



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA
Y VARIACIONES HISTOLÓGICAS DEL OVARIO
EN *Fissurella crassa* (LAMARCK, 1822)**

ANGÉLICA TATIANA DEL CAMPO AHUMADA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: LAURA HUAQUÍN MORA

**SANTIAGO, CHILE
2004**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
DE CIENCIAS VETERINARIAS

CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA Y VARIACIONES HISTOLÓGICAS DEL OVARIO EN *Fissurella crassa* (LAMARCK, 1822)

ANGÉLICA TATIANA DEL CAMPO AHUMADA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

NOTA FINAL:

| | | NOTA | FIRMA |
|--------------------|----------------------------|---------|-------|
| PROFESOR GUÍA | : LAURA HUAQUÍN MORA | : | |
| PROFESOR CONSEJERO | : BESSIE URQUIETA MANGIOLA | : | |
| PROFESOR CONSEJERO | : HÉCTOR ADARMES AHUMADA | : | |

SANTIAGO, CHILE
2004



DEDICATORIA

A Dios, quien habita en mí, y que hace de mi vida, un camino distinto...

A mi razón de existir, mi querido hijo Oscar José,

A mi amado amigo, compañero y esposo Oscar,

*A quienes me dieron la vida, su amor y su esfuerzo, mis Padres: Mónica y Moisés,
en especial a mi mamá, quien año a año me ayudo a salir adelante.*

A mi gran amiga y apoyo incondicional, mi Tía Alicia,

A mi suegra Adriana, por toda su preocupación y apoyo,

A mi suegro Oscar, por todo su cariño y que es mi guía desde el cielo

*A mis abuelitos José y Celia, por acompañarme en mi niñez
y aunque ya no estén, seguirán día a día a mi lado.*

A mi amada y recordada Abuelita Juana, que seguirá viva en mí por siempre...





AGRADECIMIENTOS

Es difícil poder enumerar a tantas personas, que han hecho posible que el día de hoy este aquí, al final de un proceso, que muchas veces pensé, que no llegaría... aunque algunas de ellas, ya no están aquí, su recuerdo las mantiene vivas dentro de mí, por lo mucho que me entregaron en vida.

A todos ¡Gracias de corazón! en primer lugar, a *Dios*, a toda mi hermosa y gran familia, en especial: mi mamá, papá, tía Alicia, abuelita Juana, mis abuelitos José y Celia, mis hermanas, mis tíos Adriana y Oscar, todos mis sobrinos, tía Rebeca, primos Mary y Raúl, tíos Sara y Oscar, mi cuñado Manuel y mis "grandes tesoros": mi amado hijo y esposo, quienes me ayudaron en este largo camino a perseverar y continuar adelante.

A mi querida profesora "guía", Laura Huaquín Mora, que con mucho cariño sobrepasó con creces los límites de ser guía y tuvo siempre mucha paciencia y cariño para orientarme en todo este proceso y además, doy gracias a mis profesores consejeros: Bessie Urquieta y Héctor Adarnes, quienes me orientaron y generosamente me brindaron parte de su tiempo; también debo agradecer a la Dra. Raquel Cepeda, por su aporte en la tinción de los cortes histológicos de este trabajo y también al Dr. Carlos González, por su colaboración en las fotografías de los mismos.

En nuestra facultad, agradezco con mucho cariño a todos mis profesores que me ayudaron en mi formación profesional, y también a los funcionarios de nuestra facultad. En este largo camino doy gracias a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo para alcanzar esta meta, en especial a: María Teresa Salamé, Cecilia Palominos, Santiago Urcelay, Valeria Rojas, Carlos Alvear, Héctor Hidalgo, Enrique Pinto, Sergio Cornejo, César Orostegui, Alvaro Cabrera, Judith Gálvez, Dr. Eduardo Larraechea, Dra. Emilia Almarza, Dr. Horacio Zepeda y Dra. María Angélica Peñailillo; Tulio Silva, Pedro Parada, Sergio Poblete, Patricia Núñez, Paula Muñoz, Fernanda Urrutia, Susana Venegas, Cecilia Meza y Jaime Solorza.

Y finalmente a mis grandes amigos, que aprenden junto a mí las lecciones de la vida ... los que me han hecho sentir, que mis caídas, no son fracaso... sino una instancia de crecimiento y superación, y que no se es nadie, sino se ama de corazón a los demás: Marianela Aguilera, Graciela Asenjo, Lorena Godoy, Carla Vergara, Mónica González, María Isabel Asenjo, Leonardo Paredes, Nelson Toledo, Alejandra Holzapfel, Leonardo Palma, Ricardo Cortés, Adrián Fernández, Juan Puga, Claudio Parra, Angela Tichauer, Rodrigo Sanhueza, Juan Manuel Uribe, Felipe Ulriksen, Miguel Mejías, Andrea Clavero, Carolina Flores, Luis Carrasco, familia Quiñones Palma, familia Arenas Bermudes, María Guzmán, Miguel Jerez, Elisa Spotorno, Marian Cáceres, en fin ... a todos mis amigos, que están en mi corazón y que me faltaría papel para poder nombrarlos a todos y agradecerles a uno por uno.

Gracias a Dios, por permitirme escoger esta hermosa carrera, en esta gran universidad, mi querida Universidad de Chile y enseñarme que la mayor recompensa de nuestro trabajo, no es lo que recibimos por él, sino aquello en lo que nos convierte...



INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|----|
| DEDICATORIA | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS | 7 |
| RESUMEN | 12 |
| SUMMARY | 12 |
| I. INTRODUCCIÓN | 14 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 1. Aspectos Generales | 19 |
| 2. Consideraciones Reproductivas | 21 |
| • Sistema Reproductor | 21 |
| • Ciclo Reproductivo | 25 |
| • Factores que afectan al Ciclo Reproductivo | 26 |
| • Índice Gonado Somático (IGS) y su relación con los períodos de desove | 29 |
| • Histología del Ovario | 31 |
| • Ovogénesis | 32 |
| • Clasificación de la Condición Gonadal | 36 |
| 3. Hormonas Esteroidales | 40 |
| • Progesterona | 42 |
| III. OBJETIVOS | 45 |
| 1. Objetivo General | 45 |
| 2. Objetivos Específicos | 45 |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 46 |
| 1. Histología | 48 |
| 2. Descripción de las células de la línea germinal de <i>Fissurella crassa</i> | 50 |
| 3. Radioinmunoanálisis (RIA) | 58 |
| 4. Análisis de los Resultados | 59 |

| | |
|--|------------|
| • Cálculo y Análisis Estadístico del Índice Gonadosomático (IGS) | 59 |
| • Análisis Histológico..... | 60 |
| • Concentración de Progesterona | 60 |
| • Relación entre Concentración de Progesterona y Estado de Madurez Ovárica | 60 |
| V. RESULTADOS | 61 |
| 1. Índice Gonadosomático (IGS)de <i>Fissurella crassa</i> | 62 |
| 2. Histología del Ovario de <i>Fissurella crassa</i> | 63 |
| 3. Estados de Madurez Ovárica en <i>Fissurella crassa</i> | 67 |
| 4. Distribución Mensual de los Estados de Madurez Gonadal de <i>Fissurella crassa</i> | 74 |
| 5. Concentración Gonadal de Progesterona en <i>Fissurella crassa</i> | 75 |
| 6. Relación entre el Estado de Madurez Gonadal y la Concentración de Progesterona en <i>Fissurella crassa</i> | 77 |
| VI. DISCUSIÓN | 79 |
| VII. CONCLUSIONES | 86 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 88 |
| IX. ANEXOS | 102 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------|---|----|
| TABLA 1: | Desembarque Total de Moluscos y de Lapa (<i>Fissurella sp.</i>) año 2000- 2001 y Tipo de Producción (SERNAPESCA, 2000 y SERNAPESCA, 2001) | 15 |
| TABLA 2: | Distribución del Desembarque Total y Tipo de Producción de Lapa (<i>Fissurella sp.</i>) años 1990-2001. (SERNAPESCA, 2000 y SERNAPESCA, 2001) | 15 |
| TABLA 3: | Precios de Mercado de Exportación de Lapa (<i>Fissurella sp.</i>) desde el año 1990 hasta octubre de 2000 (IFOP, 2001, citado por Honour,2002) | 16 |
| TABLA 4 A: | Rendimiento en Carne de <i>Fissurrella picta</i> y <i>Fissurrella nigra</i> (Sierra <i>et al.</i> , 1991) | 17 |
| TABLA 4 B: | Composición Química Proximal, en base seca, de <i>Fissurrella picta</i> y <i>Fissurrella nigra</i> (% de parte comestible) (Sierra <i>et al.</i> , 1991) | 17 |
| TABLA 5: | Determinación de la Edad en <i>F. crassa</i> (Bretos, 1980 a) | 23 |
| TABLA 6: | Valores mensuales: Peso Total, Peso Blando, Peso Gónada , Largo de Concha, Ancho de Concha e Índice Gonadosomático (IGS) | 61 |
| TABLA 7: | Distribución mensual absoluta y porcentual de los estados de madurez gonadal de <i>Fissurella crassa</i> | 74 |
| TABLA 8: | Valores Mensuales de la Concentración de Progesterona. de <i>Fissurella crassa</i> | 76 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| FIGURA 1: | Distribución Nacional de la Lapa (<i>Fissurella sp.</i>) | 20 |
| FIGURA 2: | <i>Fissurella crassa</i> (Lamark, 1822) | 21 |
| FIGURA 3: | Ovocito de <i>Fissurella crassa</i> "in vivo" | 24 |
| FIGURA 4: | Desove en <i>Fissurella crassa</i> , recorrido de los gametos desde la gónada, hasta ser liberados al medio externo | 25 |
| FIGURA 5 A: | Biopsia Gonadal | 47 |
| FIGURA 5 B: | Dibujo Esquemático de Biopsia Gonadal | 47 |
| FIGURA 6: | Representación de la medición del tamaño de un ovocito de la Línea Germinal Avanzada (LGA) | 49 |
| FIGURA 7: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovogonia (OVG). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 400 X | 50 |
| FIGURA 8: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Pre- vitelogénico I. (OVP I). Tinción PAS, aumento 200 X | 51 |
| FIGURA 9: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito re-vitelogénico II (OVP II). Tinción PAS, aumento 200 X | 52 |
| FIGURA 10: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Pre-vitelogénico III (OVP III). Tinción Hematoxilina- Eosina, aumento 200 X | 53 |
| FIGURA 11: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Vitelogénico I (OVT I). Tinción Hematoxilina- Eosina, aumento 200 X | 54 |
| FIGURA 12: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Vitelogénico II (OVT II). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X | 55 |
| FIGURA 13.: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Maduro (OV M). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X | 56 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| FIGURA 14: | Descripción de la Línea Germinal de <i>F. crassa</i> : Ovocito Maduro (OV M). Tinción PAS, aumento 400 X | 57 |
| FIGURA 14B: | Línea Germinal de <i>F. crassa</i> | 57b |
| FIGURA 15: | Distribución mensual del IGS | 62 |
| FIGURA 16: | Histología del ovario de <i>Fissurella crassa</i> . Tinción Van Gieson, aumento 400X | 63 |
| FIGURA 17: | Histología del ovario de <i>Fissurella crassa</i> . Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 400X | 64 |
| FIGURA 18: | Histología del ovario de <i>Fissurella crassa</i> . Tinción Van Gieson, aumento 200X | 65 |
| FIGURA 19: | Histología del ovario de <i>Fissurella crassa</i> . Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200X | 66 |
| FIGURA 20: | Histología del ovario de <i>Fissurella crassa</i> . Tinción PAS, aumento 100X | 67 |
| FIGURA 21: | Estado 1: en Maduración Temprana. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 40 X | 68 |
| FIGURA 22: | Estado 2: en Maduración avanzada. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 40 X | 69 |
| FIGURA 23: | Estado 3: Maduro. Tinción Hematoxilina - Eosina, aumento 40 X | 70 |
| FIGURA 24: | Estado 4: Desove. Tinción Hematoxilina - Eosina, aumento 40 X | 71 |
| FIGURA 25: | Estado 4: Desove. Tinción Van Gieson , aumento 200 X | 72 |
| FIGURA 26: | Estado 4: Desove. Tinción Van Gieson , aumento 400 X | 73 |
| FIGURA 27. | Distribución porcentual de los diferentes estados de maduración ovárica | 75 |
| FIGURA 28: | Concentración mensual de Progesterona en <i>Fissurella crassa</i> (pmol/g ovario) | 76 |
| FIGURA 29: | Distribución mensual de los estados de madurez gonadal, IGS y concentración de progesterona | 78 |

RESUMEN

La lapa (*Fissurella sp.*) es uno de los moluscos gastrópodos extraídos habitualmente para el consumo humano. Su captura desde los bancos naturales ha aumentando 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. 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, 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 12 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 (total n=60). Luego de identificar las hembras, se registró la longitud y ancho de la concha, peso total, peso blando del animal y el de cada ovario, determinándose el Índice Gonadosomático: relación peso de la gónada con respecto al peso total de las partes blandas.

Se observó que presentan dos períodos de evacuación de gametos, en relación al valor de IGS: el principal en el mes de diciembre (6,73) y otro menor en agosto (7,98), calificados histológicamente como desoves parciales y no totales como ocurre en otras especies de lapas. Además, se registró un incremento del IGS de mayor magnitud en el mes de octubre (9,95) y otro secundario en febrero (8,80). El análisis histológico del ovario de cada individuo, se realizó obteniendo una muestra de 5 a 8 mm de tejido gonadal que se fijó en Bouin alcohólico. Cortes histológicos de 5 μ grosor, fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Adicionalmente, con el objeto de diferenciar en forma clara y selectiva los diversos elementos que comprenden el estroma ovárico, se realizaron 2 tinciones complementarias: Van Gieson para la identificación de fibras colágenas y PAS (Ácido Peryódico Schiff) 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*, reconociéndose una Línea Germinal Temprana (LGT) y una Línea Germinal Avanzada (LGA). La segunda, fue clasificar los cinco estados de madurez histológica del ovario: inmaduro E⁰, en maduración temprana E¹, en maduración avanzada E², maduro E³ y desove E⁴, según las características de la línea germinal y estructurales de la gónada. Durante los meses en estudio se encontraron presentes todos los tipos celulares que comprenden la LGT y LGA, en los cinco diferentes estados de madurez ovárica, caracterizados por un predominio celular diferente, según la época del año. De acuerdo al análisis de la estructura gonadal macro y microscópica observada, se puede concluir que *Fissurella crassa* posee similares características morfológicas, reproductivas y gametogénicas que otras especies de la familia Fissurellidae.

Finalmente, con el objeto de estimar la concentración de progesterona, se tomaron 2; 1 ó 0,5 gramos 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 a partir del cual se realizó el radioinmunoanálisis (RIA) (D.P.C., Coat-A-Count ®). La concentración promedio mensual de progesterona, 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 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). Los resultados obtenidos en el presente estudio, todavía no permiten establecer el papel que cumple esta hormona en el ciclo reproductivo de *Fissurella crassa*. Lo más probable es que existan además de la progesterona, otros factores neuroendocrinos, de naturaleza tanto esterooidal como proteica, relacionados con el ciclo reproductivo de esta especie.

Palabras claves: Lapa; Gastrópodos comerciales Chile; *Fissurella crassa*; ovario; concentración de progesterona.

SUMMARY

Keyhole limpet (*Fissurella sp.*) is a gastropod mollusc habitually extracted for human consumption. During last years, its capture from natural banks in Chile has increased progressively due to its physical-organoleptic characteristics, very similar to the "loco" (*Concholepas concholepas*) and abalone (*Haliotis sp.*). Increases in its price and exports, added to the lack of restrictions, makes possible in the future a crisis of this resource. As much for the sustainable handling of the species, as for the development of culture procedures, it is necessary a better knowledge about its reproductive and growth processes, included their regulation. 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.

Keyhole limpet (*Fissurella crassa*) specimens were collected in the Montemar area (V Region, Chile), during August, October and December, 1997, and February and April, 1998. They were sexed and longitudinal shell diameter was measured to select 12 females over 45 mm in size per each month sample (total n = 60). Shell width, animal gross and soft weight and ovary weight were registered. Gonadosomatic Index (GSI) was determined as the relative weight of the ovary with respect to gross weight of soft parts.

Two periods of gamete evacuation were identified in relation to the value of IGS: the principal in December (6.73) and other in August (7.98). They were histologically described as partial or non-total egg-laying, similar as it happens in other *Fissurella* species. Additionally, the major increase in the GSI in October (9.95) and another one secondary in magnitude in February (8.80) were registered. The histology analysis of each specimens ovary was made obtaining a sample of 5 to 8 mm of gonadal tissue, fixed in alcoholic Bouin. Tissue sections of 5 μ thick, were dyed with Haematoxylin-Eosin. Additionally, two complementary stains were applied with the aim to distinguish clearly and selectively the different elements that include ovarian estroma: Van Gieson for the collagen fibers identification and PAS (Periodic Acid Schiff) for glycosamine glycans.

The histology section study of the ovaries included in two main parts: The first is a description of the germinal line of *F. crassa*, recognizing early and advanced germinal lines. The second, is a classification in five stages of histological maturity of the ovary: immature (E° 0), in early maturation (E° 1), maturation outpost (E° 2), mature (E° 3) and eggs laying (E° 4), according to the structural characteristics of the germinal line and gonads. All cells types were present during the months studied, that include early and advanced germinal lines, in the five different stages of ovarian maturity, characterized by one different cellular type predominance, according to the time of the year. Through the ovarian structure analysis, both macroscopic and microscopic, it can be concluded that *Fissurella crassa* has similar morphological, reproductive and gametogenic characteristics to other species of the Fissurellidae family.

Finally, to evaluate the ovarian progesterone concentration, tissue samples (2, 1 to 0.5 g) were taken, according to the weight of each ovary and were frozen at -20°C until

processing. Three - extraction with dichloromethane (99.5 %) procedure was followed by evaporation to dryness of lipids fraction. Dry extract was suspended in buffer PBS 0.01M, pH 7.4, to proceed then with a solid phase radioimmunoassay (RIA) technique (D.P.C., Coat-A-Count ®). The monthly average ovarian progesterone concentration was greater in August (1.75 pmol/g ovary) and smaller in February (1.19 pmol/g ovary). The statistical analysis (ANOVA and Tukey's test) indicated a significant difference ($p < 0,05$) in the progesterone concentration between the months 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 strong correlation between the degree of maturity of the ovary and the ovarian progesterone concentration (Pearson's Correlation = 0.56). These results do not allow to establish the role that fulfills this hormone in the reproductive cycle of *Fissurella crassa*.

Key words: Keyhole limpet; Comercial gastropods Chile; *Fissurella crassa*; ovary; Progesterone concentration.

INTRODUCCIÓN

El adecuado manejo de los recursos marinos es una necesidad cada vez más importante debido al interés que éstos representan como fuente de alimentación humana.

La experiencia de nuestro país con relación a la extracción indiscriminada de especies como el loco, choro zapato y ostiones, moluscos que colapsaron en décadas anteriores, con el peligro inminente de su extinción, dejan de manifiesto la necesidad de implementar cultivos para diferentes especies que en un futuro pudieran verse en crisis, permitiendo además la creación de empresas rentables que producirían divisas para el país.

El desarrollo de tecnologías de cultivo de recursos hidrobiológicos (incluyendo el cultivo de moluscos gastrópodos marinos) se ha venido incrementado paulatinamente con respecto a la extracción directa desde el medio ambiente natural, que es el principal sistema usado en Chile, el cual es limitado e irregular.

La lapa (*Fissurella sp.*) es uno de los moluscos gastrópodos de mayor tamaño (Bretos, 1988) que es extraído habitualmente para la alimentación humana. Reyes (1986), describe que este género posee características físico-organolépticas muy similares al loco y al abalone (citado por Sierra *et al.*, 1991).

El desembarque en Chile del recurso lapa se registra a partir del año 1978, con un promedio de 339,7 ton/año para el período comprendido entre 1978-1984, aumentando progresivamente desde esa fecha. Este aumento se debió a la búsqueda de un recurso alternativo al loco (*Concholepas concholepas*), molusco que desde 1993 ha experimentado una baja sostenida, debido a la sobreexplotación de este recurso y a sus sucesivas vedas.

El desembarque de lapa ha sido relativamente estable en los últimos años, desde 3.063 toneladas en 1997, hasta 2.422 toneladas el año 2001. Su máximo histórico de 6.034 toneladas se registró el año 1993 (SERNAPESCA, 2000). La mayoría de las extracciones

de este molusco se destinan a líneas de elaboración de productos fresco-enfriado, deshidratado, conserva, congelado y cocido (SERNAPESCA, 2001) (Tabla 1 y Tabla 2). Con respecto a los destinos de este recurso, las exportaciones van principalmente a países asiáticos como Japón, China, Singapur, territorio británico en Asia y E.E.U.U., observándose un crecimiento importante de los volúmenes exportados a dichos países en los últimos años.

TABLA 1. Desembarque Total de Moluscos y de Lapa (*Fissurella sp.*) año 2000- 2001, y Tipo de Producción (SERNAPESCA, 2000 y SERNAPESCA, 2001).

| | ESPECIE LAPA (TONELADAS) | | TOTAL MOLUSCOS (TONELADAS) | |
|-------------------|--------------------------------|--------------|-------------------------------|----------------|
| | AÑO 2000 | AÑO 2001 | AÑO 2000 | AÑO 2001 |
| | CHILE DESEMBARQUE TOTAL | 3.361 | 2.422 | 110.050 |
| DESHIDRATADO | 0 | 0 | 0 | 2 |
| COCIDO | 16 | 0 | 298 | 640 |
| FRESCO - ENFRIADO | 473 | 464 | 1.041 | 1.406 |
| CONGELADO | 163 | 87 | 11.050 | 15.409 |
| CONSERVA | 435 | 224 | 8.058 | 9.157 |
| SALADO - SECO | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOTAL | 1.087 | 775 | 20.447 | 26.614 |

TABLA 2. Distribución del Desembarque Total y Tipo de Producción de Lapa (*Fissurella sp.*) años 1990-2001 (SERNAPESCA, 2000 y SERNAPESCA, 2001).

| TONELADAS | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| DESEMBARQUE TOTAL | 3.688 | 3.711 | 3.921 | 6.034 | 3.963 | 2.610 | 2.070 | 3.063 | 2.990 | 3.588 | 3.361 | 2.422 |
| CONGELADO | 814 | 495 | 442 | 717 | 590 | 126 | 155 | 209 | 148 | 316 | 163 | 87 |
| FRESCO - ENFRIADO | 43 | 53 | 161 | 192 | 180 | 130 | 130 | 237 | 238 | 291 | 473 | 464 |
| CONSERVA | 89 | 453 | 524 | 763 | 484 | 446 | 345 | 720 | 623 | 657 | 435 | 224 |
| SALADO - SECO | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DESHIDRATADO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 225 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| COCIDO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 29 | 20 | 19 | 55 | 16 | 0 |

En relación a los precios de mercado del recurso lapa, éstos fueron US\$ 7,79/ton en 1999 y de US\$ 8,17/ton aproximadamente, registrado desde enero hasta octubre del 2000 (IFOP, 2001, citado por Honour, 2002) (Tabla 3).

TABLA 3. Precios de Mercado de Exportación de Lapa (*Fissurella sp.*) desde el año 1990 hasta octubre de 2000 (IFOP, 2001, citado por Honour, 2002).

| AÑO | TON | PRECIO (US\$/Ton) | TOTAL |
|------------|------------|------------------------------|--------------|
| 1990 | 880,70 | 3,97 | 3494,88 |
| 1991 | 970,10 | 10,61 | 10291,21 |
| 1992 | 980,40 | 6,00 | 5883,48 |
| 1993 | 1,16 | 7,72 | 8,99 |
| 1994 | 956,30 | 8,50 | 8126,06 |
| 1995 | 610,40 | 7,74 | 4725,47 |
| 1996 | 720,90 | 7,24 | 5218,88 |
| 1997 | 804,00 | 8,05 | 6472,04 |
| 1998 | 709,70 | 8,63 | 6124,92 |
| 1999 | 1,02 | 7,79 | 7,92 |
| 2000 * | 932,10 | 8,17 | 7614,98 |

TON: Toneladas. (*) = Período de enero-octubre.

La lapa (*Fissurella sp.*), debido a sus características físico-organolépticas, constituye un recurso de muy buena calidad para la alimentación humana. Sierra *et al.* (1991), evaluaron el rendimiento en carne y la composición física y química proximal de las especies de lapas *Fissurella picta* y *Fissurella nigra*, cuyos tamaños fueron menores a 6 cm y entre 6 a 8 cm, respectivamente (Tabla 4 A y Tabla 4 B).

Los resultados indicaron que dichas especies constituyen una buena fuente proteica y permite además clasificarlas dentro de las especies marinas magras por su bajo contenido en materia grasa (Tabla 4 B). El rendimiento en carne de lapas (Tabla 4 A) depende principalmente de la especie (siendo mayor en *F. nigra*) y en menor grado influye el tamaño de éstas. En general, las lapas de mayor tamaño presentan un mejor rendimiento en carne y un mayor contenido de proteína con respecto a la materia seca total, por lo que sería recomendable la extracción de lapas de tamaño superior a 6 cm. Esto permitiría un mejor aprovechamiento del molusco, tanto para el consumo como para la preservación de este recurso natural renovable.

TABLA 4 A. Rendimiento en Carne de *Fissurrella picta* y *Fissurrella nigra* (Sierra *et al.*, 1991).

| ESPECIE | <i>F. picta</i> | <i>F. picta</i> | <i>F. nigra</i> | <i>F. nigra</i> |
|-----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Tamaño | ∠ 6 cm | 6 - 8 cm | ∠ 6 cm | 6 - 8 cm |
| Carne | 28,76% | 30,01% | 38,75% | 40,64% |
| Visceras | 17,41% | 20,54% | 17,25% | 18,63% |
| Valvas | 53,83% | 49,45% | 44,00% | 41,12% |

TABLA 4 B. Composición Química Proximal, en base seca, de *Fissurrella picta* y *Fissurrella nigra* (% de parte comestible) (Sierra *et al.*, 1991).

| ESPECIE | <i>F. picta</i> | <i>F. picta</i> | <i>F. nigra</i> | <i>F. nigra</i> |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Tamaño | ∠ 6 cm | 6 - 8 cm | ∠ 6 cm | 6 - 8 cm |
| Proteína | 72,76% | 73,41% | 70,68% | 75,11% |
| E.N.N | 14,04% | 15,16% | 16,67% | 12,09% |
| Cenizas | 10,45% | 8,89% | 9,43% | 9,93% |
| E. Etéreo | 2,75% | 2,54% | 3,22% | 2,87% |
| Fibra cruda | 0 | 0 | 0 | 0 |

E.N.N= Extracto No Nitrogenado

En relación al tamaño de lapa explotable comercialmente, Bretos (1988), estima conveniente capturar Fissurellidos sobre los 55 mm de longitud de concha, tamaño en el cual se aprecia el incremento más significativo en el peso del animal, lo cual coincide con trabajos concernientes al aspecto reproductivo de algunas especies del género, los cuales han indicado la conveniencia de no capturar ejemplares menores de 60 mm de longitud de concha (Bretos, 1979; Bretos *et al.*, 1983, citados por Segura, 1998). Segura (1998), señala que esta proposición de veda, permitiría que los individuos se reproduzcan al menos una vez, pero no permitiría la aparición de tallas grandes en la población, efecto que se lograría sólo con la exclusión de cualquier presión extractiva

En la actualidad en nuestro país, la explotación del recurso lapa está escasamente regulada, no existiendo ninguna medida de administración, a excepción de la talla mínima de extracción, donde como medida protectora se implantó un tamaño mínimo de extracción de 60 mm (Resolución 248/1996, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción).

Aunque esta medida no hace distinción entre las distintas especies de lapas, podría ser de utilidad para evitar el agotamiento de los bancos naturales y el desequilibrio en la dinámica poblacional entre las diferentes especies (Tichauer, 2002).

Tanto para el manejo sostenido de las especies, como para el desarrollo de procedimientos de cultivo de ellas, es necesario conocer los procesos de crecimiento y reproductivos que los regulan. En relación a la reproducción de *Fissurella sp.*, existe escasa información con miras al cultivo.

La investigación de los aspectos reproductivos de este molusco, permitiría implementar metodologías como la inducción al desove, para la obtención de óvulos y espermatozoides. Tratándose ésta de una especie con fecundación externa, se facilitaría el proceso, aspecto fundamental para la formación de las larvas que darán origen a los individuos adultos, en volúmenes que permitan la producción a gran escala.

Además, los moluscos poseen una variedad de mecanismos reproductivos, que necesariamente han de ser integrados orgánicamente por mensajes o señales moleculares específicas, escasamente definidas hasta ahora, pero que incluirían principalmente a progesterona, testosterona y prostaglandinas. La comprensión de los aspectos hormonales es fundamental, ya que estas moléculas pueden tener un efecto aditivo o sinérgico ya sea en un proceso particular o en la fisiología general del sistema.

El propósito de este estudio fue describir histológicamente el ovario de *Fissurella crassa*, caracterizando los diversos estados de madurez gonadal; detectar la presencia de progesterona en la gónada y su variación en concentración a lo largo de un ciclo anual, así como también analizar si existe una relación entre ésta con el estado de madurez gonadal.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ASPECTOS GENERALES

Las lapas (*Fissurella sp*) son moluscos gastrópodos marinos bénticos que poseen un pie muscular, que es la parte comestible, el cual representa aproximadamente el 20% del animal. La importancia de estas especies radica en que son una alternativa económica para Chile como especie de consumo humano habitual en las áreas costeras y como producto de exportación (Huaquín *et al.*, 1998).

