

DESARROLLO EMBRIONARIO DE *Tetrapygyus niger* (Molina, 1782) “ERIZO NEGRO” EN DIFERENTES TEMPERATURAS

*Pamela Olaechea*¹
Juan José Panéz
Hugo Gonzáles- Figueroa

RESUMEN

Se caracterizan las diferentes etapas del desarrollo embrionario de *Tetrapygyus niger* “erizo negro” en cultivos controlados a 5, 10 y 15°C respectivamente, desde el cigote hasta la formación de larva pluteus.

Se observó que el tiempo de los ciclos de segmentación desde cigote hasta blástula temprana se alargan con relación a la temperatura, demorando 14 horas en el cultivo de 15°C, 45 horas en el de 10°C y 164 horas los que se mantuvieron a 5°C, lo que evidencia que el desarrollo embrionario temprano de *Tetrapygyus niger* es dependiente de la temperatura. El embrión de 2-células aparece 37 horas después de la fecundación a 5°C mientras que a 10°C se demora 7 horas y sólo necesita 2 horas a 15°C para llegar a blástula temprana, notándose, además, que al incrementar la temperatura el intervalo entre un ciclo de segmentación y el siguiente es más homogéneo. La variación de la temperatura induciría la activación o inhibición de señales celulares que permitirían un desarrollo embionario exitoso desde cigote hasta pluteus

Palabras claves: *Tetrapygyus niger*, erizo negro, desarrollo embrionario

SUMMARY

Different stages of *Tetrapygyus niger* “black sea urchin” embryonic development were characterized in cultures controlled to 5, 10 and 15°C respectively, from zygote until pluteus larvae. Time of cleavage cycles from zygote to early blastulae delayed 14 hours in culture at 15°C; 45 hours at 10°C and 164 hours at 5°C, which evidence that *Tetrapygyus niger* embryonic development is temperature-dependent.

2-cells embryo, appears 37 hours after of fertilization at 5°C whereas at 10°C dealed 7 hours and it is delayed, and it only needs 2 hours to 15°C to arrive at early blastula noticing, in addition, that when increasing the temperature the interval between a cleavage cycle and the following one is more homogenous. Temperature variation would induced activation or inhibition of cellular signals that they would allow a successful sea urchin development

Key words: *Tetrapygyus niger*, urchin, development embryonic

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario en erizo de mar desde cigote hasta larva pluteus comprende una serie de procesos moleculares y celulares influenciados por diversos

factores ambientales. La segmentación del cigote origina un número determinado de blastómeros que continua con un desplazamiento celular dentro del embrión y culmina con la diferenciación celular y

¹ Laboratorio de Biología del Desarrollo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma. Av. Benavides 5440, Santiago de Surco – Lima. e- mail: 200211384@mail.urp.edu.pe

crecimiento. El embrión de erizo de mar tiene una segmentación radial holoblástica donde a partir de la cuarta división los blastómeros de acuerdo al tamaño se identifican como mesómeros, macrómeros, y micrómeros. La blástula se visualiza como una cavidad central limitada por una capa de células epiteliales, y la gástrula se caracteriza por la presencia del arquenterón, luego el proceso continúa hasta la formación de una larva predadora de vida libre denominada pluteus (Khurram et al, 2004).

La concentración de compuestos químicos y la variación de la temperatura del agua, son algunos de los factores ambientales que alteran el desarrollo embrionario en los equinodermos. Compuestos fosforados bloquean la fecundación e inducen un desarrollo embrionario anormal en poblaciones del erizo *Lytechinus variegatus*. (Bottger, & McClintock, 2001). La variación de la temperatura del agua influye en la segmentación del erizo de mar alterando la duración de las fases del ciclo celular (Nurse, 1990), sólo la fusión de los pronúcleos para formar el núcleo del cigote, no sería influenciado por la temperatura (Yamada & Mihashi, 1998).

