

## ACTIVACIÓN ESPERMÁTICA IN VITRO UTILIZANDO DOS SULFATOS Y EFECTOS EN LA OBTENCIÓN DE ÓVULOS FERTILIZADOS DE *LYTECHINUS VARIEGATUS* (LAMARCK, 1816)

**In vitro sperm activation using two sulfates and effects on obtaining fertilized ovules of *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)**

*Manuel Albarrán<sup>1</sup>, Ernesto Mata<sup>2</sup> y Dilcia Morales<sup>1,3\*</sup>*

### Resumen

Los efectos tóxicos de los desechos orgánicos e inorgánicos han sido investigados por muchos científicos durante varios años con la finalidad de evidenciar cómo afectan ciertos compuestos en la fertilización de los invertebrados marinos. En este trabajo se evaluaron los efectos que tienen el cobre y el zinc en la obtención de óvulos fertilizados del erizo de mar *Lytechinus variegatus*. Para ello se utilizaron dos tiempos de activación espermática (TAE), exponiendo la esperma, por un periodo de 30 segundos y 60 segundos al sulfato de cobre y de zinc a diferentes concentraciones (0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 mg/l). El ANOVA de factores múltiples para el número de óvulos fertilizados obtenidos, demuestra que existen diferencias significativas en los compuestos ( $F=28,97$ ;  $P<0,0000$ ), para las concentraciones ( $F=1091,17$ ;  $P<0,0000$ ), y sus interacciones; TAE-compuestos ( $F=13,60$ ;  $P<0,0003$ ), TAE-concentraciones ( $F=2,49$ ;  $P<0,0451$ ) y compuestos-concentraciones ( $F=21,90$ ;  $P<0,0000$ ). Además, los efectos citotóxicos del zinc y cobre se evidencian en malformaciones de la membrana de fertilización, divisiones mitóticas alteradas y la inhibición de la adhesión celular. Estos resultados indican que los compuestos utilizados afectan la esperma desmejorando la química de las proteínas y enzimas que forman su estructura, la homeóstasis de calcio celular, daño mitocondrial y, posiblemente, la activación de procesos catabólicos irreversibles que en última instancia pueden dar como resultado la muerte celular. Los bioensayos utilizando gametos de equinoideos son excelentes herramientas que permiten caracterizar cuerpos de agua de zonas marino costeras, ya que no requieren de técnicas sofisticadas de obtención, mantenimiento y observación.

**Palabras clave:** erizo de mar, bioensayos, esperma, cobre, zinc.

[1] Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. [2] Laboratorio de Cultivo de Plancton: Núcleo de Nueva Esparta, Universidad de Oriente, Isla de Margarita, Venezuela. [3] Centro Nacional de Investigación de Pesca y Acuicultura (CENIPA), Caracas, Venezuela. \*Correo electrónico: dilciamorales01@gmail.com

## Abstract

The toxic effects of organic and inorganic waste have been investigated by many scientists for several years in order to show how certain compounds affect the fertilization of marine invertebrates. In this work, the effects of copper and zinc on obtaining fertilized ovules of the sea urchin *Lytechinus variegatus* were evaluated. For this, two sperm activation times (SAT) were used, exposing the sperm, for a period of 30 seconds and 60 seconds, to copper and zinc sulfate at different concentrations (0.01; 0.05; 0.1 and 0.5mg/l). The ANOVA of multiple factors for the number of fertilized ovules obtained, shows that there are significant differences in the compounds ( $F=28.97$ ;  $P<0.0000$ ), for the concentrations ( $F=1091.17$ ;  $P<0.0000$ ), and their interactions; SAT-compounds ( $F=13.60$ ;  $P<0.0003$ ), SAT-concentrations ( $F=2.49$ ;  $P<0.0451$ ) and compounds-concentrations ( $F=21.90$ ;  $P<0.0000$ ). In addition, the cytotoxic effects of zinc and copper are evidenced in malformations of the fertilization membrane, altered mitotic divisions, and inhibition of cell adhesion. These results indicate that the compounds used affect sperm by affecting the chemistry of the proteins and enzymes that make up its structure, cellular calcium homeostasis, mitochondrial damage, and possibly the activation of irreversible catabolic processes that may ultimately result in cell death. Bioassays using echinoid gametes are excellent tools for characterizing bodies of water in coastal marine areas, since they do not require sophisticated techniques for obtaining, maintaining and observing them.