Se han descrito 13 especies para el país (Mc. Lean, 1984) de las cuales al menos 10 son capturadas con fines comerciales. Con respecto a su distribución geográfica, el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), las divide en dos grandes grupos: el primero desde Perú hasta Chile Central y un segundo grupo, ubicado en la Provincia Magallánica que comprende el sur de Chile y Argentina, como lo muestra la Figura 1. Por otro lado, Mc. Lean (1984), describe una ubicación geográfica relativamente similar, señalando que nueve de estas especies pertenecen a la Provincia Biogeográfica Peruana, temperada cálida, que se extiende desde Perú hasta Chile Central y estas son *Fissurella bridgessi* (Lapa jerquilla o Lapa de arena), *Fissurella costata* (Lapa bonete), *Fissurella crassa* (Lapa ocho o Lapa de Sol) (Figura 2), *Fissurella cumingi* (Lapa rosada o Lapa frutilla), *Fissurella latimarginata* (Lapa negra), *Fissurella limbata* (Lapa blanca), *Fissurella máxima* (Lapa reina, Lapa buena, Lapa de los huiros o Lapa castellana), *Fissurella peruviana* y *Fissurella pulchra* (Lapa aguachenta) y cuatro especies pertenecen a la Provincia Magallánica, temperada fría, que comprende el sur de Chile y de Argentina y ellas son : *Fissurella nigra*, *Fissurella oriens*, *Fissurella picta*, y *Fissurella radiosa*. De acuerdo a los tamaños máximos descritos para el recurso lapa, es posible distinguir dos grupos de especies (www.ifop.cl): lapas que alcanzan los 10 cm de talla y que corresponde a las especie: *F. maxima* , *F. cumingi* y *F. latimarginata* , y lapas de tamaños menores de 8 cm que reúne a las especies *F. crassa*, *F. costata*, *F. limbata* y *F. pulchra*.

Fisurella crassa (Lamarck, 1822), vulgarmente llamada “Lapa de Sol” o "Lapa Ocho" es un arqueogastrópodo, que se encuentra exclusivamente en la zona intermareal (zona entre las líneas de marea alta y marea baja) que está periódicamente expuesta al aire sobre sustrato rocoso, principalmente en la costa de Sudamérica, desde Huarmey, Perú, 10°06'S, hasta Punta Pulga, Isla de Chiloé, 42°08'S (Mc Lean, 1984, citado por Vega, 1992). Esta especie taxonómicamente pertenece al tipo molusco, clase Gastrópoda, sub clase Prosobranchi, orden Archaeogastropoda, familia Fissurellidae y género *Fisurella*, incluido en el grupo Vetigastropoda. (Ponder y Lindberg, 1997).

Bretos (1978), describe a *F. crassa* como una especie, herbívora ramoneadora, la que se alimenta principalmente de algas verdes como: el luche verde (*Ulva lactuca*) y de la Lamillita (*Enteromorpha sp.*). Sus depredadores son: el pejesapo (*Syciases sanguineus*), la gaviota (*Larus dominicanus*), el chungungo (*Lutra felina*), el guarén (*Ratus norvegicus*), el pilpilén negro (*Haematopus ater*) y el hombre, principalmente (Pino *et al.*, 1994; Zagal y Hermosilla, 2001).



FIGURA 1. Distribución Nacional de Lapa (*Fisurella sp.*) El Género *Fisurella*, se distribuye en la costas de Perú, Chile y Argentina, ocho de estas especies se ubican desde el litoral del Perú hasta Chile Central (*F. bridgesii*, *F. costata*, *F. crassa*, *F. cumingi*, *F. latimarginata*, *F. limbata*, *F. maxima*, y *F. pulchra*); mientras que *F. nigra* y *F. picta* pertenecen a la Provincia Magallánica temperada fría que comprende el sur de Chile y Argentina (www.ifop.cl).

Huaquín *et al.* (1998), describen la concha de *Fissurella crassa* como lisa, de color castaño a pardo, con costillas primarias muy suaves y separadas, más notorias hacia la periferia y líneas de crecimiento concéntricas prominentes, con un margen periférico angosto, plano e intensamente pigmentado. Posee un orificio apical grande, en forma de número ocho. Pie de color gris moteado con tubérculos blancos. El manto y pie sobresalen de la concha. Manto con bandas alternadas claras y oscuras, de colores púrpura y beige. Comúnmente presenta impresiones circulares en la superficie externa de la concha causadas por el gastrópodo epibionte: *Scurria parasitica* (Figura 2).



FIGURA 2. *Fissurella crassa* (Lamarck, 1822). En la foto podemos observar sobre ella, la presencia del gastrópodo epibionte: *Scurria parasitica*.

CONSIDERACIONES REPRODUCTIVAS

Sistema Reprodutor

En los gastrópodos, la anatomía del sistema reproductor puede ser compleja Ziegenhorn y Tiem (1925), determinaron que en *Fissurella crassa*, el sistema reproductivo consiste de una gónada, una glándula y un gonoducto que desemboca en el riñón derecho (citados por Collado, 1998).

Huaquín *et al.* (1998), en un estudio realizado en la identificación del sexo y morfología de gametos de esta especie, no hicieron ninguna referencia con respecto a la existencia de un conducto genital y glándula anexa, descritos por Ziegenhorn y Tiem (1925), (citados por Collado, 1998) para *F. crassa* y por Collado (1998), para *Fissurella latimarginata* y *Fissurella cumingi*.

Las especies del género *Fissurella* son gonocóricas (sólo un ovario o testículo), poseen sexos separados (dioicas), no presentan signos de hermafroditismo ni reversión de sexos. Tampoco presentan dimorfismo sexual externo, pero los testículos son de color café claro y los ovarios de color verde (Bretos *et al.*, 1983; Mc Lean, 1984; Bretos *et al.*, 1988 a ; Bretos *et al.*, 1988 b). En ejemplares vivos, el sexo puede ser reconocido mediante biopsia gonadal (Huaquín *et al.*, 1998).

La mayoría de las especies presenta una proporción de sexos 1:1 (Bretos *et al.*, 1983; Bretos *et al.*, 1988 a ; Bretos *et al.*, 1988 b; Bretos y Chihuailaf, 1993; Bonati, 1999), sin embargo, en un estudio realizado en *F. maxima*, *F. latimarginata* y *F. cumingi*, sólo en *F. maxima* se encontró un número de individuos sexualmente indeterminados (4,31 %).

Segura (1998), señala que en muchas especies de moluscos, la determinación de la talla de primera madurez poblacional corresponde a aquel rango donde la frecuencia de individuos sexualmente maduros es igual al 50%. Sin embargo, en la literatura es posible encontrar variaciones del porcentaje entre 50 y el 100%. Un carácter que regula el desarrollo mínimo para la maduración gonadal es la edad del individuo, independientemente que haya alcanzado un cierto tamaño (Peña, 1987).

La edad en *F. crassa* es determinada por la formación de dos anillos periódicos de crecimiento al año, generalmente en invierno y verano. Este fenómeno tiene lugar al menos durante los primeros seis años de vida. No se sabe si este esquema se mantiene o si cambia en los años siguientes, dado que la tasa de crecimiento se reduce en los animales de gran tamaño (Bretos, 1980 a). Así, un individuo con una talla aproximada de 45 mm, tiene aproximadamente 2 años y tiene 4 anillos de crecimiento (IV), como lo muestra la tabla 5.

TABLA 5. Determinación de la Edad en *F. crassa* (Bretos, 1980 a).

| EDAD (años) | INCREMENTO ANUAL (mm) | LARGO DE CONCHA (mm) | TALLA ANUAL (mm) (*) |
|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 25,8 | 25,8 | 25,8 (II) |
| 2 | 19,8 | 45,6 | 44,5 (IV) |
| 3 | 14,5 | 60,1 | 58,1 (VI) |
| 4 | 9,7 | 69,8 | 68,5 (VIII) |
| 5 | 6,8 | 76,6 | 75,7 (X) |

(*) El número de anillos de crecimiento se expresa en números romanos.

La fecundación en los arqueogastrópodos es externa; la fertilización se produce directamente en el agua de mar. Vega (1992), describe que los óvulos de *F. crassa* salen al exterior adheridos unos con otros formando una especie de cordón, el cual al entrar en contacto con el medio externo, se disuelve, esparciéndose éstos individualmente. La expulsión de los gametos por parte de un animal desencadena el mismo proceso en animales vecinos, de forma que se origina una puesta masiva.

Los ovocitos de *F. crassa* (Figura 3) tienen coloración verde oscura, con un diámetro "*in vivo*" que varía entre 457 -557 μm (Vega, 1992) y están rodeados por una gruesa cubierta de gelatina. A diferencia de lo descrito por Huaquín *et al.* (1998), quien describe para la misma especie que los ovocitos *in vivo*, luego de la emisión en agua de mar, adquieren forma esférica y tienen un diámetro promedio de $228,85 \pm 22,47 \mu\text{m}$ sin envoltura y de $317,04 \pm 31,36 \mu\text{m}$ con la envoltura gelatinosa. Señalando además que la vesícula germinativa (núcleo celular) es visible en algunos ovocitos desplazada hacia un polo; externamente a la membrana plasmática (ovolema), se diferencia una lámina denominada cubierta o membrana vitelina y alrededor de ella, una gruesa cubierta translúcida de gelatina ("jely coat") de $44,08 \pm 11,78 \mu\text{m}$ de grosor.

Esta cubierta de gelatina observada con mayor aumento revela una gran cantidad de estructuras granulares dispuestas a intervalos regulares y dispersos en toda su área; con MET (Microscopía Electrónica de Transmisión) se aprecia un material fibrilar electrodenso, finalmente se observa una tercera cubierta que constituye el borde o límite

periférico del ovocito (k) "límite externo corial", éste se presenta filamentoso y de notable densidad con una interrupción en su estructura "poro". La existencia de esta cubierta "corión" estaría indicando una modalidad de interacción gamética particular, en la cual se diferencia un territorio específico para el reconocimiento celular y una vía única de penetración espermática, a través de un conducto que se ha denominado "micropilo", es decir en *F. crassa* la depresión o "cráter" observada en los ovocitos, permite inferir la existencia de micropilo a nivel de la cubierta gelatinosa (Huaquín *et al.*, 1998).

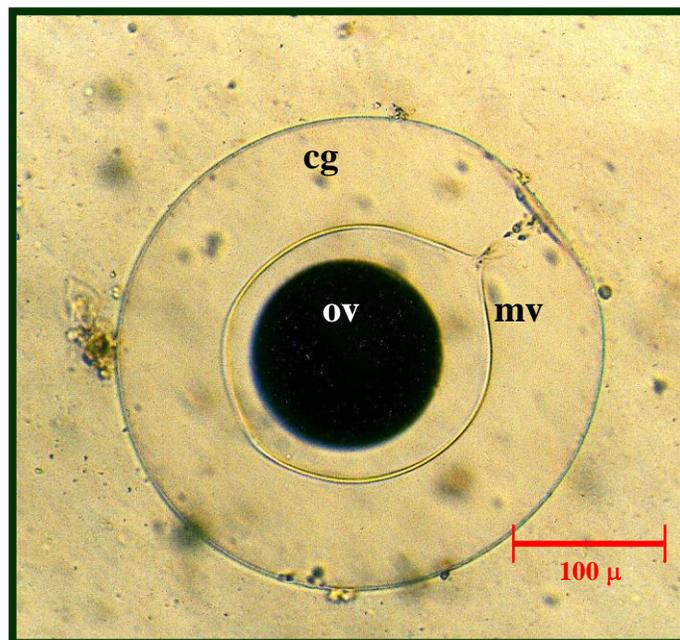


FIGURA 3. Ovocito de *Fissurella crassa* "in vivo". **cg:** Cubierta de Gelatina, **mv:** Membrana Vitelina, **ov:** Ovocito.

Ciclo Reproductivo

La liberación de los gametos es uno de los acontecimientos más relevantes del ciclo reproductivo de los invertebrados marinos, que se evidencia por un brusco descenso del volumen gonadal, con cambios en la estructura del tejido germinal, que permite la identificación histológica del desove y las diferentes fases que completan el ciclo reproductivo (Segura, 1998).

En el desove existen varias formas de liberar los gametos, la más simple consiste en expulsarlos directamente al medio externo circundante, dejando escapar libremente los huevos y esperma en el agua de mar (Peña, 1987). En *F. crassa* (Figura 4), los gametos fluyen por el nefridioporo derecho hacia la cavidad paleal o del manto, emergiendo por el orificio apical o fisura (Huaquín *et al.*, 1998).

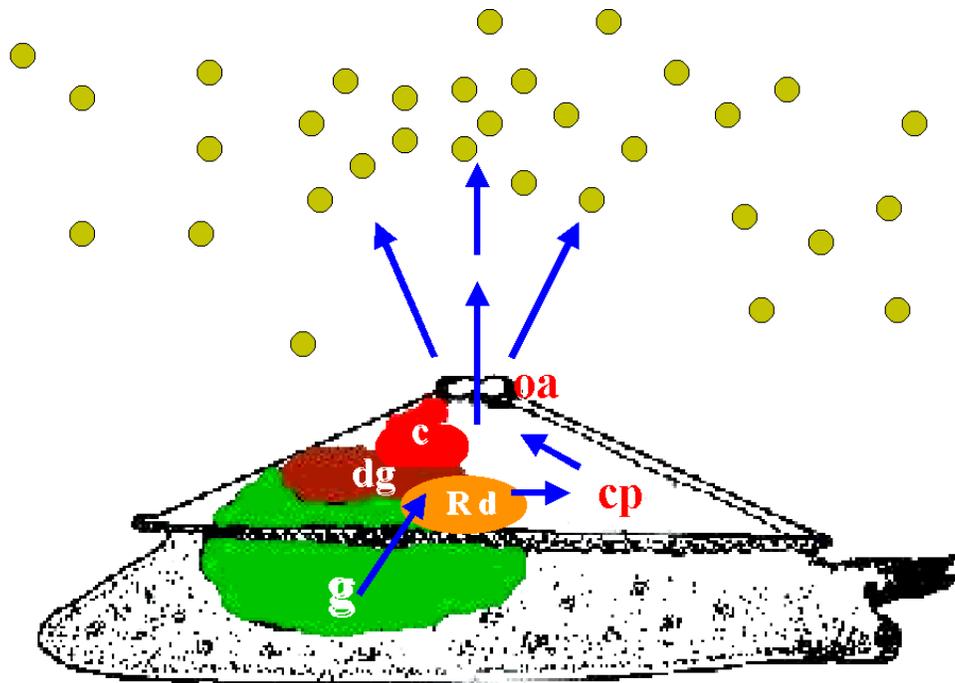


FIGURA 4. Desove en *Fissurella crassa*, recorrido de los gametos desde la gónada, hasta ser liberados al medio externo. c: corazón; cp: cavidad paleal; g: gónada; dg: glándula digestiva; oa: orificio apical y Rd: riñón derecho.

Huaquín *et al.* (1998), señalan para *F. crassa* dos períodos de desove en el año: uno en septiembre y otro en diciembre-enero, alcanzando el valor más alto de madurez gonadal de acuerdo al índice gonadosomático (IGS) en el mes de octubre.

Factores que afectan el Ciclo Reproductivo

Hahn (1989), señala que en la naturaleza el desove está condicionado a una serie de factores que gatillan la liberación de los gametos. Este proceso puede ser provocado por cambios repentinos en la temperatura del agua (aumento o disminución), exposición al aire durante las mareas bajas, fotoperíodo, ciclo lunar, liberación de gametos de otros individuos de la población, o la combinación de estos factores. De esta forma, al controlar algunos de estos factores externos, señala Himmelman (1979), se puede estimular en forma artificial el desove de los organismos .

Factores Externos

Giese (1959), señala que dentro de los principales factores exógenos que influyen en la maduración de las gónadas de los gastrópodos se pueden encontrar (citado por Peña, 1987):

- La temperatura del agua.
- El fotoperíodo.
- La nutrición.

a) Temperatura

Se ha demostrado para varias especies de moluscos que las fluctuaciones de la temperatura del agua inciden en el desove, desempeñando a su vez un importante papel en los procesos de maduración (Loosanof y Davis, 1963, citado por Segura, 1998), como en el loco, (*Concholepas concholepas*) trabajo realizado por Ramorino (1975), (citado por Peña, 1987). Sin embargo, en algunas especies no se ha obtenido respuesta a las variaciones de

temperatura, tal como lo demuestran Kikuchi y Uki (1974), para algunas especies de abalone como *Haliotis gigantea* y *Haliotis cracherodii* respectivamente (citados por Barnabé, 1996). Las temperaturas extremas del agua podrían ser uno de los factores desencadenantes de una evacuación de gametos, tanto en invierno como en verano. Sin embargo, ésto presupone que el desarrollo embrionario y, posteriormente, las larvas presentarían estrategias adaptativas diferentes para resistir condiciones de invierno y verano (Segura, 1998).

En Chile, diferentes autores, han establecido una relación entre la temperatura del mar y el ciclo reproductivo de *Fissurella sp*, asociando alzas en el IGS con aumentos de la temperatura del medio (Bretos, 1979, citada por Muñoz y Rojas, 2001; Bretos *et al.*, 1983; Bretos y Chihuailaf, 1993).

b) Fotoperíodo

La exposición a horas luz durante el ciclo reproductivo, también es un factor incidente en el acondicionamiento y madurez de los organismos. En algunas especies, fotoperíodos de 12 horas (12 Luz/ 12 oscuridad) estimularían la gametogénesis, como lo descrito por Weber y Giese (1969), en *Haliotis cracherodii* (citado por Peña, 1987). Por otro lado, Peña (1986), señala que en *Haliotis discus* fotoperíodos de 24 horas de luz conducirían a un bloqueo de la gametogénesis y la regresión de la gónada (citado por Barnabé 1996).

Honour (2002), señala algo similar a lo ocurrido con el factor temperatura en *F. cumingi*, dividiendo el ciclo de esta especie en dos etapas, según la disposición de horas luz. En la etapa I, de mayor duración de horas luz al día (fotoperíodo largo), los valores de IGS son altos y, por el contrario, en la etapa II, de menos horas luz, la actividad reproductiva es baja. Este hecho podría deberse, según la autora, a un cambio o ajuste interno del organismo, ya que esta disminución de luz podría alterar la conducta alimenticia debido a una menor disponibilidad de algas o a una menor calidad de este alimento en esta época del año. Lo anterior se podría traducir en una baja en las reservas energéticas de los

individuos, disminuyendo así el flujo metabólico hacia la gónada y, por lo tanto, una recuperación gonadal más lenta.

Soaut *et al.* (1999), al evaluar "condiciones de primavera" (aumentos graduales de temperatura y horas luz día) en el crecimiento de la gónada en *Pecten maximus*, notaron una diferencia significativamente alta frente a aquellos individuos bajo "condiciones de invierno" (disminución gradual de temperatura y horas luz día). Por otro lado, Gomot *et al.* (1989), señalan que fotoperíodos cortos inducirían la inhibición de los centros neuroendocrinos responsables de la ovulación y la postura en el molusco *Helix aspersa*, indicando que la postura sería afectada por factores ambientales adversos (fotoperíodo corto y temperaturas bajas) posiblemente por inhibición de la hormona de postura o *egg - laying hormone* (ELH), lo que sugiere un efecto compensatorio mediante el cual la carencia de alguno de estos factores puede ser suplida con un incremento del otro (citados por Honour, 2002).

c) Nutrición

Uki y Kikuchi (1982), indican que la nutrición ejerce un efecto importante sobre la maduración del órgano reproductor en moluscos gastrópodos como el abalone (citado por Peña, 1987). Así, la proliferación de algas en primavera con aumento de la temperatura del agua y del fotoperíodo, produce un mayor consumo de alimento de los individuos de una población, que se traduce en un mayor crecimiento y almacenamiento de energía que posteriormente se utilizará en la gametogénesis (Peña, 1987).

Factores internos

Todavía no está claro, cuales son los factores endocrinos que controlan las actividades sexuales en moluscos, y su mecanismo de acción, no obstante, existen algunos estudios que han intentado dilucidar estos aspectos. Giese (1959), registró que la máxima reacción de liberación de gametos en *Mytilus edulis* y *Chlamys varians*, en respuesta a estimulación externa, corresponde al período de evacuación de productos de las células neurosecretoras

cerebrales y viscerales. Esta secreción se produce justo antes de la gametogénesis y es máxima al momento de la maduración gamética. Algunas de las células neurosecretoras vacían sus secreciones antes del desove (citado por Tichauer, 2002).

En moluscos también se ha demostrado que las prostaglandinas son componentes del mecanismo de regulación y liberación de gametos, éstas son hormonas locales de vida corta sintetizadas a partir del ácido araquidónico (Morse, 1989 y Hahn, 1989 citados por Muñoz y Rojas, 2001). Morse *et al.* (1977), (citado por Stanley y Samuelson, 1994) y Tanaka (1978), (citado por Barnabé, 1996) observaron que las prostaglandinas inducen el desove en el abalon *Haliotis refescens*. En otros moluscos, Martínez *et al.* (2000), (citado por Muñoz y Rojas, 2001) observaron inducción al desove en *Argopecten purpuratus* y Morse *et al.* (1977), (citado por Stanley y Samuelson, 1994) en *Mytilus californianus*.

La condición reproductiva es consecuencia no sólo del control interno de los organismos, sino una combinación de factores externos que modulan dichos procesos y dan cuenta del estado y condición fisiológica de los individuos. Además, se debe considerar que cuánta de esas señales externas es recibida, procesada y traspasada a través del sistema nervioso, la que debe ser traducida para provocar una respuesta. Los mecanismos anteriormente señalados inciden directamente sobre el desarrollo y comportamiento reproductivos de los organismos (Honour, 2002).

Índice Gonadosomático (IGS) y su relación con los períodos de desove

Para evaluar la actividad reproductiva, la literatura señala diversos criterios, como la coloración de la gónada, los valores de IGS y la caracterización histológica. El IGS es el porcentaje que representa el peso de la gónada con respecto al peso total de las partes blandas. Su variación anual se relacionaría, según muchos autores, con los períodos naturales de desove, una información de alto valor en un estudio reproductivo.

$$\text{IGS} = \left[\frac{\text{Peso Gónada}}{\text{Peso Partes Blandas}} \right] * 100$$

En el género *Fissurella*, hay una actividad reproductiva continua, donde se pueden encontrar individuos que evacúan gametos durante casi todo el año, existiendo períodos de incremento de la gametogénesis, que coinciden con un aumento del IGS, alternando con períodos de evacuación donde el IGS disminuye.

Según el IGS, los períodos de desove varían, tanto en relación a localidad como a la especie. Así, lo han descrito Bretos *et al.* (1983); Herrera *et al.* (1983); Osorio (1986); Olguín *et al.* (1996); Remonsellez (1996); Bonati (1999), y Muñoz y Rojas (2001), en *F. Máxima*. Remonsellez (1996), y Olguín *et al.* (1996), en *F. Cumingi*. Bretos *et al.* (1988 b); Pérez *et al.* (1996), y Brown *et al.* (1997) en *F. picta*. Bretos *et al.* (1988 a), y Brown *et al.* (1997), en *F. nigra*. Segura (1998), y Olguín *et al.* (1996), en *F. pulcra*. Bretos y Chihuailaf (1993), en *F. latimarginata*. Existen además publicaciones internacionales en otras especies de *Fissurella* como Ward (1966), y Webber y Giese (1977), citados por Zuñiga, 1991 en *Fissurella barbadensis* y *Fissurella reticulata*.

Se ha planteado, de acuerdo a todos estos autores, que *Fissurella sp.* presenta dos períodos de evacuación de gametos durante el ciclo anual, sin embargo, existen variaciones estacionales del IGS con incrementos o pulsos bianuales y los consiguientes períodos posteriores de evacuación de gametos, siendo uno de ellos de mayor magnitud (Bretos *et al.*, 1983; Bretos *et al.*, 1988 (a); Bretos *et al.*, 1988 (b); Bretos y Chihuailaf, 1993; Collado, 1998; Huaquín *et al.*, 1998; Segura, 1998). Esta situación puede alterarse por cambios en el medio, como por ejemplo, el aumento de la temperatura del agua. Así, en *F. limbata*, Zuñiga (1991), registró tres "peaks" de IGS durante un ciclo anual y tres desoves parciales. Algo similar ocurrió en Caleta Quintay, V región, donde Bonati (1999), para las especies *F. máxima* y *F. cumingi* registró tres períodos de desove a lo largo del año, lo que estaría relacionado, según el propio autor, con la presencia de la corriente de El Niño durante el período en estudio.

En *F. crassa*, Huaquín *et al.* (1998), establecieron dos "peak" en la curva de IGS, uno en octubre y otro de menor intensidad en agosto, señalando además que las fluctuaciones

observadas avalan la presencia de un patrón rítmico en el cual se detectan dos desoves poblacionales en el año: uno en septiembre y otro en diciembre-enero. Los valores menores de IGS se observaron desde enero a mayo. Por otra parte, Bretos (1978), observó en *F. crassa* de la zona de Iquique (20° 15'S, 70° 8'W), que se producía un descenso importante durante diciembre de 1975 y enero de 1976, hecho que la autora interpretó como correspondiente a un período de desove de verano. Este fenómeno podría ser concordante con el desove detectado en *F. crassa* de Caleta Montemar el período de 1994 - 1995 (Huaquín *et al.*, 1998).

En esta misma especie, Tichauer (2002), estudió los valores de IGS en ejemplares machos, registrando dos "peaks" de IGS, uno en octubre y otro menor en marzo y dos períodos de evacuación de gametos, el principal en diciembre y otro menor en abril. Ambas autoras describen un ciclo reproductivo continuo para esta especie, encontrando individuos maduros a lo largo de todo el año.

Cabe señalar que aún cuando el índice gonadosomático es uno de los parámetros más utilizados para determinar el estado reproductivo del animal, tiene sus limitaciones, debido a que sólo informa de variaciones en la relación peso de la gónada versus el peso de las partes blandas, según la estación del año, producto de los cambios en la talla o en el número de los gametos, pero no entrega información acerca de la existencia y proporción de las diferentes células que comprenden la línea germinal, ni tampoco del inicio de la gametogénesis. Para poder conocer estas variables Webber y Giese (1969), señalan que se debe recurrir a estudios histológicos seriados.

Histología del Ovario

En el género *Fissurella*, Collado (1998), realizó un estudio de la histología del ovario en *Fissurella latimarginata* y *Fissurella cumingi*, dando una descripción única para las dos especies, debido a que el sistema reproductivo de ambas especies es muy similar en sus características generales, señalando que el ovario es 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 que varía de epitelio simple cúbico a columnar y al cual subyace una capa de tejido conectivo y muscular, desde donde se proyectan trabéculas o septos gonadales hacia un antro gonadal común. Estos septos gonadales soportan la línea germinal en interacción con células somáticas. Las células germinales se desarrollan en forma centrífuga alrededor de estos ejes hacia el antro gonadal, liberándose a medida que alcanzan la madurez.

También en *Fissurella latimarginata*, Segura (1998), describe la estructura ovárica, señalando que el ovario, al igual que el testículo, está dividido por septos que se generan en las paredes del mismo y que recorren el espacio gonadal formando múltiples compartimientos o acinos ováricos en donde se desarrollará la línea germinal. Los septos están formados por tejido conectivo, recorridos en su interior por vasos sanguíneos. Según avanza el desarrollo celular, estos septos van disminuyendo en grosor hasta disgregarse casi por completo en el momento final de la madurez gonadal, instante en el que son liberados los ovocitos en su máximo estado de madurez.

Además, Oliva (1992), indica que en *Fissurella crassa* las trabéculas poseen un ducto hemolinfático en su interior (citado por Tichauer, 2002).

Ovogénesis

El desarrollo general de las células germinales, desde su forma más simple hasta el final de la diferenciación, es conocido como espermiogénesis y ovogénesis, en machos y hembras, respectivamente.

En moluscos se ha descrito que el proceso inicial de ovogénesis es similar al de las primeras fases de la espermiogénesis. Las células primordiales originan ovogonias primarias, estas células se dividen cuatro veces, alcanzando a tener 16 ovogonias secundarias, éstas entran en meiosis y son ovulados como ovocitos primarios (Dohmen, 1983, citado por Segura, 1998).

Los ovocitos de diferentes especies de moluscos son ovulados en etapas meióticas distintas (Deguchi y Osanai, 1994 a; Deguchi y Osanai, 1994 b y Colas *et al.*, 1993); en Fissurellidos, Collado (1998), señala para *F. latimarginata* y *F. cumingi*, que en las hembras de ambas especies, los resultados sugieren que los ovocitos son evacuados en estado de "Profase I" o estado de vesícula germinativa, sin evidenciar la adición de secreciones por parte de la glándula o epitelio. Por otro lado, la evacuación de ovocitos en etapa de profase I, indica que la fecundación es externa, pues se requiere de un estímulo adicional para reactivar la meiosis, estímulo que podría ser desencadenado por el agua de mar o por el espermatozoide.

Línea Germinal

La descripción de la línea germinal en hembras permite establecer la nomenclatura para la identificación de los estadios germinales a través de la ovogénesis, tal como lo hace Segura (1998), quien establece la siguiente caracterización de la línea germinal para *Fissurella latimarginata*:

Ovogonias : Células de forma esférica. Núcleo esférico cromóforo conteniendo gránulos de cromatina periféricos. Citoplasma escaso y difícil de delimitar. Estas células se encuentran en grupos en la periferia de los acinos, en las inmediaciones del tejido conectivo trabecular. Suelen estar presentes en los ovarios en cualquier momento del ciclo reproductivo y su tamaño promedio alcanza las 5 μm .

Ovocito previtelogénico I : Célula esférica a piriforme, su tamaño promedio es de $24,1 \pm 5,6 \mu\text{m}$. El citoplasma es fuertemente basófilo y tiene un aspecto finamente granular. Núcleo cromóforo de gran tamaño, alcanza un promedio relativo del $54 \pm 6 \%$ del tamaño celular, con nucléolo fuertemente teñido y excéntrico .

Ovocito previtelogénico II: Célula de forma variable, siendo frecuentemente piriforme o poliédrica, de un diámetro promedio de $40,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$. Presentan citoplasma fuertemente basófilo y de aspecto finamente granular, marcado por el inicio de vitelogénesis lipídica.

Núcleo esférico representa un 45% del tamaño celular, nucléolo excéntrico fuertemente teñido.

