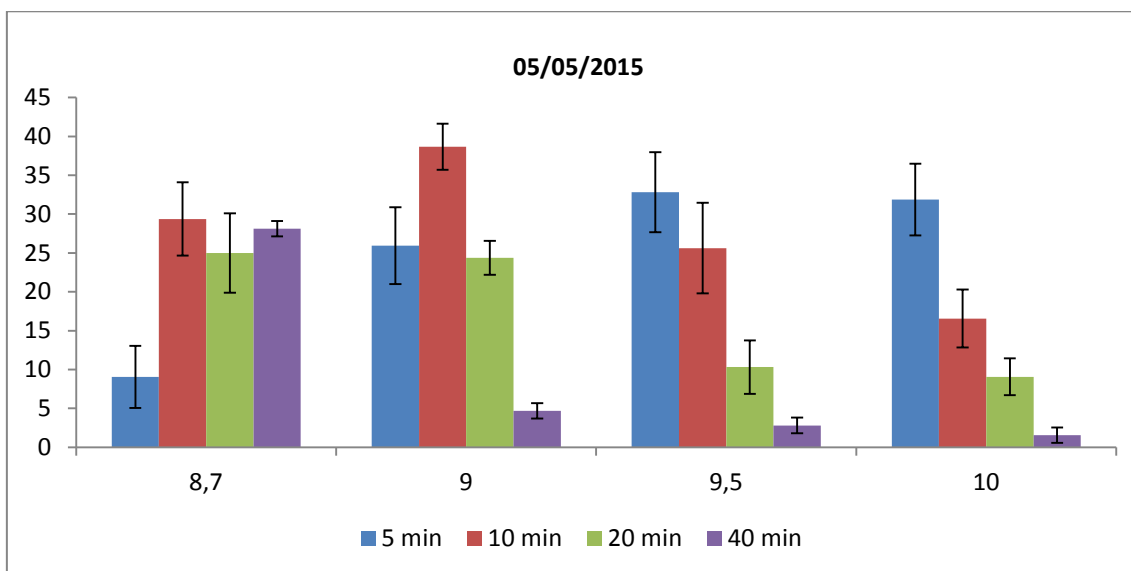


Figura 4: porcentaje de larvas normales obtenidas en los distintos tratamientos de pH (9.0, 9.5 y 10.0) y tiempos de exposición (10, 20 y 40 minutos) en la prueba realizada el 05/05/2015.

En esta última prueba, los porcentajes obtenidos en cualquier caso son más altos que en pruebas anteriores, esto puede ser debido a que todos los individuos empleados son de estadio V. Se observa claramente como a pH altos, el porcentaje disminuye al ir aumentando el tiempo de exposición, siendo menores a pH 10.0 que a pH 9.5. Mientras que, a pH bajos, se necesita más tiempo. En este caso, el porcentaje más alto se obtiene a pH 9.0 durante 10 minutos, con un éxito próximo al 40%.

En general, se puede observar que para todos los pH probados el éxito en el desarrollo embrionario disminuye a mayor tiempo de exposición, y que con los mismos tiempos de exposición el éxito es menor según aumentamos el pH, porque dañan los ovocitos. Se observa que dentro de todos los pH y tiempos probados, los mejores resultados en todas las pruebas se obtuvieron con la combinación pH 9.0 durante 10 minutos. Con pH más bajo, se obtienen también buenos resultados, sobre el 30% de larvas normales pero es necesario alargar el tiempo de exposición a 40 minutos, por lo que sería menos práctico, ya que se alargaría el bioensayo.

A penas se encuentran trabajos similares al nuestro. El trabajo de Hodgson *et al.* (2007) realizado con otras especies de *Patella* (*P. ullysiponensis* y *P. vulgata*) encontraron resultados similares a los nuestros, y obtuvieron los mayores porcentajes de larvas trocóforas, después de alcalinizar los ovocitos durante 10 minutos a pH 9

utilizando hidróxido amónico como base alcalinizadora. El único trabajo realizado con *P. depressa* (Aquino de Souza *et al.* 2009), mostró mejores resultados utilizando como base alcalinizadora hidróxido sódico a pH 9.5, en lugar de NH_4OH , con un tiempo de alcalinización menor de una hora. Trabajos previos, realizados en el laboratorio en el marco de este proyecto, mostraron también buenos resultados utilizando NaOH aunque se requerían tiempos de exposición mucho mayores, porque lo que decidió utilizarse hidróxido amónico como base alcalinizadora.

