

Maduración *In vitro* del abulón *Halliotis*
rufescens y lapa *Lottia gigantea*

TESIS

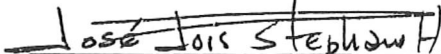
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

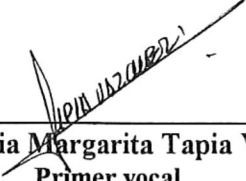
PRESENTA:

Bernardino de Jesús Ortiz Barrón

APROBADO POR:


Dra. Meredith Gould Chambers
Director de tesis


Dr. José Luis Stephano Hornedo
Secretario


M.C. Olivia Margarita Tapia Vazquez
Primer vocal

*Nil sciri si quis putat, id quoque nescit
An sciri possit quo nil scire fatetur*

*(El que cree que no se puede saber nada no sabe
siquiera si se puede saber que nada se sabe)*

Lucrecio

DEDICATORIA

A mis padres que con un gran esfuerzo y sacrificio, no siempre debidamente recompensado, se avocaron a la tarea de educarme.

Gracias

Ana

Gracias por tu apoyo y ayuda

A mis amigos: Ernesto Peralta, Francisco Cadena y Ricardo Caballero.

A los profesores Meredith y Estefano quienes con dedicación al trabajo y paciente deseo de enseñar han influido, con su ejemplo, en generaciones de alumnos .

Gracias

AGRADECIMIENTOS

(Difícil es recordar a cada momento a las personas que se cruzan en nuestra vida de estudiante y nos brindan ayuda, de ahí lo difícil que es escribirlo).

Mi agradecimiento al cuerpo de maestros de la Carrera de Biología, especialmente a los profesores Miguel Carrillo, Irma Rivera y Olivia Tapia.

A Blanca, amable y eficiente secretaria de la facultad, siempre dispuesta a ayudar y orientar. Así como a Freddy, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	3
III. MATERIAL Y METODOS.	5
IV. RESULTADOS.	11
V. DISCUSION.	45
VI. CONCLUSION.	51
VII. LITERATURA CITADA.	53
VIII. APENDICE.	56
VIII.I Mapa de la Bahía Todos Santos, en donde se localiza el Morro.	56
VIII.II Mapa de la Bocana, Baja California, México.	57

INTRODUCCION

La explotación comercial del abulón se basa principalmente en su extracción del mar durante su ciclo no reproductivo. Sin embargo la explotación, no siempre realizada con medida, propició que se diezmaran las poblaciones naturales con la consecuente disminución en las capturas o tallas mínimas requeridas. En algunos casos esta situación ha tratado de remediarse utilizando técnicas de reproducción artificial; estas técnicas consisten básicamente en inducir el desove de machos y hembras para obtener semillas viables (ovocitos fecundados, larvas normales). A pesar del éxito de estas técnicas, no se considera posible que los pescadores las lleven a cabo de forma continua debido a sus múltiples ocupaciones, y a la necesidad de disponer de instalaciones adecuadas para el control de la temperatura del agua. Por estas razones se pensó en buscar otro método químico que permitiera el aprovechamiento de las gónadas de los animales que se sacrifican, y que normalmente se desechan, para producir con ellas semilla. Sin embargo, cuando los ovocitos aún están en la gónada permanecen en estado inmaduro, por lo que se busco algún compuesto que produjera la maduración *in vitro*, sin necesidad de inducir el desove de organismos vivos.

La obtención de abulones es una tarea difícil y costosa, aún con fines de investigación, por esta razón se decidió probar previamente esta estrategia con algún

molusco que fuera más fácil de obtener, manejar, de bajo costo y que no requiriera de condiciones de laboratorio especiales durante 1 - 4 días. Por estas razones fue elegida la lapa común *Lottia gigantea*.

Al inicio del trabajo pensamos que la técnica desarrollada para lapa sería posible de aplicar, quizás con algunas modificaciones, a los abulones.

El desarrollo de un método sencillo y económico, como el antes descrito, es ideal para que sea aplicado por las empresas que explotan al abulón, ya que estas empresas se enfrentan con una creciente escasez del recurso y con restricciones de explotación impuestas por el gobierno, el cuál, pretende en principio, mantener las poblaciones explotadas lejos de niveles críticos de sobrevivencia. Debido a lo anterior, el repoblamiento de las áreas utilizadas para la extracción de este producto es primordial. Sin embargo, cabe señalar, la producción de semilla y su liberación en el océano no conlleva a repoblar en un 100% las áreas explotadas, debido a que los abulones, al igual que todo organismo, debe enfrentar un sinnúmero de dificultades que constantemente disminuyen las probabilidades de sobrevivencia, lo cuál es tema para otra clase de estudios. A pesar de esta consideración creemos que un trabajo como el presente contribuye en algo a la solución del problema.

ANTECEDENTES

Fué J. Loeb el primer científico que utilizó un método químico para inducir maduración en ovocitos de invertebrados, una de las especies que utilizó fue la lapa común *Lottia gigantea* (Loeb, 1905). En esta especie los ovocitos removidos del ovario son inmaduros y no inician el desarrollo cuando son fecundados (Loeb, 1905). Loeb probó varios métodos para madurarlos *in vitro* y obtuvo los mejores resultados con una mezcla de 50 ml de agua de mar + 1 ml de NaOH 0.1 M aplicada durante 4 - 6 horas, seguido por fecundación en agua de mar normal (Loeb, 1905).

Subsecuentemente en la lapa europea *Patella vulgata*, se reportó el 100% de maduración *in vitro* cuando los ovocitos fueron expuestos en agua de mar con 1 mM de NH_4Cl , pH 9. El efecto fue rápido, se necesitó solamente 1 minuto con 20 mM de NH_4OH o 4 minutos con 1 mM, ambos a pH 9 (Guerrier *et al.*, 1986). Hasta la fecha no se ha reportado un método de inducir el desove y producir ovocitos maduros en lapa.

En abulón pueden obtenerse ovocitos maduros por desove. El método más común es el de Morse *et al.* (1987) (ver Métodos). Los ovocitos inmaduros de abulón están en profase de meiosis y durante la maduración avanzan a metafase de la primera división meiótica, donde se detienen hasta la fecundación. Hasta la fecha no se ha reportado un método para inducir maduración en ovocitos obtenidos del ovario.

Un efecto común del NH_4Cl y el NH_4OH es el aumentar el pH intracelular. El NH_4^+ esta en equilibrio con el $\text{NH}_3 + \text{H}^+$, pero solamente el NH_3 es soluble en lípidos y logra cruzar la mem-

brana plasmática. En el interior de la célula se establece un nuevo equilibrio, entonces el NH_3 se une con el H^+ para formar el NH_4^+ , produciendo la alcalinización del citoplasma (Boron *et al.*, 1978). Raras veces una célula es permeable al NH_4^+ (Burkhardt y Fromter, 1992); en este caso el citoplasma se acidifica cuando el NH_4^+ se disocia en un H^+ y un NH_3 . En *Patella* el NH_4^+ induce un aumento en el pH intracelular; esto se ha detectado utilizando una sonda fluorescente (Vilain *et al.*, 1993). La microinyección de amortiguadores alcalinos (pH 7.8) induce la ruptura de la envoltura nuclear (el primer paso morfológico en la transición de profase I a metafase I de meiosis). Sin embargo, no se puede concluir que el único efecto del NH_4^+ es sobre el pH intracelular; por ejemplo, en ovocitos de erizo también induce un aumento en calcio intracelular (Zucker *et al.*, 1978). En lapa, no se han publicado estudios sobre el calcio intracelular durante la maduración aunque se sabe que el efecto del NH_4Cl es independiente de la presencia del calcio extracelular (Guerrier *et al.*, 1986). En abulón no se han investigado las bases iónicas de la maduración.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION, MANTENIMIENTO Y TRANSPORTE DE LOS ORGANISMOS

Lapas (*Lottia gigantea*) de ambos sexos fueron recolectadas en el km. 109 de la carretera Tijuana-Ensenada, en el lugar conocido como El Morro (Apéndice 1). Después se trasladaron al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias de la U.A.B.C.. Para el transporte se utilizó un recipiente de plástico conteniendo agua de mar a 16°C. Una vez que fueron transportados los animales al laboratorio se mantuvieron en estanques de fibra de vidrio de 500 l de capacidad, acondicionados con filtro biológico, aereación continua y a una temperatura constante de 16°C. No les fue administrado alimento.

Los abulones (*Haliotis rufescens*) se recolectaron en el ejido La Bocana, lugar situado aproximadamente a 30 km al oeste de Santo Tomás, B.C. (Apéndice 2). Los abulones se transportaron en cajas de unicel conteniendo agua de mar a una temperatura de 16 °C (durante el viaje no fue controlada la temperatura). Al llegar al laboratorio los organismos se colocaron en estanques rectangulares de fibra de vidrio, con capacidad de 500 l; la temperatura fue mantenida a 16°C. Los organismos permanecieron en el acuario hasta su utilización en los experimentos; como alimento se suministró la macroalga *Macrocystis pyrifera*.

OBTENCION DE LOS GAMETOS DE LAPA *Lottia gigantea*

Con un bisturí se practicó una incisión en la parte ventral derecha del pie. Los ovocitos se recuperaron utilizando una pipeta Pasteur (Fig. 1) y se les colocó en vasos de vidrio de 250 ml con agua de mar filtrada (0.45 mm) a 16 °C. Previamente se sometió a 2 ó 3 lavados necesarios para eliminar el tejido de la gónada que comunmente rodea a los ovocitos.

La extracción de los espermatozoides se realizó igual que con los ovocitos (Fig. 1); la única diferencia fue que los espermatozoides extraídos permanecieron concentrados en tubos eppendorf y almacenados a una temperatura de 4°C hasta su uso.

OBTENCION DE LOS GAMETOS DEL ABULON *Halliotis rufescens*

A las hembras se les practicó una pequeña incisión en la gónada utilizando un bisturí, luego se procedió a extraer los ovocitos con una pipeta Pasteur. Los ovocitos extraídos fueron lavados en varias ocasiones con agua de mar filtrada (0.45mm) hasta que fueron eliminados la mayoría de los ovocitos lisados.

Para que los abulones macho liberaran sus gametos se utilizó el método de Morse *et al.* (1987); este método consiste en colocar los abulones en 12 l de agua de mar, mantener una temperatura constante de 16 °C y un pH de 9.1, por adición de 50 ml de tris-hidroximetil-aminometano 2M (TRIS, Sigma Chemical San Louis Mo.). Después se añaden 50 ml de peróxido de hidrógeno al 6%, preparado en ese momento a partir de una solución concentrada al 30% (Baker), almacenada a 4°C en la obscuridad; la concentración final fué de 7.5 mM. Los abulones permanecieron en esta solución, sin ser

perturbados, durante un tiempo de 2.5 - 3.5 hrs. Cuando la liberación de gametos comenzó, la solución fue reemplazada por agua de mar fresca, también con una temperatura de 16 °C. Este último procedimiento se repitió durante 2 - 3 veces para lavar el peróxido remanente, debido a que si permanece en el medio un exceso de peróxido, se induce a malformaciones durante el desarrollo, o hace inviables a los gametos.

MADURACION *in vitro* DE LAPA

Se procedió a preparar soluciones de NH_4OH de la siguiente manera: El equipo utilizado para ajustar el pH fue un Orion 501 (Boston, MA.), provisto de un electrodo de vidrio (Corning Glass Works, Corning, N.Y.). Este equipo se calibró previamente utilizando una solución patrón de pH 7.0 (Fisher Fairlaw, NJ). El NH_4OH diluido 1:10 fue adicionado gota a gota hasta ajustar el pH del agua de mar (pH 8.5 - 9.0). Los ovocitos recolectados con anterioridad, y mantenidos en agua de mar común, se centrifugaron mecánicamente, colocando después el paquete en un vaso de cristal que contenía la solución de NH_4OH , pH 8.5 - 9.0; los ovocitos fueron resuspendidos y centrifugados de nuevo en la misma solución, donde finalmente se dejaron. Se tomaron muestras de ovocitos (experimentales y controles) a intervalos de tiempo de 5, 15 y 30 minutos. Esto se hizo para determinar el tiempo aproximado en que ocurrió el 100% de maduración. Para evaluar la maduración fue utilizado un microscopio de luz (Bausch & Lomb, Cambridge Instruments, Cambridge MA.) y otro de contraste de fases (American Optical, Buffalo, MA.). Para evaluar si la envoltura nuclear había desaparecido, lo que significaría

que los ovocitos han avanzado de profase I a metafase I de meiosis, se procedió a aplastar los ovocitos con un cubreobjetos antes de observarlos.