Ovocito previtelogénico III: Célula de forma variable de piriforme a alargada, de diámetro promedio de $63,2 \pm 6,7 \mu\text{m}$. Citoplasma basófilo de aspecto fuertemente granular, la vitelogénesis endógena se hace mucho más evidente que en el estado anterior. Núcleo esférico, ocupa no más del 45 % del tamaño celular, nucleolo excéntrico fuertemente teñido. Además, estos ovocitos se caracterizan porque en ellos se comienza a formar una cubierta mucilaginosa en los márgenes de la membrana plasmática.

Ovocito vitelogénico I: Célula de forma esférica, con un diámetro promedio de $74,6 \pm 10,6 \mu\text{m}$. Citoplasma notoriamente granular, comienza vitelogénesis exógena, lo que se comprueba por la presencia de plaquetas vitelínicas acidófilas en el citoplasma, produciéndose un tránsito entre una débil basofilia a una débil acidofilia. Núcleo ligeramente esférico y central, el nucléolo se tiñe con colorantes ácidos. Zona de gelatinización en aumento, representando un promedio $21 \pm 7,6 \%$ del tamaño folicular.

Ovocito vitelogénico II : Célula esférica, de diámetro promedio de $85,4 \pm 9,6 \mu\text{m}$, con citoplasma predominantemente eosinófilo, se puede observar cierta fusión de vacuolas vitelínicas, persistiendo el aspecto granular. El núcleo se halla desplazado del centro y se tiñe moderadamente. Persiste la unión al septo germinativo por un pedúnculo. La zona de gelatina alcanza un 29 % del tamaño folicular.

Ovocito vitelogénico III: Célula esférica, diámetro promedio de $105,1 \pm 8,5 \mu\text{m}$, predominantemente eosinófila con zonas de fusión de vacuolas vitelínicas que dan un aspecto más homogéneo al citoplasma. La zona de gelatinización, alcanza un $33 \pm 4,9 \%$ del tamaño celular. Núcleo desplazado del centro y fuertemente teñido. Persiste conexión al septo .

Ovocito en madurez final: Célula esférica irregular, miden un diámetro promedio de $101,3 \pm 4,6 \mu\text{m}$. El citoplasma presenta indicios de hidratación y muestran un aspecto estrellado

y teñido homogéneamente con la eosina debido a la gran fusión de vacuolas vitelínicas. La zona de gelatinización representa un $35 \pm 5,6$ % del tamaño folicular, ocasionalmente se ven indicios de pedunculación. Observaciones del pedúnculo de fijación ovocitaria muestran gránulos de vitelo en su interior, evidenciando una posible participación de esta estructura en el proceso de vitelogénesis.

Collado (1998), establece que las variaciones de los distintos tipos celulares de la línea germinal permiten caracterizar los estados de madurez gonadal, así como también, el grado de desorganización que presenten tanto los "ovocitos vitelogénicos libres en tránsito" en el antro gonadal y los "ovocitos vitelogénicos libres residuales", permiten caracterizar los estados de evacuación y regresión de las hembras adultas en el ciclo reproductivo.

De acuerdo al grado de evolución morfológica que presenta la línea germinal en las hembras de cada muestreo y consecuentemente con la caracterización de los estados gonadales a partir de la escala de clasificación, propuesta por Brown *et al.* (1997), Collado (1998), estableció las variaciones mensuales de los animales en cada estado histológico gonadal en *Fissurella cumingi* y *Fissurella latimarginata*, describiendo en las hembras, que la línea germinal temprana (LGT) está ubicada en la región basal de los septos gonadales y comprende ovogonias, ovocitos previtelogénicos 1 (OpVI), ovocitos previtelogénicos 2 (OpV2) y ovocitos vitelogénicos adheridos (OVA), mientras que la línea germinal avanzada (LGA) comprende ovocitos vitelogénicos pedunculados, que se proyectan hacia la región antral, y ovocitos vitelogénicos libres (OVL) que ocupan este espacio y que durante la época reproductiva se desorganizan y se observan en tránsito en el antro gonadal. Con respecto a la estructura de los ovocitos de *F. Latimarginata* y *F. cumingi*, el mismo autor, señala que son de color verde y se componen de A) la célula rodeada por la membrana celular; B) la cubierta vitelina, que sólo es discernible después de poner en contacto el ovocito con el agua de mar y C) la cubierta gelatinosa. En *Fissurella latimarginata* el ovocito mide $136,5 \mu\text{m}$ de diámetro con una desviación estándar de $\pm 5,1 \mu\text{m}$, la cubierta vitelina $189,8 \pm 5,8 \mu\text{m}$ y la cubierta gelatinosa $454,9 \pm 17,1 \mu\text{m}$, mientras que en *Fissurella cumingi* el ovocito mide $134,0$ de diámetro $\pm 5,1 \mu\text{m}$, la cubierta vitelina $181,9 \pm 5,5 \mu\text{m}$ y la cubierta gelatinosa $446,9 \pm 16,6 \mu\text{m}$.

Clasificación de la Condición Gonadal

Para establecer criterios de madurez gonadal con claridad es fundamental una identificación precisa de los estados del desarrollo.

Segura (1998), señala que son variados los criterios de clasificación utilizados en la literatura, citando a diversos autores, como Ward (1966), quien describe para *Fissurella barbadensis* la línea germinal en base al tamaño del ovocito y su respectivo núcleo; considera, además, el patrón de compactación de la cromatina y establece la aparición de la cubierta de gelatina en los ovocitos de 80 μm de diámetro promedio (citado por Segura, 1998).

Una descripción aún más completa es la que entrega Pavez *et al.* (1983), para *Fissurella maxima* sumando a los criterios anteriores la presencia del pedúnculo de fijación como criterio de identificación, estructura que en *Fissurella latimarginata* persiste, en algunos casos, hasta avanzado estado de madurez y cuya función estaría asociada con la incorporación de vesículas vitelinas. Además, este autor describe los aspectos que incluyen la acumulación de plaquetas vitelinas en el citoplasma producto de la actividad vitelogénica y los consecuentes cambios en la afinidad cromática del citoplasma (citado por Segura, 1998).

Según Jong-Brink *et al.* (1983), el proceso de síntesis de componentes del vitelo estaría asociado a la cubierta de células foliculares que rodean el ovocito que en muchas especies, es el principal criterio de detección histológica de la ovulación. Señalando que esta estructura, descrita habitualmente en otros moluscos, no fue detectada en los momentos finales de la madurez ovocitaria de ningún individuo, situación concordante con la literatura relativa a Fisurellidos. En contraposición, la autora, no describe la presencia de la cubierta de gelatina. Esta estructura, además representa un criterio práctico de identificación de los folículos ya que su formación es casi coincidente con el inicio de la vitelogénesis (citada en Segura, 1998).

Otros criterios histológicos, importantes para determinar estados de madurez, han sido descritos por ejemplo, por Lozada y Bustos (1984), para *Venus antiqua* los cuales describen la cantidad de tejido conectivo intrafolicular y el diámetro de los folículos, el cual varía de acuerdo al grado de madurez sexual (citado por Segura, 1998). Por otra parte, Villalejo (1993), distingue para *Argopecten circularis*, etapas del desarrollo por medio de la frecuencia modal del diámetro de los ovocitos (citado por Segura, 1998). De este análisis, señala Segura (1998), se desprende que cualquier caracterización histológica del desarrollo germinal debe incluir como criterio básico el tamaño promedio de los ovocitos y, de ser posible, establecer una afinidad de este criterio con alguna característica citomorfológica de la célula germinal. Además, que la utilización de los valores de IGS como herramienta única para la identificación del estado característico del desarrollo de la madurez gonadal no permite una gran precisión, aunque puede ser de gran confiabilidad si se desea detectar el estado de madurez final o el de desove, considerando que éstos son momentos claves dentro del período reproductivo.

El análisis histológico de los acinos ováricos, considerando la predominancia de las diferentes fases del desarrollo germinal, permite establecer la clasificación de los estados de madurez. Es así como Brown *et al.* (1997), realizan una clasificación en cinco estados de madurez gonadal de *Fissurella latimarginata*, *Fissurella cumingi*, *Fissurella picta* y *Fissurella nigra*, según el grado de evolución morfológica de la línea germinal. Collado (1998), establece diversos grados de madurez ovárica para *Fissurella cumingi* y *Fissurella latimarginata*, siguiendo la misma escala descrita por dicho autor. Estos son:

- D1: Desarrollo Inicial o Madurez Inicial.
- D2: Desarrollo Avanzado o Madurez Avanzada.
- D3: Desarrollo Total o Maduro.
- R1: Regresión Inicial o Evacuación Parcial.
- R2: Regresión Total o Evacuación Final.

En el caso de los machos, la nueva onda de maduración puede coexistir con el estado de regresión gonadal, lo que indicaría la dinámica y continuidad del proceso de ovogénesis; por lo tanto, los ejemplares son clasificados de acuerdo a la condición predominante.

Segura (1998), utiliza un criterio diferente al anterior, estableciendo seis grados de madurez en *Fissurella latimarginata*.

1.- Inmaduro: Sólo presencia de células germinales jóvenes, de la línea germinal temprana (LGT) o previtelogénicas. Células agrupadas en regiones vascularizadas de lamelas ovígeras, presentan citoplasma escaso, núcleos esféricos y basófilos, ovogonias y ovocitos en primeras fases del desarrollo. No hay presencia de ovocitos en vitelogénesis en ninguna de sus etapas ni residuos de ovocitos maduros.

2.- En Maduración (Madurez inicial): Predominancia de ovocitos previtelogénicos II (pv2) y previtelogénicos III (pv3) marcados por el inicio de la vitelogénesis lipídica, proceso por el cual, el citoplasma acumula sustancias de reserva, presenta un acelerado crecimiento y comienza una vacuolización del citoplasma representada por la depositación de lípidos. El núcleo crece pero no en la misma proporción del citoplasma. Aparición de primeros ovocitos vitelogénicos I (vit 1) y vitelogénicos II (vit 2) además de una mínima cantidad de ovocitos maduros (mad). Los septos gonádicos son gruesos y muestran desarrollo germinal temprano aún adherido a sus paredes.

3.- Maduro: Predominancia de ovocitos vitelogénicos I, vitelogénicos II y vitelogénicos III (vit3), en claro proceso de vitelogénesis proteica, que se comprueba por la aparición de depósitos de proteína en forma de plaquetas acidófilas. Los núcleos presentan un contorno irregular. Estos ovocitos están envueltos de una cubierta de gelatina, característica de la línea germinal avanzada. Hay presencia de ovocitos maduros aunque adheridos a las paredes de los septos gonádicos, aún es posible encontrar células de la línea germinal temprana.

4.- Madurez final: Ovocitos en vitelogénesis activa, y en proceso de hidratación que constituye el fenómeno previo a la eliminación del ovocito y que se evidencia por el contorno irregular de estas células germinales. Además las paredes de los acinos ováricos se encuentran muy disgregadas entre una abundante masa de ovocitos maduros. También es posible encontrar, zonas donde el desarrollo germinal se reanuda nuevamente.

5.- Desove: Escasos ovocitos maduros y un notorio aumento de la línea germinal temprana y tejido con gran abundancia de ovogonias.

6.- Regresión: El desarrollo de las células de la línea germinal temprana se encuentra más avanzado, representado en una predominancia de ovocitos previtelogénicos, es posible encontrar aún algunos ovocitos maduros residuales.

El registro de los estados germinales en cortes de hembras *Fissurella latimarginata* mostraron dos momentos principales dentro del desarrollo. Uno compuesto por las células de la línea germinal temprana, caracterizadas por su tamaño y su afinidad hacia el colorante hematoxilina. Y una segunda fase integrada por las células de la línea germinal avanzada, fácilmente identificables por la presencia de una capa de gelatina envolviendo el ovocito y formando un folículo. Estas últimas, además, marcan el inicio de la vitelogénesis y la afinidad del citoplasma hacia el colorante, cambiando gradualmente del color azul de la hematoxilina al rosado de la eosina. El análisis cuantitativo de dichos estados germinales mostró un comportamiento de actividad cíclico, con una alta presencia de ovocitos maduros durante noviembre, además, es posible observar un notorio aumento de la línea germinal temprana posterior a los períodos de máxima madurez, los cuales identifican los estados de regresión de la gónada (Segura, 1998).

Hormonas Esteroidales

Lehoux y Sandor (1970), revelaron la presencia de esteroides y enzimas metabolizadoras de esteroides, sugiriendo que estas hormonas, estudiadas principalmente en vertebrados, estaban también en el tipo Mollusca (citado por Tichauer, 2002), en el cual están incluidas varias clases, entre las más conocidas se encuentran los bivalvos (almejas, cholgas, ostiones, choritos), los cefalópodos (jibias, calamares, pulpos y nautiloideos) y los gastropódos (lapas, locos, abalones, caracoles, babosas).

En relación a la presencia de esteroides, en moluscos existen diversos trabajos como: en cefalópodos, Di Aniello *et al.* (1996), y Di Cosmo *et al.* (2001), en el pulpo (*Octopus vulgaris*). Y en bivalvos, de Longcamp *et al.* (1970); de Longcamp *et al.* (1974); Reis Henriques y Coimbra (1990), en el mejillón (*Mytilus edulis*) e Idler *et al.* (1969), en la venera (*Placopecten magellanicus gmelin*).

La producción de esteroides en diferentes moluscos gastrópodos se demostró usando colesterol como precursor (Voogt, 1973 a; Voogt, 1973 b; Idler *et al.*, 1978, citados por Reis Henriques y Coimbra, 1990).

La biosíntesis de esteroides dentro de la clase gastropoda ha sido descrita para diferentes especies:

- En gastrópodos opistobranquios, Lupo di Prisco y Fulgheri (1975), lo describen en la liebre de mar (*Aplysia depilans*) y Hines *et al.* (1996), en la mariposa de mar ó pterópodo (*Clione antarctica*).
- En gastrópodos pulmonados, como los caracoles terrestres, Le Guellec *et al.* (1987), lo describen en *Helix aspersa* y Bose *et al.* (1997), en *Achatina fulica*.
- En gastrópodos prosobranquios, como la crepidula (*Crepidula fornicata*) lo describen Bardon *et al.* (1971), específicamente en lapas, Honour (2002), demostró la biosíntesis de esteroides (progesterona, 17 β estradiol y testosterona) para *Fissurella cumingi* (machos y hembras) y Tichauer, (2002), la biosíntesis de testosterona en *Fisurella crassa* (machos).

Se ha demostrado la participación de varios órganos en moluscos (particularmente los tentáculos ópticos, cerebro y gónadas) y ciertos neuropéptidos, en la regulación de procesos fisiológicos específicos como: la ovulación (Geraerts *et al.*, 1983, citado por Hines *et al.*, 1996), la vitelogénesis (Geraerts y Joosse, 1975, citados por Hines *et al.*, 1996), el crecimiento y la diferenciación (Feral *et al.*, 1987, citados por Hines *et al.*, 1996).

Algunos antecedentes de la presencia de esteroides sexuales en molusco y la variación cuantitativa y cualitativa de éstos, son relacionados con procesos de reproducción y crecimiento, sugiriendo una regulación sobre los procesos fisiológicos. Es así como, los factores neuroendocrinos procedentes de los cerebroganglios y, en menor proporción, de los ganglios viscerales, liberados en el medio interno, resultan ser indispensables para la realización de la mitosis de las células germinales, de la meiosis y de la vitelogénesis (Barnabé, 1996).

Con respecto a la función de las hormonas esteroidales en invertebrados, Hines *et al.* (1992 a), midieron mediante radioinmuno ensayo (RIA) los niveles de esteroides sexuales en los ovarios, testículos y ciego pilórico durante la gametogénesis de estrella de mar *Asterias vulgaris*, mostrando que los niveles crecientes de progesterona en los testículos coinciden con la espermatogénesis y los de testosterona con la formación de la columna espermatogénica. En los ovarios los niveles de estradiol y testosterona son más altos en el comienzo de la ovogénesis, mientras que los niveles de progesterona no cambian significativamente durante todo un ciclo gametogénico anual, sugiriendo la hipótesis que los aumentos transitorios en los niveles de esteroides sexuales durante gametogénesis pueden servir como moduladores endógenos de reproducción.

A partir de gónadas e hígado de cefalópodos y del cuerpo entero de crustáceos se determinó la concentración de progesterona, testosterona y de estrógenos, encontrándose que éstas aumentaron durante la maduración sexual de los animales. (Nikitina *et al.*, 1977).

En relación a la función que pueden cumplir los esteroides en los procesos reproductivos

de los moluscos, Aubry, (1962) muestra que la inyección de testosterona incrementa la espermatogénesis y que inhibe la ovogénesis y que el estradiol tuvo el efecto contrario. Ambas hormonas son estimuladas por progesterona (citado por Reis Henriques y Coimbra, 1990).

En moluscos gastrópodos, los estudios de Hines *et al.* (1996), sugieren la existencia de vías de síntesis de esteroides en la mariposa de mar *Clione antarctica*, reconociéndose muchas moléculas intermedias que tienen efectos reproductivos ya demostrados en otros sistemas, como por ejemplo testosterona, androsterona, estradiol, etc., no estando determinado el efecto específico de ellos en la maduración de los gametos de moluscos.

En lapas, Honour (2002), señala que en *Fissurella cumingi*, se detectan esteroides (progesterona, 17 β estradiol y testosterona) a nivel de la hemolinfa, cuyas concentraciones fluctúan a lo largo del ciclo reproductivo. Los tres esteroides identificados exhiben comportamientos diferentes en relación a las variaciones del índice gonadosomático (IGS), así la testosterona y el 17 β estradiol, exhiben mayores concentraciones en el período de ascenso del IGS, mientras que la progesterona muestra una mayor concentración en la fase de disminución del IGS, por otro lado en hembras el 17 β estradiol se asocia al período vitelogénico.

Progesterona

Con respecto a la biosíntesis de progesterona "*in vivo*", ésta se ha demostrado en invertebrados por Lehoux y Sandor (1970); Gafney y Goad (1974), en *Pisaster ochraceus*, *Srongylocentrotus franciscanus*, *Dysticus marginalis*, *Acilus sulcatus*, *Tribolium confusum*.

Shoenmarkers (1979), y Shoenmarkers y Voogt (1980), señalaron que los tejidos del equinodermo *Asterias rubens* (estrella de mar) convirtieron colesterol y progesterona, respectivamente, en varios productos esteroidales, reflejando la presencia de enzimas sintetizadoras de esteroides. (citados por Hines *et al.*, 1992 b).

En moluscos existen trabajos de biosíntesis de progesterona en diversas especies como: Lehoux y Sandor (1970), en *Pecten herecius*; Saliot y Barbier (1971), en *Pecten maximus*; Shackleton (1974), en *Callithrix jacchus*; Reis Henriques y Coimbra (1990), en *Mytilus edulis*; Csaba y Bierbahuer (1979), en *Helix pomatia*; Kavaliers *et al.* (2000), en *Cepaea nemoralis*; Di Cosmo *et al.* (1998), Di Cosmo *et al.* (2001), Tosti *et al.* (2001), en *Octopus vulgaris*. Dentro de los moluscos gastrópodos prosobranquios Lehoux y Williams (1971), en *Littorina littorea* y en lapas específicamente, Honour (2002), en la hemolinfa de *Fisurrella cumingi* (machos y hembras).

En moluscos Di Cosmo *et al.* (1998), realizaron uno de los primeros trabajos que registra la caracterización e inmunolocalización de un receptor para progesterona en el sistema reproductivo de la hembra *Octopus vulgaris* (pulpo).

Por su parte, Krush *et al.* (1979), concluyen que en el caracol *Helix pomatia*, la vía de la progesterona se lleva a cabo en la gónada, antes y después de la ovoposición.

En relación a la función que cumple la progesterona en invertebrados, como el crustáceo *Jasus frontalis* (Langosta de Juan Fernández), Elorza (1998), concluye que la 17α -hidroxiprogesterona estaría actuando directamente sobre dos órganos distintos y de dos formas diferentes, en el ovario promueve tanto la mitosis y meiosis de las células germinales, como el proceso de previtelogénesis y vitelogénesis endógena, donde los ovocitos se preparan para la posterior incorporación de la vitelogenina (proteína precursora del vitelo). En el hepatopáncreas, estimula la síntesis y liberación de vitelogenina hacia la hemolinfa.

En moluscos, el estudio del ciclo reproductivo del bivalvo *Mytilus edulis* (mejillón) mostró que los niveles de progesterona en machos y hembras medidos durante todo un ciclo reproductivo anual son similares aunque ligeramente más altos en hembras, probablemente debido al bajo porcentaje de agua en el cuerpo. Lo anterior sugiere que el rol de estos esteroides no es diferente en machos y hembras. El nivel de progesterona en el cuerpo de animales de ambos sexos durante un año, supone la idea que la progesterona estaría

involucrada en la regulación de procesos sexo-específicos, actuando sobre las gónadas particularmente en la gametogénesis, debido a que los niveles más altos de esta hormona los observaron en el período de desove (Reis Henriques y Coimbra, 1990).

En Fissurellidos, el único trabajo hasta ahora descrito en el país, es el realizado por Honour (2002), en la hemolinfa de *Fissurella cumingi*, quien señala que la progesterona, generalmente muestra una mayor concentración en la fase de disminución del IGS, asociando a esta hormona con los períodos de desove y latencia reproductiva, concluyendo que las variaciones en las concentraciones de progesterona durante el período en estudio, soportan la idea de que esta hormona regula los procesos reproductivos de esta especie y que, además, tendría una función sexo - específica, dado el perfil diferente presentado por progesterona en hembras y machos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Describir aspectos reproductivos generales y del ciclo ovárico de *Fissurella crassa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir histológicamente el ovario, caracterizando los diversos estados de madurez gonadal de *Fissurella crassa*.
2. Evaluar el contenido gonadal de progesterona.
3. Determinar la posible relación entre las variaciones histológicas del ovario y su contenido de progesterona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Fissurella crassa* se obtuvieron en el sector de Montemar V Región, durante los meses de agosto, octubre y diciembre de 1997; febrero y abril de 1998. Se recolectaron individuos con tallas mayores a 45 mm de longitud de concha, que se transportaron al laboratorio y se mantuvieron en recipientes con 2 L de agua de mar, que se cambió diariamente. Se alimentaron con distintos tipos de macroalgas (*Macrocystes sp*, *Ulva sp*, e *Iridacea sp*.) hasta ser procesadas entre 24 a 48 horas desde su obtención.

Debido a que *Fissurella crassa* carece de dimorfismo sexual, la identificación de las hembras, se realizó a través de la obtención de gametos mediante "biopsia gonadal", por punción del pie dirigida hacia posterior, de modo de alcanzar la gónada con una jeringa conteniendo 0,2 ml de agua de mar filtrada con antibióticos (penicilina sódica: 60 mg/L y estreptomicina:50 mg/L) (Figura 5 A y 5 B). El líquido obtenido tiene coloración verdosa si se trata de ovario y amarillenta si es testículo, realizándose un análisis microscópico, para confirmar la identificación de los respectivos gametos.

Además, se registró la longitud y ancho de la concha, el peso total, el peso blando del animal y de el ovario, estableciéndose el Índice Gonadosomático (relación entre el peso de la gónada y el peso total de las partes blandas).

Se trabajó con 12 individuos hembras para cada uno de los meses analizados, obteniéndose las muestras para histología y radioinmunoanálisis (RIA); éstas últimas se conservaron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.



FIGURA 5 A . Biopsia Gonadal. La identificación de las hembras, se realizó a través de la obtención de gametos, mediante biopsia gonadal, por punción del pie llegando hasta la gónada.

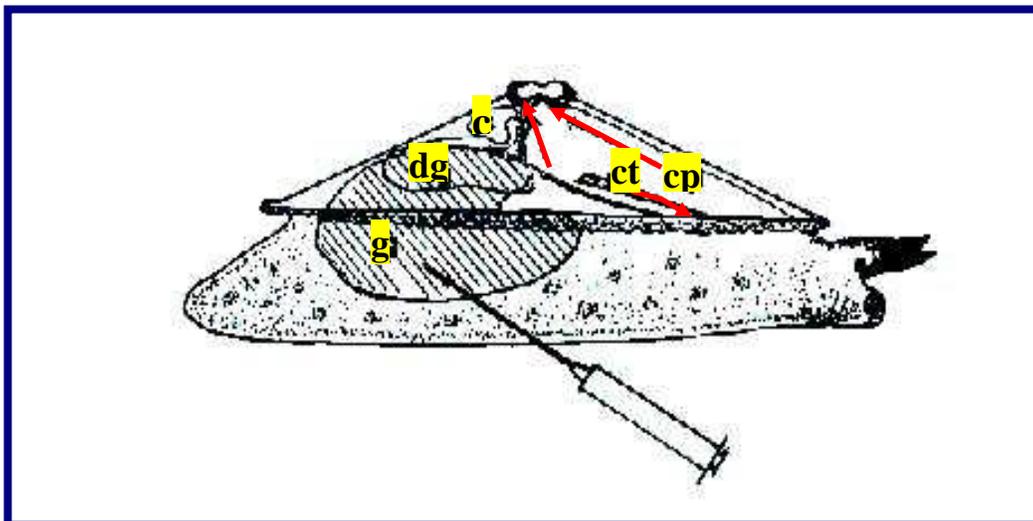


FIGURA 5 B. Dibujo Esquemático de Biopsia Gonadal. Se observa el lugar donde se realiza la punción transpedal para alcanzar la gónada (g), y obtener la muestra que permite reconocer el sexo. **c:** corazón; **cp:** cavidad paleal; **ct:** ctenidio; **dg:** glándula digestiva. (Huaquín, 1998).

Histología

Para histología se hizo un corte en cuña en el centro del ovario, obteniéndose 5 a 8 mm de tejido gonadal, de cada ejemplar. La fijación de las muestras, se realizó en Bouin alcohólico, después se deshidrataron sucesivamente en alcohol etílico de 70°, 95° y 100°. Luego se aclararon en xilol e incluyeron en parafina, para efectuar cortes de 5 µm de grosor, los que fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E), con la cual el núcleo adquirió un color azul intenso y prácticamente todas las estructuras citoplásmicas y sustancias intercelulares se tiñeron de color rosado.

Adicionalmente con el objeto de diferenciar en forma clara y selectiva, los diversos elementos que comprenden el estroma ovárico, se realizaron 2 tinciones complementarias: Van Gieson para la identificación de fibras colágenas y PAS (Ácido Peryódico Schiff) para glicosaminoglicanos; efectuadas en el Laboratorio de Histología del Departamento de Cs. Biológicas Animales, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon, modelo eclipse E 600, con cámara de video digital coll snap cf. color, en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Departamento de Patología Animal, de la misma Facultad.

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* basada en la descripción hecha por Segura (1998), para *F. latimarginata*.

Para lo cual se analizó globalmente el tejido reconociéndose los diferentes tipos celulares que comprenden la línea germinal de *F. crassa*:

1. *Línea Germinal Temprana* (LGT): Ovogonia, Ovocito Pre-vitelógenico I; Ovocito Pre-vitelógenico II y Ovocito Pre-vitelógenico III.
2. *Línea Germinal Avanzada* (LGA): Ovocito Vitelógenico I; Ovocito Vitelógenico II y Ovocito Maduro.

La medición de las células de la línea germinal se realizó utilizando un lanómetro Reichert 7902. El diámetro se obtuvo en centímetros, por medio de una regla incluida en el lanómetro, que son posteriormente convertidos a micrones, según el aumento correspondiente (100 x), mediante una tabla standard para dicho efecto. En el caso de las células de la línea germinal avanzada (LGA), se incluyó además el diámetro de la célula con y sin cubierta de gelatina (Figura 6).

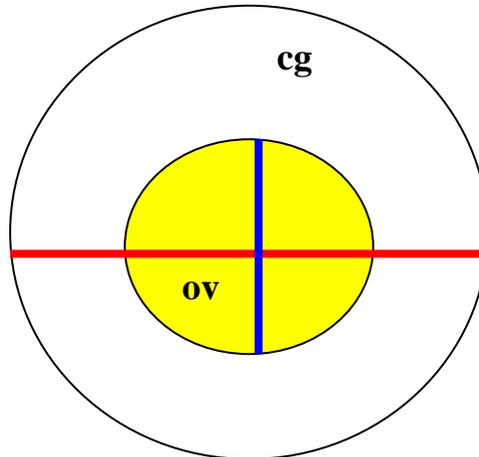


FIGURA 6. Representación de la medición del tamaño de un ovocito de la Línea Germinal Avanzada (LGA). La línea azul muestra el diámetro celular del ovocito (ov) y la roja, el diámetro de la célula más la cubierta de gelatina (cg).

La segunda parte, consistió basándose en la descripción obtenida en este estudio de la línea germinal de *F. crassa*, clasificar según las características estructurales del tejido gonadal y el desarrollo de ovocitos, las muestras correspondientes a cada uno de los meses estudiados, en cinco diferentes estados del ciclo reproductivo:

- Estado (0): Inmaduro.
- Estado (1): en Maduración Temprana.
- Estado (2): en Maduración Avanzada.
- Estado (3): Maduro.
- Estado (4): Desove.

Descripción de las células de la línea germinal de *Fissurella crassa*

- **Ovogonias** : Células de forma esférica. Núcleo cromóforo, presencia de nucléolo fuertemente teñido, desplazado generalmente hacia un polo. Citoplasma escaso basófilo. Se ubican preferentemente en los bordes de los septos ováricos, alrededor del tejido conectivo trabecular, junto a otras células de la Línea Germinal Temprana (LGT). Se pueden encontrar a lo largo de todo el ciclo reproductivo y su tamaño promedio alcanza los 7,6 μm (Figura 7).