Prueba 2: comparación del éxito en la fecundación con diferentes concentraciones de espermia y ovocitos

En las siguientes gráficas se representan los resultados obtenidos en porcentaje de larvas normales, tras probar diferentes concentraciones de espermia para la fecundación (gráfico 05/05/2015) y las mismas concentraciones de espermia combinándolas con diferentes concentraciones de ovocitos.

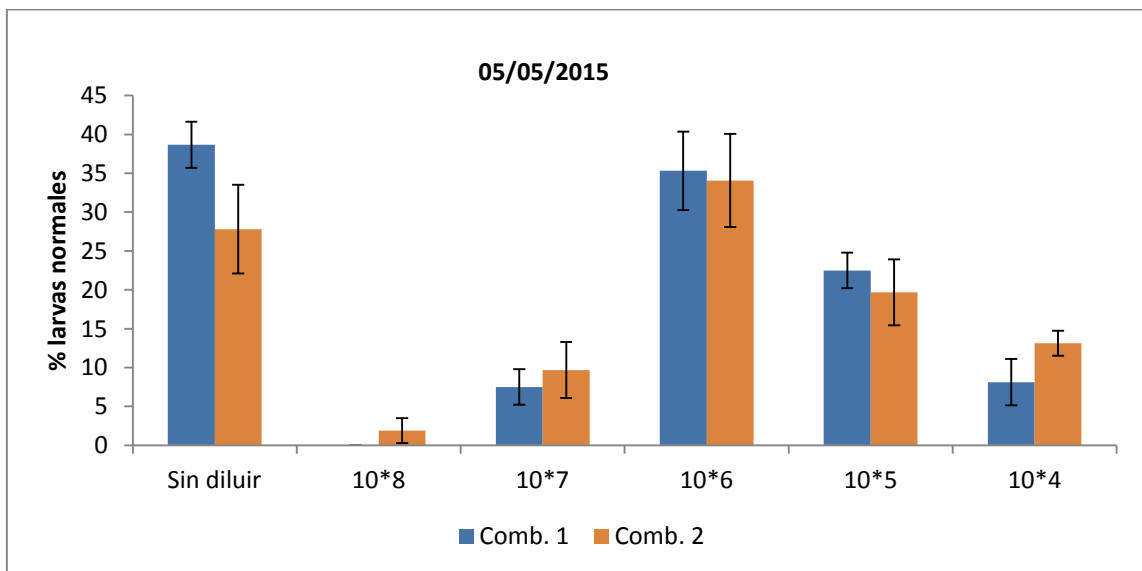


Figura 5: porcentaje de larvas normales obtenidas en cada una de las concentraciones de espermia (sin diluir, sin diluir, 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5) para las dos combinaciones (1, machos empleados en otra prueba; 2, machos nuevos) en la prueba realizada el 05/05/2015.

Se realizaron dos pruebas utilizando diferentes machos aunque todos en estadio V.

Se observan resultados muy similares independientemente de los machos empleados. Las concentraciones más adecuadas son “sin diluir”, con un porcentaje de éxito medio del 32.5%, y la concentración de 10^6 con un éxito del 35%. Sin embargo se observa como para las diluciones de 10^8 y 10^7 , los porcentajes son muy bajos. Esto puede ser debido a que la concentración de espermia sea demasiado alta, produciéndose poliespermia y por tanto, larvas anormales. Las concentraciones de 10^5 y 10^4 también resultan en porcentajes menores, probablemente por no haber espermia suficiente para la fecundación.

Hodgson *et al.* (2007), en su estudio con las especies *P. vulgata* y *P. ulyssiponensis*, encontraron que la concentración de esperma que producía el mayor éxito en la fecundación fue entre 10^5 y 10^7 espermatozoides/mL. Por otro lado Aquino de Souza *et al.* (2009), utilizaron en su estudio una concentración de esperma entre 10^4 y 10^6 , que fue con la que obtuvieron mejores resultados para *P. depressa*.