Por otra parte, la maduración con NaOH se hizo siguiendo el método de Loeb (1905), el cuál consiste en la preparación de una solución con 1 ml de NaOH 0.1 M + 50 ml de agua de mar; el pH fue ajustado a 9. También se efectuaron muestreos a diferentes tiempos para determinar el tiempo y porcentaje de maduración.

MADURACION *in vitro* EN ABULON

Se preparó una solución de agua de mar con NH_4OH , pH 9.0 (ajustado de la misma manera que la descrita con anterioridad). Antes de colocar los ovocitos en la solución se lavaron hasta 12 veces para eliminar los ovocitos en malas condiciones, después se colocaron en la solución preparada; se muestreo a diferentes tiempos para conocer el progreso de la maduración. Durante todos los experimentos se monitorio el pH, encontrando que frecuentemente ocurría un descenso en el pH, el cuál era ajustado de inmediato (Fig. 21).

FECUNDACION DE LA LAPA (madurados con NH_4OH)

Para eliminar el NH_4OH del medio se procedió a lavar en varias ocasiones los ovocitos con agua de mar limpia, esto fue debido a que el NH_4OH tiende a disminuir los porcentajes de fecundación (datos no mostrados).

Para la fecundación se utilizaron espermatozoides concentrados, los cuales, antes de fecundar a los ovocitos, se diluyeron a diferentes concentraciones.

El porcentaje de fecundación fue determinado con base en el porcentaje de larvas alcanzado 24 horas después de la fecundación (el experimento del día 14 de octubre se determinó durante la etapa de dos células). Al igual que los experimentos mostrados arriba, también fueron fecundados los ovocitos tratados con NaOH y con NH_4OH , pH 8.5, después de ser removido el NaOH y el NH_4OH .

CONCENTRACIONES DE GAMETOS UTILIZADOS		
FECHA	CONCENTRACION $\frac{\text{♂}}{\text{♀}}$ (ml)	ORGANISMO
05/11/92	2000	LAPA
18/11/92	300	LAPA

Para realizar los conteos de espermatozoides se utilizó la cámara de Neubauer. Previamente al conteo los espermatozoides se inmovilizaron con formaldehído al 15%. Los ovocitos se contaron, sin fijarlos previamente, en un volumen conocido; se observó en un microscopio óptico con un objetivo 10X. Para los conteos de los espermatozoides y de los ovocitos fue considerado el factor de dilución.

FECUNDACION DE LOS OVOCITOS INMADUROS DE *Lottia gigantea*

Durante un experimento, a 1950 ovocitos colocados en un volumen de 1.95 ml., se les agregó 400 μl . de espermatozoides concentrados. Media hora después se lavó 3 veces con agua de mar para eliminar a aquellos espermatozoides que aún rodeaban a los ovocitos; también se les adicionó una solución de EGTA-glucosa 5mM, pH 9, o pronasa a 1 mg/ml en agua de mar para remover la capa vitelina con los espermatozoides

supernumerarios pegados. Posteriormente los ovocitos fueron fijados con formaldehído al 15% en agua de mar. Se tiñeron con bisbenzamida (25 $\mu\text{g/ml}$; Calbiochem, San Diego CA) y se determinó, utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BH-2) con un objetivo de inmersión 60X (SPlan Apo A.N. 1.4), si había pronúcleos masculinos dentro de los ovocitos.

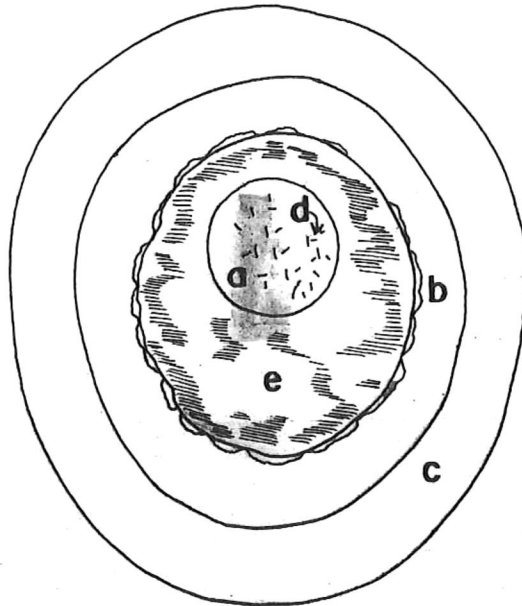
POLISPERMIA Y PRODUCCION DE LARVAS EN LA LAPA

Se removieron las capas vitelinas por los métodos descritos arriba y se fijó 15 minutos después de la inseminación (antes de la formación del primer cuerpo polar). Posteriormente se tiñeron (ver arriba) y se contó el número de pronúcleos masculinos con microscopía de epifluorescencia. En algunos de los experimentos la normalidad y anormalidad se determinó en la etapa de 2 células, o 24 horas después de la inseminación.

RESULTADOS

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS OVOCITOS INMADUROS DE *Lottia gigantea*

Los ovocitos recién extraídos de la parte más externa de la gónada presentan un pigmento verde en su interior, tienen una apariencia flácida e irregular y cada uno está rodeado por una capa de gelatina y células foliculares. En promedio cada ovocito alcanza un diámetro de $120\mu\text{m}$ y posee una vesícula germinal ($45\mu\text{m}$) que aparece colocada en la periferia del ovocito con los cromosomas, contenidos en su interior, en profase I de meiosis (Esquema 1 y Fig. 1, 2, 3 y 4). En estos ovocitos obtenidos de la gónada se obtiene hasta un 95% en buenas condiciones (Fig. 19).



Esquema 1. Ovocito inmaduro minutos después de que adquiere una forma redonda.

En el esquema se aprecia:

- a) vesícula germinal;
- b) las células foliculares;
- c) capa de gelatina;
- d) cromosomas en profase I de meiosis.
- e) el citoplasma con su pigmento de color verde.

**CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS OVOCITOS DE *Lottia gigantea*,
INDUCIDOS A MADURAR CON HIDROXIDO DE AMONIO (NH_4OH) pH 9.
(secuencia de eventos)**

Cuando los ovocitos maduran ocurre la ruptura de la vesícula germinal y se redondean, aún más, las células foliculares que se encuentran localizadas inicialmente alrededor de los ovocitos; después tienden a colocarse hacia la periferia, en uno de los polos, para perderse después. Luego aparece una área blanca (Fig. 5), que es el lugar donde están localizados los cromosomas en metafase I de meiosis (Fig. 6). Esta estructura aparece localizada en la periferia de los ovocitos.

**INDUCCION DE MADURACION DE *Lottia gigantea* CON HIDROXIDO DE
AMONIO (NH_4OH) pH 9 (porcentajes y tiempos)**

En siete experimentos con NH_4OH pH 9.0 se logró un 100% de maduración (Tabla Ia y Figs.7 y 8) en un tiempo mínimo de 10 minutos y un máximo de 35 minutos; el promedio fue de 21 minutos (el experimento del 7/10/1992 no se incluyó porque no fue determinado el tiempo exacto de maduración (Tabla Ia).

Como puede observarse en los controles (Tabla Ib) el porcentaje de maduración fue muy bajo (1-25%); el promedio de 6 experimentos fue de 8%. Cabe señalar que después de grandes períodos de tiempo (Tabla Ib), algunos lotes alcanzaron una ligera maduración espontánea. Sería interesante conocer el mecanismo de maduración y si estos ovocitos llegan a ser viables.

INDUCCION DE MADURACION DE *Lottia gigantea*, TRATADOS CON HIDROXIDO DE AMONIO (NH_4OH) pH 8.5 (porcentajes y tiempos)

En estos experimentos los ovocitos presenta también un alto porcentaje de maduración (87-97%), aunque ligeramente menor que cuando se utiliza NH_4OH pH 9.0. Sin embargo se requirió de más tiempo (220'-325') para lograrlo (Fig. 7, Tabla II). Esto indica que el pH o la concentración del NH_4OH son componentes críticos para llevar a cabo el proceso de maduración.

INDUCCION DE MADURACION DE *Lottia gigantea* CON HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) pH 9.0-9.56 (porcentajes y tiempos)

Los experimentos mostrados en la Tabla III demuestran, al igual que los de NH_4OH pH 8.5, que es necesario un mayor tiempo para lograr un alto porcentaje de maduración. Por otra parte, en el experimento llevado a cabo el día 29/09/1992 se demostró que a mayor pH ocurría un menor porcentaje de maduración, lo cuál sugiere que ocurre daño celular.

Sí se comparan los resultados con NaOH de la Tabla III, y las Figs. 7 y 8, con los resultados de NH_4OH de la Tabla Ia, se observa que aún cuando ambos presentan un pH cercano los tratados con el NH_4OH maduraron más rápidamente.

**PORCENTAJE DE FECUNDACION DE OVOCITOS MADURADOS CON NH_4OH
pH 8.5 Y 9.0 Y NaOH pH 9.0 - 9.56 (comparación)**

Como se puede ver en la Tabla Ia, se obtuvo de un 92 a un 100% de fecundación en los ovocitos tratados con NH_4OH ; estos ovocitos se fecundaron de 2 minutos a 65 minutos después de que alcanzan la maduración. Sin embargo, los ovocitos que se fecundaron 323 minutos después de la maduración llegaron a perder la capacidad de iniciar el desarrollo, por lo que se recomienda que la fecundación se lleve a cabo lo más rápido posible después de que los ovocitos han madurado. También es interesante llegar a determinar si con 1 ó 2 minutos de tratamiento con NH_4OH pH 9.0, y luego lavarlos inmediatamente con agua de mar pH 8.0, es un tiempo suficiente para que los ovocitos maduren.

Como puede apreciarse en la Tabla II, el porcentaje de fecundación con NH_4OH pH 8.5 también fu alto (98%, aunque se realizó sólo un experimento). Sin embargo en los experimentos con NaOH pH 9.0 - 9.18, fue posible observar que se ocurría una disminución en el porcentaje de fecundación (compare los resultados con los otros tratamientos de la Tabla III y la Fig. 9). La razón de esta diferencia la desconocemos. En los controles (ovocitos inmaduros), los espermatozoides si lograron penetrar, pero no alcanzaron a activar al ovocito. Al parecer, cuando ocurre la maduración, se establece simultaneamente el mecanismo de activación (inicio de desarrollo).

POLISPERMIA Y LARVAS NORMALES EN LA LAPA COMUN EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON NH_4 pH 8.5, 9.0 Y CON NaOH pH 9.1 Y 9.56

El hecho de haber encontrado un porcentaje de fecundación mayor al porcentaje de larvas normales en todos los tratamientos (Fig. 9), sugiere que los ovocitos de *Lottia gigantea* presentan una alta susceptibilidad a la polispermia (Fig. 10, compare con Fig. 11). También, las diferencias en porcentaje de larvas normales en los diferentes tratamientos (Fig. 9), podría explicarse como una variación en la cantidad promedio de espermatozoides que rodean a cada ovocito (Figs. 10, 11 y 12). Sin embargo, en 2 experimentos realizados durante los días 14/10/92 y 23/10/92 (Figuras 7, 8 y 9) se utilizaron la mismo lote de ovocitos y espermatozoides, y se usaron las mismas proporciones (esperma/ovocito) para los diferentes tratamientos. A pesar de esto el porcentaje de larvas logradas con NaOH fue menor, lo cuál sugiere una mayor susceptibilidad a que se presente polispermia o daño celular durante el proceso de maduración; es también posible que la maduración sea incompleta; aunque los ovocitos presenten una apariencia morfológica madura, es posible que fisiológicamente no lo esten. Se requiere de experimentos futuros para corroborar esta hipótesis.