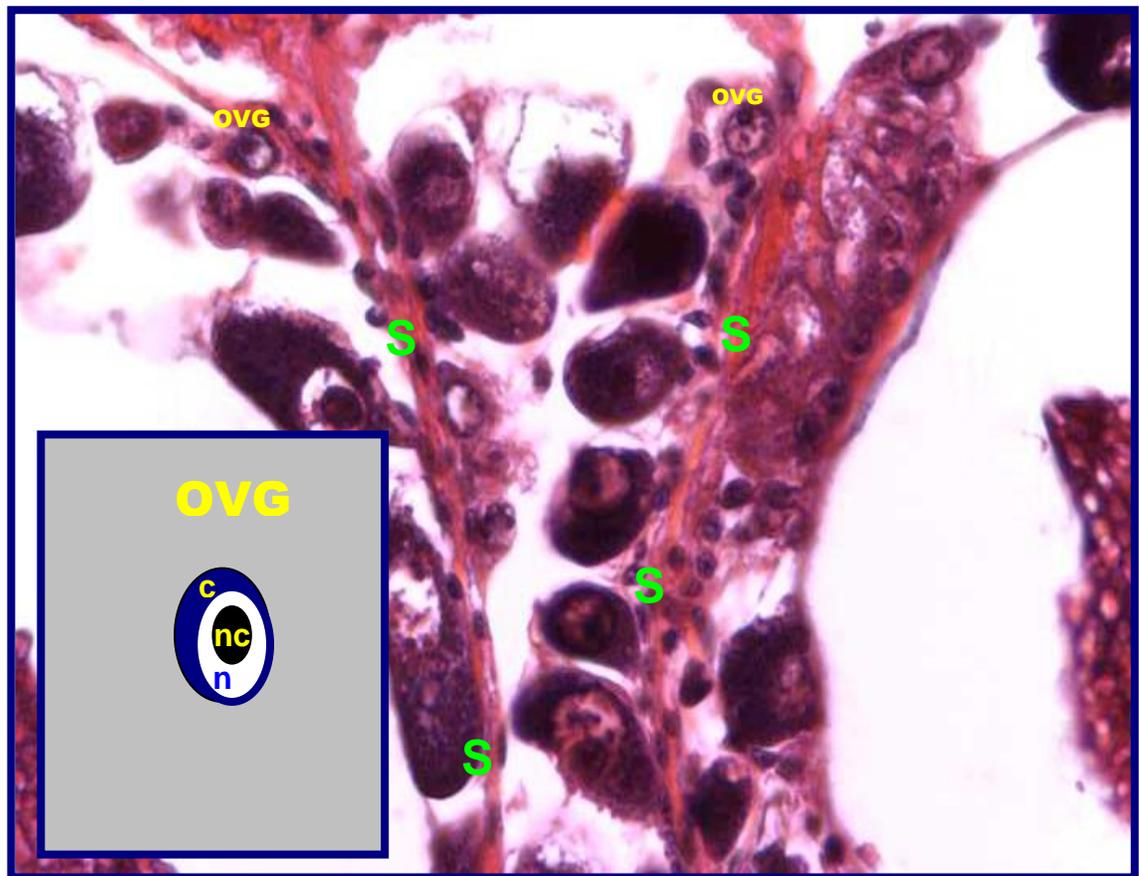


FIGURA 7. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovogonia (OVG). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 400 X. Observándose que el núcleo (**n**) no se tiñe, al contrario del nucléolo (**nc**) el cual esta fuertemente teñido, escaso citoplasma (**c**). Septos ováricos (**S**).

- **Ovocito Previtelogénico I** : Célula esférica a piriforme de un diámetro promedio de 14 μm ., núcleo cromóforo, de gran tamaño, nucléolo fuertemente teñido, central o excéntrico; el citoplasma en rápido aumento es fuertemente basófilo y de aspecto finamente granular. Se encuentra dispuesto generalmente al igual que las demás células de la Línea Germinal Temprana (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, evidenciando la presencia de glicosaminoglicanos del tejido conectivo (Figura 8).

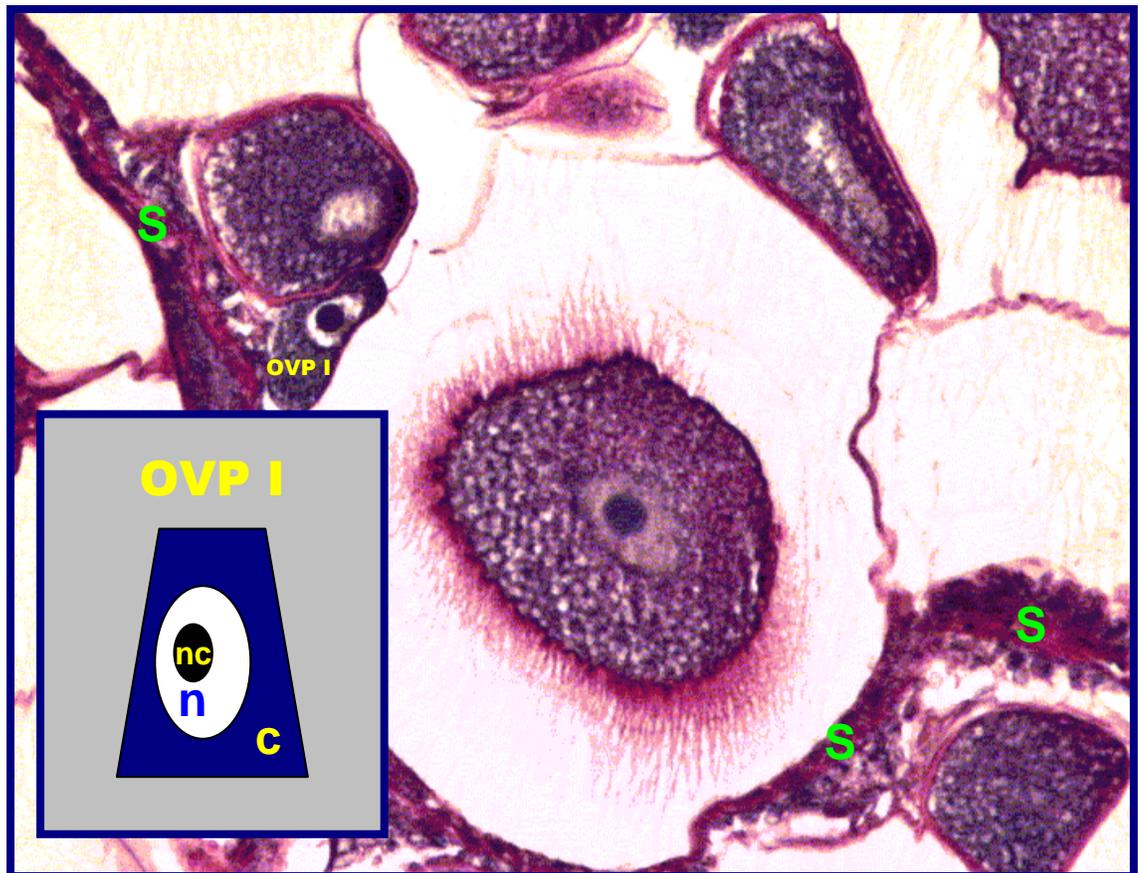


FIGURA 8. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Previtelogénico I. (OVP I). Tinción PAS, aumento 200 X. Observándose núcleo (n) cromóforo, el nucléolo (nc) basófilo y central, con un citoplasma (c) finamente granular. Y glicosaminoglicanos en el tejido conectivo, septos ováricos (S) (PAS +) color rojo púrpura.

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, nucléolo excéntrico fuertemente teñido; el citoplasma es marcadamente basófilo cuyo aspecto finamente granular es más notorio que el tipo celular anterior, evidenciando el inicio de la vitelogénesis (Figura 9).

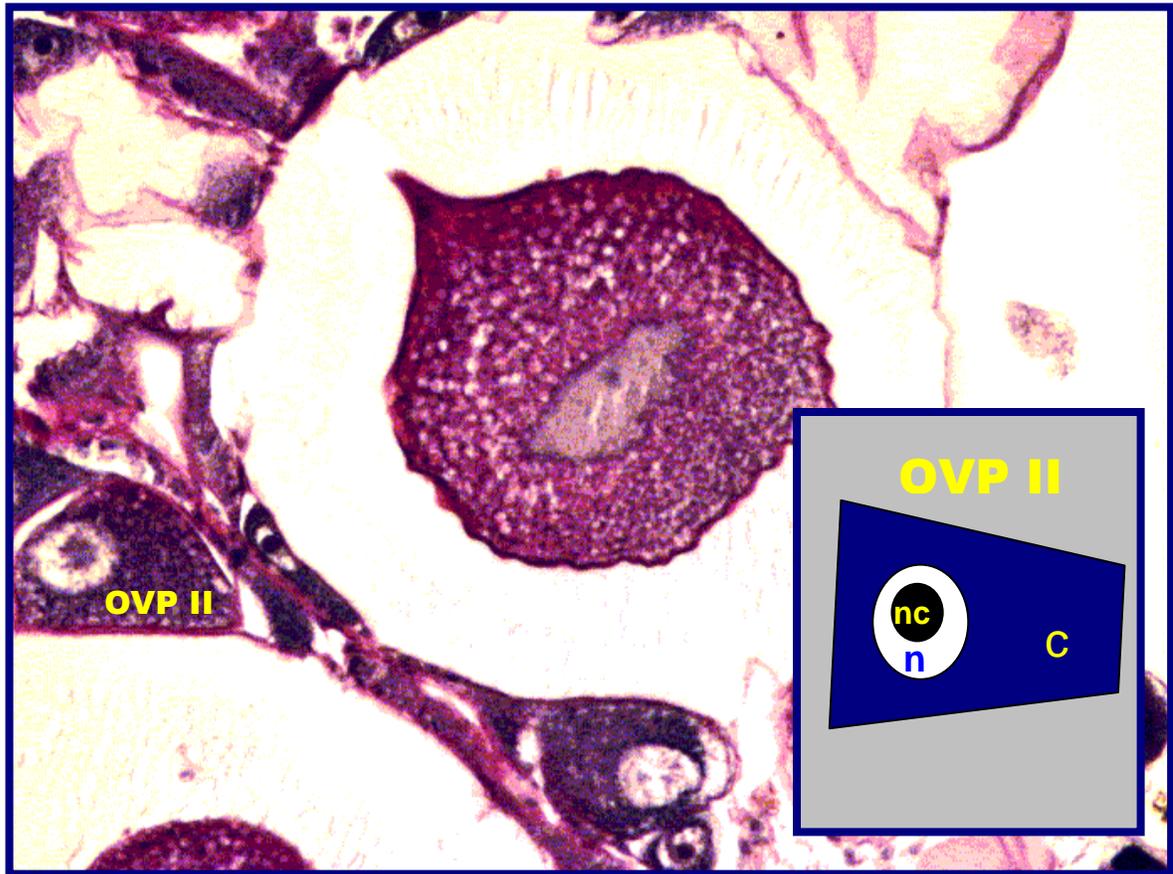


FIGURA 9. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Pre-vitelogénico II (OVP II). Tinción PAS, aumento 200 X. Observándose cromóforo el núcleo (n) generalmente desplazado hacia un polo, nucléolo (nc) fuertemente basófilo, al igual que el citoplasma (c).

Ovocito Previtelogénico III : Célula de forma variable de piriforme a alargada, de un diámetro promedio de 32 μm . Núcleo cromóforo, esférico, de menor dimensión, que los anteriores tipos celulares, en relación al tamaño total celular, nucléolo excéntrico fuertemente teñido. En citoplasma la coloración que tiende hacia el inicio de la eosinofilia, de aspecto fuertemente granular, evidenciando más notoriamente la vitelogénesis. Estos ovocitos se diferencian de los anteriores, porque en ellos comienza a formarse una delgada cubierta de gelatina, en los márgenes de la membrana plasmática (Figura 10).

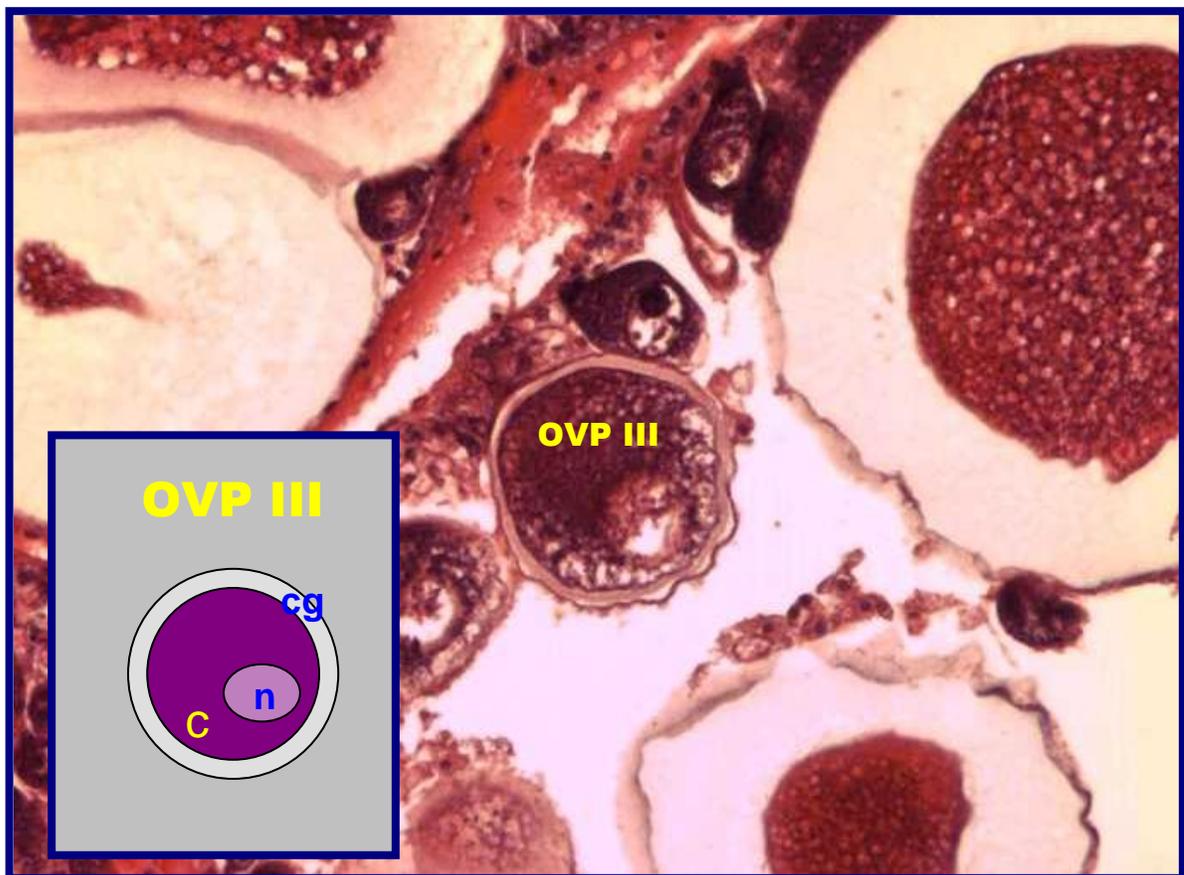


FIGURA 10. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Pre-vitelogénico III (OVP III). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X. Observándose el núcleo (n) cromóforo, citoplasma (c) basófilo y granular, iniciando la vitelogénesis, en la periferia celular puede evidenciarse el inicio de la formación de una delgada cubierta de gelatina (cg).

Ovocito Vitelogénico I : Célula esférica con un diámetro promedio de 55 μm . Citoplasma eosinofílico, notoriamente granular. Núcleo ligeramente esférico y central y se tiñe al igual que el nucléolo. La zona de gelatinización de color blanco se hace más notoria que el tipo celular anterior (Figura 11).

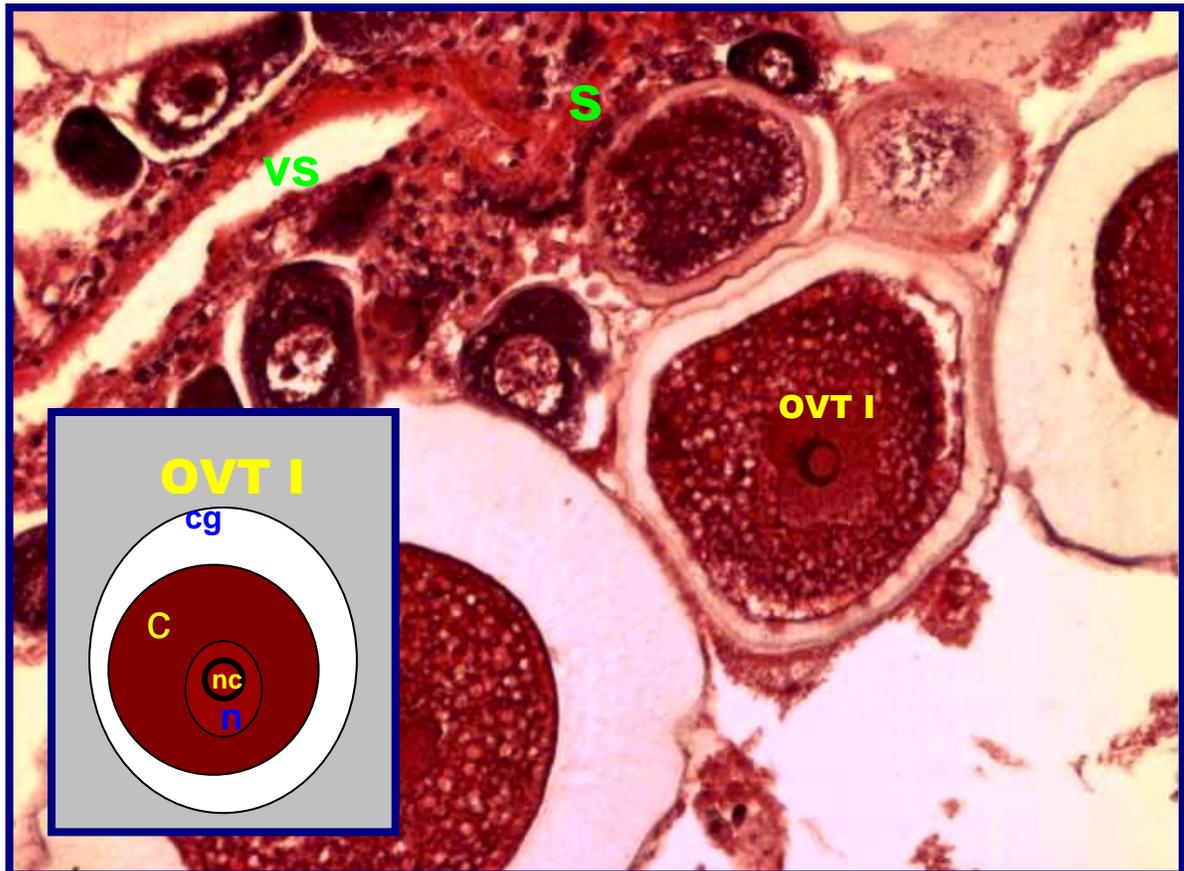


FIGURA 11. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Vitelogénico I (OVT I). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X. Observándose que el núcleo (**n**) se tiñe, al igual que el nucléolo (**nc**), citoplasma (**c**) eosinofílico y granular. En el septo ovárico (**S**), observamos la presencia de un vaso sanguíneo (**vs**), la cubierta de gelatina (**cg**) se hace mucho más notoria.

Ovocito Vitelogénico II : Célula esférica, de diámetro promedio de 77 μm . Citoplasma predominantemente eosinófilico persistiendo el aspecto granular. El núcleo es casi esférico de posición central o excéntrica y se tiñe al igual que el nucleólo. En algunos ovocitos podemos observar la existencia de un pedúnculo de fijación al septo germinativo. La zona de gelatina blanca que rodea al ovocito alcanza una dimensión importante respecto del tamaño total de este tipo celular (que incluye el diámetro del ovocito más la zona de gelatina que lo rodea) (Figura 12).

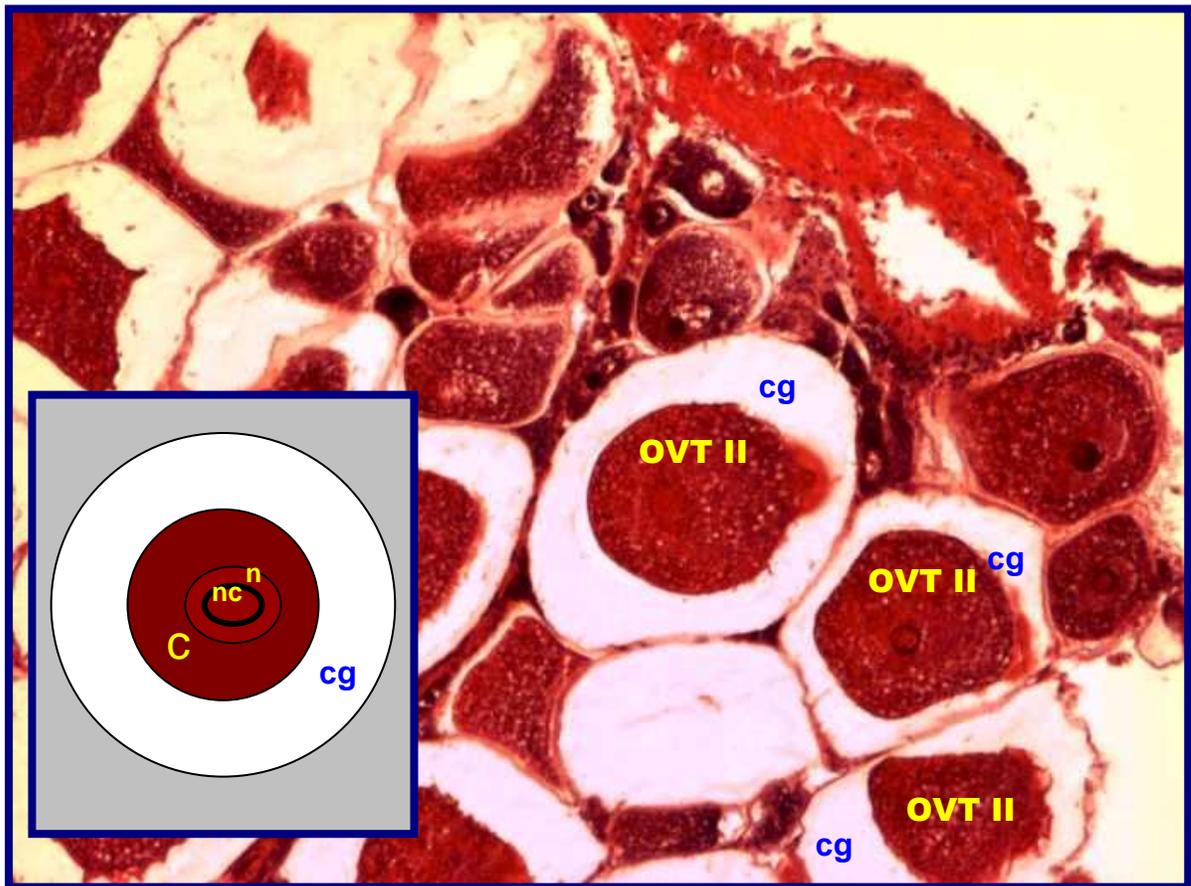


FIGURA 12. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Vitelogénico II (OVT II). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X. Observándose que el núcleo (n) se tiñe, al igual que el nucleólo (nc), citoplasma (c) eosinófilico, la cubierta de gelatina (cg) en progresivo aumento.

Ovocito Maduro : Célula esférica a irregular diámetro promedio de 95 μm , fuertemente eosinófilica, en algunos casos todavía es posible encontrar el pedúnculo de conexión. El citoplasma de aspecto granular se tiñe homogéneamente con la eosina, adquiriendo un forma estrellada o esférica. La zona de gelatinización blanca que rodea al ovocito alcanza su máximo grosor (Figura 13).

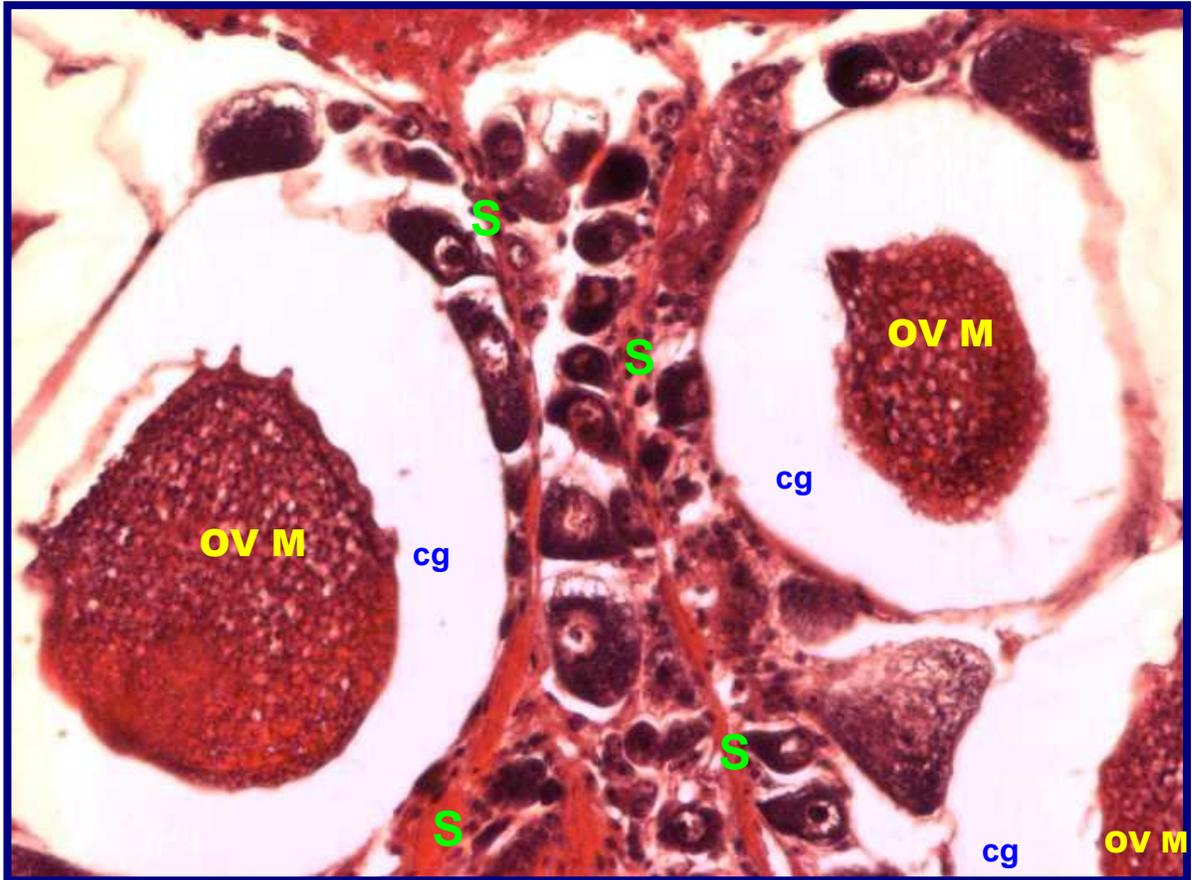


FIGURA 13. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Maduro (OVM). Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200 X. Observándose citoplasma (c) granular y eosinófilico, septos ováricos (S) gruesos, la cubierta de gelatina (cg) que rodea al ovocito alcanza su máximo grosor.

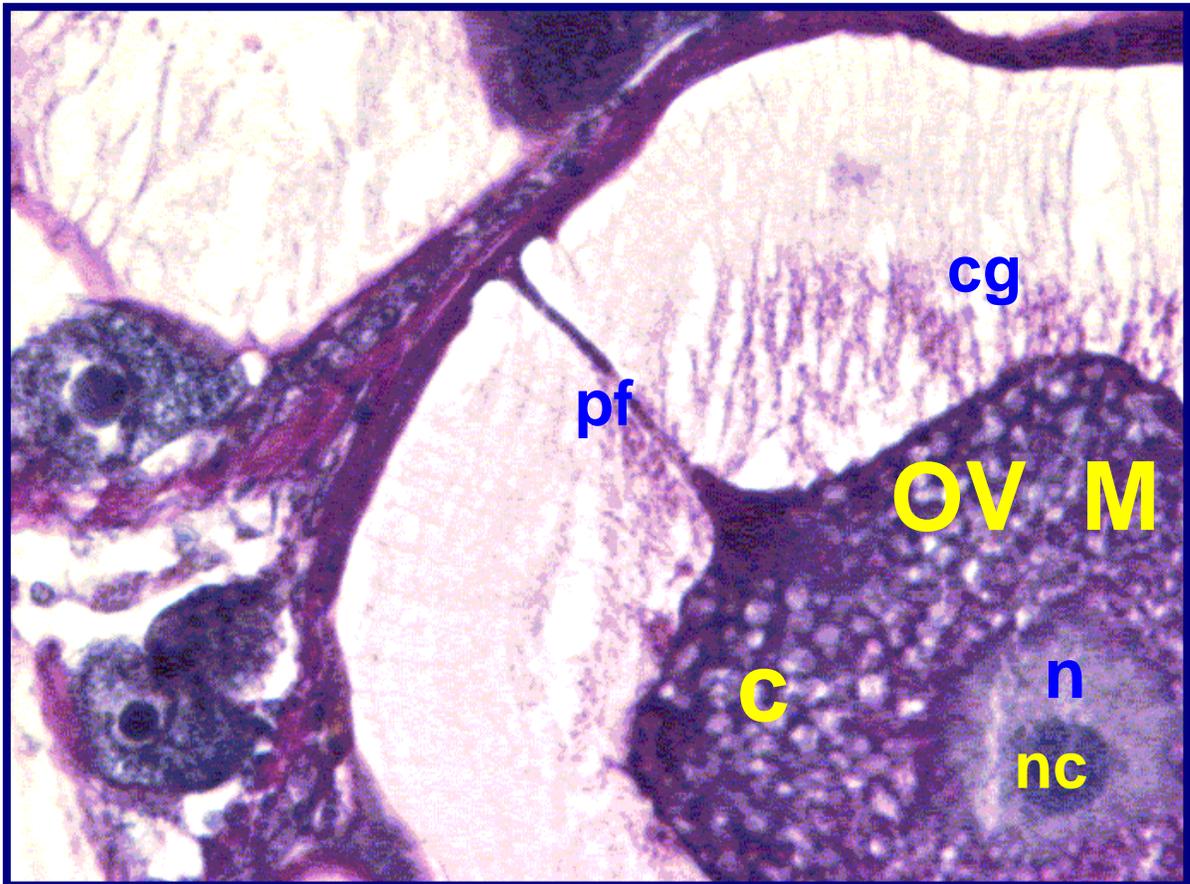


FIGURA 14. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*: Ovocito Maduro (OV M). Tinción PAS, aumento 400 X. Observándose que el núcleo (**n**), nucléolo (**nc**) el cual esta fuertemente teñido, citoplasma (**c**) granular, la cubierta de gelatina (**cg**) es gruesa y podemos observar la presencia de un pedúnculo de fijación (**pf**), y glicosaminoglicanos en el tejido conectivo (PAS +) que rodea a los ovocitos, color rojo púrpura.

