

LÍNEA GERMINAL Y CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA DEL OVARIO DE *FISSURELLA CRASSA* (LAMARCK, 1822)

GERMINAL LINE AND PROGESTERONE CONCENTRATION OF THE OVARY IN *FISSURELLA CRASSA* (LAMARCK, 1822)

ANGÉLICA DEL CAMPO A.¹ (MV); LAURA G. HUAQUÍN M.¹ (PROF. BIOL.);
BESSIE URQUIETA M.¹ (QF, MG Cs)

SUMMARY

The objectives were to describe the histology of the ovary in *Fissurella crassa*, characterizing the diverse stages of gonadal maturity, to detect the presence of progesterone in the ovary and to analyze a possible relation between the latter and the stage of gonadal maturity. Females keyhole limpet of 45 mm in size, (total n = 60) were collected in the Montemar area (V Region, Chile), during five months (n = 12/month). The histology analysis of each specimens ovary was made on 5µm thick tissue sections, dyed with Haematoxylin-Eosin using light microscopy. Finally, to evaluate the ovarian progesterone concentration, after an extraction procedure, a solid phase radioimmunoassay (RIA) technique (D.P.C., Coat-A-Count ®) was used. Through the ovarian structure analysis, both macroscopic and microscopic, it can be concluded that *F. crassa* has similar morphological, reproductive and gametogenic characteristics to other species of the Fissurellidae family. The statistical analysis (ANOVA and Tukey's test) indicated a significant difference ($p < 0.05$) in the progesterone concentration between the month of august and april on respect to december and february. October's sample is not significantly different from the others. In addition, it does not exist a strong correlation between the degree of maturity of the ovary and the ovarian progesterone concentration (Pearson's Correlation = 0.56).

KEY WORDS: Keyhole limpet; *Fissurella crassa*; ovary germinal line; ovarian progesterone concentration.

PALABRAS CLAVE: Lapa, *Fissurella crassa*; línea germinal del ovario; concentración ovárica de progesterona.

INTRODUCCIÓN

La lapa (*Fissurella sp.*), molusco archaeogastropoda, extraído habitualmente para la alimentación humana (Bretos, 1988), constituye una buena fuente proteica y se clasifica dentro de las especies marinas magras (Sierra y col., 1991). Su desembarque ha sido relativamente estable en los últimos años, con un promedio de captura de 2.422 toneladas en-

tre 1992 y 2002 (Sernapesca, 2002). Su captura desde los bancos naturales ha aumentado progresivamente en los últimos años, debido a sus características físico-organolépticas muy similares al loco (*Concholepas concholepas*) y al abalone (*Haliotis sp.*). El alza en los precios y el consecuente aumento de las exportaciones, sumado a la falta de vedas, hacen pensar en una posible crisis de este recurso en el futuro. Son escasos los antecedentes disponibles (Vega, 1992) en relación con la biología reproductiva de la especie. Se señala para las especies del género que pueden evacuar gametos durante casi todo el año o que presentan desoves dos veces al año (Bretos y col.; 1988 (A); Bretos y col.; 1988 (B); Bretos y Chihuailaf, 1990). Con respecto a la descripción de la línea germinal, existen estudios

¹ Departamento Ciencias Biológicas Animales, Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile. tatydelcampo@netnow.cl lhuaquin@uchile.cl burquiart@uchile.cl

sobre la base del tamaño del ovocito en *F. barbadensis*, realizados por Ward (1966). En los estudios reproductivos que describen ovocitos recién desovados se indica que éstos no poseen cubierta folicular (Jong-Brink y col., 1983). Tanto para el manejo sustentable de las especies como para el desarrollo de procedimientos de cultivo de ellas es necesario conocer los procesos reproductivos y de crecimiento y su regulación. Los objetivos de este trabajo fueron describir histológicamente el ovario de *Fissurella crassa*, caracterizando los diversos estados de madurez gonadal de esta especie; detectar la presencia de progesterona en la gónada y analizar si existe relación entre la concentración hormonal con el estado de madurez gonadal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con un total de 60 lapas hembras, mayores de 45 mm de longitud de concha, recolectadas en el sector de Montemar (V Región), mensualmente, durante agosto, octubre y diciembre de 1997; febrero y abril de 1998 (n = 12/mes). Luego de identificar las hembras se registraron la longitud y ancho de la concha, peso total, peso blando del animal y el de cada ovario, determinándose el Índice Gonadosomático (IGS):

[IGS = (Peso de la gónada / Peso blando) x 100], el cual corresponde a la relación entre el peso de la gónada con respecto al peso total de las partes blandas.