Como se aprecia en la Fig. 9 (renglón G o barra G), durante el experimento del día 18/12/92 se logro casi un 100% de fecundación y un 94% de larvas normales utilizando una baja proporción de esperma/ovocito igual a 2000/1 (Fig. 13). Además el experimento demostró que con el NH_4OH no ocurre daño en los ovocitos, apoyando la con-

clusión de que la presencia de larvas anormales en los demás experimentos con NH_4OH fue causada por la polispermía.

ESPERMATOZOIDES Y FECUNDACION EN *Lottia gigantea*

Debido a los altos porcentajes de fecundación obtenidos en los experimentos (Fig. 9), se demostró que los espermatozoides extraídos de la gónada (Fig. 1) presentaban buena movilidad y capacidad de fecundación (Fig. 14), aún después de permanecer de 48-72 horas en refrigeración a 4 °C (datos no mostrados).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL OVOCITO MADURO E INMADURO EN EL ABULON *Haliotis rufescens*

Al igual que la lapa *Lottia gigantea*, los ovocitos del abulón rojo *Haliotis rufescens*, presentan vesícula germinal (75 μm) con cromosomas en profase I de meiosis y tienen un diámetro de 190 μm , sin incluir la capa vitelina. Sin embargo, y a diferencia de *Lottia gigantea*, los ovocitos del abulón rojo están desprovistos de células foliculares (Fig. 15).

También, a diferencia de los altos porcentajes de ovocitos inmaduros que se recuperan en buenas condiciones de la gónada de *Lottia gigantea*, en los ovocitos inmaduros de abulón, recuperados directamente de la gónada, se obtienen porcentajes menores de ovocitos en buenas condiciones (Fig. 19).

Cuando los ovocitos de abulón maduran no presentan vesícula germinal (compare las Figs. 15 y 16), y si se observan con microscopía de epifluorescencia puede a-

preciarse el reinicio de la meiosis, progresando los cromosomas de profase I de meiosis a metafase I (Figs. 17 y 18).

INDUCCION DE MADURACION CON NH_4OH pH 9.0 EN EL ABULON ROJO

***Halliotis rufescens* (porcentajes y tiempos)**

Como puede apreciarse en la Tabla IV, se requiere un tiempo de 3 a 6 horas para que se alcance un 90% de maduración, a diferencia de lo que sucede con *Lottia gigantea*; desconocemos la razón de esta diferencia. Las Figs. 20 y 21 muestran los porcentajes de maduración alcanzados en función del tiempo.

PRODUCCION DE LARVAS DE ABULON *Halliotis rufescens* DESPUES DE LA MADURACION CON NH_4OH

Una vez que los ovocitos alcanzan la maduración *in vitro*, nos preguntamos si tendrían la capacidad de ser fecundados y producir larvas normales, la respuesta fue positiva; con esto se demostró que después del tratamiento con NH_4OH pH 9.0 los ovocitos mantienen su capacidad de producir larvas normales (Fig. 22).

Aunque no se calcularon porcentajes y promedios de las larvas normales obtenidas, podemos decir que las proporciones alcanzadas fueron altas; sin embargo, también se obtuvieron larvas anormales (Fig. 23), lo cuál sugiere que ocurre daño celular, aunque no se determinó polispermia. Se requiere de mayor investigación en este sentido para hacer determinaciones más exactas.

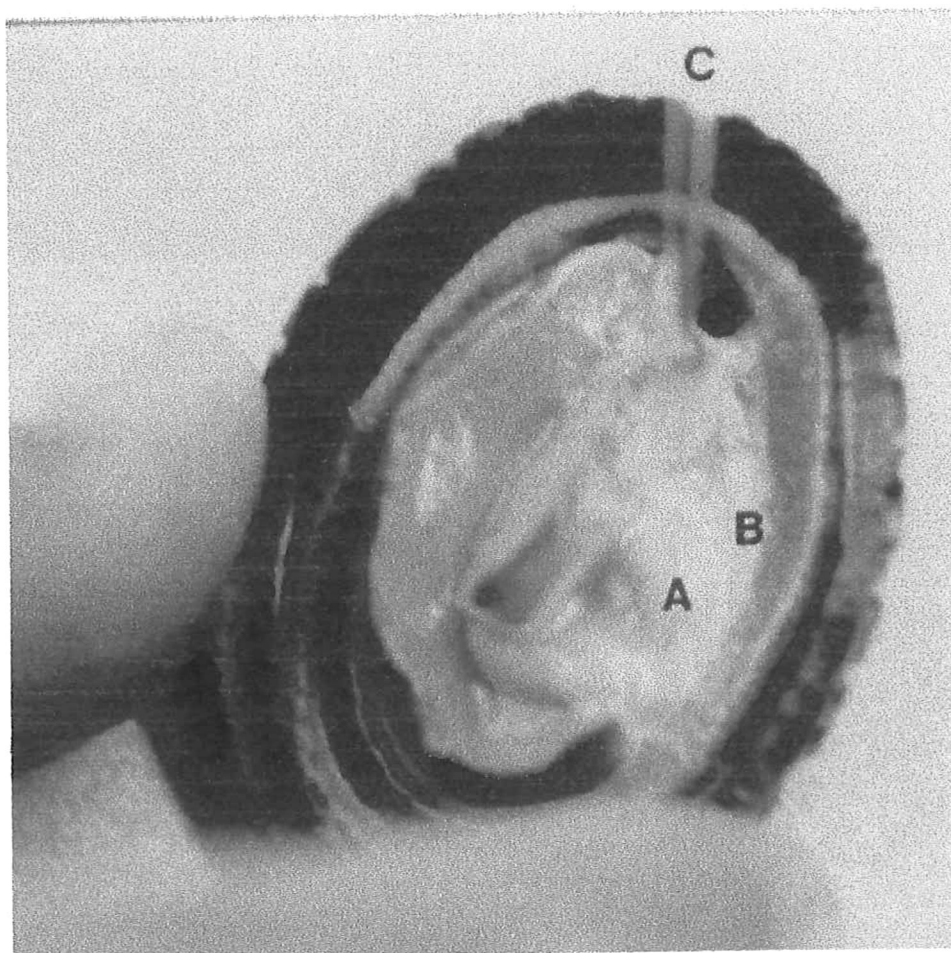


Figura 1. Se muestra la facilidad con la que son obtenidos los espermatozoides y los ovocitos de *Lottia gigantea*. Solo es necesario hacer una pequeña insición en la gónada y succionar los gamétos con una pipeta pasteur. En A) gónada, B) espermatozoides (color blanco), y C) pipeta pasteur. La gónada de las hembras presenta una coloración verde.

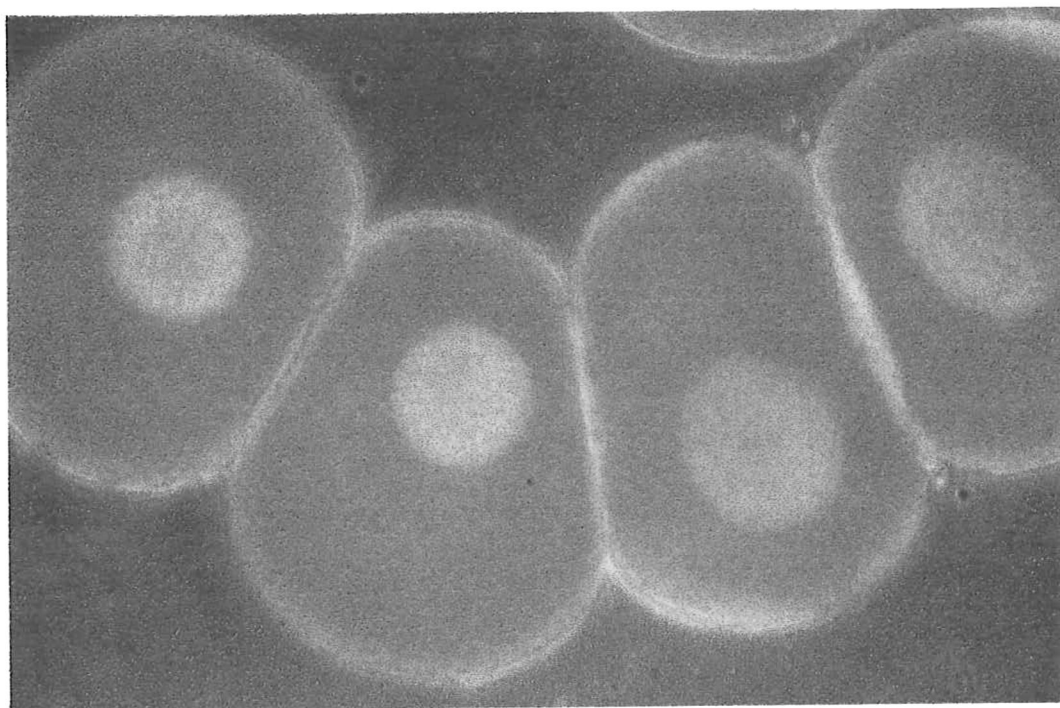


Figura 2. Ovocitos inmaduros de *Lottia gigantea* obtenidos de la gónada en profase I de meiosis. En la gónada, tal y como se muestra, los ovocitos están agregados. Vistos con microscopía de contraste de fases.

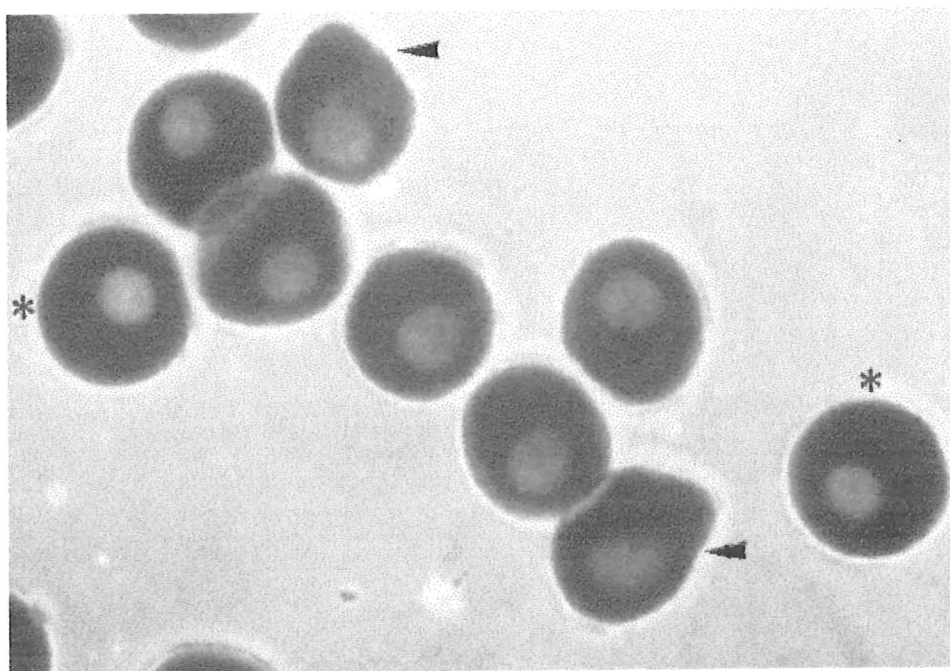


Figura 3. Ovocitos inmaduros de *Lottia gigantea*. Observe la forma irregular y apariencia flácida (ver flechas); después de algunos minutos los ovocitos tienden a redondearse (ver asteriscos).