Tetrapygus niger «erizo negro», es la especie más común que se encuentra a lo largo de toda la costa peruana que ha sido usada en el presente trabajo para caracterizar las diferentes etapas del desarrollo embrionario, desde la formación del cigote, de la blástula y su transformación posterior en larva pluteus, en cultivos controlados a 5, 10 y 15°C respectivamente,

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de especímenes

Especímenes de *Tetrapygus niger* «erizo negro» se colectaron en la playa Punta Negra (Km. 44 de la Panamericana Sur) entre los meses de abril a julio y se transportaron al laboratorio en baldes de plástico que contenían agua de mar.

En el laboratorio se procedió a separar individuos machos y hembras de acuerdo al tamaño.

Se acondicionaron cámaras de cultivos controladas a 5, 10 y 15°C respectivamente. El agua de mar que se utilizó en todos los experimentos fue filtrada y autoclavada y además se le agregó una solución de gentamicina (2mg/litro) para evitar el crecimiento bacteriano.

Obtención de gametos

Cada espécimen, hembra o macho recibió una inyección intracelómica de 0,2 ml de KCl (0.53 M) para inducir la liberación de los gametos.

En seguida cada ejemplar fue colocado sobre la superficie de una cubeta de vidrio con agua de mar y la salida de los gametos del cuerpo de cada individuo ocurrió entre 1 a 4 minutos después de la inyección. Una secreción blanca nacarada indicaba la presencia de espermatozoides mientras que una de color rojo vinoso la de ovocitos. Los ovocitos se mantuvieron en el agua de mar filtrada y la masa espermática se aisló y se mantuvo en seco.

Fertilización *in vitro*.

Se preparó una «suspensión patrón» agregando una gota de la masa espermática a 10 ml de agua de mar filtrada y temperada a 5, 10, y 15° C respectivamente. Por otro lado, en una cubeta de vidrio se colocó 2 ml de la suspensión de ovocitos, a la que se agregó 0.1 ml de la «suspensión patrón» y se diluyó hasta 150 ml con agua de mar filtrada y temperada, adecuada para cada bioensayo.

Desarrollo embrionario.

Las diferentes etapas del desarrollo embrionario se identificaron, a través de un microscopio compuesto de campo claro Nikon, colocando en una lámina, con bordes de parafina, 3 gotas del cultivo y cubriéndola con una laminilla. Se contaron, por cada vez, 100 embriones en cuatro campos diferentes.

El momento de la mezcla de gametos se consideró como tiempo de inicio del desarrollo y a partir de allí, las observaciones se realizaron cada 30 minutos durante las primeras 8 horas y posteriormente las observaciones se hicieron cada hora, hasta visualizar el estado de larva pluteus.

Se realizaron cinco repeticiones experimentales en el cultivo de 15°C y tres en los cultivos de 5 y 10°C respectivamente. El valor promedio obtenido de la suma total del recuento embrionario por cada rango de temperatura se consideró como el tiempo de duración de cada etapa del desarrollo embrionario

RESULTADOS

Los cigotes iniciaron la segmentación en todos los bioensayos, pero sólo llegaron hasta pluteus los que se mantuvieron a 10 y 15 °C. En la figura 1 se muestra las diferentes etapas del desarrollo embrionario desde cigote hasta pluteus de *Tetrapygyus niger* obtenidas en el laboratorio.

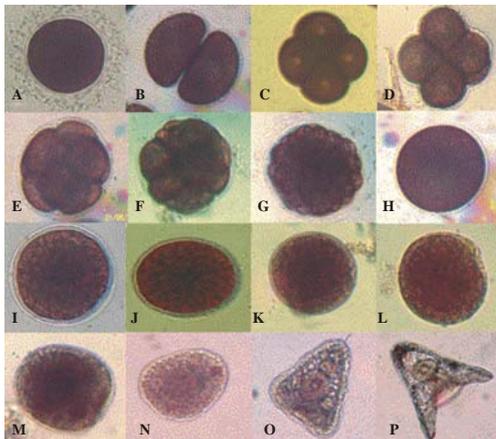


Figura 1: Etapas del desarrollo temprano de *Tetrapygyus niger* «Erizo Negro» (400X). A) Zigote B) 2 Células. C) 4 Células. D) 8 Células. E) 16 Células. F) 32 Células. G) Mórula. H) Blástula temprana I) Blástula media. J) Blástula tardía. K) Gástrula temprana. L) Gástrula media. M) Gástrula tardía. N) Prismático. O) Pluteus temprano. P) Pluteus tardío.