El análisis histológico del ovario de cada individuo se realizó obteniendo una muestra de 5 a 8 mm³ de tejido gonadal que se fijó en Bouin alcohólico. Cortes histológicos de 5µm de grosor, fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Además, con el objeto de diferenciar en forma clara y selectiva los diversos elementos que comprenden el estroma ovárico, se realizaron dos tinciones complementarias: Van Gieson para identificar fibras colágenas y PAS (Ácido Peryódico Shiff) para glicosaminoglicanos.

El estudio de los cortes histológicos de los ovarios se dividió en dos partes principales: la primera fue realizar una descripción de la línea germinal de *F. crassa*. La segunda fue clasificar los cinco estados (E°) de madurez histológica del ovario: inmaduro E° 0, en maduración temprana E° 1, en maduración avanzada E° 2, maduro E° 3 y desove E° 4, según las características de la línea germinal y estructurales de la gónada.

Finalmente, con el objeto de estimar la concentración ovárica de progesterona, se tomaron 2; 1 o 0,5 g de gónada, respectivamente, según el peso de cada ovario y posteriormente se congelaron a -20 °C, hasta su procesamiento. La progesterona contenida en la fracción lipídica del tejido gonadal se obtuvo mediante triple extracción con diclorometano al 99,5%, que luego se evaporó a sequedad, obteniéndose un extracto seco, el cual fue resuspendido con buffer PBS 0,01 M a pH 7,4 para proceder luego a la cuantificación por radioinmunoanálisis (RIA) (D.P.C., Coat-A-Count ®).

RESULTADOS

El ovario de *Fissurella crassa* se observa como un gran saco de color verde oscuro, multilobulado, de morfología y tamaño variable dependiendo del estado de madurez de los ejemplares. La gónada está recubierta por un epitelio simple que varía desde cúbico a columnar y al cual subyacen fibras de tejido conectivo y muscular, desde donde se proyectan trabéculas o septos gonadales. El parénquima que constituye el tejido noble del órgano está formado por las diversas células de la línea germinal. El estroma está constituido por tejido conectivo, el que posee diversos elementos celulares y una matriz extracelular (compuesta por una sustancia amorfa y elementos fibrilares). Este tejido conectivo se evagina en el interior de la gónada, formando desde la pared trabéculas de sostén o septos, los cuales recorren el espacio gonadal formando múltiples compartimientos o acinos ováricos desde donde se desarrolla la línea germinal. Estos septos van disminuyendo en grosor hasta depletarse casi por completo en el momento final de la madurez gonadal. Las células germinales se desarrollan en forma centrífuga alrededor de estos ejes.

Se analizó integralmente el tejido reconociéndose los diferentes tipos celulares que comprenden la línea germinal (LG) (Fig. 1). En el desarrollo de la LG del ovario de *F. crassa* se diferencian claramente dos líneas celulares, una Línea Germinal Temprana (LGT) y una Línea Germinal Avanzada (LGA):

- *Línea Germinal Temprana* (LGT): Ovogonia, Ovocito Previtelogénico I; Ovocito Previtelogénico II y Ovocito Previtelogénico III.
- *Línea Germinal Avanzada* (LGA): Ovocito Vitelogénico I; Ovocito Vitelogénico II y Ovocito Maduro.