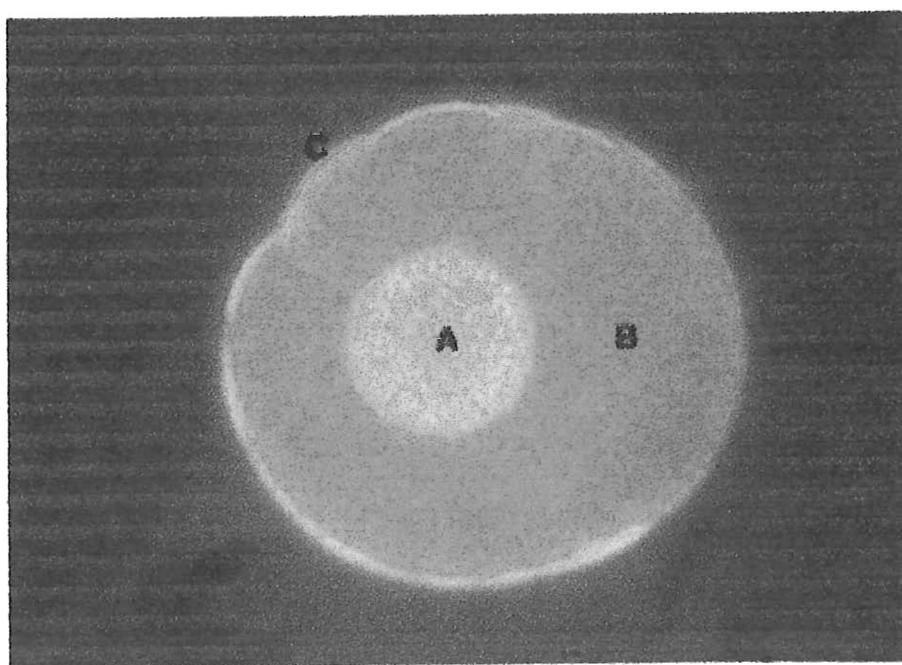


Figura 4. Forma de los ovocitos inmaduros de *Lottia gigantea* una vez que se han redondeado, vistos con microscopía de contraste de fases. En A) vesícula germinal, B) citoplasma, C) células foliculares. Observe que la capa de gelatina, aunque siempre presente, no se alcanza a apreciar en la fotografía..

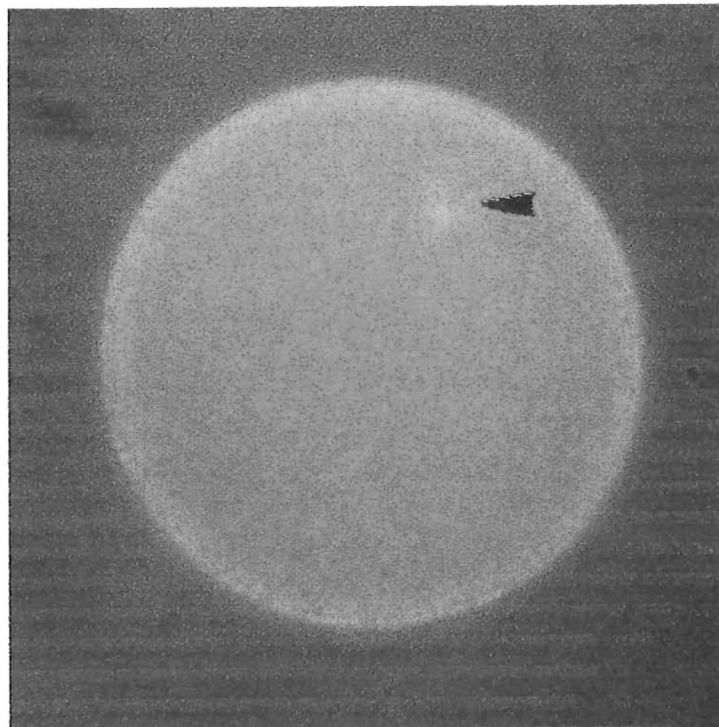


Figura 5. Ovocito madurado con NH_4OH pH 9.0. Observe que aparece redondeado, libre de células foliculares y con una área blanca (ver flecha).

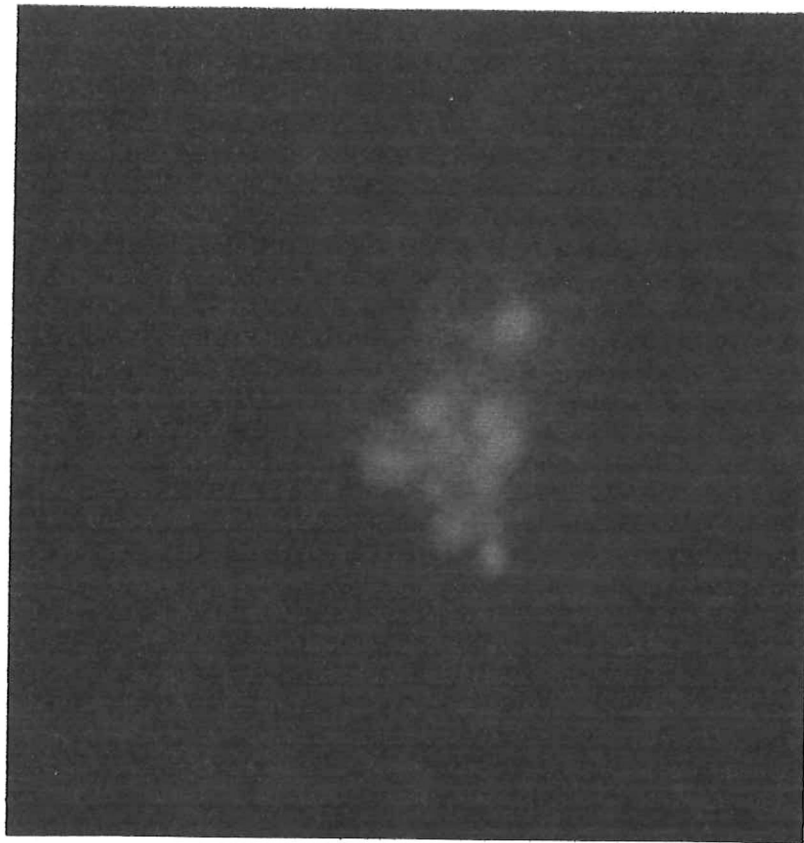


Figura 6. Ovocito de lapa común teñido con bizbenzamida, visto con microscopía de epifluorescencia. Observe los cromosomas, muy pequeños, que aparecen condensados en metafase I de meiosis; se localizan dentro de un área blanca que no aparece en la fotografía.

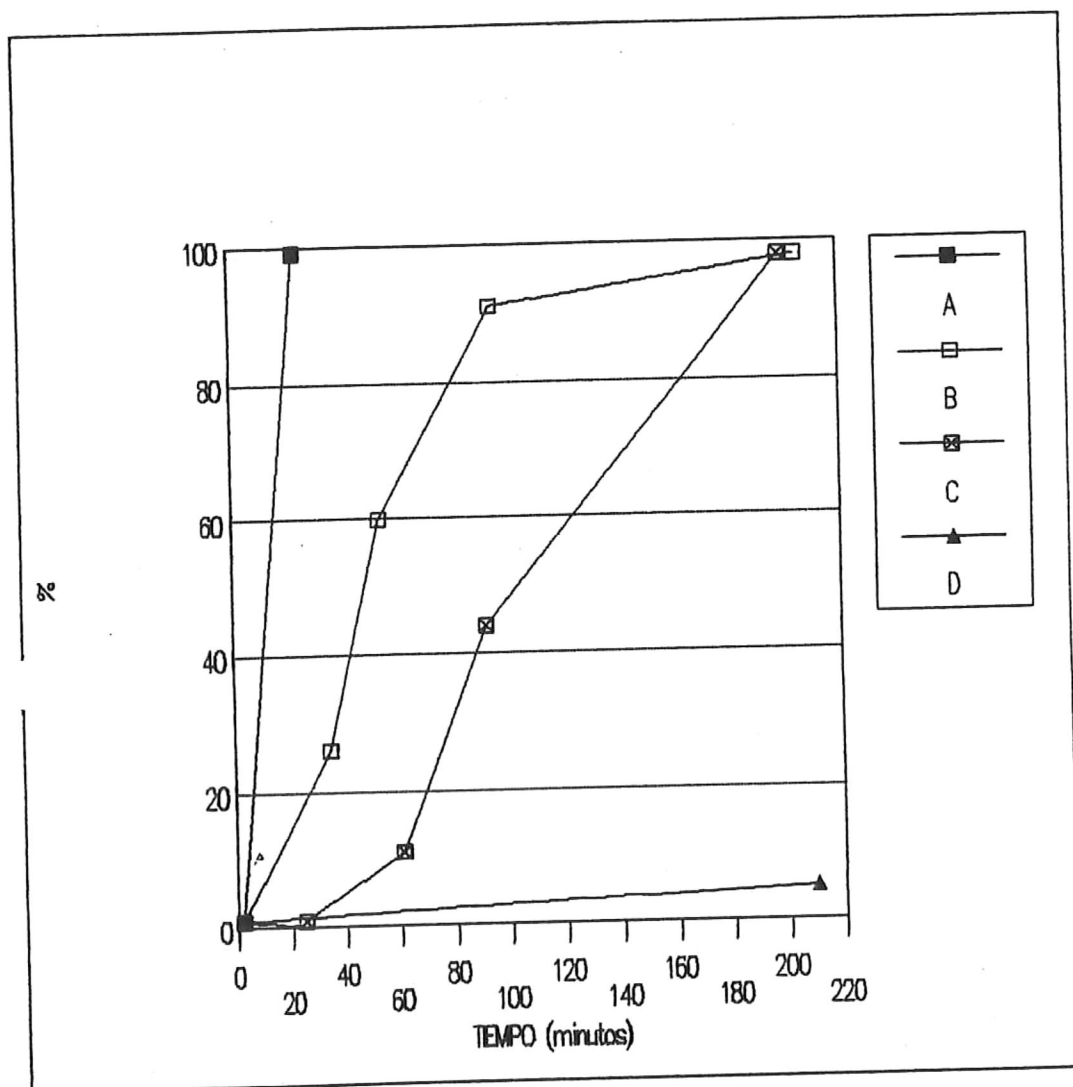


Figura 7. En la gráfica se muestra los porcentajes y el tiempo de maduración *in vitro* de la lapa común con los diferentes tratamientos empleados para inducir la maduración. A) NH_4OH pH 9.0, B) NH_4OH pH 8.5, C) NaOH pH 9.18, D) control. Observe lo rápido que es inducida la maduración con el NH_4OH pH 9.0; también observe el bajo porcentaje de maduración que alcanzaron los controles. Fecha: 14/10/92.

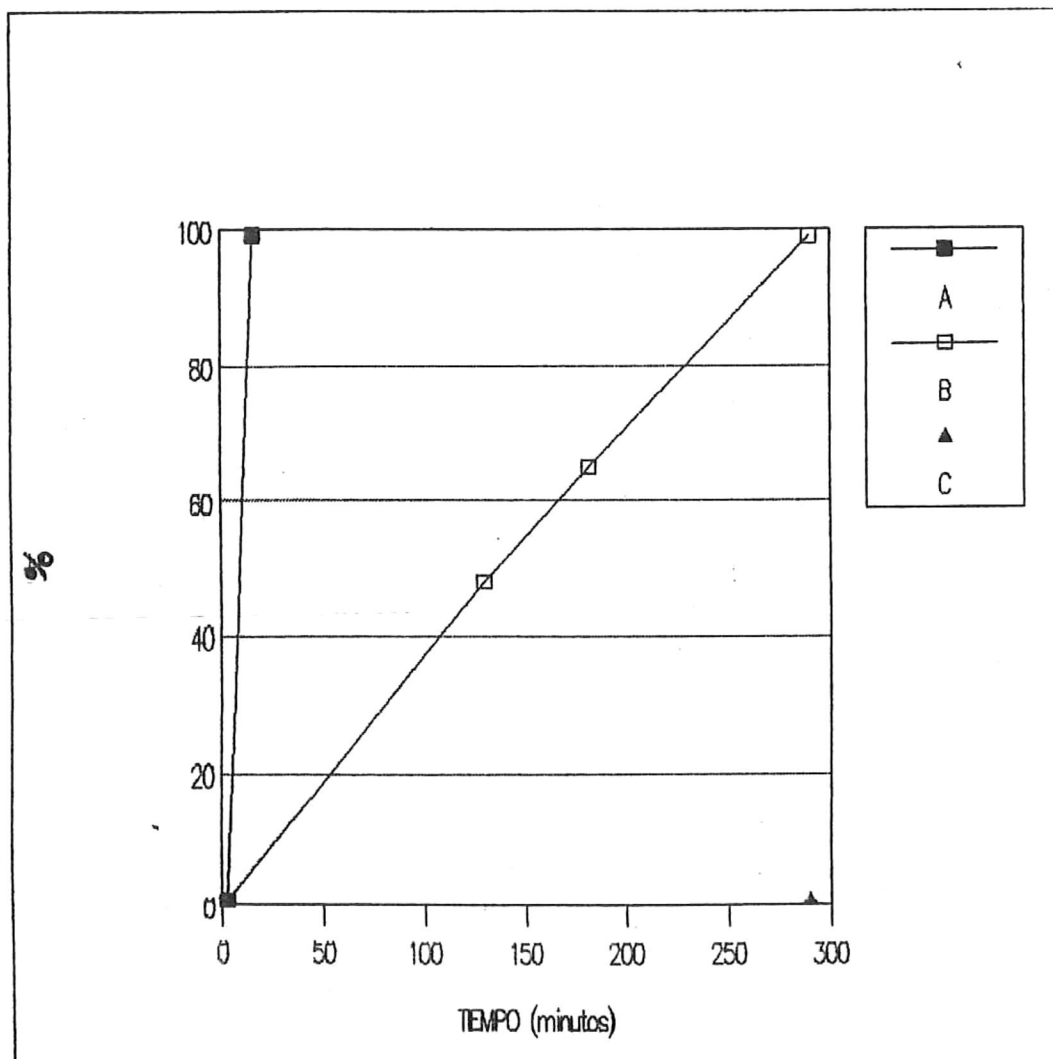


Figura 8. La gráfica muestra el experimento realizado el 23/10/92. Al igual que en la Fig. 7 se muestra lo rápido y reproducible de los resultados de la maduración con NH_4OH pH 9.0. Observe la diferencia dramática en el tiempo con NaOH. A) NH_4OH pH 9.0, B) NaOH pH 9.0, C) Control.