En el cultivo a 5°C sólo se logró obtener blástula temprana a las 164 horas después del inicio del desarrollo embrionario (Figura 2), en cambio en el cultivo mantenido a 10°C el desarrollo, desde cigote hasta pluteus se completó a las 345.5 horas (Figura 3), mientras que los que se conservaron a 15 °C llegaron hasta pluteus a las 120 horas (Figura 4).

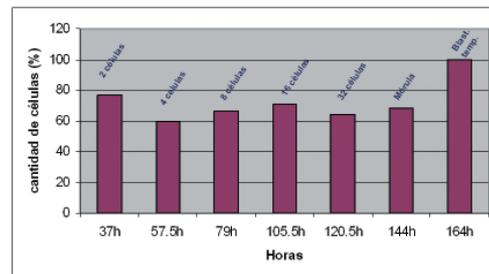


Figura 2: Etapas del desarrollo embrionario de *Tetrapygyus niger* «erizo negro» a 5°C

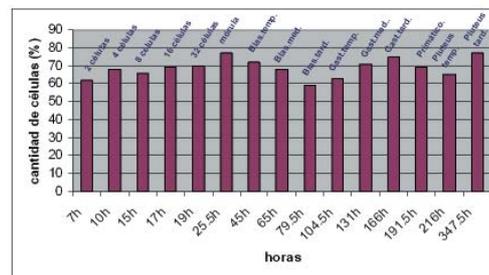


Figura 3: Etapas del desarrollo embrionario de *Tetrapygyus niger* «erizo negro» a 10°C

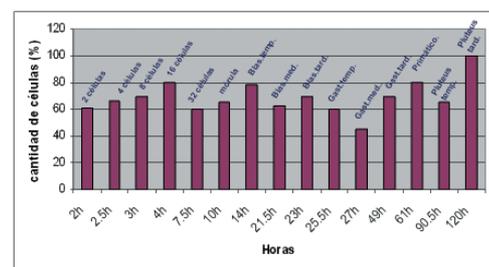


Figura 4: Etapas del desarrollo embrionario de *Tetrapygyus niger* «erizo negro» a 15°C

DISCUSIÓN

La temperatura es un factor ambiental que afecta la duración del desarrollo embrionario en el erizo de mar. Se acepta que la entrada del espermatozoide provoca la activación del ovocito, que se expresa a nivel molecular y celular de diferentes maneras. El núcleo espermático se transforma en pronúcleo para que pueda fusionarse con el pronúcleo femenino y se restablezca el número diploide de cromosomas en el núcleo zigótico (Morin et al., 1999). El proceso de activación del ovocito es independiente de la temperatura, sin embargo la duración de los primeros ciclos de segmentación en *Pseudocentrotus depressus* y *Hemicentrotus pulcherrimus*, son dependientes de la temperatura (Yamada & Mihashi 1998). En los bioensayos realizados se observa que el tiempo de los ciclos de segmentación del cigote hasta blástula temprana se alargan con relación a la temperatura, demorando 14 horas en el cultivo de 15°C, 45 horas en el de 10°C y 164 horas los que se mantuvieron a 5°C, lo que evidencia que el desarrollo embrionario de *Tetrapygus niger* también depende de la temperatura. El embrión de 2-células aparece 37 horas después de la fecundación a 5°C mientras a 10°C ocurre en 7 horas y sólo demora 2 horas en los de 15°C notándose, además, que al incrementar la temperatura el intervalo entre un ciclo de segmentación y el siguiente se hace más homogéneo.