LINEA GERMINAL *Fissurella crassa*

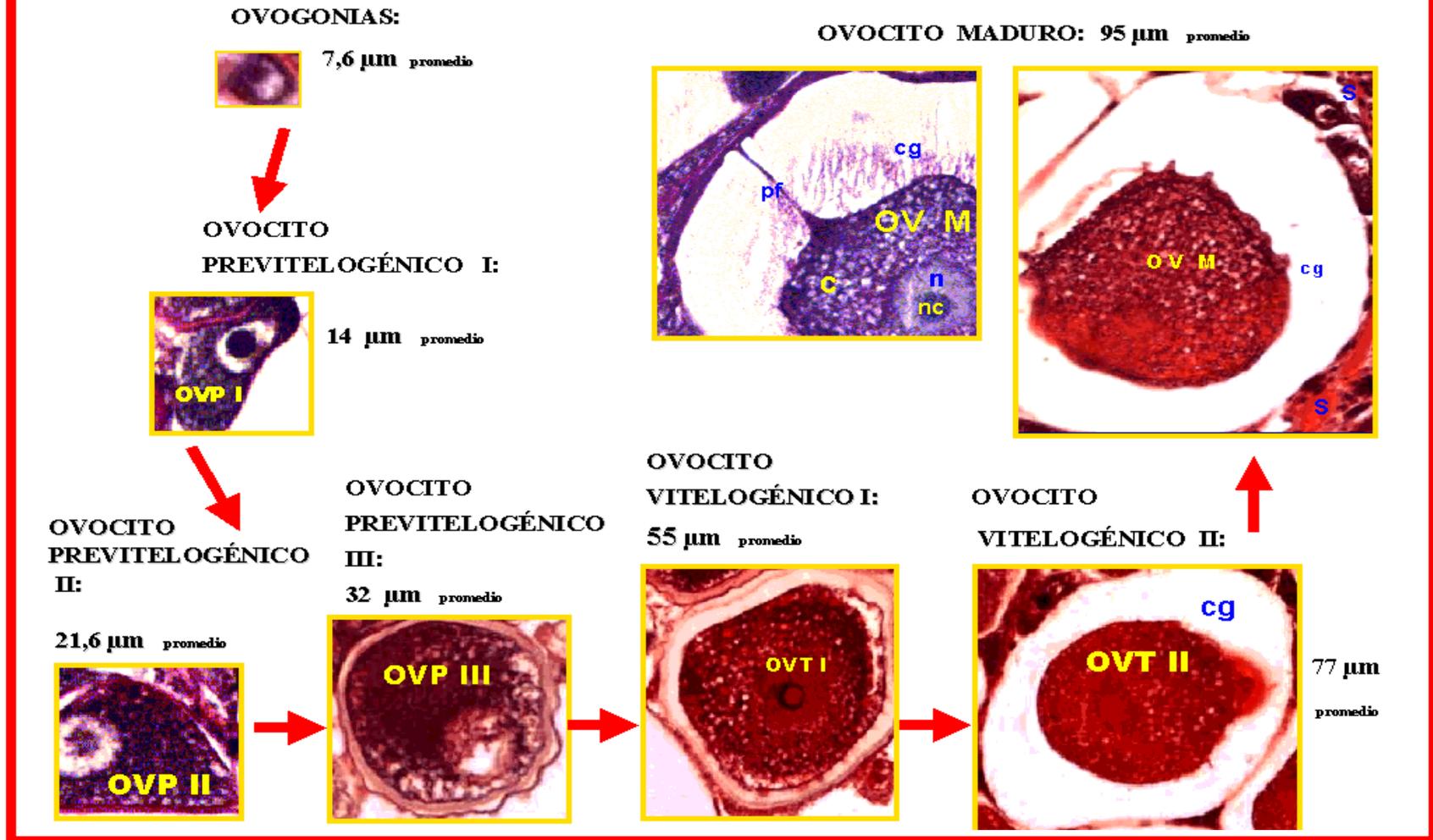


FIGURA 14 B. Descripción de la Línea Germinal de *F. crassa*.

Radioinmunoanálisis (RIA).

Para medir la concentración de progesterona durante un ciclo anual, se empleó el método de radioinmunoensayo (RIA), el que se realizó en el Laboratorio de Hormonas y Metabolitos del Departamento de Cs. Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, en conjunto con el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La fracción lipídica que contiene los esteroides en el tejido gonadal (fase orgánica), se separó de la fase acuosa (que contiene los restos del tejido ovárico) mediante extracción con diclorometano al 99,5 %. Para dicho efecto, se tomaron 2; 1 ó 0,5 g de gónada respectivamente, según el peso de cada ovario y posteriormente se congelaron a -20°C hasta su procesamiento, basándose en el protocolo descrito por Reis Henriques y Coimbra (1990), para el molusco *Mytilus edulis*.

Las muestras de ovario que se mantenían congeladas, posteriormente fueron homogeneizadas manualmente en 1 ml 0,01 M de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 en baño de hielo agregándose 5 ml de diclorometano al 99,5 %. Luego se realizó sonicación por 30 segundos en un sonicador "ultratip lab - sonic system" con una amplitud por tono de 80, a continuación se agitó mecánicamente en agitador "vortex" por 2 minutos y después se añadieron 5ml de diclorometano para nuevamente agitar en "vortex" por un minuto más.

Finalmente, las muestras se mantuvieron a -20°C por 24 horas, con el objeto de obtener una buena separación entre la fase acuosa y la fase orgánica donde están suspendidos los esteroides. La fase acuosa se congeló y se mantuvo en la superficie, mientras que la orgánica permaneció líquida en el fondo del tubo.

Se extrajo la fase orgánica de la muestra la que se reservó para su posterior empleo. A la fase acuosa restante se agregaron nuevamente 5ml de diclorometano al 99,5 % y se agitó mecánicamente por dos minutos, a continuación se separó la fase orgánica resultante.

Posteriormente se mezclaron ambas fases orgánicas y se sometieron a evaporación completa en baño de agua termoregulado, con corriente de aire, obteniendo un residuo o extracto seco, el cual contenía la progesterona. Este extracto seco fue resuspendido con 400, 200 y 100 μl de buffer PBS a pH 7,4 según si se tomaron 2; 1 ó 0,5 g de gónada respectivamente, tomando de cada suspensión 100 μl para el radioinmunoanálisis.

Aplicando los correspondientes factores de dilución, se estimaron los contenidos de progesterona (pmol /g ovario) utilizando reactivos específicos para dicha molécula. Este método se basa en que la progesterona marcada con Yodo 125 (I^{125}), compite por un tiempo fijo con la progesterona presente en las muestras, por sitios de unión del anticuerpo antiprogesteroa, adsorbido a la pared del tubo de ensayo (RIA de fase sólida) (D.P.C., Coat-A-Count $\text{\textcircled{R}}$).

Análisis de los Resultados.

1. Cálculo y Análisis Estadístico del Índice Gonadosomático (IGS).

Se cálculo el IGS, además se determinó el promedio, la desviación standard, el mínimo y el máximo, para cada uno de los individuos de los meses en estudio. Donde el IGS corresponde al peso de la gónada (PG) en relación al peso total de las partes blandas (PT):

$$\text{IGS} = (\text{PG}/\text{PT}) * 100$$

Para comparar los valores mensuales de IGS, se realizó análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y comparaciones múltiples a posteriori (Test de Tukey). Como el IGS, corresponde a un valor porcentual, para realizar un análisis de varianza se transformaron los valores obtenidos para IGS, según la fórmula de Blizz (Fórmula Arcoseno).

$$\text{IGSt} = (\text{Arcoseno}\sqrt{\text{IGS}}) * 57.29578$$

2. Análisis Histológico

Cada uno de los ejemplares correspondientes al presente estudio, fueron clasificados en cinco estados de madurez ovárica (inmaduro, en maduración temprana, en maduración avanzada, maduro y desove) presentando su distribución mensual y porcentual a lo largo del período.

3. Concentración de Progesterona

Para comparar los niveles de progesterona, en cada época del año, se realizó análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y comparaciones múltiples a posteriori (Test de Tukey).

4. Relación entre Concentración de Progesterona y Estado de Madurez Ovárica

Para establecer si existe una relación entre la concentración de progesterona y estado de madurez ovárica, se realizó una Correlación de Pearson (Astudillo et al., 1968).

RESULTADOS

Los valores promedio mensuales (\pm D.S.), mínimos y máximos de las variables evaluadas en la primera etapa de trabajo de laboratorio: peso total, peso blando, peso gónada, largo de concha, ancho de concha e índice gonadosomático (IGS) de cada ejemplar se presentan en la tabla 6.

TABLA 6. Valores mensuales: Peso Total, Peso Blando, Peso Gónada, Largo de Concha, Ancho de Concha e Índice Gonadosomático (IGS).

| MEDICIÓN: | | AGOSTO | OCTUBRE | DICIEMBRE | FEBRERO | ABRIL |
|--------------------------|--------------|--------|---------|-----------|---------|-------|
| PESO TOTAL(g) | prom. | 78,13 | 60,11 | 78,12 | 66,06 | 55,42 |
| | (σ) | 14,80 | 26,43 | 25,13 | 20,35 | 19,54 |
| | mín. | 61,90 | 35,75 | 42,34 | 29,77 | 24,45 |
| | máx. | 115,92 | 127,80 | 116,27 | 99,52 | 85,86 |
| PESO BLANDO (g) | prom. | 47,40 | 38,35 | 51,41 | 36,50 | 34,69 |
| | (σ) | 9,34 | 15,65 | 17,82 | 12,01 | 13,32 |
| | mín. | 38,55 | 18,39 | 25,76 | 17,26 | 16,34 |
| | máx. | 73,50 | 71,95 | 85,60 | 54,60 | 54,75 |
| PESO GONADA (g) | prom. | 3,73 | 3,79 | 3,47 | 3,31 | 3,01 |
| | (σ) | 1,09 | 1,78 | 1,49 | 1,91 | 2,02 |
| | mín. | 2,35 | 2,11 | 1,46 | 1,13 | 0,98 |
| | máx. | 6,06 | 8,52 | 5,54 | 6,70 | 7,39 |
| LARGO CONCHA(mm) | prom. | 77,72 | 68,18 | 72,73 | 72,63 | 68,38 |
| | (σ) | 5,06 | 10,21 | 7,19 | 10,69 | 11,22 |
| | mín. | 70,00 | 48,00 | 61,00 | 52,40 | 50,80 |
| | máx. | 87,60 | 87,30 | 82,60 | 85,80 | 88,10 |
| ANCHO CONCHA (mm) | prom. | 46,54 | 41,70 | 43,95 | 45,38 | 40,33 |
| | (σ) | 4,48 | 6,73 | 5,64 | 7,26 | 7,31 |
| | mín. | 37,00 | 32,30 | 30,40 | 28,80 | 28,30 |
| | máx. | 54,90 | 56,20 | 52,10 | 55,50 | 51,70 |
| IGS (%) | prom. | 7,98 | 9,96 | 6,73 | 8,80 | 8,61 |
| | (σ) | 2,54 | 1,98 | 1,97 | 3,72 | 4,22 |
| | mín. | 5,66 | 7,29 | 4,03 | 4,81 | 3,33 |
| | máx. | 15,06 | 14,64 | 11,05 | 16,96 | 16,67 |

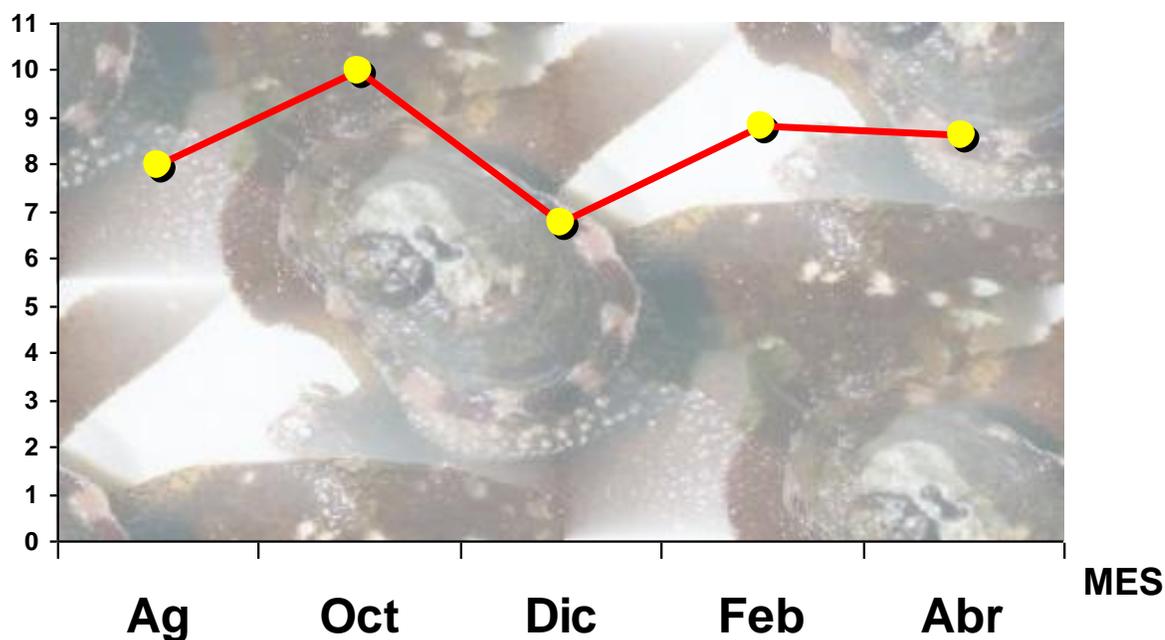
Promedio (prom.), desviación standard (σ), mínimo (mín.) y máximo (máx.).

Índice Gonadosomático (IGS) de *Fissurella crassa*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, como lo muestra la figura 15, el IGS promedio máximo para *Fisurrella crassa* se obtuvo en el mes de octubre, con un valor de 9,95 registrándose un segundo peak, correspondiente al mes de febrero (8,79)

Por otro lado, los menores valores promedio del IGS, obtenidos en los meses de diciembre (6,73) y agosto (7,98), evidenciarían la presencia de dos períodos de evacuación de gametos (Figura 15). El ANDEVA y Test de Tukey indican que no existen diferencias significativas entre los meses muestreados ($p < 0,05$).

IGS



| IGS | AGOSTO | OCTUBRE | DICIEMBRE | FEBRERO | ABRIL |
|----------|--------|---------|-----------|---------|-------|
| Promedio | 7,98 | 9,95 | 6,73 | 8,79 | 8,60 |

FIGURA 15. Distribución mensual del IGS.

Histología del Ovario de *Fisurella crassa*

El ovario de *Fisurella 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 que varía de epitelio simple cúbico a columnar y al cual subyace una capa de tejido conectivo y muscular (Figura 16 y 17), desde donde se proyectan trabéculas o septos gonadales. (Figura 18).

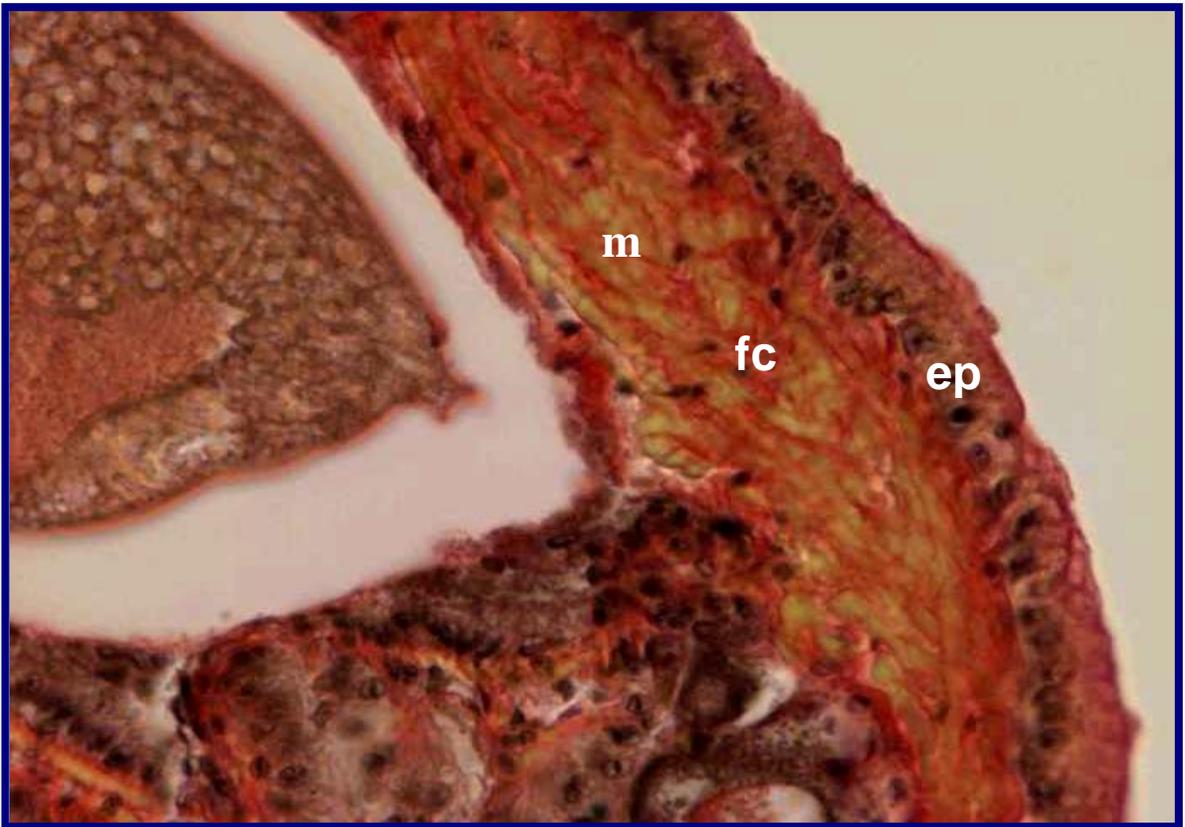


FIGURA 16. Histología del ovario de *Fisurella crassa*. Tinción Van Gieson, aumento 400X. Se observa que el ovario está recubierto por un epitelio (**ep**) simple cúbico a columnar, y al cual subyace una capa de tejido conectivo con fibras colágenas (**fc**) de color rojo y de tejido muscular (**m**) de color amarillo.

El parénquima que constituye el tejido noble del órgano está formado por las diversas células de la línea germinal y el estroma, el cual cumple diversas funciones: mecánica o de sostén, de transporte de metabolitos y almacenamiento entre otras; 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 hacia 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 en donde se desarrolla la línea germinal (Figura 18 y 19).

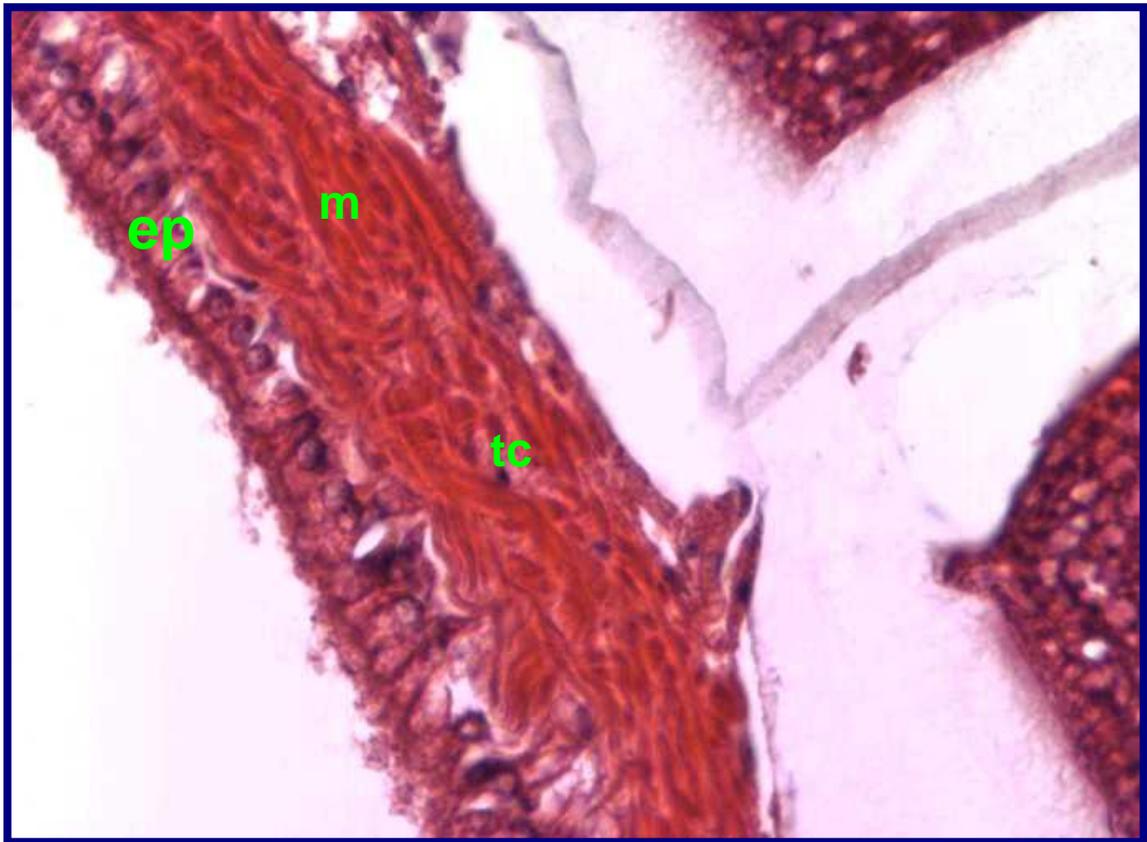


FIGURA 17. Histología del ovario de *Fissurella crassa*. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 400X. Donde se observa que el ovario está recubierto por un epitelio simple (**ep**) cúbico a columnar, y al cual subyace una capa de tejido conectivo (**tc**) de color rosado y muscular de color rojo (**m**).

Según avanza el desarrollo celular, estos septos van disminuyendo en grosor hasta disgregarse casi por completo en el momento final de la madurez gonadal. Las células germinales se desarrollan en forma centrífuga alrededor de estos ejes.

Los septos están formados por tejido conectivo, donde se observa la presencia de numerosas fibras de colágeno, las cuales se ven como estructuras ondulantes que se tiñen de rosado con la tinción de Hematoxilina-Eosina y rojas con Van Gieson.

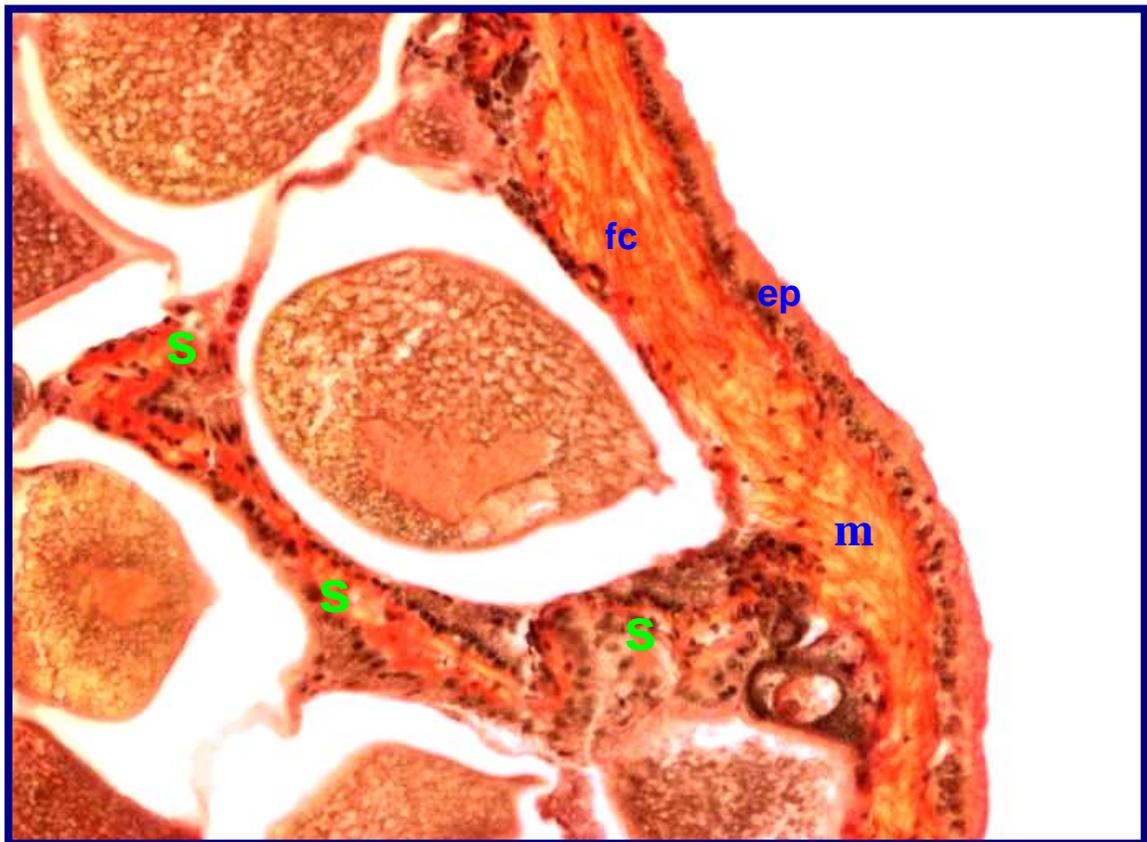


FIGURA 18. Histología del ovario de *Fissurella crassa*. Tinción Van Gieson, aumento 200X. El ovario está revestido por epitelio (**ep**) al cual subyace una capa muscular (**m**) y de tejido conectivo, el cual se evagina hacia el interior de la gónada, formando desde la pared trabéculas de sostén o septos, (**S**) formados por tejido conectivo, donde se pueden observar numerosas fibras colágenas (**fc**) de color rojo.

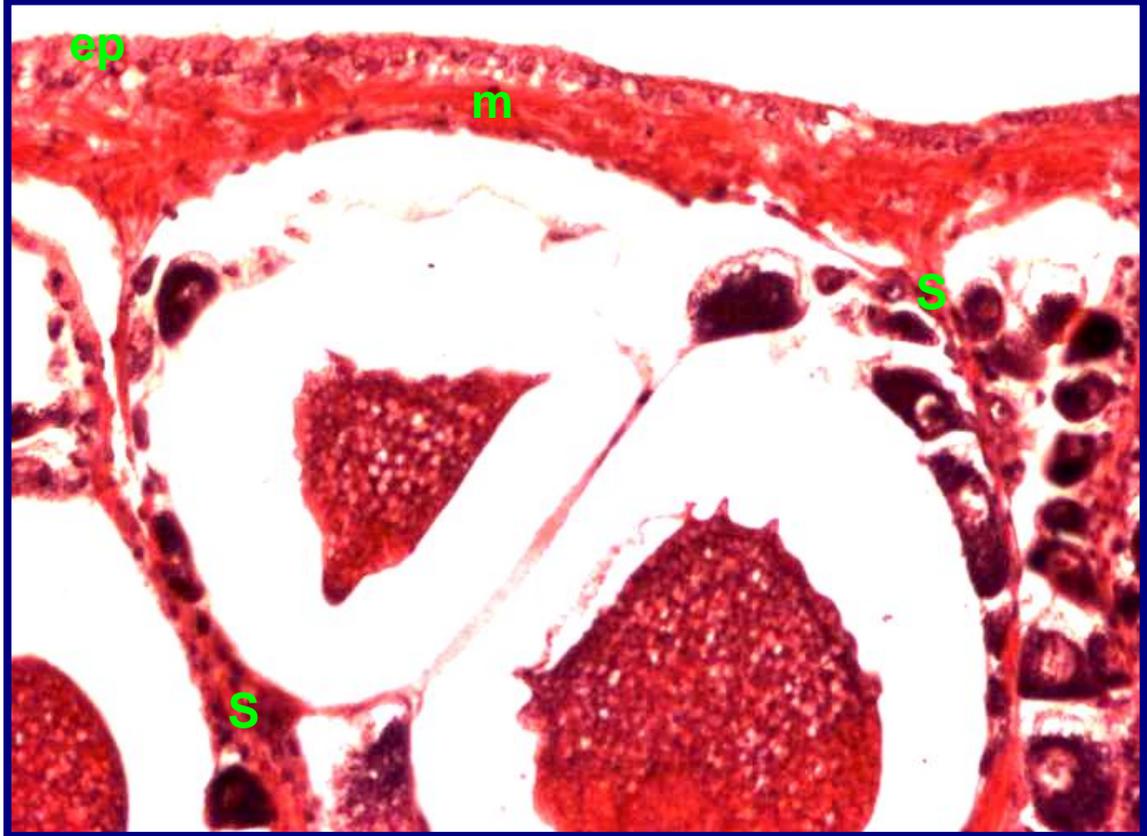


FIGURA 19. Histología del ovario de *Fissurella crassa*. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 200X. Donde se observa que el ovario está cubierto por epitelio (**ep**) cúbico y dividido por numerosos septos (**S**) formados por tejido conectivo donde se observa la presencia de numerosas fibras de colágeno, las cuales se ven como estructuras ondulantes que se tiñen de rosado y muscular de color rojo (**m**).