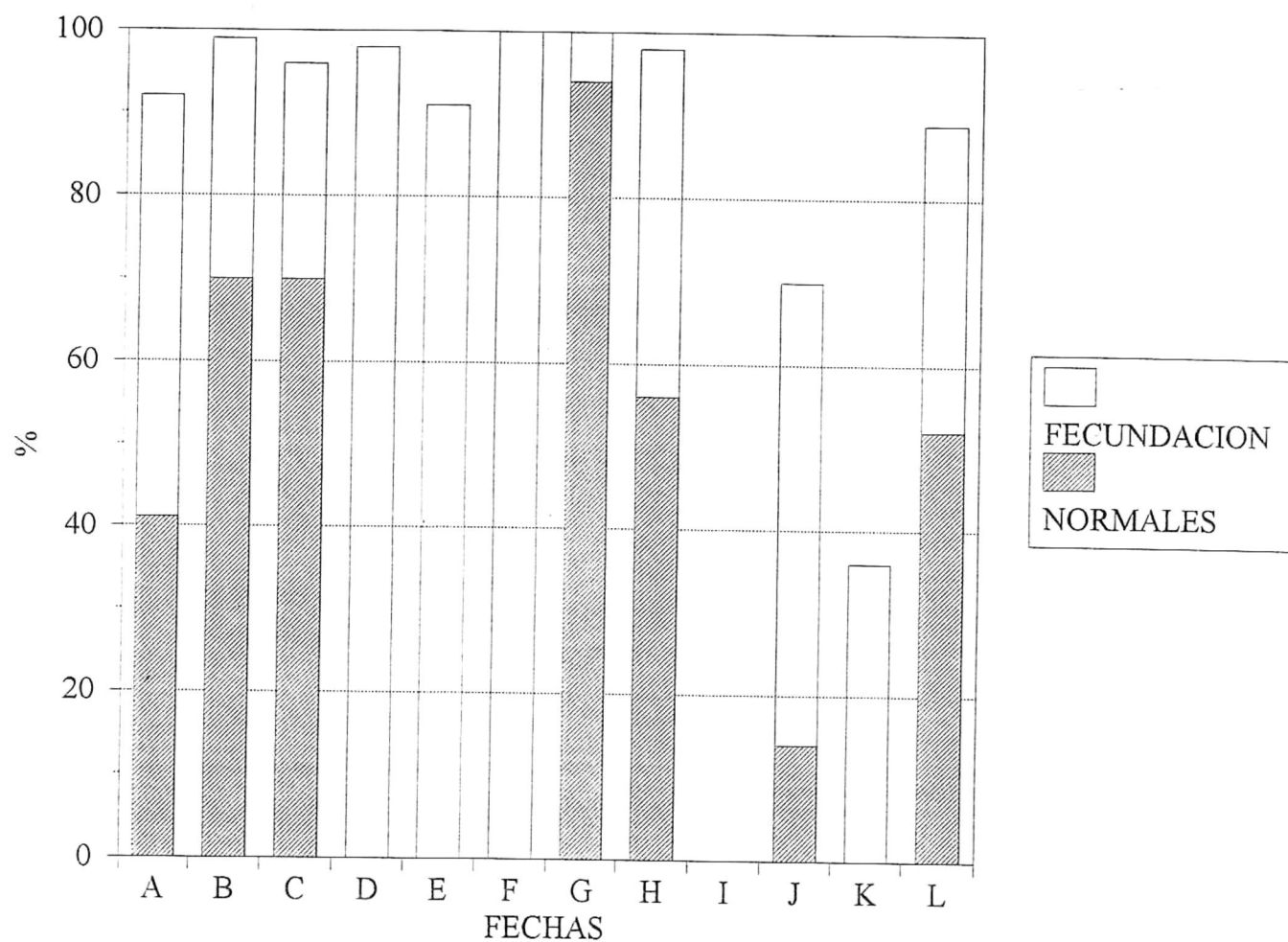


Figura 9. Muestra un resumen de los resultados obtenidos con fecundación y larvas normales que corresponden a las siguientes fechas y tratamientos (ver tabla en la página siguiente).

(Continuación de la Figura # 9)

TRATAMIENTOS					
FECHAS	NH ₄ OH pH 9.0	NH ₄ OH pH 8.5	NaOH pH 9.1	NaOH pH 9.56	NaOH pH 9.0
K 29/09/92				*	
A 07/10/92	*				
B 14/10/92	*				
H 14/10/92		*			
J 14/10/92			*		
C 23/10/92	*				
L 23/10/92					*
D 04/11/92	*				
E 10/11/92	*				
F 18/11/92	*				
G 18/12/92	*				
I CONTROL					

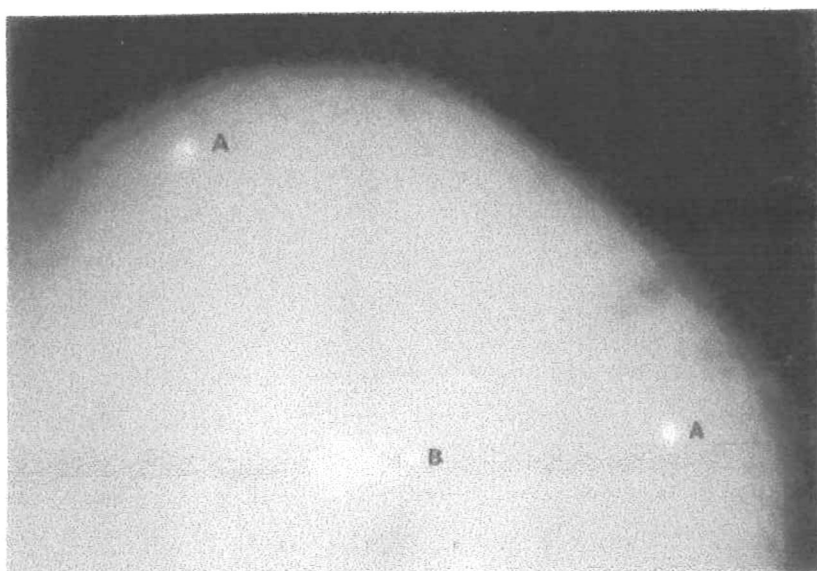


Figura 10. Ovocito polispermicos teñidos con bisbenzamida ($25 \mu\text{m}/\text{ml}$ en agua de mar), visto con microscopía de epifluorescencia. En (A) se observan dos pronúcleos masculinos, en (B), al centro, cromosomas femeninos dirigiéndose hacia la formación, y posterior expulsión, del primer cuerpo polar.

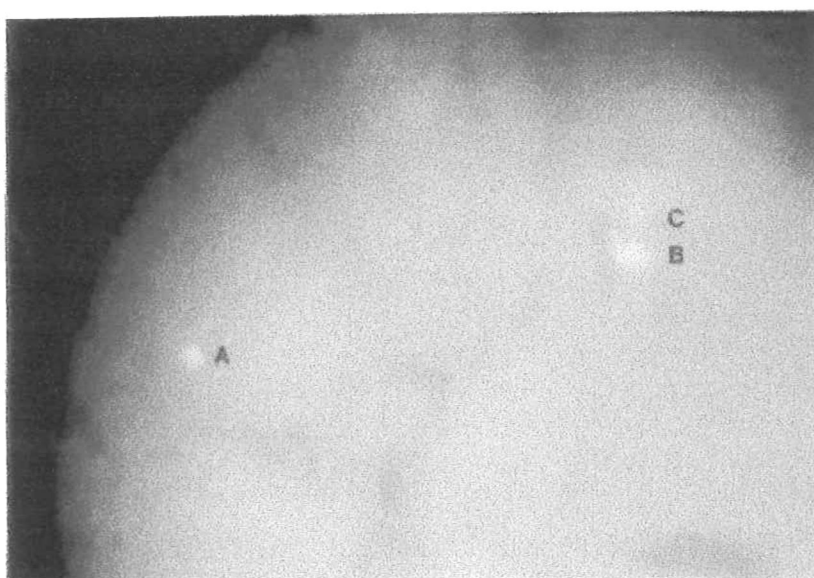


Figura 11. Ovocito monospermico teñido de la misma manera que el ovocito de la Fig. 10. Se observó inmediatamente después de la formación del primer cuerpo polar: A) pronúcleo masculino, en B) cromosomas, C) el primer cuerpo polar condensado.

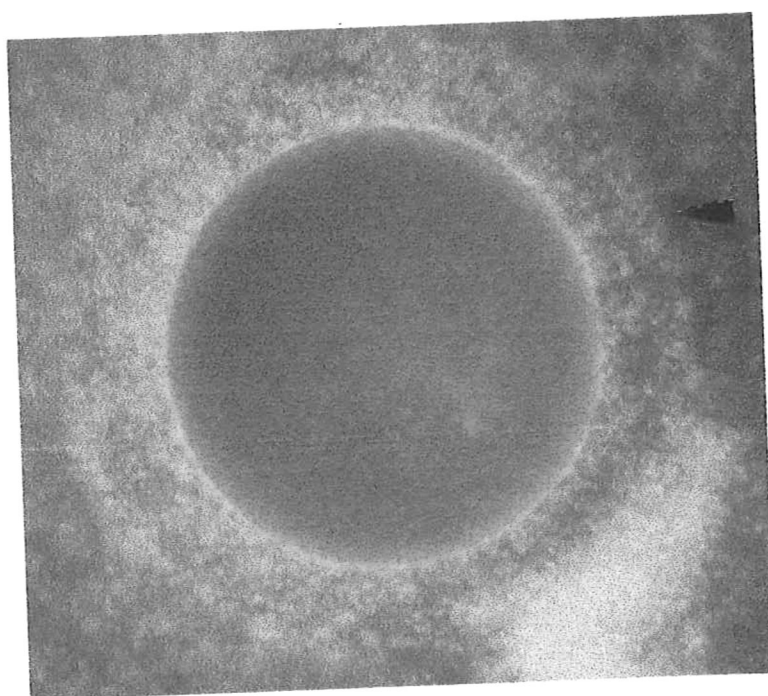


Figura 12. Las altas densidades de espermatozoides propician la polispermia y desarrollo anormal. La flecha en la fotografía muestra la capa de gelatina, puesta en evidencia por la alta concentración de espermatozoides que le rodean.