En nuestro caso, aunque los mejores resultados se obtuvieron con esperma "sin diluir" y con la dilución 10^6 , puesto que la utilización de esperma "sin diluir", es decir, añadiendo directamente unos μL de esperma (la punta de una pipeta Pasteur), supone una menor manipulación del material biológico, que el uso de una solución diluida o partir de un stock de esperma (10^6), parece mejor utilizar esperma "sin diluir" igual que se hace en otros bioensayos embrio-larvarios (Fernández y Beiras, 2001).

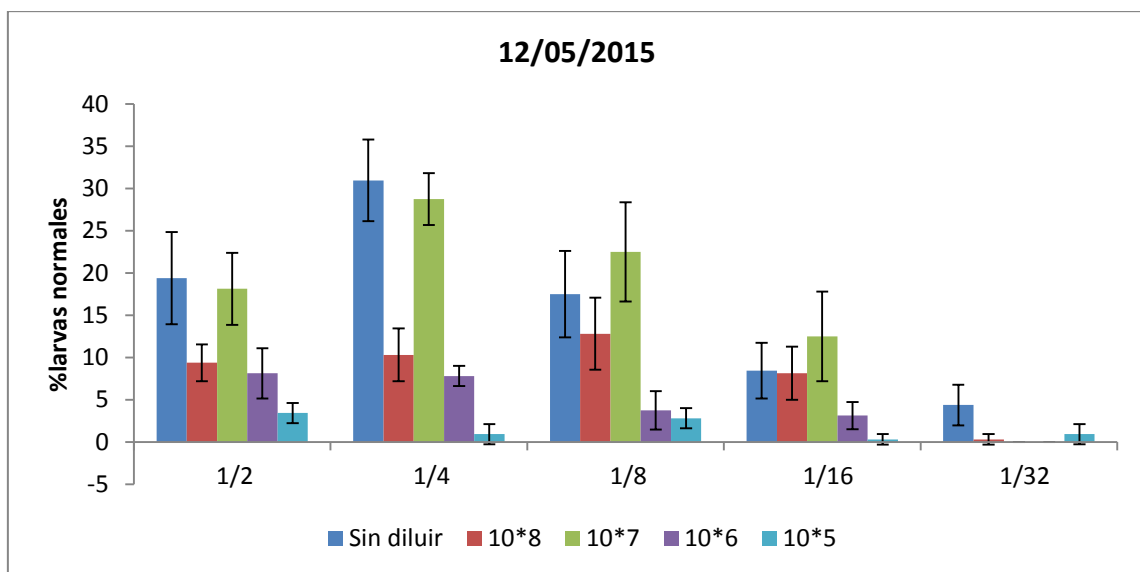


Figura 6: porcentaje de larvas normales obtenidas en cada una de las combinaciones de esperma (sin diluir, sin diluir, 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5) y ovocitos (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32).

En esta prueba, se combinaron también diferentes concentraciones de ovocitos con las mismas concentraciones de esperma que en la prueba anterior. En estos resultados se observa, que las tres primeras concentraciones de ovocitos (las 3 más altas) son las más adecuadas, ya que son las que tienen un porcentaje de éxito mayor, y dentro de ellas, las combinaciones con las diluciones de esperma "sin diluir" y 10^7 son las que presentan mejores resultados, alcanzando un máximo del 32% con la combinación esperma "sin diluir" y concentración de ovocitos 1/4 (194.45 ovocitos/mL). También se obtiene un valor ligeramente inferior (28%) con la misma concentración de ovocitos pero la concentración 10^7 de esperma. Por otro lado, se observa como al disminuir la concentración de ovocitos y esperma, disminuye también el porcentaje de éxito, siendo mínimo con la concentración 1/32.

Prueba 3: determinación de la toxicidad de metales pesados sobre el desarrollo embrionario de *P. depressa*.

En las siguientes gráficas, se representa el % de larvas normales obtenidas en los bioensayos de toxicidad realizados.