FIGURA 1
DESCRIPCIÓN DE LA LÍNEA GERMINAL DE *F. CRASSA*

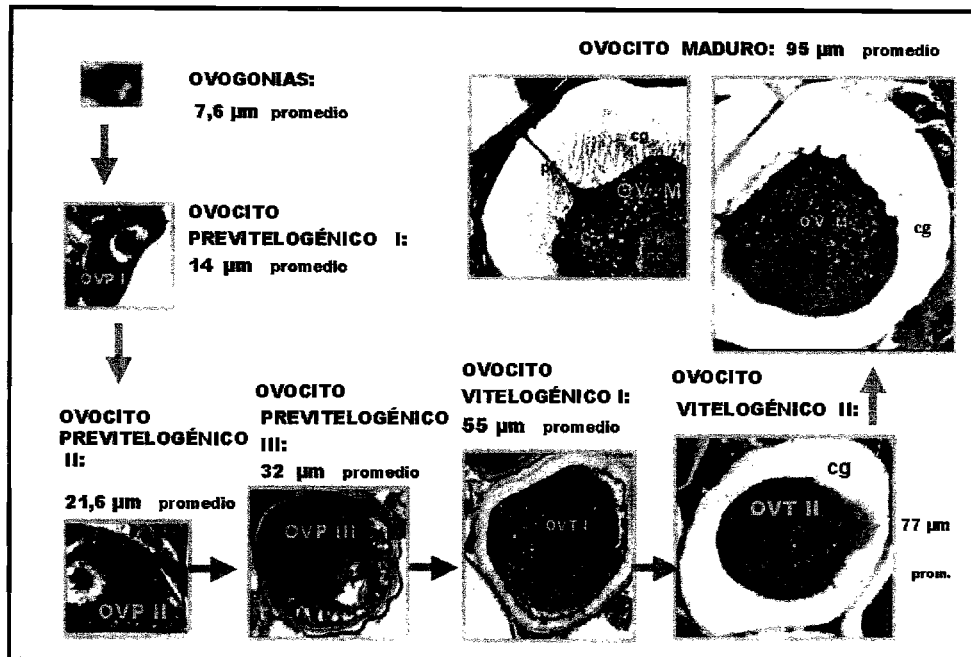
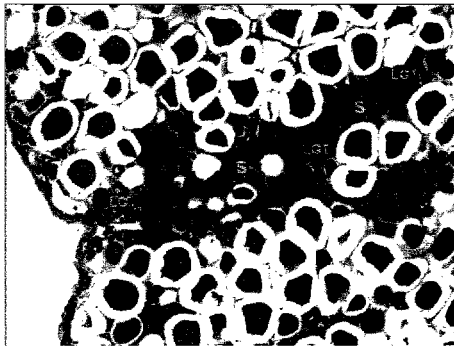
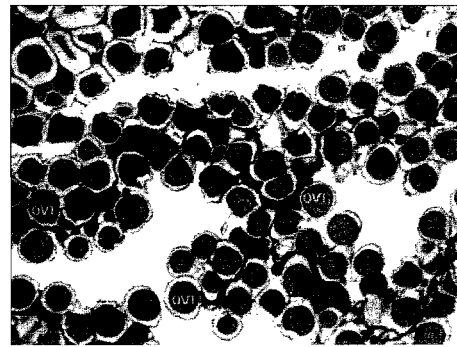


FIGURA 2
ESTADOS DE MADUREZ DEL OVARIO DE *FISSURELLA CRASSA*

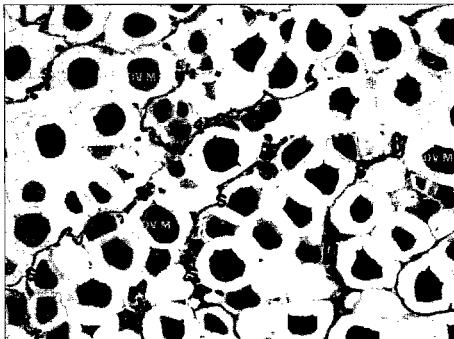
ESTADO 1



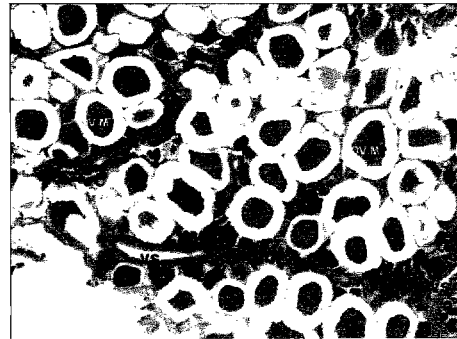
ESTADO 2



ESTADO 3



ESTADO 4



S: septos; OVM: Ovocito Maduro; LGT: Línea Germinal Temprana; OVG: Ovocitos Vitelogénicos; VS: vasos sanguíneos.