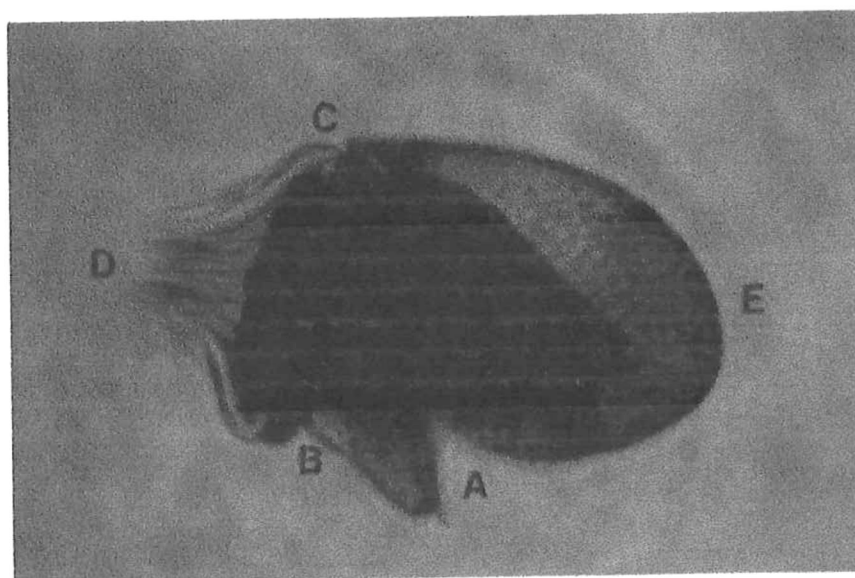


Figura 13. Larva velígera de *Lottia gigantea* 24 horas después de la fecundación, visto con microscopía de contraste de fases. En la foto se aprecia: A) opérculo, B) pie, C) velo, D) cílios y E) concha. Larva fecundada con una densidad promedio de 2000 espermatozoides por ovocito.

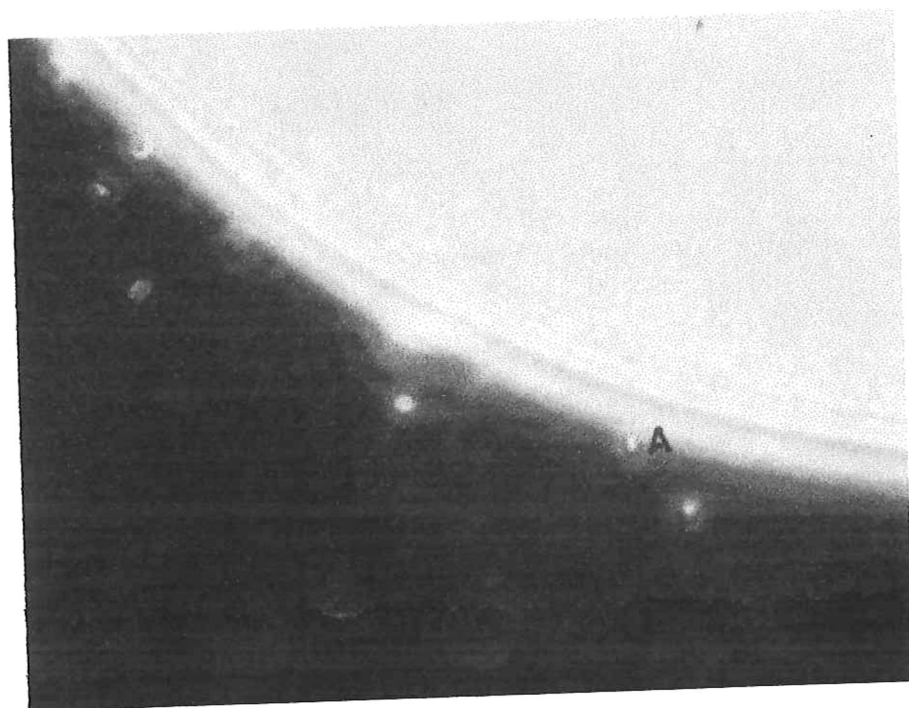


Figura 14. Ovocito de lapa obtenido de la gónada fotografiado durante la fecundación, visto con microscopía de contraste de fases. En A) espermatozoides en contacto con la capa superficial, no se observa la capa de gelatina.

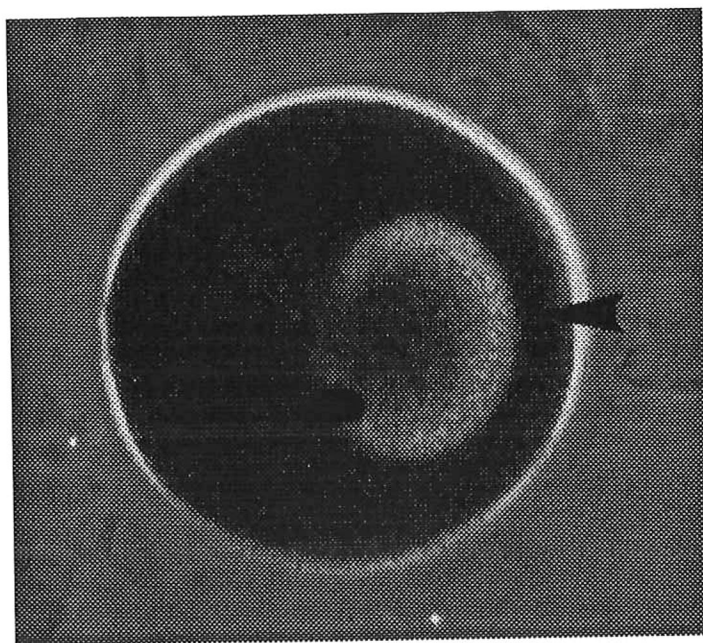


Figura 15. Ovocito de abulón *Halliotis rufescens* recién obtenido de la gónada. Visto con microscopía de luz (el ovocito fue aplastado con un cubreobjeto para observar mejor la vesícula germinal). La flecha indica la presencia y localización de la vesícula germinal, la cuál contiene en su interior los cromosomas en profase I. de meiosis (no mostrados en la foto).

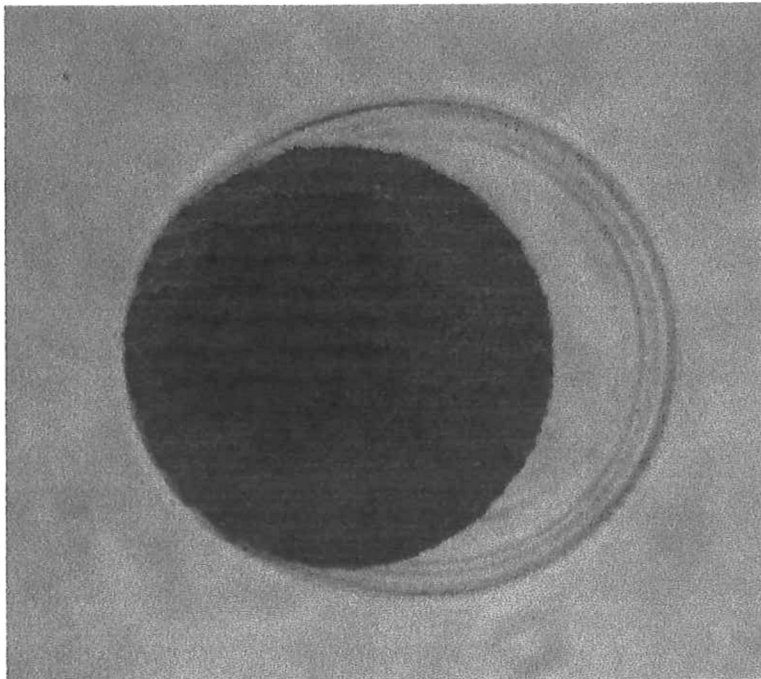


Figura 16. Observe que ha desaparecido la vesícula germinal, la cuál indica que la envoltura nuclear se rompió, adquiriendo la capacidad de iniciar desarrollo. Durante este proceso los cromosomas progresan de profase I de meiosis a metafase I de meiosis (Fig. 17 y 18).



Figura 17. Ovocito del abulón teñido con bisbenzamida. Visto con microscopía de epifluorescencia. Se observa la presencia de cromosomas condensándose para llegar a la metafase I de meiosis (fase que precede a la maduración). Los ovocitos fueron tratados con NH_4OH pH 9.0.



Figura 18. Ovocito del abulón (*Haliotis rufescens*) en metafase I de meiosis, madurado con NH_4OH pH 9.0. Observe que se encuentra en el estadio típico de metafase. Visto con microscopía de epifluorescencia y teñido de la misma manera que el ovocito de la Fig. 17.

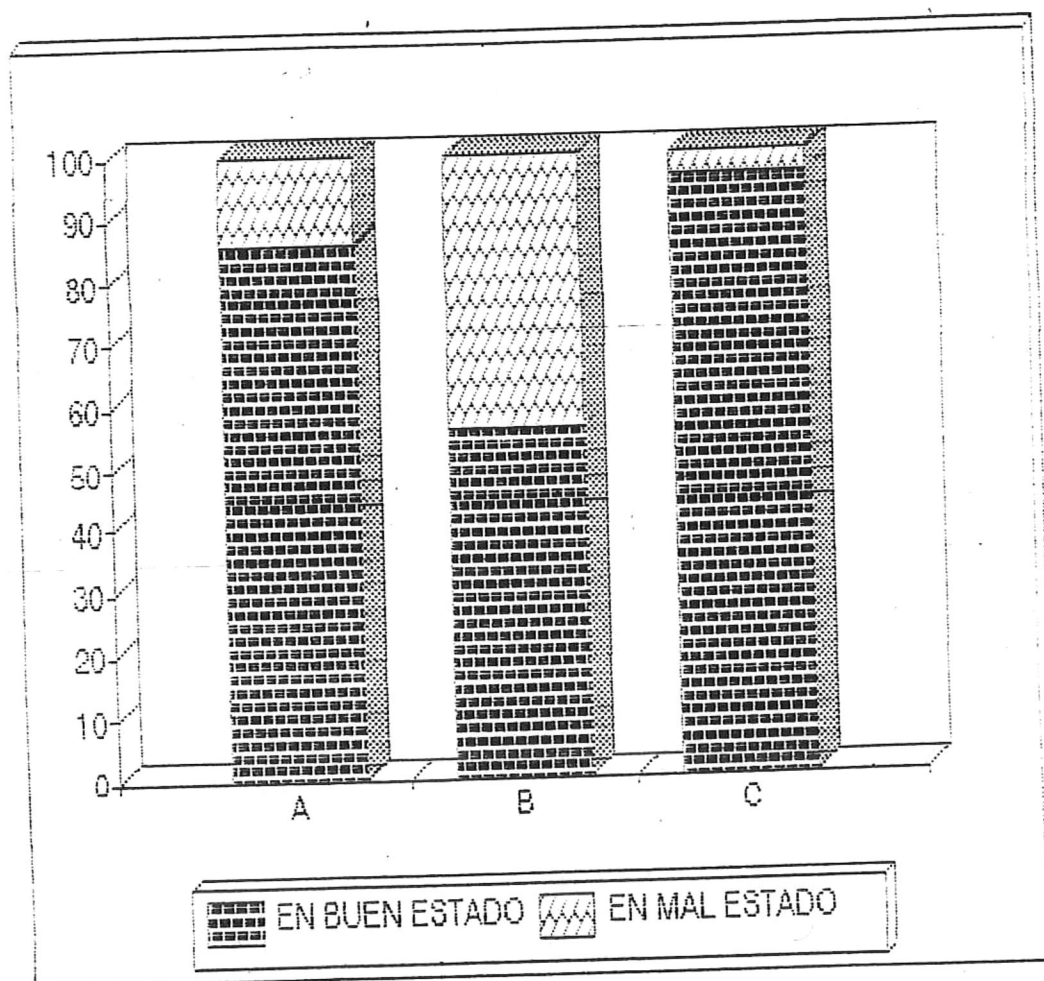


Figura 19. Los ovocitos de lapa recobrados de la gónada típicamente se encuentran en muy buen estado, ver C): 18/12/92). A diferencia de la lapa, los ovocitos del abulón típicamente se encuentran en mal estado, ver B): 17/12/92 y A): 08/12/92). Los datos de abulón representados aquí provienen de dos de los mejores lotes recobrados.