Además de diversas células, principalmente fibroblastos, el tejido conectivo posee una matriz extracelular, compuesta por elementos fibrilares, como fibras de colágeno entre otras y una cantidad variable de sustancia fundamental o intercelular amorfa, la cual se encuentra separando a la vez que envolviendo a las células, fibras y vasos sanguíneos; compuesta por agua, sales, diversos metabolitos y mucopolisacáridos o glicosaminoglicanos que se tiñen de color rojo púrpura con la tinción de Ácido Peryódico Shiff (PAS) (Figura 20).

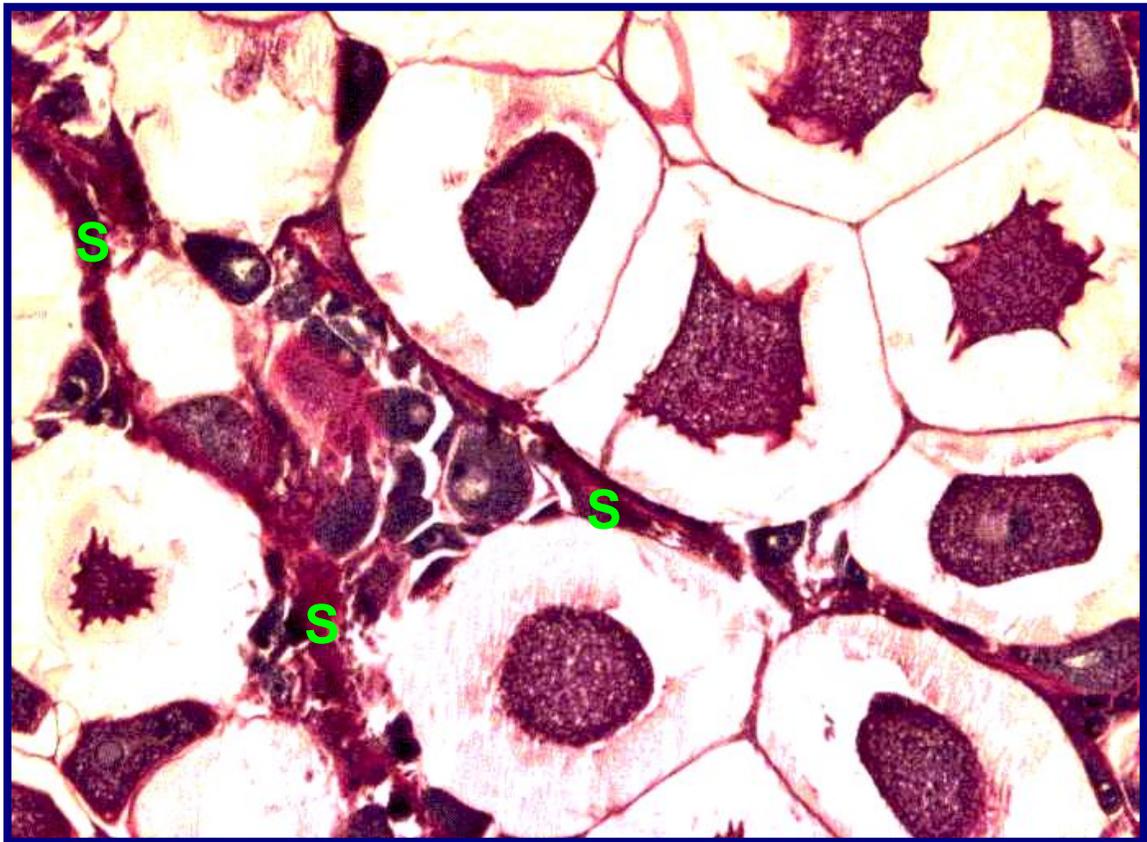


FIGURA 20. Histología del ovario de *Fissurella crassa*. Tinción PAS, aumento 100X. El ovario está dividido por numerosos septos (S) formados por tejido conectivo, el que forma parte de la matriz extracelular, constituida además por otros elementos como mucopolisacáridos, que se tiñen de color rojo púrpura.

Estados de Madurez Ovárica en *Fissurella crassa*.

Durante los meses muestreados se encontraron presentes todos los tipos celulares que comprenden la línea germinal (LGT y LGA), en los diferentes estados de madurez gonadal, donde dependiendo de la época del año, predominó más un tipo celular que otro.

❖ Estado (0): Inmaduro

Este estudio no encontró ningún individuo en este estado, debido a que los ejemplares, tenían tallas mayores a 45 mm, los que corresponden a individuos sexualmente maduros.

- **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 línea germinal temprana (LGT), principalmente ovocitos pre-vitelogénicos. En el parénquima, aunque pueden observarse todas las células que componen la línea germinal, existe un claro predominio de la línea germinal avanzada (LGA), principalmente ovocitos vitelogénicos en distintos grados de desarrollo. Se ve claramente la presencia de ovocitos maduros (OV M) (Figura 21).

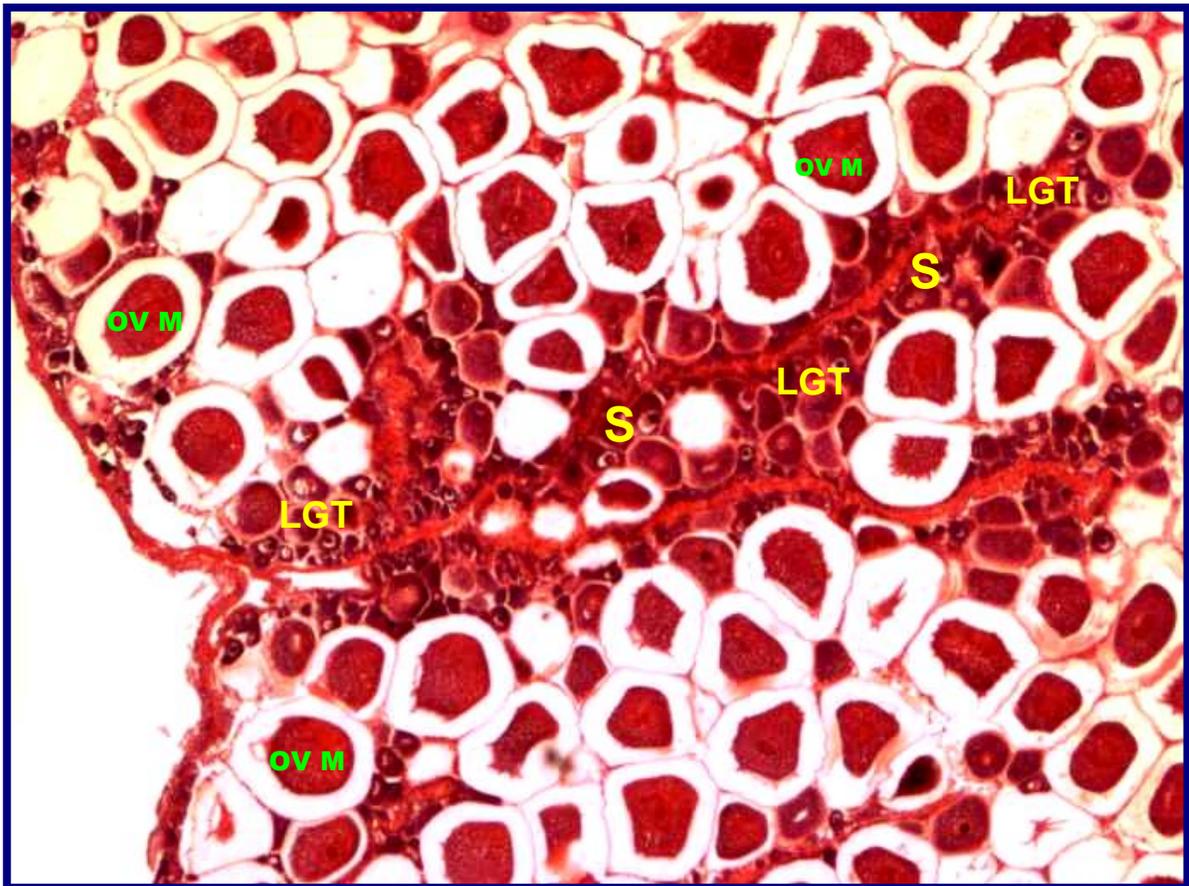


FIGURA 21. Estado 1: en Maduración Temprana. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 40 X. Los septos gonadales (S) son gruesos, en sus paredes se observan células de línea germinal temprana (LGT) y en el parénquima la presencia de ovocitos maduros (OV M).

- **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 el estado anterior, ovocitos previtelogénicos, pero en escasa cantidad. Aumenta la presencia de ovocitos maduros (Figura 22).

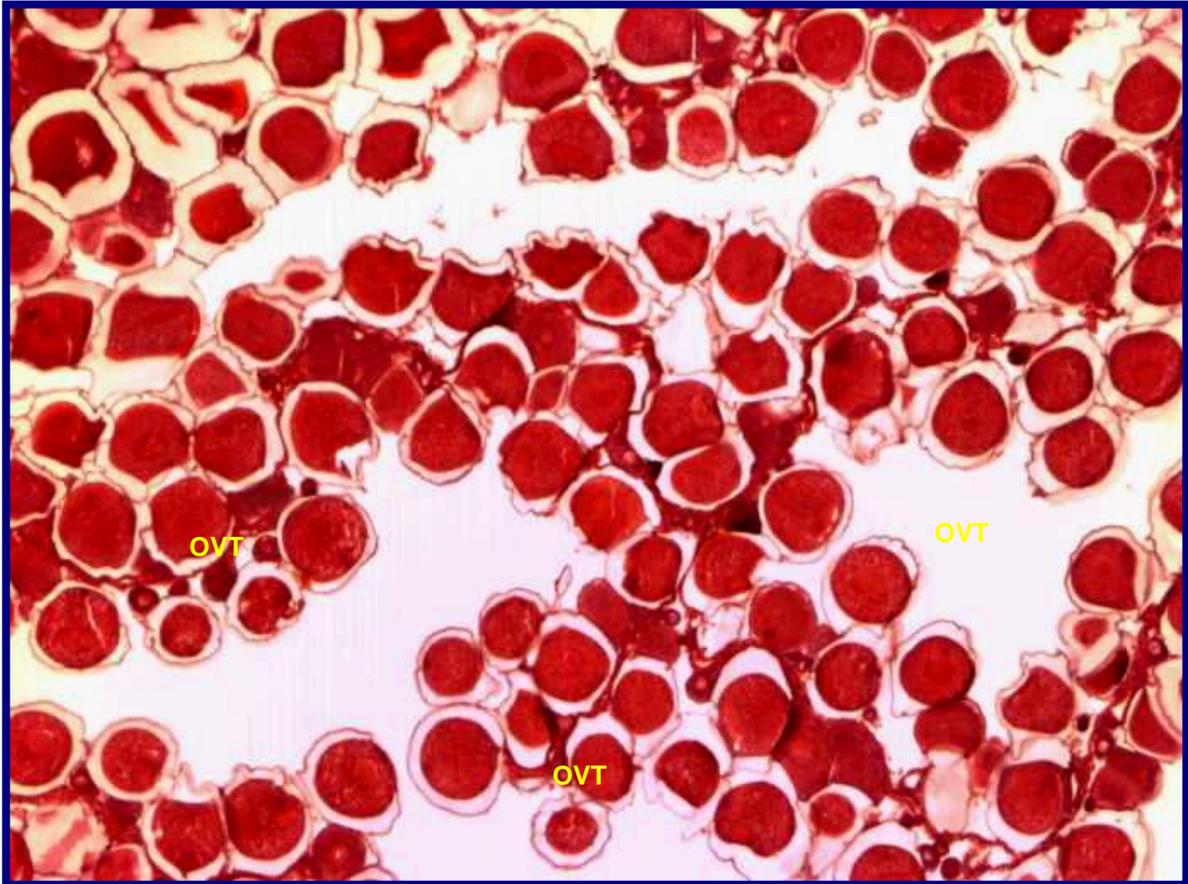


FIGURA 22. Estado 2: en Maduración avanzada. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 40 X, existe un marcado predominio de ovocitos vitelogénicos (OVT) en distintos grados de desarrollo.

- **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 parénquima, 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 (Figura 23).

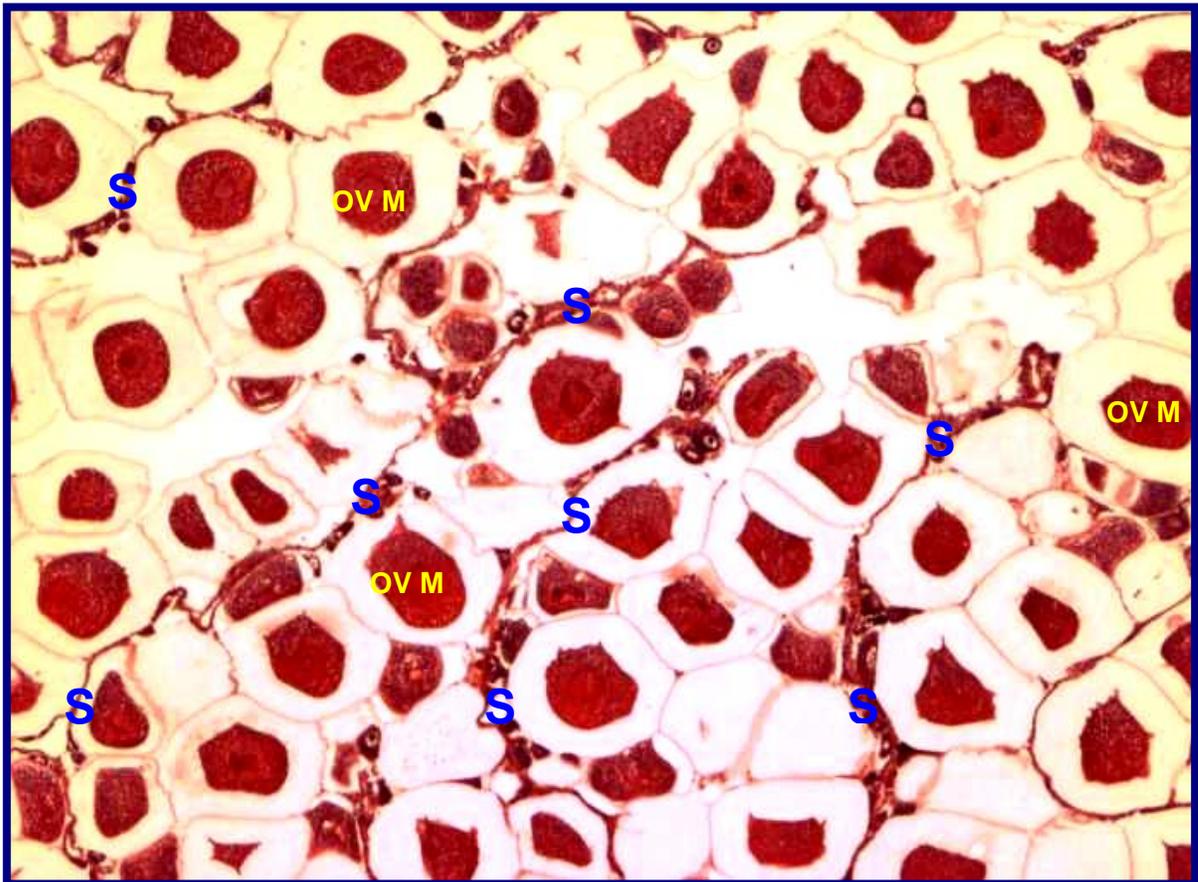


FIGURA 23. ESTADO 3: Maduro, Tinción Hematoxilina - Eosina, aumento 40 X, los septos gonadales son muy delgados (S) y en el parénquima la presencia de ovocitos maduros (OV M).

- **Estado (4): Desove**

En el estroma, se observa un engrosamiento de los septos gonadales, 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 (Figura 24).

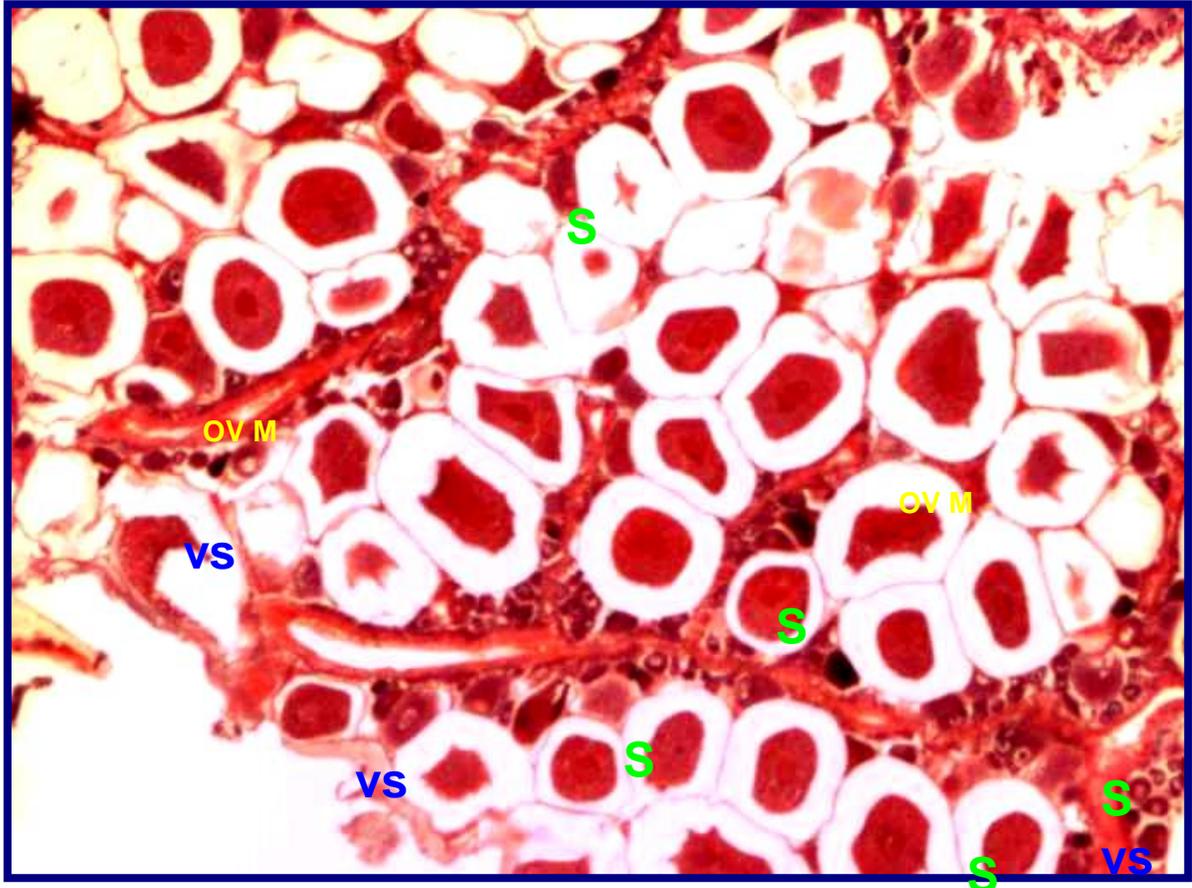


FIGURA 24. Estado 4: Desove. Tinción Hematoxilina-Eosina, aumento 40 X, se observa un engrosamiento de los septos gonadales (S), se hace más notoria la presencia de vasos sanguíneos (vs) en el interior de los septos gonádicos, en relación a los otros estados de maduración ovárica. Se observa la presencia de un número importante de ovocitos maduros (OV M).

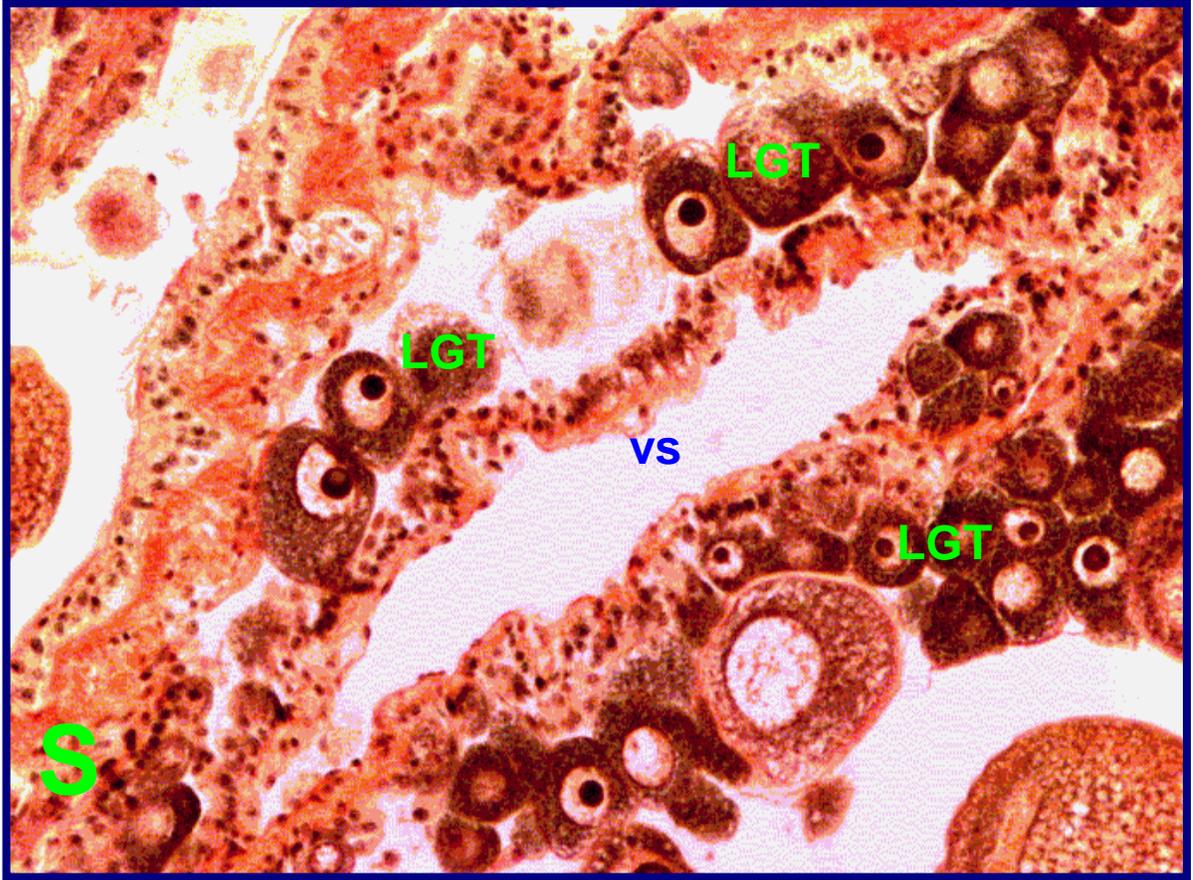


FIGURA 25. Estado 4: Desove. Tinción Van Gieson, aumento 200 X, se observa un engrosamiento de los septos gonadales , alrededor de los cuales se puede ver la formación de una línea germinal temprana (LGT) y se hace más notoria la presencia de vasos sanguíneos (vs) en el interior de los septos gonádicos, en relación a los otros estados de maduración ovárica.



FIGURA 26. Estado 4: Desove. Tinción Van Gieson , aumento 400 X, se observa la formación de una línea germinal temprana (**LGT**) alrededor de los septos gonádicos y se hace más notoria la presencia de vasos sanguíneos (**vs**) en su interior , en relación a los otros estados de maduración ovárica.

Distribución mensual de los estados de madurez gonadal de *Fissurella crassa*.

Los ejemplares correspondientes a cada uno de los meses en estudio, fueron clasificados en cinco estados de madurez gonadal: Estado 0: Inmaduro, Estado 1: en Maduración Temprana, Estado 2: en Maduración Avanzada, Estado 3: Maduro y Estado 4: Desove. En la tabla 7, se muestra la distribución mensual de los estados de madurez ovárica y en la figura 27, la distribución porcentual, de los mismos a lo largo del período en estudio.

TABLA 7. Distribución mensual absoluta y porcentual de los estados de madurez gonadal de *Fissurella crassa*.

| MESES | E° 0 | E° 1 | E° 2 | E° 3 | E° 4 |
|-------|------|----------|-----------|------------|----------|
| Ag | 0 | 0 | 0 | 8 (67 %) | 4 (33%) |
| Oct | 0 | 0 | 0 | 12 (100%) | 0 |
| Dic | 0 | 7 (58%) | 0 | 5 (42%) | 0 |
| Feb | 0 | 0 | 11 (92%) | 1 (8%) | 0 |
| Abr | 0 | 0 | 0 | 7 (58%) | 5 (42%) |

E° 0: Inmaduro; E° 1 : En Maduración temprana; E° 2: En Maduración avanzada; E° 3: Maduro; E° 4: Desove

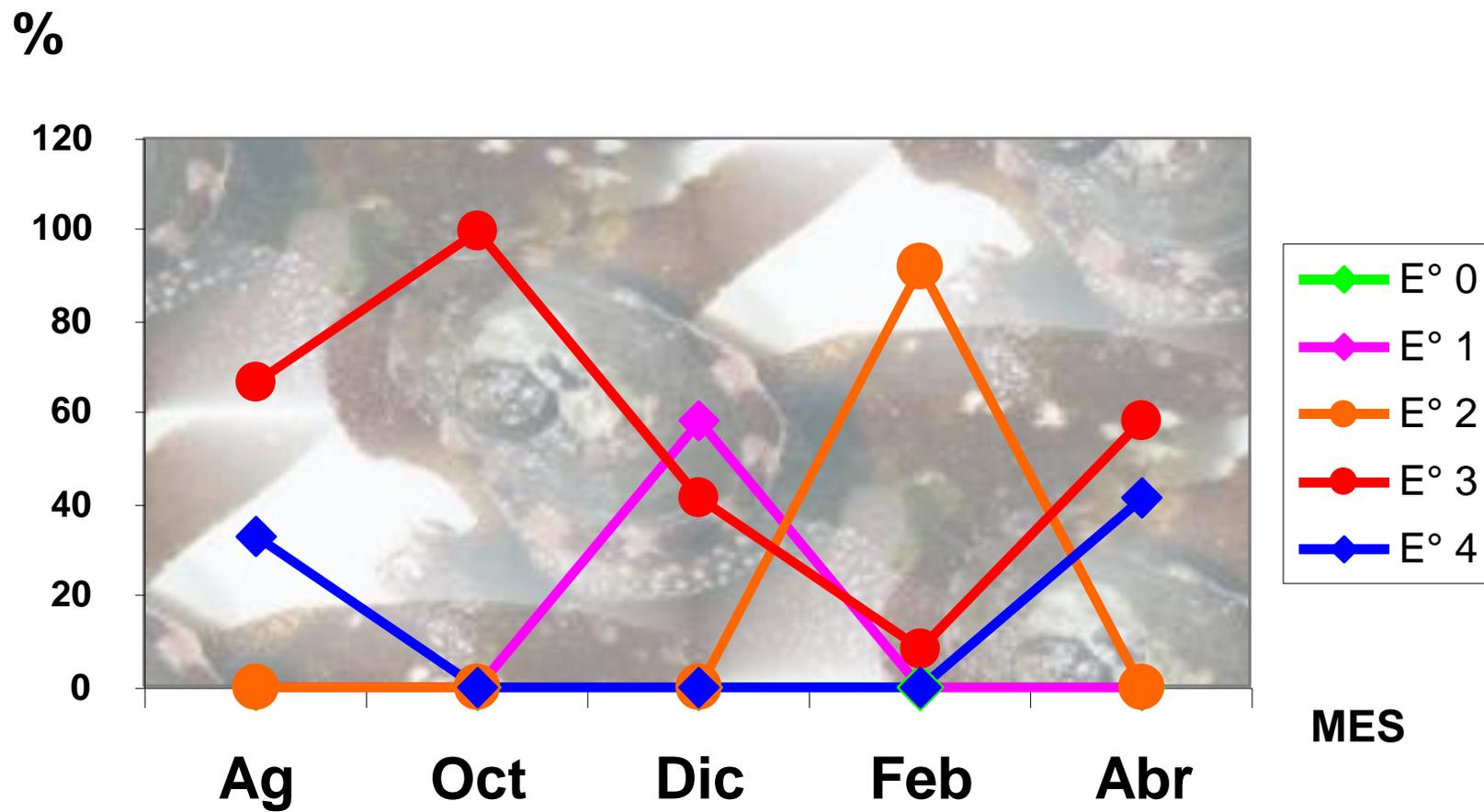


FIGURA 27. Distribución porcentual de los diferentes estados de maduración ovárica. E°0: Inmaduro; E°1: en Maduración temprana; E° 2: en Maduración avanzada; E° 3: Maduro; E° 4: Desove.

Concentración de Progesterona en *Fissurella crassa*

En la Tabla 8 se presentan los valores promedios obtenidos de la medición de la concentración de progesterona para cada uno de los meses en estudio.

TABLA 8. Valores Mensuales de la Concentración de Progesterona.

| P4(pmól/g) | AGOST | OCTUBRE | DICIEMBRE | FEBRERO | ABRIL |
|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| prom. | 1,75 | 1,56 | 1,20 | 1,19 | 1,73 |
| (σ) | \pm 0,60 | \pm 0,29 | \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 |

P4: progesterona, (σ): desviación standard, mín: mínimo y máx: máximo.

Los valores promedios mensuales de la concentración gonadal de progesterona fluctuaron entre 0,12 y 3,2 pmol/g ovario, encontrándose la mayor concentración en el mes de agosto (1,75 pmol/g ovario) y la menor en el mes de febrero (1,19 pmol/g ovario) (Figura 28).