Ovogonias: Células de forma esférica, con núcleo cromóforo de alrededor de 4 μm , presencia de nucléolo fuertemente teñido, desplazado generalmente hacia un polo. Citoplasma escaso, basófilo. Las ovogonias se ubican preferentemente en los bordes de los septos ováricos, alrededor del tejido conectivo trabecular, junto a otras células de la LGT. Se pueden encontrar a lo largo de todo el ciclo reproductivo y su tamaño promedio alcanza los 7,6 μm .

Ovocito Previtelogénico I: Célula esférica a piriforme con un diámetro promedio de 14 μm , el núcleo se mantiene cromóforo, de gran tamaño (7,2 μm aproximadamente), nucléolo fuertemente teñido, central o excéntrico; el citoplasma ha aumentado de diámetro, fuertemente basófilo y de aspecto finamente granular. Estas células se encuentran dispuestas generalmente al igual que las demás células de la LGT, en las paredes de los septos gonadales. Septos que se tiñen color rojo púrpura: PAS (+), al igual que la periferia de otros tipos celulares y del espacio intercelular, evidencian la presencia de glicosaminoglicanos del tejido conectivo.

Ovocito Previtelogénico II: Célula de forma variable, siendo frecuentemente piriforme o poliédrica, de un diámetro promedio de 21,6 μm , núcleo generalmente desplazado hacia un polo, cromóforo, de forma esférica representa gran parte del tamaño celular (8,9 μm aproximadamente), nucléolo excéntrico, bien definido. El citoplasma es marcadamente basófilo cuyo aspecto finamente granular es más notorio que en el tipo celular anterior, evidenciando el inicio de la vitelogenénesis.

Ovocito Previtelogénico III: Célula de forma variable de piriforme a alargada, de un diámetro promedio de 32 μm . Núcleo cromóforo, esférico de 12,6 μm aproximadamente, de menor dimensión que los anteriores tipos celulares, en relación al tamaño total celular, nucléolo excéntrico fuertemente teñido. El citoplasma levemente eosinófilo, de aspecto fuertemente granular, da cuenta del proceso de vitelogenénesis en desarrollo. Estos ovocitos se diferencian de los anteriores, porque en ellos comienza a formarse una delgada cubierta de gelatina que mide alrededor de 2,4 μm , asociada a la membrana plasmática.

Ovocito Vitelogénico I: Célula esférica con un diámetro promedio de 55 μm , incluyendo la cubierta de gelatina. Citoplasma eosinófilo, notoriamente granular. Núcleo ligeramente esférico y central que a diferencia de los tipos celulares anteriores tiene un

aspecto eosinófilo al igual que el nucléolo. La zona de gelatinización ubicada en la periferia celular, de aspecto translúcido se hace más notoria que en el tipo celular anterior (5,28 μm aproximadamente).

Ovocito Vitelogénico II: Célula esférica, citoplasma predominantemente eosinófilo persistiendo el aspecto granular. El núcleo es casi esférico de posición central o excéntrica y se tiñe al igual que el nucléolo. En algunos ovocitos podemos observar la existencia de un pedúnculo de fijación al septo germinativo. La zona de gelatina periférica mide en promedio 13,3 μm , por lo que el tamaño total celular alcanza un promedio de 77 μm (que incluye el diámetro del ovocito más la zona de gelatina que lo rodea).

Ovocito Maduro: Célula esférica a irregular con un diámetro promedio de 95 μm , que incluye la cubierta de gelatina. El citoplasma de aspecto granular se tiñe homogéneamente con la eosina, adquiriendo una forma estrellada o esférica. La zona de gelatinización blanca que rodea al ovocito alcanza su máximo grosor 20,6 μm en promedio. En algunos casos es posible encontrar el pedúnculo de conexión, el cual con tinción PAS adquiere un color violeta oscuro.

En todas las muestras se encontraron presentes todos los tipos celulares que comprenden la LGT y la LGA, de este modo según las características de la LG y estructurales de la gónada, se clasificaron cuatro estados de madurez histológica del ovario: en maduración temprana (E° 1), en maduración avanzada (E° 2), maduro (E° 3) y desove (E° 4), caracterizados cada uno por un predominio celular distinto, según la época del año (Fig. 2).