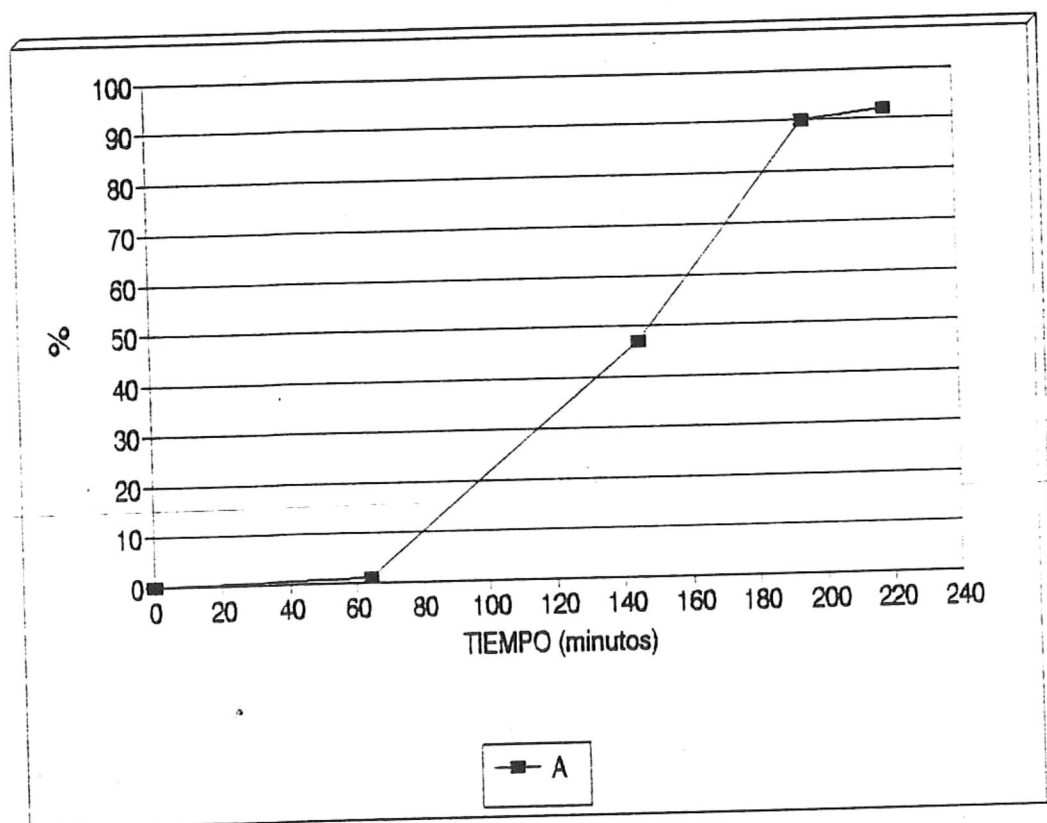


Figura 20. A) Porcentaje y tiempo de maduración de ovocitos de abulón madurados con NH_4OH pH 9.11.

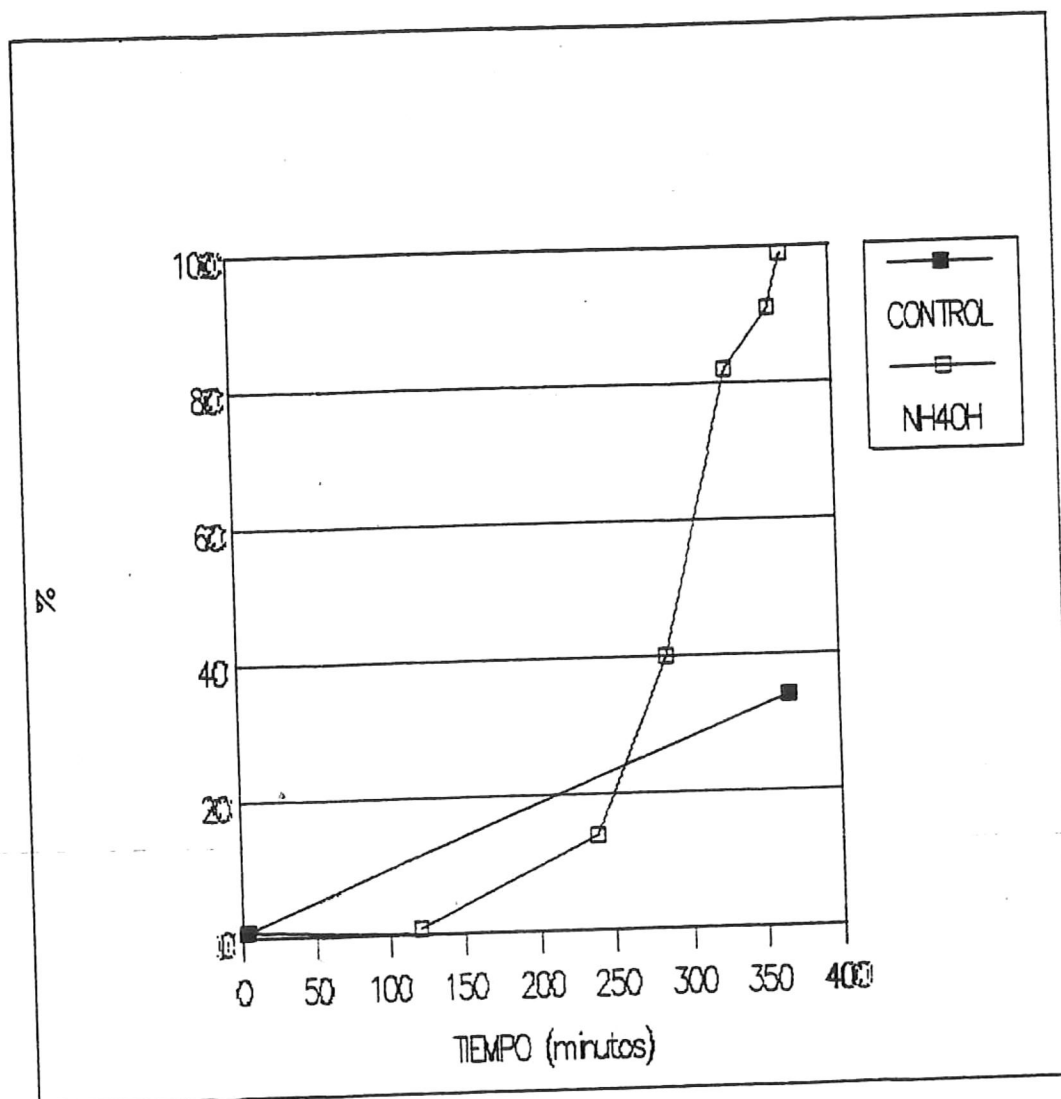


Figura 21. Ovocitos de abulón madurados con NH_4OH durante el experimento el pH se ajustó entre 9.0-9.11.



Figura 22. Larvas normales de abulón producidas a partir de ovocitos madurados con NH_4OH pH 9.0, fecundados con espermatozoides; obtenidos utilizando el método de peróxido de hidrógeno.

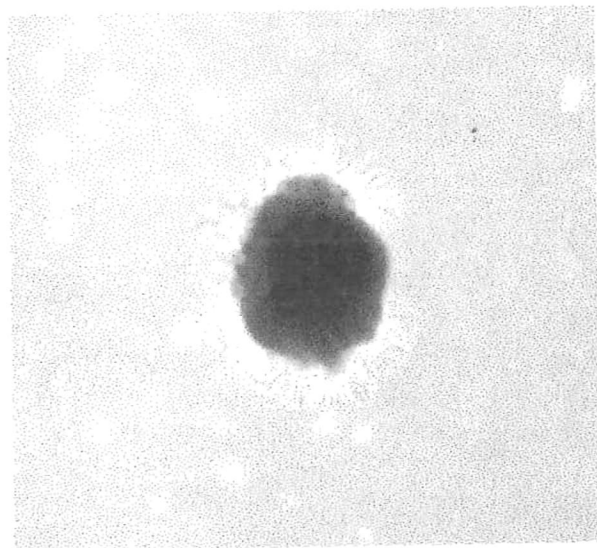


Figura 23. Larva anormal de abulón, obtenida después de madurar *in vitro* ovocitos con NH_4OH ; después de fecundarlos.

TABLA I RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS CON OVOCITOS TRATADOS CON HIDROXIDO DE AMONIO (NH₄OH) pH 9.0				
FECHA AÑO 1992	TIEMPO DE MADURACION (minutos)	% DE MADURACION	T DE FE- CUNDACION DESPUES DE LA MADU- RACION (minutos)	% DE FE- CUNDACION
7 DE OCT	38 aproximado	100	13	92
14 DE OCT	25	100	65	99
" " "			323	3
23 DE OCT	15	100	2	96
29 DE OCT	10	100		
4 DE NOV	35	98	39	98
5 DE NOV	17	100		
10 DE NOV	20	100	29	92
18 DE NOV	26	100		100

TABLA Ib RESUMEN DE LOS CONTROLES REALIZADOS EN EXPERIMENTOS CON NH₄OH pH 9.0		
FECHA 1992	TIEMPO DE MADURACION (minutos)	% DE MADURACION
7 DE OCT	38	3
14 DE OCT	130	10
23 DE OCT	190	1
4 DE NOV	380	6
5 DE NOV	180	25
18 DE NOV	79	10

Nota: No se incluyeron los controles de los experimentos de el 29/10/92 y del 10/11/92.

TABLA II RESULTADOS DE DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON HIDROXIDO DE AMONIO (NH₄OH) pH 8.5					
FECHA: AÑO 1992	TRATAMIENTO	TIEMPO DE MADURACION (minutos)	% de MADURACION	TIEMPO DE FECUNDACION DESPUES DE MADURACION	PORCENTAJE DE FECUNDACION
12 DE OCT.	NH ₄ OH pH 8.5	140	87		
12 DE OCT.	CONTROL	90	1		
14 DE OCT.	NH ₄ OH pH 8.5	205	97	153	98
14 DE OCT.	CONTROL	130	10		

TABLA III RESUMEN DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS CON NaOH pH 9.0 Y 9.56					
FECHA: AÑO 1992	TRATAMIENTO NaOH	TIEMPO DE MADURACION (minutos)	% DE MADURACION	TIEMPO DE FECUNDACION DESPUES DE LA MA- DURACION (minutos)	% DE FECUN- DACION
29 DE SEP.	pH 9.56	330	55	94	37
14 DE OCT.	pH 9.18	197	98	160	70
23 DE OCT.	pH 9.0	289	99	15	89

Nota: los controles de estos experimentos aparecen en la Tabla Ib (excepto el día 29/4/92).

TABLA IV RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE OVOCITOS DE ABULON <i>Haliotis rufescens</i> TRATADOS CON (NH ₄ OH) pH 9.0			
FECHA	TRATAMIENTO	TIEMPO DE MADURACION (horas)	% DE MADURACION
3 DE DIC. 1992	NH ₄ OH pH 9.0	6.0	92
3 DIC. DE 1992	CONTROL	6:10'	34
8 DE DIC. 1992	NH ₄ OH pH 9.0	3:39'	92
8 DE DIC. 1992	CONTROL	0	0

DISCUSION

Los resultados demuestran que un tratamiento con amonio a pH 9 es suficiente para inducir maduración hasta metafase I, en ovocitos extraídos de los ovarios de la lapa común y el abulón rojo; esto permite su posterior desarrollo al ser fecundados. Con el éxito obtenido con este procedimiento nos acercamos a la meta principal del presente trabajo: encontrar un método sencillo que pueda ser llevado a la práctica en la orilla del mar para no desperdiciar los gametos que portan los organismos extraídos para consumo humano, especialmente abulón, y contribuir de esa forma a la repoblación de estos organismos en áreas intensamente explotadas (resta afirmar el método para mejorar el rendimiento).