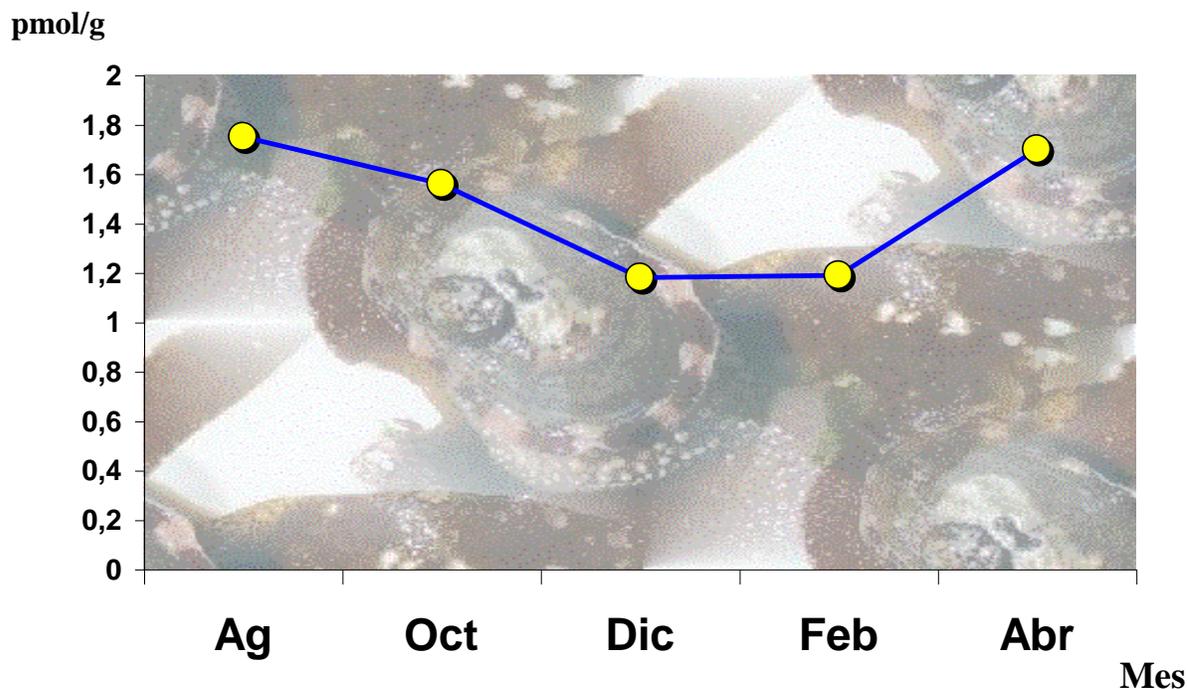


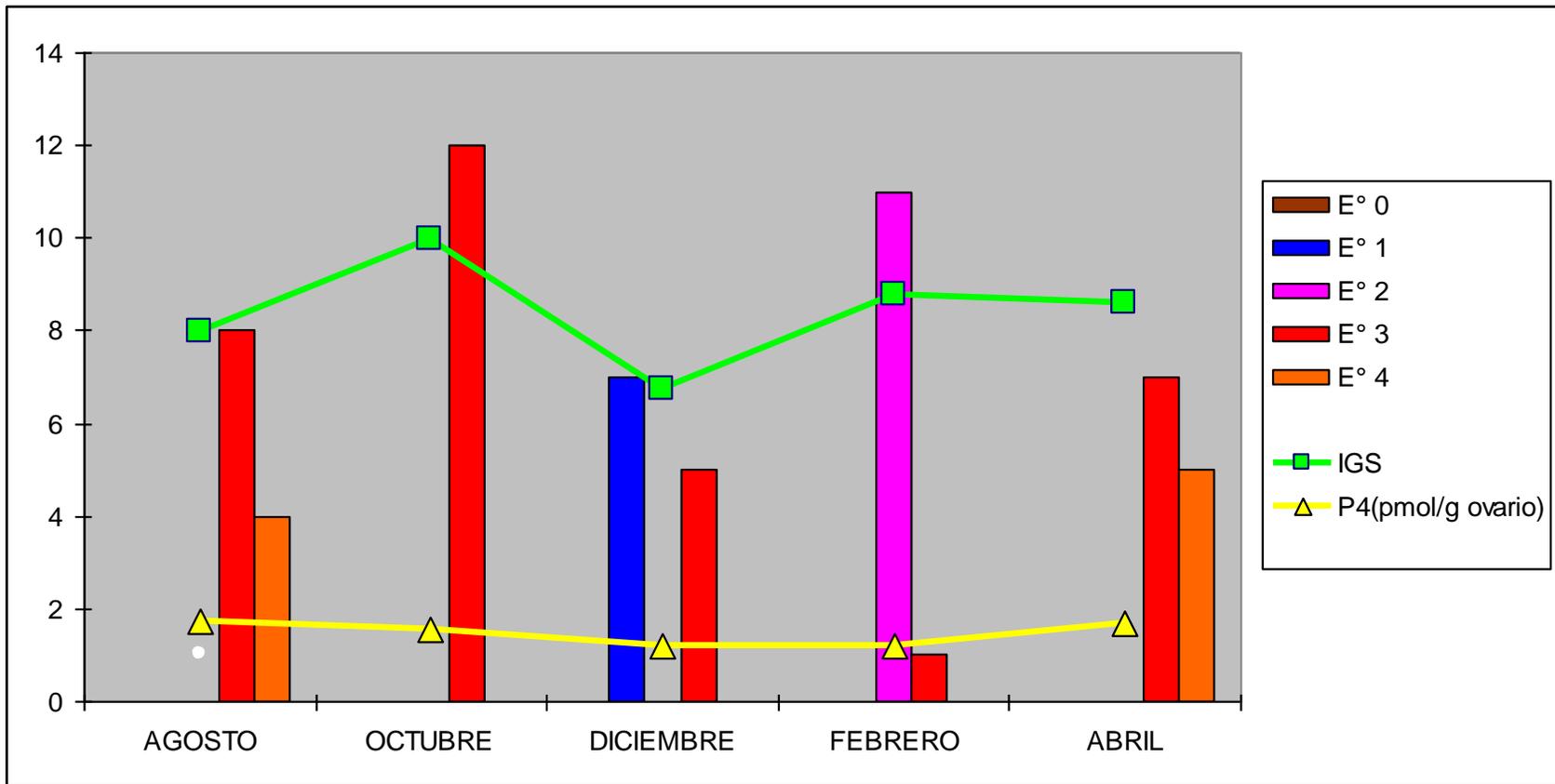
FIGURA 28. Concentración mensual de Progesterona en *Fissurella crassa* (pmol/g ovario)

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.

Relación entre el Estado de Madurez Gonadal y la Concentración de Progesterona en *Fissurella crassa*.

Para determinar si las variables en estudio, Estado de Madurez Gonadal: E°1, E°2, E°3, E°4 y la concentración de progesterona, presentaban alguna relación, se utilizó un Test de Correlación de Pearson. El análisis indicó una correlación = 0,56 entre ambas variables.

A continuación en la figura 29, se muestra la distribución mensual de los estados de madurez gonadal, IGS y concentración de progesterona.



| MESES | E° 0 | E° 1 | E° 2 | E° 3 | E° 4 | IGS | P4(pmol/g ovario) |
|-----------|------|------|------|------|------|------|-------------------|
| AGOSTO | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 7,98 | 1,75 |
| OCTUBRE | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 9,95 | 1,56 |
| DICIEMBRE | 0 | 7 | 0 | 5 | 0 | 6,73 | 1,2 |
| FEBRERO | 0 | 0 | 11 | 1 | 0 | 8,79 | 1,19 |
| ABRIL | 0 | 0 | 0 | 7 | 5 | 8,60 | 1,70 |

FIGURA 29. Distribución mensual de los estados de madurez gonadal, IGS y concentración de progesterona. Estado 0: Inmaduro, Estado 1: en Maduración Temprana, Estado 2: en Maduración Avanzada, Estado 3: Maduro y Estado 4: Desove. IGS: Índice Gonadosómico y P4 : Progesterona.

DISCUSIÓN

Diversos autores han señalado una actividad reproductiva continua para las diferentes especies del género *Fissurella* del litoral chileno, encontrándose individuos que pueden evacuar gametos casi todo el año, (Bretos *et al.*, 1983; Bretos *et al.*, 1988 (a); Bretos *et al.*, 1988 (b); Bretos y Chihuailaf 1990; Zuñiga, 1991; Collado, 1998; Segura, 1998).

Este trabajo realizado en el sector de Montemar V región, registró bimensualmente el IGS durante un ciclo anual, y los resultados obtenidos fueron comparados con el grado de madurez gonadal, establecido por cortes histológicos a lo largo del ciclo reproductivo. Se registraron dos "peaks" de IGS, uno en octubre y uno de menor magnitud en febrero, coincidiendo con que el 100% de los individuos muestreados en el mes de octubre se encontraban en E³: Maduro y en el segundo "peaks" de IGS, el 92% de los ejemplares estaba en E²: en Maduración Avanzada y el 8% restante en E³: Maduro. Por lo tanto existe una coincidencia entre el grado de madurez gonadal, establecido histológicamente y el IGS registrado en este estudio.

Además se registraron en relación al valor de IGS, dos períodos de evacuación de gametos para hembras de *F. crassa*: el principal en diciembre y uno menor en agosto. En el principal período de evacuación, diciembre, el 58% de los individuos se encontraba en E¹: en Maduración Temprana, (etapa siguiente al desove, en el ciclo de madurez gonadal) y el 42 % restante en E³: Maduro (próximo a desovar). Por lo que se puede concluir que existe una concordancia entre el período de desove registrado por el IGS y el estado de madurez ovárica (establecido histológicamente) de los individuos.

El resultado obtenido en relación a los valores de IGS a lo largo del ciclo reproductivo, concuerda parcialmente con lo descrito por Huaquín *et al.* (1998), para la misma especie y zona de muestreo. Se encontró una coincidencia en el "peak" de mayor valor de IGS (octubre) y el principal período de desove (diciembre), con el trabajo anteriormente señalado.

Sin embargo se encontró una diferencia entre estos trabajos, en el mes de presentación del segundo "peak" de IGS (agosto y febrero respectivamente), y el segundo período de desove (septiembre y agosto respectivamente). Esta diferencia podría ser explicada por el hecho de que la fecha de este estudio, coincidió con la presencia del fenómeno de la "Corriente del Niño" (que incrementó en 2 a 3 °C la temperatura del agua), en el cual el mes de agosto correspondió a una baja del IGS (desove) a diferencia de Huaquín *et al.* (1998), en que dicho mes correspondió a un alza del valor de IGS. El menor valor de IGS obtenido, en el presente trabajo, se debió probablemente a que el aumento de la temperatura del agua, provocó una maduración gonadal prematura y el estímulo al desove consecuente, lo que concuerda, al analizar la distribución porcentual de los estados de madurez ovárica, establecida histológicamente para el mes de agosto en el cual, el 67 % de los ejemplares, se encuentra en E°3: Maduro (proximo a desovar) y el 33% restante en E°4: Desove.

El aumento de la temperatura ambiental y del agua, puede haber tenido dos efectos en las poblaciones de fauna costera. Por un lado, disminuir las poblaciones de recursos bentónicos (Alvial, 1998) y por otro lado, estimular la gónada, favoreciendo la reproducción de la especie estudiada. Al respecto Osorio *et al.* (1985), señala que en *Fisurella maxima* en estudios realizados en los Vilos, durante la presencia de la Corriente del Niño, el 87,4 % de los individuos se encontraban en madurez máxima y evacuación, registrando cuatro evacuaciones masivas en un año, resultado que contrasta con lo señalado para la misma especie por Bretos *et al.* (1983), quién registra en Iquique, dos evacuaciones masivas para el mismo período (uno a fines de primavera e inicios de verano y otro durante el invierno). Al respecto Zuñiga (1991), señala que es muy probable que los desoves parciales de *F. limbata* (en total tres) en la zona de Fray Jorge y de Fisurellidos en general estarían condicionados por factores ambientales propios de cada lugar y/o endógenos que pueden cambiar de año en año, citando también lo ocurrido en *F. maxima* durante la presencia del Fenómeno del Niño (Osorio *et al.*, 1985).

A la misma conclusión llega Honour (2002), al analizar el ciclo reproductivo de *F. cumingi*, en Caleta Quintay (33° 13'S, 71° 38'O), V región, esta especie presentó una evolución

diferencial, segregándola en una primera etapa de alta actividad, con dos desoves importantes, y una segunda de baja actividad reproductiva, señalando que estos hechos se ven fuertemente influenciados por factores abióticos como temperatura, fotoperíodo y ciclo de mareas.

Algo similar ocurrió en *F. maxima*, *F. cumingi* y *F. latimarginata*, donde Bonati (1999), registró 3 períodos de desove a lo largo del año 1998; señalando el autor que la influencia de la temperatura del agua en el ciclo de las tres especies se evidencia, en la coincidencia que el desove de mayor magnitud es el de junio para todas las especies en estudio, con un incremento térmico del agua relacionado con la presencia de la "Corriente del Niño".

Por otro lado, Huaquín *et al.* (1998), encontraron una concordancia en ejemplares machos y hembras de la misma especie, en relación al principal y secundario, "peak" de IGS y período de desove, en la misma zona del actual trabajo, sin la influencia de la "Corriente del Niño". Al comparar los resultados del presente estudio en ejemplares hembras, con los obtenidos por Tichauer (2002), para ejemplares machos, en la misma zona y época de muestreo, se obtuvo una coincidencia en el mes de presentación de el principal "peak" de IGS y período de desove; sin embargo, no se obtuvo tal concordancia, al comparar el "peak" secundario de IGS y período de desove en ejemplares machos y hembras respectivamente.

En relación al estudio histológico, se describieron 4 estados de madurez ovárica, similares a los descritos por Collado (1998), y Segura (1998), para *F. latimarginata*, exceptuando el E° 4: Desove, en el cual, a diferencia de lo descrito por los autores anteriores, en *F. crassa* se encontraron ovocitos en madurez avanzada y maduros, en una proporción abundante al interior de los septos gonadales, por lo que se puede concluir, que lo registrado para esta especie, se trata de desoves parciales y no totales, como lo señalado para *F. latimarginata* y *F. cumingi*. Estos resultados obtenidos en *F. crassa* son coincidentes, con lo descrito por Zuñiga (1991), para *F. limbata*, aludiendo a que los tipos celulares dominantes en las gónadas son los ovocitos maduros y espermatozoos, como ocurre en *F. barbadosensis* y *F. reticulata* (Webber y Giese, 1977, citado por Zuñiga, 1991), donde las gónadas se

presentaron siempre maduras y con gametos maduros, luego de los desoves, lo que sugiere, según el autor, que estos ocurren en "forma parcial".

Por otro lado, cabe destacar que se encontró la presencia del parásito *Proctoeces lintoni*, en algunas gónadas de los ejemplares estudiados, lo que concuerda con lo observado por Oliva y Huaquín (2000), los que señalan que *Proctoeces lintoni*, es un parásito común en las gónadas de *Fissurella sp.*; pudiendo encontrar la presencia de este parásito infestando la gónada de *Fissurella crassa*, en una gradiente latitudinal de aproximadamente 3.000 km, desde el Perú hasta la región de Valdivia en Chile. Estos datos señalan los autores sugiere, que la infestación de esta especie de lapa, puede no estar asociada a la latitud. Además, Oliva y Vega (1994), evaluaron el efecto de *Proctoeces lintoni* en la fecundidad de *Fissurella crassa*, cuantificando una pérdida de la fecundidad del 32,2 % promedio en hembras infectadas (citado en Bonatti, 1999).

Con relación a la presencia de hormonas esteroidales y de células neurosecretoras que producen estas hormonas en invertebrados ha sido motivo de muchas investigaciones, antiguamente se pensaba que estas hormonas eran exclusivas de vertebrados. Lehoux y Sandor (1970), señalan la presencia de estrógenos, andrógenos y progestágenos en las gónadas y otros órganos en diferentes grupos de moluscos.

Los trabajos publicados al respecto, están orientados a averiguar la presencia o ausencia de estas hormonas y el metabolismo de sus precursores en los diferentes tejidos con alguna función productora y/o secretora de esteroides (Krush *et al.* 1979; Di Aniello *et al.* 1996; Di Cosmo *et al.* 2001; Hines *et al.* 1996; de Longcamp *et al.* 1970; de Longcamp *et al.* 1974; Moore *et al.* 1978; Reis Henriques y Coimbra 1990; Idler *et al.* 1969; Lehoux y Sandor 1970; Lupo di Prisco y Fulgheri 1975; Le Guellec *et al.* 1987; Bose *et al.* 1997; Honour 2002 ; Tichauer 2002).

Existe poca información referente a las fluctuaciones de las concentraciones hormonales según el período del ciclo reproductivo y sobre las concentraciones hormonales necesarias para gatillar la gametogénesis, Reis Henriques y Coimbra (1990), registraron fluctuaciones

anuales en los niveles de progesterona en machos y hembras, del molusco *Mytilus edulis*, observando los niveles más altos de esta hormona en el período de desove.

En relación a la presencia o ausencia de progesterona, en *F. crassa*, se registró la existencia de esta hormona, medida en el ovario de ejemplares hembras. Esto coincide con la presencia de progesterona en la hemolinfa de otra especie de lapa: *F. cumingi*, registrada por Honour (2002). La concentración de progesterona en *F. crassa*, presentó fluctuaciones a lo largo del período en estudio, los valores promedios mensuales de la concentración gonadal de progesterona fluctuaron entre 1,19 y 1,75 pmol/g ovario, que corresponden a los meses de febrero y agosto; con un mínimo y un máximo de 0,12 y 3,2 pmol/g ovario, respectivamente considerando todo el período en estudio. 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 los meses de febrero y diciembre).

Al analizar la distribución de los valores promedios mensuales de IGS y la concentración de progesterona durante el período analizado, podemos observar que en agosto, diciembre y abril, existe una tendencia similar para ambas variables, no así en octubre y febrero, donde, mientras los valores de IGS aumentan, el nivel de progesterona decae. Si comparamos los dos "peak" de IGS, registrados durante octubre y febrero, podemos observar que la progesterona muestra una tendencia a decaer en el período de máxima madurez gonadal, dado por los valores más altos de IGS.

Al hacer una relación con los meses donde hubo desove, el principal en diciembre, el nivel de progesterona, de este mes es casi el más bajo del período (1,2 pmol/g ovario) y en agosto, por el contrario donde se registró el segundo desove, el valor promedio del nivel de progesterona, es el más alto del período (1,75 pmol/g ovario).

Por lo tanto, no existe una tendencia clara entre los niveles de progesterona registrados y el estado de madurez ovárica dado por el IGS, situación similar ocurre con el grado de madurez establecido histológicamente y los niveles de progesterona.

Con el objeto de determinar si el estado de madurez gonadal estaba relacionado con las fluctuaciones en los niveles de progesterona, se efectuó un test de Correlación de Pearson,. El análisis indicó que no existe una fuerte correlación entre ambas variables (correlación = 0,56).

Se puede concluir de estos resultados que todavía faltaría establecer el mecanismo exacto por el cual esta hormona incide en el ciclo reproductivo, debido a que pueden existir además de progesterona, otros factores neuroendocrinos relacionados con el ciclo de esta especie, tanto de naturaleza esteroidea como proteica.

A una conclusión similar llegó Honour (2002), quien señala que los niveles de progesterona de las distintas muestras de hemolinfa de *F. cumingi*, machos y hembras, no siguen un patrón determinado. Por otra parte, señala que las altas concentraciones de progesterona registradas en la hemolinfa de *F. cumingi*, en relación con los otros dos esteroides (17 β estradiol y testosterona), podría deberse a una corta permanencia de estas hormonas en la hemolinfa y ser metabolizadas en otro tipo de más alta permanencia, por lo que su medición a través de la técnica utilizada (ELISA), podría no haberlos detectado.

Finalmente, es evidente por todo lo anteriormente expuesto, 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, con un manejo controlado de cultivo, y su posterior comercialización en mercados nacionales e internacionales generando divisas para el país y disminuyendo la presión de extracción del recurso desde los bancos naturales, los que en la actualidad, no se encuentran regulados en cuanto a nivel de captura y época de explotación (vedas de temporada reproductiva), lo que podría llevar a una crisis en la oferta de este molusco, debido a la falta de protección.

CONCLUSIONES

En relación con los resultados antecedentes de este trabajo se podría concluir que:

1. *Fissurella crassa* presenta un ciclo reproductivo continuo, encontrándose individuos maduros a lo largo del año.
2. El desarrollo de la línea germinal en el ovario de *F. crassa*, es semejante a lo descrito para otras especies de *Fissurella*, diferenciándose claramente 2 líneas celulares, una Línea Germinal Temprana (LGT) y una Línea Germinal Avanzada (LGA).
3. Se registró dos "peaks" de IGS, uno en octubre y uno de menor magnitud en febrero.
4. Existen dos períodos de evacuación de gametos, en relación al valor de IGS, para hembras, *F. crassa*: el principal en diciembre y uno menor en agosto, los que son concordantes con el criterio de clasificación histológica de madurez gonadal. Además podemos presumir, por la presencia de ovocitos maduros en la gónada durante el estado de desove, que se trata de desoves parciales y no totales como lo que ocurre en otras especies de lapas.
5. La presencia de progesterona en la gónada de *F. crassa* muestra variaciones de concentración promedio durante un año, siendo la máxima en el mes de agosto (1,75 pmol/g ovario) y la mínima (1,19 pmol/g ovario) en el mes de febrero. El análisis estadístico (ANDEVA y Test de Tukey) indicó que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de progesterona, de los meses de agosto y abril, con respecto a los meses de febrero y diciembre, el mes de octubre no difiere significativamente del resto de los meses.

6. No existe una fuerte correlación entre el grado de madurez del ovario y la concentración de progesterona (Test de Correlación de Pearson = 0,56).

7. Los resultados obtenidos no permiten todavía establecer el mecanismo exacto por el cuál esta hormona incide en el ciclo reproductivo.

BIBLIOGRAFÍA

ALVIAL, A. 1998. "El Niño" cómo y donde actúa. Aqua noticias Internacional. 10 (42): 42-45.

ASTUDILLO, V. M.; RABINDRANATH, L.; MORALES, M.A.; ORREGO, C.; TORO, M. 1968. Elementos de Bioestadística. Facultad de Ciencias Pecuarias y Veterinarias. Universidad de Chile. p. 201-214.

AUBRY, R. 1962. Étude de l' action pharmaco - dynamique des hormones de Vertébrés chez les Gásteropodes Pulmonés. Thése Fac. Sc. Univ. Strabourg. Masson. Paris.

BARDON, O.; LUBET, P.; DROSDOWSKY, M.A. 1971. Biosynthesis of steroids in a marine gastropod mollusk, *Crepidula fornicata* (Phil). Steroidologia 2 (6): 366-377.

BARNABÉ, G. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. Editorial Acribia (España). 519 p.

BONATI, P. 1999. Análisis del Ciclo Reproductivo de *Fissurella sp.* (Mollusca, Archasegastropoda) en Caleta Quintay (33° 13'S; 71° 38'W) y su potencial aplicación a la acuicultura. Tesis para optar al título de Ingeniero en Acuicultura y al Grado Académico de Licenciado en Ciencias de la Acuicultura. 91p.

BOSE, R.; MAJUMDAR, C.; BHATTACHARYA, S. 1997. Steroids in *Achatina fulica* (Bowdich) - Steroid Profile in Hemolymph and in - Vitro Release of Steroids from Endogenous Precursors by Ovotestis and Albumin Gland. Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology y Endocrinology. 116(3): 179-182.

BRETOS, M. 1978. Growth in the Keyhole Limpet *Fissurella crassa* Lamark (Mollusca: Archaeogastropoda) in Northern Chile. The Veliger, 21(2): 268-273.

BRETOS, M. 1979. Aspectos poblacionales y reproductivos de *Fissurella cumingi* en Iquique. Arch. Biol. Med. Exp. 12 (4): 499.

BRETOS, M. 1980 (A). Age determination in the Keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamarck (Archaeogastropoda: Fissurellidae) based on shell growth rings. Biol. Bull. 159: 606-612.

BRETOS, M. 1980 (B). La formación de anillos de crecimiento en *Fissurella crassa* en el norte de Chile. Bolm. Inst. Oceanogr., S. Paulo. 29 (2): 69-71.

BRETOS, M.; TESORIERI, I.; ALVAREZ, L. 1983. The biology of *Fisurella 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.; QUINTANA, V.; IBARROLA, V. 1988 (A). Bases biológicas para el manejo de *Fisurella nigra*. Medio Ambiente 9 (1): 55 - 62.

BRETOS, M.; GUTIÉRREZ, J.; ESPINOZA, Z. 1988 (B). Estudios biológicos para el manejo de *Fisurella picta*. Medio Ambiente 9 (1): 28-34.

BRETOS, M.; CHIHUAILAF, R. 1990. Biometría y otros aspectos de *Fisurella pulchra* (Mollusca: Prosobranchia). Rev. Biol. Mar. 25(1): 1-14.

BRETOS, M.; CHIHUAILAF, R. 1993. Studies on the reproduction and Gonadal Parasites of *Fissurella pulchra* (Gastropoda: Prosobranchia). The Veliger 36 (3): 245-251.

BROWN, D.; GONZÁLEZ, M.L.; LÓPEZ, D.; DURÁN, L. 1997. Estudios de los ciclos vitales de las especies comerciales de lapas del género *Fissurella* en las regiones I a X. Informes Técnicos. FIP. Fondo de Investigación Pesquera. 170 p.

COAT A COUNT TOTAL PROGESTERONE. 1997. Dignostic Products Corporation. 7p.

COLAS, P.; LAUNAY, C.; VAN LOON, A.E.; GUERRIER, P. 1993. Protein Synthesis Controls Cyclin Stability in Metaphase I arrested oocytes *Patella vulgata*. Exp. Cell Res. 208 (2): 518-521.

COLLADO, G. 1998. Aspectos de la sexualidad como propiedades biológicas de diferenciación en dos especies de *Fissurella* Brugière, 1789. Tesis de grado. Instituto de Oceanología, Universidad de Valparaíso. 86 p.

CSABA, G.; BIERBAHUER, J. 1979. Effect of oestrogenic, and androgenic and gestagenic hormones on the gametogenesis (oogenesis and spermatogenesis) in the snail *Helix pomatia*. Acta Biol Med Ger 38 (8):1145-1148.

D' ANIELLO, A.; DI COSMO, A.; DI CRISTO, C.; ASSISI, L.; BOTTE, V.; DI FIORE, M.M. 1996. Occurrence of sex steroid hormones and their binding proteins in *Octopus vulgaris* lam. Biochemical and Biophysical Research Communications. 227 (3): 782-788.

DE LONGCAMP, D.; DROSDOWSKY, M.; LUBET, P. 1970. Biosintesis of steroids in mollusca. Demostration of 17 beta- hydroxysteroid dehydrogenase in the gonads of *Mytilus edulis* L.(a bivalve mollusk). C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 271 (17): 1564-1566.

DE LONGCAMP, D.; LUBET, P.; DROSDOWSKY, M. 1974. The in vitro biosintesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*) . Gen Comp Endocrinol 22 (1): 116-127.

DEGUCHI, R.; OSANAI, K. 1994 (A). Meiosis reinitiation from the first prophase is dependent on the levels of intracellular Ca^{2+} and pH in oocytes of the bivalves *Macra chinensis* and *Limaria hakodatensis*. Dev. Biol. 166 (2): 587-599.

DEGUCHI, R.; OSANAI, K. 1994 (B). Repetitive intracellular Ca^{++} increases at fertilization and role of Ca^{++} in Meiosis reinitiation from the first Metaphase in Oocytes of marine bivalves. Dev. Biol. 163 (1): 162-174.

DI COSMO, A.; PAOLUCCI, M.; DI CRISTO, C.; BOTTE, V.; CIARCIA, G. 1998. Progesterone receptor in the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris*: characterization and immunolocalization. Mol. Reprod. Dev. 50 (4): 451-460.

DI COSMO, A.; DI CRISTO, C.; PAOLUCCI, M. 2001. Sex steroid hormone fluctuations and morphological changes of the reproductive system of the female of *Octopus vulgaris* throughout the annual cycle. J. Exp. Zool. 289 (1): 33-47.

DIELEMAN, S.J.; SCHOENMARKERS, H.J. 1979. Radioimmunoassays to determine the of progesterone and estrone in starfish *Asterias rubens*. Gen. Comp. Endocrinol. 39 (4): 534-542.

DOHMEN, M.R. 1983. Gametogénesis. Ed Academic Press. Inc New York-London The Mollusca 3: 1 - 47.

ELORZA, A. 1998. Efecto de la 17α hidroxiprogesterona sobre la maduración ovárica de la langosta de Juan Fernández *Jasus frontalis* (Crustacea: Decapoda: Palinuridae). Tesis Título Biólogo Marino. Coquimbo. Chile. Universidad Católica del Norte. Fac. Ciencias del Mar.

FERAL, C.; LE GALL, S.; MARTIN, M.C.; LENGRONNE, C. 1987. The neuroendocrine mechanism responsible for sexual inversion of the gonad in the protandrous hermaphroditic mollusc *Crepidula fornicata* L. Gen. Comp. Endocrinol. 65: 432-438.

GAFNEY, J.; GOAD, L.J. 1974. Progesterone metabolism by the echinoderms *Asterias rubens* and *Marthasterias glacialis*. Biochem. J. 138 (2): 309-311.

GERAERTS, W.P.M.; JOOSSE, J. 1975. Control of vitellogenesis and growth of the female accessory sex organs by the dorsal body hormone (DBH) in the hermaphrodite fresh - water snail *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 27: 450- 464.

GERAERTS, W.P.M.; EBBERINK, R.H.M.; CHEESEMAN, P.; NUYT, C.; HOGENES, TH.M. 1983. Partial purification and characterization of the ovulation hormone of the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol. 51: 471-476.

GIESE, A.C. 1959. Comparative physiology: Annual reproductive cycles of marine invertebrates. Ann. Rev. Physiol. 21: 547-576.

GOMOT, H.; GOMOT, L.; GRIFFOND, B. 1989. Evidence for a light compensation of the inhibition of reproduction by low temperatures in the snail *Helix aspersa* and albumen gland responsiveness to different condition of photoperiods and temperatures. Biology of Reproduction 40: 1237-1245.