Estado 1: en Maduración Temprana. Al observar el estroma ovárico, se puede evidenciar que los septos gonádicos son gruesos, desarrollándose en sus paredes células de la LGT, principalmente ovocitos previtelogénicos. En el parénquima, se pueden observar ovocitos vitelogénicos en distintos grados de desarrollo.

Estado 2: en Maduración Avanzada. En el estroma, los septos gonádicos disminuyen considerablemente de espesor, en algunos casos son difíciles de diferenciar. En el parénquima, existe un predominio marcado de ovocitos vitelogénicos II, pudiendo observarse al igual que él en estado anterior, ovocitos previtelogénicos, pero en escasa cantidad. Aumenta la presencia de ovocitos maduros.

Estado (3): Maduro. En el estroma se observan los septos gonadales delgados y en sus paredes pueden verse en escasa cantidad células de LGT. El pa-

FIGURA 3
CONCENTRACIÓN MENSUAL DE PROGESTERONA EN *FISSURELLA CRASSA*
(PMOL/G DE OVARIO)

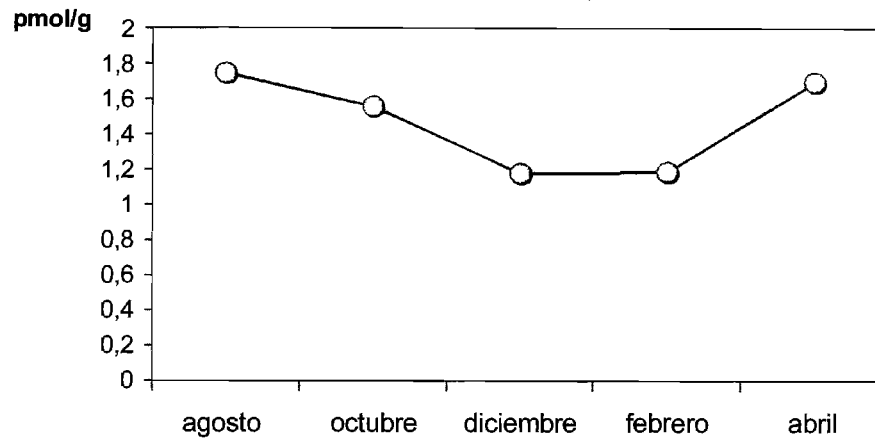


TABLA 1
VALORES MENSUALES DE LA CONCENTRACIÓN
DE PROGESTERONA

P4 (pmol/g)	agosto	octubre	diciembre	febrero	abril
prom.	1,75	1,56	1,20	1,19	1,73
(σ)	$\pm 0,60$	$\pm 1,56$	$\pm 0,50$	$\pm 0,44$	$\pm 0,40$
mín.	1,14	1,16	0,12	0,65	1,05
máx.	3,20	2,16	1,88	2,14	2,51

rénquima en su mayoría está compuesto por ovocitos vitelogénicos II y ovocitos maduros con una gruesa cubierta de gelatina. Las ovogonias son escasas, disponiéndose en la periferia, cercanas a la membrana basal.

Estado (4): Desove. En el estroma se observa un engrosamiento de los septos gonadales (en relación al estado anterior), en las paredes de los cuales predominan los ovocitos previtelogénicos, que dan cuenta del inicio de un nuevo ciclo. En el parénquima cabe señalar la presencia de un número importante de ovocitos maduros, por lo cual esta especie tendría desoves parciales y no totales. Se hace más notoria la presencia de vasos sanguíneos en el interior de los septos gonádicos, en relación a los otros estados de maduración ovárica.

Se registró un incremento del IGS de mayor magnitud en el mes de octubre (9,95) y otro secundario en febrero (8,80).

La concentración ovárica de progesterona promedio mensual (Fig. 3, Tabla 1) fue mayor en el mes de agosto (1,75 pmol/g ovario) y menor en el

mes de febrero (1,19 pmol/g ovario). El análisis estadístico (ANDEVA y Test de Tukey) indicó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración ovárica de progesterona, entre los meses de agosto y abril, con respecto a diciembre y febrero; la muestra de octubre no difiere significativamente del resto de los meses. Además, se encontró que no existe una fuerte correlación entre el grado de madurez del ovario y la concentración de progesterona (Correlación de Pearson = 0,56).