Después de la formación del núcleo zigótico se reinicia rápidamente el ciclo celular, en respuesta a señales que estimulan o inhiben el desarrollo embrionario (Morgan, 1995). Está ampliamente aceptado que las ciclinas y sus respectivas quinasas regulan la progresión del ciclo celular en sus diferentes fases. Las ciclinas D y E tienen un rol fundamental en el desarrollo embrionario del erizo de mar. La ciclina E se localiza en la cabeza del espermatozoide y después de la fusión se distribuye en el citoplasma del

ovocito, sin embargo parece que su activación no es necesaria para la progresión del ciclo celular durante el desarrollo temprano en erizo de mar (Schnackenberg & Marzluff, 2002). Por otro lado, el ARNm de ciclina D aumenta considerablemente en los embriones en la etapa de blástula temprana permaneciendo en un nivel constante a través de la embriogénesis, esto coincide con un incremento de la actividad de cdk4. Si la expresión ectópica del ARNm de la ciclina D ocurre en embriones antes de la etapa de 16-células, se produce la muerte embrionaria (Moore et al., 2002). Al respecto pareciera que la temperatura de 5°C, podría influir en la activación de ciclina D antes de blástula temprana, desorganizando el embrión de *Tetrapygus Níger* y por lo tanto deteniendo su desarrollo posterior.

En *Echinometra lucunter*, (Sewell. & Young, 1999) se ha comprobado que diferentes rangos de temperatura afectan el desarrollo embrionario y limitan la distribución geográfica de la especie, encontrando que temperaturas mayores a 15°C incrementan las tasas de fecundación y desarrollo embrionario, incluso los estados de blástula, gástrula y larva pluteus sobreviven a temperaturas entre 38 y 40°C, concluyendo que el desarrollo óptimo de esta especie caribeña ocurre entre 27 a 34°C. *Strongylocentrotus droebachiensis* «erizo verde» desarrolla de manera normal a 8 °C, *Strongylocentrotus purpuratus* «erizo púrpura» a 10 °C, *Arbacia purpuratus* a 23°C, (Tyler, 1944) y la temperatura óptima para el desarrollo embrionario temprano de *Tetrapygus niger* «erizo negro», fluctúa entre 14 a 16 °C. En consecuencia se puede concluir que cada especie de erizo de mar necesita de una temperatura óptima para un desarrollo exitoso desde cigote hasta pluteus y que esta varía de acuerdo al hábitat de cada especie.

LITERATURA CITADA

- BOTTGER., SA Y MCCLINTOCK JB. 2001. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* Echinodermata: Echinoidea. Comp. Bioch & Phys. (part C) 129: 307-315
- KHURRUM M., HERNANDEZ, ESKALAEI M., BADALI O., COYLE-THOMPSON C. & OPPENHEIMER SB. 2004. Carbohydrate involvement in cellular interactions in sea urchin gastrulation. Acta histochemica 106: 97-106
- MORIN V., DÍAZ F., MONTECINO M., FOTHERGILL-GILMORE L., PUCHI M. & IMSCHENEZKY M . 1999. Poly (ADP-rybosilation) protects maternally derived histones from proteolysis alter fertilization. Biochem J. 343: 95-98.
- MOORE JC., SUMEREL JL., SCHNACKENBERG BJ.,NICHOLS JA., WIKRAMANAYAKE., GARY A., WESSEL M, & MARZLUFF WF. 2002. Cyclin D and cdk4 are required for normal development beyond the blastula stage in sea urchin embryos. Mol & Cell Biol 22: 4863-4875.
- MORGAN, DO. 1995. Principles of CDK regulation. Nature 374:131-134.
- NURSE, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 344: 543-552
- SCHNACKENBERG BJ. & MARZLUFF WF 2002. Novel localization and possible functions of cyclin E in early sea urchin development J Cell Sci. 115, 113-121.
- SEWELL MS. & YOUNG CM 1999. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 236:291-305
- TYLER MS 1994. Echinoid fertilization and development. In Developmental Biology: A guide for experimental study. Sinauer Associates . Publishers; Sunderland, Massachusetts.pp.55-66
- YAMADA K. & MIHASHI K. 1998. Temperature-Independent period Immediately after fertilization in sea urchin eggs. Biol. Bull. 195: 107-III,