GOTTFRIED, H.; DORFMAN, R. 1970. Steroids of invertebrates V. The *in Vitro* biosynthesis of steroids by the male - phase ovotestis of the slug (*Ariolimax californicus*). Gen. Comp. Endocrinol. 15: 120-138.

HAHN, K. 1989. Handbook of culture of Abalone and Other Marine Gastropods. University of California. Florida, 335 p.

HERRERA, G.; PUEBLA, R.; PAVEZ, M.; PÉREZ, G. 1983. Estudio Histológico del Ciclo Reproductivo de *Fissurella maxima* (Sowerby, 1835). Seminario para optar al título de Profesor de Estado en Biología y Ciencias. Instituto Profesional de Iquique. Iquique. 31p.

HIMMELMAN, J. 1979. Synchronization of Spawning in Marine Invertebrates by Phytoplankton. Advances in Invertebrate Reproduction W. H. Clark and T. Adams. Eds. California 19 p.

HINES, G.A.; WATTS, S.A.; SOWER, S.A.; WALKER, C.W. 1992 (A). Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. Gen. Comp. Endocrinol. 87 (3): 451-460.

HINES, G.A.; WATTS, S.A.; WALKER, C.W.; VOOGT, P.A. 1992 (B). Androgen metabolism in somatic and germinal tissues of sea star *Asterias vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 B (3): 521-526.

HINES, G.A.; BRYAN, P.J.; WASSON, K.M.; MC CLINTOCK, J.B.; WATTS, S.A. 1996. Sex steroid metabolism in the Antarctic pteropod *Clione antarctica* (Mollusca: Gastropoda). *Invertebrate Biology* 115 (2): 113-119.

HONOUR, J. 2002. Análisis abiótico, hormonal y patológico de la fisiología reproductiva de *Fisurella 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 ciencias de la Acuicultura.. Fac. de Ecología y Recursos Naturales. Escuela de Ciencias del Mar. Universidad Nacional Andrés Bello. 147 p.

HUAQUÍN, L.; GUERRA, R.; BRETOS, M. 1998. Identificación del sexo y morfología de gametos de la lapa *Fisurella crassa* Lamark, 1822 (Mollusca: Archaeogastropoda). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 33 (2): 223-239.

IDLER, D.R.; SANGALANG, G.B.; KANAZAWA, A. 1969. Steriod desmolase in gonads of marine invertebrate, *Placopecten magellanicus* Gmelin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 12 (2): 222-230.

IDLER, D.R.; KHAIL, M.W.; BROOKS, C.J.; EDMONS, C.G.; GILBERT, J.D. 1978. Studies of sterols from marine molluscs by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 59 B: 163-167.

JONG BRINK, H.; BOER, H.H.; JOOSSE, J. 1983. Reproductive biology of invertebrates. Ed Academic Press. Inc New York-London. The Mollusca, 1.

KAVALIERS, M.; PERROT-SINALL, T.S.; DESJARDINS, D.C.; CROSS-MELLOR, S.K.; WIEBE, J.P. 2000. Antinociceptive effects of the neuroactive steroid, 3 alpha-hydroxy- 5 alpha-pregnan- 20- one and progesterone in the land snail, *Cepaea nemoralis*. Neuroscience 95 (3): 807-812.

KIKUCHI, S.; UKI, N. 1974. Technical study on artificial spawning of abalone (*genus Haliotis*) I. Relation between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus-hannai*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 33: 69-78.

KRUSCH, B.; SCHOENMAKERS, H.J.N.; VOOGT, P.A.; NOLTE, A. 1979. Steroid synthesizing capacity of the dorsal body of *Helix pomatia* L. (Gastropoda) - an in vitro study. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 64B: 101-104.

LEHOUX, J.G.; SANDOR, T. 1970. The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzyme systems in invertebrates. A review, Steroids 16: 141-171.

LEHOUX, J.G.; WILLIAMS, E.E. 1971. Metabolism of progesterone by gonadal tissue of *Littorina littorea* (L) (Prosobranchia, Gastropoda). J. Endocrinol 51 (2): 411-412.

LE GUELLEC, D.; THIARD, M.C.; REMY-MARTIN, J.P.; DERAY, A.; GOMOT, L.; ADESSI, G.L. 1987. *In vitro* metabolism of androstenedione and identification of endogenous steroids in *Helix aspersa*. Gen Comp Endocrinol 66 (3): 425-433.

LOSANOF, W.L.; DAVIS, H.C. 1963. Rearing of bivalve mollusk: Advances in Marine Biology. F.S. Rusell Ed. Academic Press. London: 2-136.

LOZADA, E.; BUSTOS, H. 1984. Madurez y fecundidad de *Venus antiqua antiqua* (King y Broderip 1835) en la Bahía de Ancud. Rev. de Biología Marina. 20 (2): 91-112.

LUPO DI PRISCO, C.; FULGHERI, F.D. 1975. Alternative pathways of steroid biosynthesis in gonads and hepatopancreas of *Aplysia depilans*. *Comp. Biochem. Physiol B* 50(1): 191-195.

MARTÍNEZ, G.; METIFOGO, L.; LENOIR, R.; OLIVARES, A. 2000. Prostaglandins and Reproduction of the Scallop *Argopecten purpuratus*: II Relationship With Gametes Release. *Journal of Experimental Zoology* 287: 86-91.

MC. LEAN, J.H. 1984. Systematics of *Fisurella* in the Peruvian and Magallanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). National History Museum, Los Angeles Country, Contributions in Science.354: 1-70.

MOORE, M.N.; LOWE, D.M.; FIETH, P.E. 1978. Responses of lysosomes in the digestive cells of the common mussel. *Mytilus edulis*, to sex steroids and cortisol. *Cell. Tissue. Res.* 188 (1).

MORSE, D.; DUNCAN, H.; HOOKER, N.; MORSE, A. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in Mollusca, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetasa. Marine Science Institute and Departament of Biological Science. University of California. *Science.* 196: 298-300.

MORSE, A. 1989. How Do Planktonic Larvae Know Where to Settle?. *American Scientist* (79): 154-167.

MUÑOZ, P.; ROJAS, V. 2001. Análisis del efecto del shock térmico y peróxido de hidrógeno 3mM como inductores al desove en *Fisurella maxima* (Sowerby, 1835). Tesis de grado para optar al Título de Ingeniero en Acuicultura y al grado Académico de Licenciatura en Ciencias del Mar. Facultad de Ecología y Recursos Naturales. Escuela de Ciencias del Mar. Universidad Andrés Bello.

NIKITINA, S.M.; SAVCHENKO, O.N.; KOGAN, M.E.; EZHKOVA, N.S. 1977. Preparative isolation of progesterone, testosterone and estrogens from marine invertebrate tissues. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 13 (4): 443-447.

OLGUÍN, A.; OLIVA, J.; GONZÁLEZ, J.; LEÓN, C.; PAVEZ, M.; CORTÉS, M.; CORTÉS, C. 1996. Investigación de aspectos reproductivos del recurso Lapa tendientes a establecer medidas de regulación. Informe final del Proyecto Fondo Nacional de Desarrollo Regional (FNDR - BIP: 20085111 - 0).

OLIVA, M. 1992. Parasitic Castration in *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda) Due to an Adult Digenea, *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol 87 (1): 37-42.

OLIVA, D.; CASTILLA, J.C. 1992. Guía para el Reconocimiento y Morfometría de Diez Especies del Género *Fissurella* Bruguière, 1789 (Mollusca: Gastropoda) Comunes en la Pesquería y Conchales Indígenas de Chile Central y Sur. Gayana Zoología 56 (3-4): 77-108.

OLIVA, M.; VEGA, A. 1994. Efect of Adult Trematode, *Proctoeces lintoni* (Digenea) on the Fecundity of *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 89 (2): 225.

OLIVA, M.E.; HUAQUÍN, L.G. 2000. Progenesis in *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae), a parasite of *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda) in a latitudinal gradient in the Pacific coast of South America. Journal of Parasitology 86 (4): 768-772.

OSORIO, C.; AVILES, S.; FIGUEROA, P. 1985. Efectos del Fenómeno del Niño sobre la reproducción de *Fissurella maxima* en los Vilos 1983 - 1984. V Jornadas de Ciencias del Mar. Coquimbo. R-42.

OSORIO, C. 1986. Estudios biológicos en *Fissurella maxima* (Sowerby, 1835) en Chile. Resúmenes del X Congreso Latinoamericano de Zoología. Viña del Mar, Chile. 498 p.

PAVEZ, M.; PUEBLA, R.; PÉREZ, G. 1983. Estudio Histológico del Ciclo Reproductivo de *Fissurella máxima* (Sowerby 1835). (Mollusca: Archaeogastropoda: Fissurellidae). Seminario para optar al título de Profesor de Estado en Biología y Ciencias. 29 p.

PEÑA, J. 1986. La gónada de *Haliotis discus* Reeve (Gastropoda Prosobranquia) y los factores que influyen su maduración. *Iberus*.6:2.

PEÑA, J. 1987. Reproducción de Gasterópodos Prosobranquios. En : Reproducción en Acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT). Espinosa de los Monteros J. y Labarta U. Edit. p. 217-249. Madrid. España.

PINO, C.; OLIVA, D.; CASTILLA, J.C. 1994. Ritmos de actividad en las lapas *Fisurella crassa* Lamarck, 1822 y *Fisurella latimarginata* Sowerby, 1835: Efectos del ciclo marea y fotoperíodo. *Rev.Biol.Mar.*29(1): 89-99.

PONDER, W.F.; LINDBERG, D.R. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119: 83-265.

RAMORINO, L.M. 1975. Ciclo Reproductivo de *Concholepas concholepas* en la zona de valparaíso. *Rev. Biol. Marina*. 15 (2): 149-177.

REIS HENRIQUES, M.A.; COIMBRA, J. 1990. Variations in the levels of progesterone on *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Com. Physiol.* 95 A (3): 343-348.

REMONSELLEZ, J. 1996. Inducción al Desove y Perspectivas Económicas del Recurso Lapas en Chile: *Fisurella máxima* Sowerby 1835 y *Fisurella cumingi* Reeve

1849 (Molusca, Gastropoda). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Fac. de Ingeniería. Universidad Nacional Andrés Bello. 79 p.

REYES, E. 1986. ¿Qué pasó con el loco? . Chile pesquero. N° 36. Junio. p: 27-32

SALIOT, A.; BARBIER, M. 1971. Isolation of progesterone and several Ketosteroids of the female part gonads of the scallop *Pecten maximus*. Biochimie 53 (2): 265-266.

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 p.

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA). 2000. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Valparaíso. Chile.

SERNAPESCA (SERVICIO NACIONAL DE PESCA). 2001. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción. Valparaíso. Chile.

SHACKLETON, C.H. 1974. Progesterone and oestrogen metabolism in the pregnant marmoset (*Callithrix jacchus*). J. Steroid Biochem. 5 (6): 597-600.

SHOENMARKERS, H.J.N. 1979. *In vitro* biosynthesis of steroids from cholesterol by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Comp. Biochem. Physiol. 63 B: 179-184.

SHOENMARKERS, H.J.; VOOGT, P.A. 1980. *In vitro* biosynthesis of steroids from progesterone by the ovaries and pyloric caeca of the starfish *Asterias rubens*. Gen. Comp. Endocrinol. 41 (3): 408-416.

SHOENMARKERS, H.J.; DIELEMAN, S.J. 1981. Progesterone and estrone levels in the ovaries, pyloric caeca and perivisceral fluid during the annual reproductive cycle of

starfish, *Asterias rubens*. Gen. Comp. Endocrinol. 43 (1): 63-70.

SIERRA, M.G.; ELLENBERG, I.; LÓPEZ, M.E.; TEJO, G. 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.

SOAUT, C.; QUERE, C.; DONVAL, A.; PAULET, Y.; SAMAIN, J. 1999. An experimental study of the combined effects of temperature and photoperiod on reproductive physiology of *Pecten maximus* from the bay of Brest (France). Aquaculture 172: 301-314.

STANLEY; SAMUELSON. 1994. The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. Amer. Zool. 34:589-598.

TANAKA, Y. 1978. Spawning induction in the abalone, *Nordotis gigantea*, by addition of hydrogen peroxyde. Proc. 7 th. Jap. Sov. Joint. Symp. Aquacult: 207-211.

TICHAUER, A. 2002. Concentración de Testosterona Testicular de *Fissurella crassa* Lamark 1822, durante un ciclo anual y su interrelación con la histología gonadal. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 93 p.

TOSTI, E.; DI COSMO, A.; CUOMO, A.; DI CRISTO, C.; GRAGNANIELLO, G. 2001. Progesterone induces activation in *Octopus Vulgaris* spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 59 (1): 97-105.

UKI, N.; KIKUCHI, S. 1982. Technical study on artificial spawning of abalone - genus *Haliotis*. Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 44: 83-90.

VEGA, A. 1992. Primeros Estadios del Desarrollo Larval de *Fisurella crassa* (Lamark 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 p.

VILLALEJO, M. 1983. El ciclo reproductivo de la almeja catarina, *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) en relación con temperatura y fotoperíodo, en Bahía Concepción, B.C.S., México. Rev. Ciencias Marinas 19 (2): 181-202.

VOOGT, P.A. 1973 (A). On the biosynthesis and composition of 3 β - sterols in some representative of the Asteroidea. Int. J. Biochem. 4: 42-50.

VOOGT, P.A. 1973 (B). Investigations of the capacity of synthesising 3 β - sterols in mollusca. X- Biosynthesis and composition of 3 β - sterols in Cephalopoda. Arch. Int. Physiol. Biochem. 81: 401-407.

WARD, J. 1966. The Breeding Cycle of the Keyhole Limpet *Fissurella barbadensis* Gmelin. Bulletin of Marine Science, 16 (4): 685-695.

WEBBER, H.H.; GIESE, A.C. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda, Prosobranchia). Biocell 18 (3): 59-73.

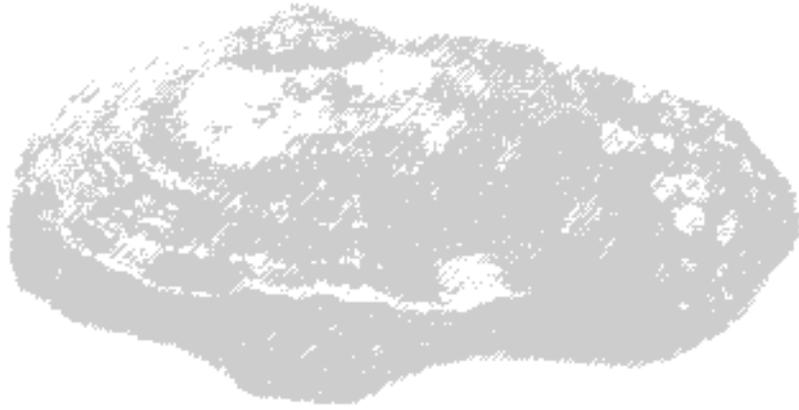
WEBBER, H.H.; GIESE, A.C. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda, Prosobranchia). Marine Biology 4: 152-159.

WEBBER, H.H.; GIESE, A.C. 1977. Gastropoda: Prosobranchia. In Reproduction of Marine Invertebrates. Pearse (Eds.) Academic Press. New York. Vol IV: 1-98.

ZAGAL, C.; HERMOSILLA, C. 2001. Guía de invertebrados Marinos del Litoral Valdiviano. Editorial Quebecor World Chile S.A. Stgo. de Chile. Primera edición. 217 p.

ZIEGENHORN, A.; THIEM, H. 1925. Beitrage zúr Systematik und Anatomie der Fissurelliden. Jenaische Zeitschrift fur Naturwissenschaft 62: 1 - 78.

ZUÑIGA, 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 Ciencias del Mar. Universidad Católica del Norte. 74p.



ANEXOS



ANEXOS

I) ANEXO MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo de tinciones

A) Tinción Hematoxilina - Eosina

1. Desparafinar
2. Xilol I, II y III cada uno, por 10 minutos
3. Alcohol I, II y III 100°, Alcohol 96° y Alcohol 70° cada uno, por 5 minutos.
4. Hidratar
5. Lavar con agua corriente ó destilada 5 minutos
7. Hematoxilina por 2-5 minutos
8. Lavado en agua corriente (suave) hasta eliminar exceso
9. Carbonato de litio, 3 minutos
10. Lavado en agua corriente y corriendo 5 minutos
11. Limpiar el portaobjetos (suave) con gasa
12. Eosina (previamente filtrada) 5 minutos
13. Lavado rápido en agua (eliminar exceso)
14. Deshidratación
15. Alcohol I, II y III 100° por 5 minutos
16. Aclarar
17. Xilol I (fenicado) 5 minutos
18. Xilol II y III 5 minutos
19. Montaje realizado en Bálsamo de Cánada.

❖ Resultados:

- Núcleos : azules
- Citoplasma y otros elementos tisulares : rosa a rojo

B) Tinción P.A.S. (Ácido Peryódico - Shiff)

Método de identificación de Glucosaminglicanos

1. Desparafinar
2. Xilol I, II y III cada uno por 10 minutos
3. Alcohol I, II y III 100°, Alcohol 96° y Alcohol 70° cada uno por 5 minutos.
4. Hidratar
5. Lavar con agua corriente ó destilada 5 minutos
6. Solución Ácido Peryódico 10 minutos
7. Lavar en Agua corriente 5 minutos
8. Lavar en Agua destilada I y II 5 minutos
9. Reactivo de Shiff 30 minutos (a t° ambiente)
10. Lavar en Agua Sulfurosa I, II y III (recién preparada) 5 minutos
11. Lavar en Agua corriente por 10 minutos
12. Hematoxilina (2 - 5) minutos
13. Lavado en agua corriente (suave) hasta eliminar exceso
14. Limpiar portaobjetos con gasa
15. Deshidratación
16. Alcohol de 96°, Alcohol I, II y III 100° por 5 minutos
17. Aclarar
18. Xilol I (fenicado) 5 minutos
19. Xilol II y III 5 minutos
20. Montaje realizado en Bálsamo de Cánada.

❖ Resultados :

Sustancias PAS positivas : rojo púrpura.

TINCIÓN VAN GIESON

1. Desparafinar
2. Xilol I y II cada uno por 10 minutos
3. Xilol III por 5 minutos
4. Deshidratar
5. Alcohol I, II y III 100°, Alcohol 96° y Alcohol 70° cada uno por 5 minutos.
6. Hidratar
7. Lavar con agua corriente ó destilada 5 minutos
8. Tinción nuclear con hematoxilina férrica de Weigert, 5 minutos .
9. Lavar abundantemente en agua corriente, hasta que los núcleos se observen nitidamente negros. Aproximadamente 10 minutos.
10. Pasar por un baño de agua destilada 3 minutos
11. Teñir en la solución de Van Gieson o de Picro - Ponceau. 2 - 5 minutos, en este caso Picro Ponceau 2 minutos.
12. Colocar directamente en alcohol de 95° un baño rápido
13. Alcohol de 96°, Alcohol I, II y III 100° por 5 minutos
14. Aclarar
15. Xilol I (fenicado) 5 minutos
16. Xilol II y III 5 minutos
17. Montaje realizado en Bálsamo de Cánada.

❖ Resultados:

- Núcleos : azules a negros
- Citoplasma, fibras musculares : amarillo
- Fibras Colágenas : rojas

II) ANEXO RESULTADOS

A) Detalle de los valores de las mediciones de peso y tamaño, obtenidas para cada uno de los meses.

N°: Número; PT: Peso Total; PB: Peso Blando; PG: Peso Gónada; L.C: Largo Concha; AC: Ancho Concha.

| AGOSTO | | | | | |
|--------|--------|-------|------|-------|-------|
| N° | PT | PB | PG | AC | L. C |
| 1 | 71,10 | 43,99 | 3,32 | 37,00 | 83,40 |
| 2 | 61,90 | 38,55 | 2,35 | 45,50 | 72,20 |
| 3 | 83,06 | 44,97 | 3,05 | 50,00 | 79,60 |
| 4 | 90,00 | 51,48 | 3,76 | 47,60 | 75,30 |
| 5 | 62,53 | 40,82 | 3,02 | 43,70 | 70,00 |
| 6 | 115,92 | 73,50 | 5,09 | 54,90 | 87,60 |
| 7 | 85,00 | 49,77 | 4,10 | 44,50 | 78,50 |
| 8 | 74,01 | 40,23 | 6,06 | 44,60 | 74,30 |
| 9 | 76,57 | 51,32 | 4,44 | 47,60 | 78,30 |
| 10 | 77,87 | 48,28 | 2,93 | 48,20 | 77,30 |
| 11 | 74,90 | 45,20 | 2,56 | 50,90 | 82,50 |
| 12 | 64,65 | 40,74 | 4,09 | 44,00 | 73,60 |

| OCTUBRE | | | | | |
|---------|--------|-------|------|-------|-------|
| N° | PT | PB | PG | AC | L. C |
| 1 | 37,31 | 24,45 | 3,58 | 38,60 | 65,00 |
| 2 | 49,95 | 32,92 | 3,07 | 40,00 | 62,40 |
| 3 | 84,45 | 58,69 | 5,09 | 46,20 | 76,50 |
| 4 | 44,44 | 31,13 | 2,63 | 46,10 | 74,90 |
| 5 | 127,80 | 71,95 | 8,52 | 56,20 | 87,30 |
| 6 | 58,06 | 41,69 | 3,04 | 40,30 | 69,30 |
| 7 | 52,59 | 31,81 | 3,15 | 36,90 | 64,10 |
| 8 | 75,72 | 49,99 | 4,81 | 47,20 | 73,20 |
| 9 | 47,58 | 29,75 | 2,77 | 40,10 | 60,20 |
| 10 | 69,80 | 44,43 | 4,52 | 44,00 | 76,00 |
| 11 | 37,86 | 24,99 | 2,11 | 32,30 | 61,20 |
| 12 | 35,75 | 18,39 | 2,17 | 32,50 | 48,00 |

| DICIEMBRE | | | | | |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| N° | PT | PB | PG | AC | L. C |
| 1 | 113,21 | 57,86 | 4,18 | 44,4 | 71,9 |
| 2 | 66,77 | 44,78 | 4,95 | 52,1 | 81,2 |
| 3 | 116,27 | 85,6 | 5,13 | 50,2 | 82,6 |
| 4 | 94,05 | 63,04 | 2,75 | 47,1 | 74,3 |
| 5 | 86,26 | 60,26 | 4,68 | 43,8 | 74 |
| 6 | 93,68 | 65,12 | 3,61 | 44,1 | 73,8 |
| 7 | 42,34 | 28,82 | 2,14 | 30,4 | 62 |
| 8 | 75,59 | 53,03 | 3,89 | 44 | 73,2 |
| 9 | 91,74 | 62,64 | 5,54 | 48,2 | 79,6 |
| 10 | 45,88 | 25,76 | 1,51 | 39 | 61 |
| 11 | 61,39 | 36,22 | 1,46 | 41,2 | 75,7 |
| 12 | 50,23 | 33,79 | 1,8 | 42,9 | 63,5 |

| FEBRERO | | | | | |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| N° | PT | PB | PG | AC | L. C |
| 1 | 74,66 | 33,82 | 3,15 | 47,50 | 63,90 |
| 2 | 56,92 | 22,20 | 1,54 | 42,00 | 52,40 |
| 3 | 30,82 | 29,30 | 1,41 | 28,80 | 65,10 |
| 4 | 73,83 | 53,84 | 6,70 | 44,40 | 71,40 |
| 5 | 68,08 | 33,58 | 3,16 | 51,50 | 76,60 |
| 6 | 61,66 | 30,36 | 1,49 | 46,60 | 76,80 |
| 7 | 62,07 | 38,32 | 6,50 | 43,60 | 76,70 |
| 8 | 69,92 | 32,38 | 4,21 | 49,40 | 78,60 |
| 9 | 99,52 | 54,60 | 4,79 | 52,60 | 83,00 |
| 10 | 77,80 | 40,26 | 2,83 | 46,00 | 83,60 |
| 11 | 29,77 | 17,26 | 1,13 | 36,70 | 57,60 |
| 12 | 87,65 | 52,09 | 2,83 | 55,50 | 85,80 |

| ABRIL | | | | | |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| N° | PT | PB | PG | AC | L. C |
| 1 | 74,33 | 54,75 | 4,10 | 39,60 | 68,20 |
| 2 | 85,86 | 46,81 | 1,56 | 51,70 | 88,10 |
| 3 | 67,82 | 45,23 | 3,90 | 46,20 | 69,60 |
| 4 | 73,58 | 47,48 | 7,39 | 41,70 | 76,20 |
| 5 | 57,36 | 39,24 | 2,19 | 36,90 | 65,40 |
| 6 | 70,34 | 41,57 | 2,80 | 47,40 | 81,70 |
| 7 | 52,41 | 22,58 | 1,22 | 50,40 | 80,70 |
| 8 | 34,67 | 16,34 | 1,48 | 36,10 | 61,50 |
| 9 | 51,95 | 36,72 | 6,12 | 37,80 | 59,05 |
| 10 | 41,15 | 28,90 | 1,85 | 32,00 | 59,80 |
| 11 | 24,45 | 17,10 | 0,98 | 28,30 | 50,80 |
| 12 | 31,09 | 19,52 | 2,48 | 35,80 | 59,50 |

B) Detalle de los valores obtenidos de progesterona, estado de madurez ovárica, IGS y edad, para cada uno de los meses.

P4: Progesterona (pmol/ g ovario); IGS: Índice Gonado Somático.

| AGOSTO | | | | | |
|---------------|---------------|---------------------|---------------|------------|-------------|
| N° | N° RIA | P4 (pmol/gr) | Estado | IGS | Edad |
| 1 | 1A | 1,14 | Maduro | 7,55 | ≥ 6 |
| 2 | 3A | 3,20 | Desove | 6,10 | 5 |
| 3 | 4A | 2,36 | Desove | 6,78 | ≥ 6 |
| 4 | 6A | 2,38 | Desove | 7,30 | 5 |
| 5 | 16A | 1,60 | Maduro | 7,40 | 5 |
| 6 | 19A | 1,76 | Maduro | 6,93 | ≥ 6 |
| 7 | 20A | 1,48 | Maduro | 8,24 | ≥ 6 |
| 8 | 21A | 1,33 | Maduro | 15,06 | 5 |
| 9 | 22A | 1,67 | Maduro | 8,65 | ≥ 6 |
| 10 | 23A | 1,40 | Desove | 6,07 | ≥ 6 |
| 11 | 25A | 1,48 | Maduro | 5,66 | ≥ 6 |
| 12 | 26A | 1,24 | Maduro | 10,04 | 5 |

| OCTUBRE | | | | | |
|----------------|--------------|---------------------|---------------|------------|-------------|
| N° | N°RIA | P4 (pmol/gr) | Estado | IGS | Edad |
| 1 | 1o | 1,8 | Maduro | 14,6 | 4 |
| 2 | 6 | 1,6 | Maduro | 9,3 | 4 |
| 3 | 7 | 1,5 | Maduro | 8,6 | 5 |
| 4 | 11o | 1,5 | Maduro | 8,4 | 5 |
| 5 | 15o | 2,1 | Maduro | 11,8 | ≥ 6 |
| 6 | 16o | 1,8 | Maduro | 7,2 | 4 |
| 7 | 17 | 1,6 | Maduro | 9,9 | 4 |
| 8 | 18 | 1,5 | Maduro | 9,6 | 5 |
| 9 | 19o | 1,2 | Maduro | 9,3 | 4 |
| 10 | 27o | 1,3 | Maduro | 10,1 | 5 |
| 11 | 33o | 1,1 | Maduro | 8,4 | 4 |
| 12 | 37 | 1,3 | Maduro | 11,8 | 3 |

| DICIEMBRE | | | | | |
|------------------|---------------|---------------------|---------------|------------|-------------|
| N° | N° RIA | P4 (pmol/gr) | Estado | IGS | Edad |
| 1 | 13D | 1,61 | Maduro | 7,22 | 5 |
| 2 | 14D | 0,81 | Maduro | 11,05 | ≥ 6 |
| 3 | 17D | 1,56 | Maduro | 5,99 | ≥ 6 |
| 4 | 18D | 1,08 | En mad. temp | 4,36 | 5 |
| 5 | 20D | 1,88 | Maduro | 7,77 | 5 |
| 6 | 24D | 1,32 | En mad.temp | 5,54 | 5 |
| 7 | 27D | 0,55 | En mad. temp | 7,43 | 4 |
| 8 | 31 D | 1,38 | Maduro | 7,34 | 5 |
| 9 | 40D | 1,45 | En mad. temp | 8,84 | ≥ 6 |
| 10 | 44D | 1,45 | En mad. temp | 5,86 | 4 |
| 11 | 45D | 0,12 | En mad. temp | 4,03 | 5 |
| 12 | 46D | 1,05 | En mad. temp | 5,33 | 4 |

| FEBRERO | | | | | |
|----------------|---------------|---------------------|------------------|------------|-------------|
| N° | N° RIA | P4 (pmol/gr) | Estado | IGS | Edad |
| 1 | 2F | 0,91 | En mad. avanzada | 9,31 | 4 |
| 2 | 3F | 0,65 | En mad. avanzada | 6,94 | 3 |
| 3 | 5F | 1,06 | En mad. avanzada | 4,81 | 4 |
| 4 | 2M | 1,68 | Maduro | 12,44 | 5 |
| 5 | 8M | 0,91 | En mad. avanzada | 9,41 | 5 |
| 6 | 11M | 1,28 | En mad. avanzada | 4,91 | ≥ 6 |
| 7 | 13M | 1,33 | En mad. avanzada | 16,96 | ≥ 6 |
| 8 | 14M | 2,14 | En mad. avanzada | 13,00 | ≥ 6 |
| 9 | 16M | 1,19 | En mad. avanzada | 8,77 | ≥ 6 |
| 10 | 7M | 0,74 | En mad. avanzada | 7,03 | ≥ 6 |
| 11 | 20M | 1,54 | En mad. avanzada | 6,55 | 3 |
| 12 | 21M | 0,85 | En mad. avanzada | 5,43 | ≥ 6 |