DISCUSIÓN

De acuerdo al análisis de la estructura gonadal macro y microscópica observada, se puede señalar que *Fissurella crassa* posee similares características morfológicas, reproductivas y gametogénicas que otras especies de la familia Fissurellidae, lo que concuerda con lo descrito por diversos autores, que han señalado un ciclo reproductivo continuo para las diferentes especies de este género en el litoral

chileno, encontrándose individuos maduros a lo largo del año, vale decir, que pueden evacuar gametos durante la mayor parte del año (Bretos y col., 1983; Bretos y col., 1988 (A); Bretos y col., 1988 (B); Bretos y Chihuailaf, 1990; Zúñiga, 1991; Collado, 1998; Segura, 1998). En este caso, los cuatro estados de madurez ovárica descritos son similares a los señalados por Collado para *F. latimarginata* y *F. cumingi* (1998) y Segura (1998) para *F. latimarginata*, exceptuando el E° 4: Desove en el cual, a diferencia de lo descrito para estas especies, en *F. crassa* aún es posible encontrar ovocitos en madurez avanzada y maduros al interior de la gónada. Estos resultados en *F. crassa* son coincidentes con lo descrito para *F. limbata* (Zúñiga, 1991), en que los tipos celulares dominantes en las gónadas son los ovocitos maduros, al igual que en *F. barbadosis* y *F. reticulata*, donde las gónadas se presentaron maduras y con gametos maduros luego de los desoves, evidenciando un desove parcial.

En relación al valor de IGS, existirían dos períodos de evacuación de gametos, que son concordantes con el criterio de clasificación histológica de madurez gonadal, los que fueron clasificados por la presencia de ovocitos maduros en la gónada durante el estado de desove, como desoves parciales y no totales como lo que ocurre en otras especies de lapas, como, por ejemplo, en *F. latimarginata* y *F. cumingi*.

Con respecto a hormonas esteroidales, algunos autores (Lehoux y Sandor, 1970) señalan la presencia de estrógenos, andrógenos y progestágenos en las gónadas de moluscos. En *F. crassa* se registró la existencia de progesterona medida en el ovario de ejemplares hembras. Esto coincide con la presencia de progesterona en la hemolinfa de otra especie de lapa: *F. cumingi* (Honour, 2002).

Finalmente, es evidente, que en el ciclo reproductivo de *F. crassa* es necesario aún despejar interrogantes en relación a la interrelación de todos los factores neuroendocrinos involucrados, tanto los esteroidales como los de naturaleza proteica, los que no pueden ser considerados como procesos aislados, al igual que otros parámetros como la temperatura, fotoperíodo y alimentación, entre otros. En la medida que se avance en el conocimiento de la interacción de todas las variables que influyen y modelan los ciclos reproductivos, en su conjunto, se podrá manejar el momento óptimo para someter a los individuos a estímulos inductivos de manera de obtener desoves masivos y controlados, que permitan llevar a cabo la producción de lapas de manera eficiente en cuanto a la calidad y cantidad de

gametos, asegurando un desarrollo sustentable del recurso en el tiempo.

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron describir histológicamente el ovario de *Fissurella crassa*, caracterizando los diversos estados de madurez gonadal de esta especie; detectar la presencia de progesterona en la gónada y analizar si existe relación entre la concentración hormonal con el estado de madurez gonadal. Se trabajó con 60 lapas hembras, mayores de 45 mm de longitud de concha, recolectadas durante 5 meses ($n = 12/\text{mes}$) en el sector de Montemar (V Región). El análisis histológico del ovario de cada individuo se realizó obteniendo cortes de 5 μm de grosor, los que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Finalmente, con el objeto de estimar la concentración ovárica de progesterona se realizó radioinmunoanálisis (RIA) (D.P.C., Coat-A-Count®). De acuerdo al análisis de la estructura gonadal macro y microscópica observada, se puede concluir que *F. crassa* posee similares características morfológicas, reproductivas y gametogénicas que otras especies de la familia Fissurellidae. El análisis estadístico (ANDEVA y Test de Tukey) indicó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de progesterona, entre los meses de agosto y abril, con respecto a diciembre y febrero. El mes de octubre no difiere significativamente del resto de los meses. Además, se encontró que no existe una fuerte correlación entre el grado de madurez del ovario y la concentración de progesterona (Correlación de Pearson = 0,56).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Adarmes, por sus valiosas sugerencias; a la Dra. Raquel Cepeda, por su colaboración y buena disposición al facilitar el laboratorio de Histología para realizar parte de este trabajo; al Dr. Carlos González, por su ayuda en la obtención de microfotografías, y la colaboración de la Dra. Valeria Rojas y equipo de computación, pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. A la ayuda del Sr. Juan Soto (Caleta Montemar, V Región) en la recolección de los ejemplares y a la Dra. Bernardita Campos (Universidad de Valparaíso), por las facilidades de manutención en acuarios.