El efecto más probable que ejerce el amonio en los ovocitos es el aumento de el pH intracelular (ver Antecedentes). Esto explicaría porque, en lapa, el NaOH en agua de mar al mismo pH fue mucho menos efectivo. Como se mencionó en los antecedentes, el NH_3 es altamente soluble en membranas, mientras que el OH^- no puede cruzar la membrana sin pasar por proteínas. Sin embargo, las células poseen transportadores de H^+ , OH^- y de HCO_3^- en la membrana y que son utilizados para la regulación del pH interno, por lo que el movimiento de iones es influido por los gradientes de concentración a través de la membrana; por esta razón un aumento del pH externo puede ocasionar

consecuentemente, un aumento en el pH intracelular, lo que explica el débil efecto del NaOH. En los casos de lapa común (*Lottia gigantea*) y abulón rojo (*Haliotis rufescens*), creemos que el amonio propicia la maduración porque ocurre un aumento del pH intracelular, queda por demostrarse si ésta última hipótesis es cierta; es necesario para demostrarlo llevar a cabo mediciones del pH intracelular y determinar si hay otros factores involucrados, o si ocurren efectos sinérgicos, con el Ca^{++} , por ejemplo. Como se ha mencionado en los Antecedentes, ocurre un aumento en pH intracelular durante la maduración inducida por NH_4Cl en la lapa europea (Vilain *et al.*, 1993). Lo mismo se ha observado en ovocitos del bivalvo *Limaria hakodatensis* madurados por NH_4Cl (Deguchi y Osanai, 1994), En el gusano marino *Urechis caupo* (Gould y Stephano, 1993) y el bivalvo *Mactra chinensis* (Deguchi y Osanai, 1994), un aumento en el pH intracelular inducido por la fecundación es necesario para la ruptura de la vesícula germinal; sin embargo, en estas especies los ovocitos no se detienen en metafase I. En cambio, para que ocurre la ruptura de la vesícula germinal no se requiere de un aumento del pH intracelular, lo mismo sucede en estrella de mar (Peaucellier *et al.*, 1988; Johnson y Epel, 1982) y en la rana *Xenopus* (Lee y Steinhardt, 1981).

¿Cuales son los mecanismos que inducen la salida de la profase (ruptura de la vesícula germinal) y luego detienen a los ovocitos en metafase I? Se ha logrado determinar en organismos tan diversos como levaduras hasta mamíferos, que un factor común que interviene en este fenómeno es el llamado **FACTOR PROMOTOR DE LA FASE M** (FPM o MPF por sus siglas en inglés, revisado por Stephano, 1993). El FPM

consiste de una proteína cinasa (la p34) unida a una ciclina y directa o indirectamente es responsable del rompimiento de la envoltura nuclear, la condensación de cromosomas, la formación del huso cromosómico y el avance a la etapa de metafase, donde se detiene hasta que es degradada la ciclina para entrar a la anafase (Stephano, 1993). La activación del FPM requiere de la asociación con la ciclina y su desfosforilación en los residuos # 14 (treonina) y # 15 (tirosina), procesos que pueden ser activados por el aumento en el pH intracelular. En *Patella* ha sido demostrado que ovocitos inducidos con amonio producen FPM activo (Neant y Guerrier, 1988). Utilizando inhibidores de síntesis de proteínas se encontró que la presencia del factor activo no requirió de la síntesis de nuevas proteínas, pero sí su mantenimiento. Cuando ovocitos en metafase I fueron incubados con emetina (un inhibidor de síntesis de proteínas), los cromosomas descondensaron y la envoltura nuclear se formó de nuevo (Neant y Guerrier, 1988). Un efecto de la inhibición fue la rápida desaparición de las ciclinas (van Loon *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que el amonio activa al FPM (aunque se desconoce el mecanismo exacto de operación) y que la síntesis continua de ciclinas se requiere para el arresto en metafase I.

EN RESUMEN, QUEDAN LAS SIGUIENTES PREGUNTAS POR CONTESTAR:

1. ¿Es el reinicio de la meiosis en lapa y abulón responsabilidad del aumento en el pH intracelular?

Queda por demostrar: a) Si se presenta la maduración elevando el pH intracelular por otro método, b) Si ocurre maduración en ausencia de alcalinización intracelular.

2. ¿Es el aumento en el pH intracelular suficiente para reiniciar la meiosis? Por ejemplo: ¿No se requiere de un aumento en los niveles de Ca intracelular?

3. ¿Como se activa el FPM en los ovocitos inmaduros (se une con ciclinas, fosfatasas, etc.)?

4. ¿Es la ciclina la única proteína cuya síntesis se requiere para mantener la metafase I?

CONSIDERACIONES PARA MEJORAR EL RENDIMIENTO DE OVOCITOS VIABLES Y CON PRESENCIA DE DESARROLLO NORMAL DESPUES DE LA FECUNDACION

Aunque al utilizar el amonio se produjeron larvas de abulón, fue notable el porcentaje de ovocitos que presenta daño cuando fueron removidos del ovario. Desconocemos si existen estudios de ovocitos de abulón que utilicen microscopía electrónica, pero puede especularse sobre la posible existencia de uniones estrechas o adhesiones de otro tipo con células somáticas en el ovario que hacen difícil el desprendimiento de los ovocitos sin que ocurra daño. Obviamente si existen tales conexiones

debe existir alguna forma en la que los ovocitos se desprenden de forma natural sin dañarse. Debido a la magnitud de este problema sería excelente encontrar un método sencillo para madurar y desprender ovocitos en trozos de ovario. Nos preguntamos: ¿que sucedería si fueran incubados trozos de ovario en agua de mar con amonio? Otra pregunta que surge es conocer el tiempo mínimo requerido por los ovocitos de abulón para madurar con NH_4OH . Otra posibilidad es que los ovocitos de abulón son permeables al NH_4^+ (ver Antecedentes) entonces no se alcaliniza el citoplasma, lo cuál puede ser probado con mediciones del pH intracelular.

Por otra parte, en lapa el daño que se presenta cuando se desprenden los ovocitos del ovario fue casi nulo. Los ovocitos recién salidos aparecen deformados, posiblemente sea debido a su apiñamiento en el ovario, adquiriendo espontáneamente una forma redondeada una vez que se liberan en el agua de mar. Las bases moleculares de este fenómeno, que también se presenta en algunas otras especies como el ostión no se conocen (Inaba, 1936), aunque puede especularse que quizás se origina por movimientos de iones que producen un aumento de la presión osmótica dentro del ovocito.

También en la lapa, falta por probar si es posible mejorar el rendimiento de ovocitos maduros capaces de desarrollarse normalmente después de la fecundación, por ejemplo con tratamientos con amonio con menor duración. El hecho de que no ocurrio el desarrollo de ovocitos fecundados después de 3 horas, sugiere que existe un tiempo óptimo para la fecundación después de la maduración. En estrella de mar sí se conoce la existencia de un tiempo óptimo después que los ovocitos son tratados con la 1-metil-

adenina (la hormona natural que induce la maduración en estrellas de mar (Kanatani, et al., 1969). Los ovocitos son menos susceptibles a la polispermia entre la ruptura de la vesícula germinal y la formación del primer cuerpo polar (Miyazaki e Hirai, 1979).

CONCLUSIONES

1. Se encontraron lapas *Lottia gigantea* reproductivas de ambos sexos de octubre a diciembre de 1992.
2. Se recobran ovocitos inmaduros (profase I de meiosis) de la gónada con más de un 90% de viabilidad, pero sin capacidad de fecundación (Los espermatozoides entran en los ovocitos pero estos no son capaces de iniciar el desarrollo).
3. Se recobran espermatozoides de la gónada con capacidad de fecundación.
4. Se induce 100% de maduración (ruptura de la vesícula germinal, avance a la metafase I de meiosis y desprendimiento de células foliculares) con NH_4OH pH 9 en un tiempo promedio de 21 minutos (7 experimentos), adquiriendo ahora la capacidad de fecundación arriba del 90%.
5. En los ovocitos tratados con NH_4OH pH 8.5 se retrasa la maduración (más de 2 horas), aunque también adquieren la capacidad de fecundación.
6. En los ovocitos tratados con NaOH pH 9 a 9.56 la maduración se llevo a cabo en más de 5 horas con un porcentaje menor de fecundación (37-89%).
7. Ovocitos madurados con NH_4OH pH 9 se obtienen altos porcentajes de larvas normales.
8. Se desarrolló un método para detectar polispermia que consiste en disolver la capa vitelina con EGTA-glucosa o pronasa, y teñir posteriormente con bisbenzamida. Con este método se determinó que los ovocitos de lapa son susceptibles a la polispermia y requieren de concentraciones bajas de espermatozoides para su desarrollo normal.

9. Se recuperan bajos porcentajes de ovocitos inmaduros en buenas condiciones de la gónada de abulón *Halliotis rufescens*.
10. Los ovocitos de abulón tratados con NH_4OH pH 9 maduran en un tiempo de entre 3 y 6 horas y con un porcentaje mayor al 90%.
11. Los ovocitos de abulón madurados con NH_4OH pH 9 y con un porcentaje mayor al 90%, tienen la capacidad de fecundar y desarrollar larvas normales cuyo porcentaje no se determinó.
12. En ambas especies, *Lottia gigantea* y *Halliotis rufescens*, el probable mecanismo de maduración es el aumento en pH intracelular inducido por el NH_4OH .

BIBLIOGRAFIA

- Boron, W.F., Ross, A. y P. De Weer. 1978. NH_4Cl and other weak bases in the activation of the sea urchin eggs. *Nature* 274:190
- Burckhard, B-C y E. Fromter. 1992. Pathways of the $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Arch.* 420:83-86.
- Deguchi, R. y K. Osanai. 1994. 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*. *Devel. Biol.* 166:587-599.
- Gould, M.C. y J.L. Stephano. 1993. Nuclear and cytoplasmic pH increase at fertilization in *Urechis caupo*. *Devel. Biol.* 159:608-617.
- Guerrier, P., M. Brassart, C. David and M. Moreau. 1986. Sequential control of meiosis reinitiation by pH and Ca^{2+} in oocytes of the prosobranch mollusk *Patella vulgata*. *Dev. Biol.* 114, 315-324.
- Guerrier, P., P. Guerrier, I. Neant and M. Moreau. 1986. Germinal vesicle nucleoplasm and intracellular pH requirements for cytoplasmic maturity in oocytes of the prosobranch mollusk *Patella vulgata*. *Dev. Biol.* 116:92-99.
- Inaba, F. 1936. Studies on the artificial parthenogenesis of *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 1*, 5:1-46.
- Johnson, C.H. y D. Epel. 1982. Starfish oocyte maturation and fertilization: Intracellular pH is not involved in activation. *Devel. Biol.* 92:461-469.

Kanatani, H., H. Shirai, K. Nakanishi, y T. Kurosawa. 1969. Isolation and identification of meiosis inducing substance in starfish. *Nature* 221:273-274.

Lee, S.C. y R.A. Steinhard. 1981. pH changes associated with meiotic maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. *Devel. Biol.* 85:358-369.

Loeb, J. 1905. On chemical methods by witch the eggs of a mollusc (*Lottia gigantea*) can be caused to became mature. *Univ. Calif. Publ. Physiol.* 3:1-18.

Miyazaki, S-I y S. Hirai. 1979. Fast polyspermy block and action potential. Correlated changes during oocyte maturation of a starfish. *Devel. Biol.* 70:327-340.

Morse, D.E., N. Hooker, y A. Morse. 1987. Chemical control of reproduction in bivalve and gastropod molluscs. III. An inexpensive technique for mariculture of many species. *Proc. Ninth Annu. Meet. Word. Maric. Soc.* 9:543-547.

Neant, I. and P. Guerrier. 1988. Meiosis reinitiation in the mollusc *Patella vulgata*. Regulation of MPF, CSF and chromosome condensation activity by intracellular pH, protein synthesis and phosphorylation. *Development* 102:505-516.

Peaucellier, G., A. Picard, J.J. Robert, J-P Capony, J-C. Labbé y M. Dorée. 1988. Phosphorylation of ribosomal proteins during meiotic maturation and following activation in starfish oocytes: its relationship with changes in intracellular pH. *Exp. Cell. Res.* 174:71-88.

Stephano, J.L.. 1993. El factor promotor de la fase-M y el control de la división celular. *Ciencia* 44:305-322.

Vilain, J-P., Rodeau, J-L and S. Gaillard. 1993. Florescent probe measurement of intracellular pH during meiosis reinitiation by ammonia in oocytes of the mollusc *Patella vulgata*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 104A, No. 3. pp:479-482.

vann Lonn, A.E., P. Colas, H.J., Goedemans, I. Neant, P. Dalbon, y P. Guerrier. 1991. The role of cyclins in the maturation of *Patella vulgata* oocytes. EMB. J. 10: 3343-3349.

Zucker, R.S., R.A. Steinhardt y M.M. Winkler. 1978. Intra cellular calcium and the mechanism of parthenogenetic activation of sea urchin eggs. Devel. Biol. 65:285-295.