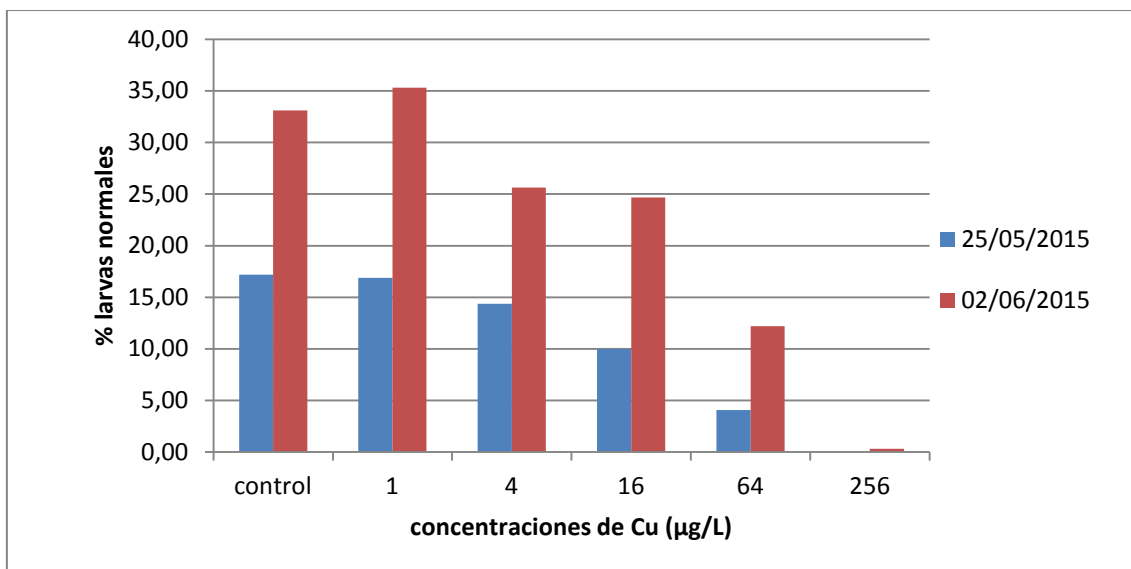


Figura 7: porcentaje de larvas normales obtenidos, en el control y en las distintas concentraciones de Cu, en las dos pruebas realizadas el 25 de mayo y 2 de junio de 2015.

Para el Cu, podemos observar que, para ambas pruebas, con una concentración de 1µg/L obtenemos un resultado similar al obtenido con el control. Pero que a partir de esta concentración, comienza a resultar tóxico, disminuyendo el porcentaje de larvas normales por debajo del 50% (respecto al control) a partir de 64µg/L, y siendo letal la concentración de 256µg/L.

La variación del porcentaje de éxito en el desarrollo larvario en ambas pruebas, debe ser consecuencia de la calidad de los gametos, ya que en la segunda prueba se emplearon individuos de estadio V, y en la primera estaban en estadio III y IV (por no tener disponibilidad de organismos en estadio V).

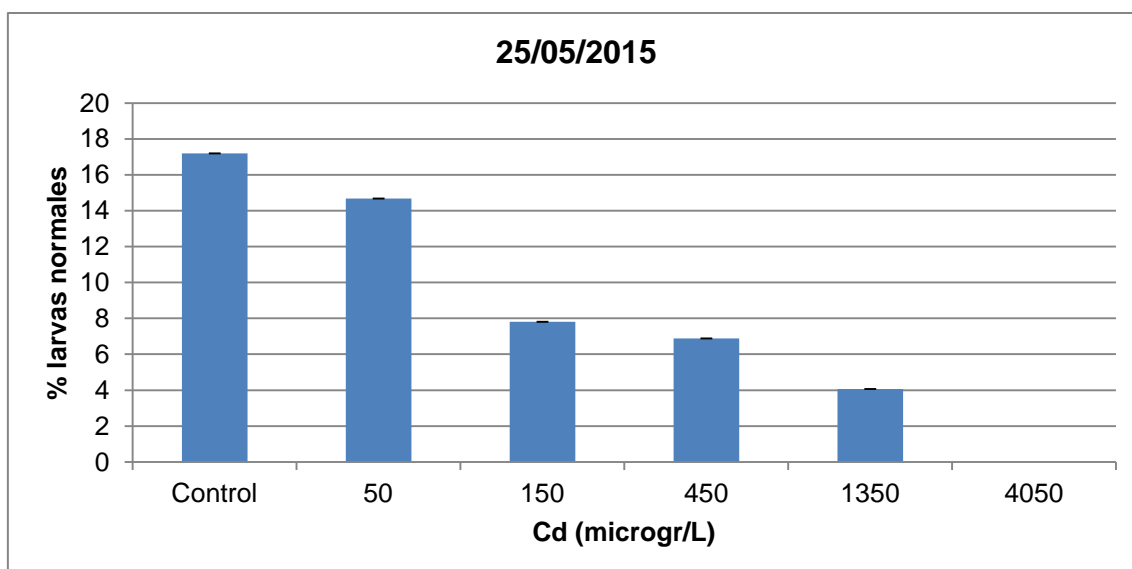


Figura 8: porcentaje de larvas normales obtenidos, en el control y en las distintas concentraciones de Cd.