REFERENCIAS

- BRETOS, M., I. TESORIERI, L. ÁLVAREZ. 1983. The biology of *Fissurella maxima* Sowerby (Mollusca: Arqueogastropoda) in Northern Chile. 2. Notes on its reproduction. Biol. Bull. 165: 559-568.
- BRETOS, M. 1988. Pesquería de lapas en Chile. Medio Ambiente 9(2): 7-12.
- BRETOS, M., V. QUINTANA, V. IBARROLA. 1988 (A). Bases biológicas para el manejo de *Fissurella nigra*. Medio Ambiente 9 (1): 55-62.
- BRETOS, M., J. GUTIÉRREZ, Z. ESPINOZA. 1988 (B). Estudios biológicos para el manejo de *Fissurella picta*. Medio Ambiente 9 (1): 28-34.
- BRETOS, M., R. CHIHUAILAF. 1990. Biometría y otros aspectos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosobranchia). Rev. Biol. Mar. 25(1): 1-14.
- COLLADO, G. 1998. Aspectos de la sexualidad como propiedades biológicas de diferenciación en dos especies de *Fissurella* Bruguière, 1789. Tesis de grado. Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso. 86 pp.
- HONOUR, J. 2002. Análisis abiótico, hormonal y patológico de la fisiología reproductiva de *Fissurella cumingi* (Reeve, 1849) para la definición de innovaciones tecnológicas productivas. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Acuicultura y al Grado Académico de Licenciado en Cs. de la Acuicultura. Fac. de Ecología y Recursos Naturales. Escuela de Cs. del Mar. Universidad Nacional Andrés Bello. 147 pp.
- JONG BRINK, H., H.H. BOER, J. JOOSSE. 1983. Reproductive biology of invertebrates. Mollusca I. In: Adiyodi, K.G. and Adiyodi R.G. Ed. Reproductive biology of invertebrate. Oogenesis, oviposition and oosorption. J. Wiley, Chichester, New York. 1983, pp. 297-355.
- LEHOUX, J.G., T. SANDOR. 1970. The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates. A review. Steroids 16: 141-171.
- SEGURA, C. 1998. Evaluación de la función gonadal de *Fissurella latimarginata* (Sowerby, 1835) de Caleta Coloso, Antofagasta. Tesis de grado. Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta. 70 pp.
- SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca). 2002. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Valparaíso. Chile.
- SIERRA, M.G., I. ELLENBERG, M.E. LÓPEZ, G. TEJO. 1991. Composición física y química proximal de las especies de lapas *Fissurella picta* y *F. nigra* extraídas en Bahía Mansa, Osorno, X Región, Chile. Biota, 7 (1-2): 1-6.
- VEGA, A. 1992. Primeros Estadios del Desarrollo Larval de *Fissurella crassa* (Lamarck, 1822) y efecto castrador de *Proctoeces lintoni* Siddiqi y Cable 1960, en la fecundidad. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Tesis de grado. Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta. 44 pp.
- WARD, J. 1966. The Breeding Cycle of the Keyhole Limpet *Fissurella barbadensis* Gmelin. Bulletin of Marine Science, 16 (4): 685-695.
- ZÚÑIGA, J.C. 1991. Ciclo reproductivo, talla de primera madurez sexual y parasitosis de *Fissurella limbata* Sowerby 1835 en Fray Jorge (Molusca: Archaeogastropoda: Fissurellidae). Tesis Licenciado en Cs. del Mar. Universidad Católica del Norte. 74 pp.