En la prueba de toxicidad de Cd, podemos observar como la concentración de 50µg/L, ya resulta tóxica, ya que su porcentaje de éxito es inferior al obtenido en el control. El éxito en la embriogénesis disminuye aproximadamente un 50% con respecto al control a 150µg/L, e impide el desarrollo embrionario a una concentración de 4050µg/L.

5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en las pruebas de optimización del protocolo de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario de *P. depressa*, recomendamos:

1. Madurar los ovocitos mediante exposición a agua de mar alcalinizada con hidróxido amónico a pH 9.0 durante 10 minutos.
2. La concentración de esperma óptima para la fecundación *in vitro*, sería "sin diluir", mediante adicción directa del esperma del macho con ayuda de una pipeta Pasteur. La concentración de ovocitos óptima, es 194.45ovocitos/mL.

En cuanto a la toxicidad de los metales pesados, concluimos que el Cu y el Cd resultan tóxicos para el desarrollo embrionario de *P. depressa* a las siguientes concentraciones:

1. El cobre, disminuye el porcentaje de éxito en el desarrollo embrionario un 50% respecto al control a una concentración de 64µg/L, e impide el desarrollo a concentraciones de 256µg/L.
2. El cadmio, disminuye el porcentaje de éxito en el desarrollo embrionario un 50% respecto al control a partir de una concentración 150µg/L, e impide el desarrollo embrionario a una concentración de 4050µg/L.

6. Conclusions

Based on the results obtained, we recommend:

1. To mature oocytes by exposition to alkalized sea water with ammonium hydroxide at pH 9.0 for 10 minutes.
2. The optimal sperm concentration for *in vitro* fertilization would be "undiluted sperm", through direct addition of the sperm with the end of a Pasteur pipette. The optimal concentration of oocytes is 194.45oocytes/mL.

Regarding the toxicity of heavy metals, we conclude that Cu and Cd are toxic to the embryonic development of *P. depressa* at the following concentrations:

1. Copper decreases the embryo development success, 50% with respect to the control at a concentration of 64µg/L, and prevents the embryo development at a concentration of 256µg/L
2. Cadmium decreases the percentage embryo development success, 50% respect to the control at a concentration of 150µg/L concentration, and prevents the embryonic development at a concentration of 4050µg/L.

7. Bibliografía

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.

Fernández N., Beiras R. (2001). Combined Toxicity of Dissolved Mercury with Copper, Lead and Cadmium on Embryogenesis and Early Larval Growth of the *Paracentrotus lividus*. Sea-Urchin. *Ecotoxicology* 10: 263 - 271.

Fernández N., Alborés I., Aceña Matarranz S. (2015) Characterization of the reproductive cycle and physiological condition of *Patella vulgata* in the NW of the Iberian Peninsula: Relevant information for a sustainable exploitation. *Fisheries Research* 164: 293 - 301

His E., Beiras R., Seaman MNL. (1999). The assessment of marine pollution-Bioassays with bivalve embryos and larvae. *Advances in Marine Biology*, Vol. 37. Southward, AJ; Tyler, PA.; Young, CM (eds). Academic Press, London

Hodgson A. N., Quesne W.J., Hawkins S., Bishop J.D. (2007). Factors affecting fertilization success in two species of patellid limpet (Mollusca: Gastropoda) and development of fertilizationkinetics models. *Marine Biology* 150: 415-426.

Mhadhbi L., Boumaiza M., Beiras R. (2010). A standard ecotoxicological bioassay using early life stages of the marine fish *Psetta maxima*. *Aquatic Living Resources* 23, 209-216

O'Connor T.P. (1996). Trends in chemical concentrations in mussels and oysters collected along the US coast from 1986 to 1993. *Marine Environmental Research* 41: 183-200.

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.

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* 89 (6): 1215–1221