**Keywords:** sea urchin, bioassays, sperm, copper, zinc.

## Introducción

Las acciones antropogénicas se relacionan directa e indirectamente con la calidad de

En este sentido, los efectos tóxicos de los desechos orgánicos e inorgánicos han sido investigados por muchos científicos durante varios años, tal es el caso de Montoya *et al.* (2013), Cerón *et al.* (2014) y Archbold *et al.* (2019), cuya finalidad fue evidenciar cómo afectan ciertos compuestos en la fertilización de los invertebrados marinos como los erizos de mar de la especie *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816), que resultan ideales debido a su abundancia, sensibilidad a los

los ambientes acuáticos, cambian sus características y presentan riesgos para la biota y la salud humana (De Almeida *et al.* 2013).

cambios en la química del agua y por la facilidad de obtención de sus gametos (Cerón *et al.* 2014). Además, tienen una gran importancia en los ecosistemas marinos pudiendo definir comunidades completas. Por lo anterior, en este trabajo se estableció como objetivo evaluar los efectos que tienen el cobre y el zinc en la obtención de óvulos fertilizados del erizo de mar *L. variegatus*.

## Materiales y Métodos

Se extrajeron ejemplares adultos de erizo *L. variegatus* en el canal de entrada de la Laguna La Restinga, Boca del Río, Península de Macanao, Nueva Esparta, Venezuela, mediante buceo autónomo y se trasladaron a la Sala de Cría del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Oriente.

Una vez eliminados los epibiontes y restos de materia orgánica con abundante agua de mar filtrada, se seleccionaron los erizos de mayor tamaño y de mejores características de acuerdo a lo recomendado por Montoya y Mata (2013).

Siguiendo la metodología descrita por Bustos y Olave (2001), a los organismos escogidos se les colocó una inyección de una solución 0,5 M de KCl en la cavidad del celoma, a través de la membrana peristomal. Los gametos masculinos se recolectaron en recipientes de vidrio y se preservaron hasta su uso, mientras que los gametos femeninos fueron lavados con agua de mar filtrada y esterilizada en un tamiz de 30  $\mu\text{m}$ , posteriormente, se seleccionaron en base a su esfericidad, abundancia de vitelo y membrana sin rugosidades (Mata *et al.* 2007).

Para el diseño experimental, se elaboraron soluciones de cada compuesto a analizar (sulfato de cobre y sulfato de zinc) a cuatro concentraciones (0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 mg/l) y una solución control con solo agua de mar filtrada en matraces Erlenmeyer de 1 L utilizando una balanza electrónica ( $\pm 0,0001$  apreciación) de acuerdo al caso.

Luego, en cápsulas de Petri de vidrio de 60 ml de capacidad, se agregó 40 ml de agua de mar filtrada y esterilizada (por quintuplicado) y 1.000.000 de óvulos recién obtenidos de *L. variegatus*, aproximadamente. Las cápsulas fueron rotuladas por tratamiento y concentración.

Paralelamente, de las soluciones preparadas de cada compuesto y control, se tomó una muestra de 100 ml y se colocó en un Erlenmeyer de vidrio de 125 ml de capacidad y se añadió posteriormente 3 ml de solución espermática de *L. variegatus* de acuerdo a los tiempos de activación espermática (TAE) establecidos en esta investigación (30 s y 60 s). Seguidamente, se añadió 0,5 ml de la solución espermática en las cápsulas de Petri correspondientes a su tratamiento (compuesto, concentraciones y control).

En un lapso de cinco minutos, se observó el tratamiento control y una vez visualizada en este la membrana de fertilización, todas y cada una de las cápsulas de Petri correspondientes a los tratamientos y concentraciones fueron fijadas inmediatamente con formalina al 2%. Posteriormente, de cada tratamiento y concentraciones se tomó una pequeña muestra ( $n=100$ ), utilizando un microscopio óptico y un portaobjeto excavado para registrar el número de óvulos fertilizados obtenidos y los posibles efectos en la estructura del óvulo como resultado de la exposición espermática a cada compuesto, concentraciones y TAE, esto último se logró con la ayuda de una cámara digital VanGuard, modelo 1200-VEK con la cual fue provisto el microscopio mencionado.

Cabe destacar que, el procedimiento anteriormente descrito se realizó en paralelo para llevar a cabo las investigaciones correspondientes al TAE de 60 s en *L. variegatus* (Figura 1).

El ANOVA de factores múltiples para el número de óvulos fertilizados obtenidos, demuestra que existen diferencias significativas en los compuestos ( $F= 28,97$ ;  $P<0,0000$ ), para las concentraciones

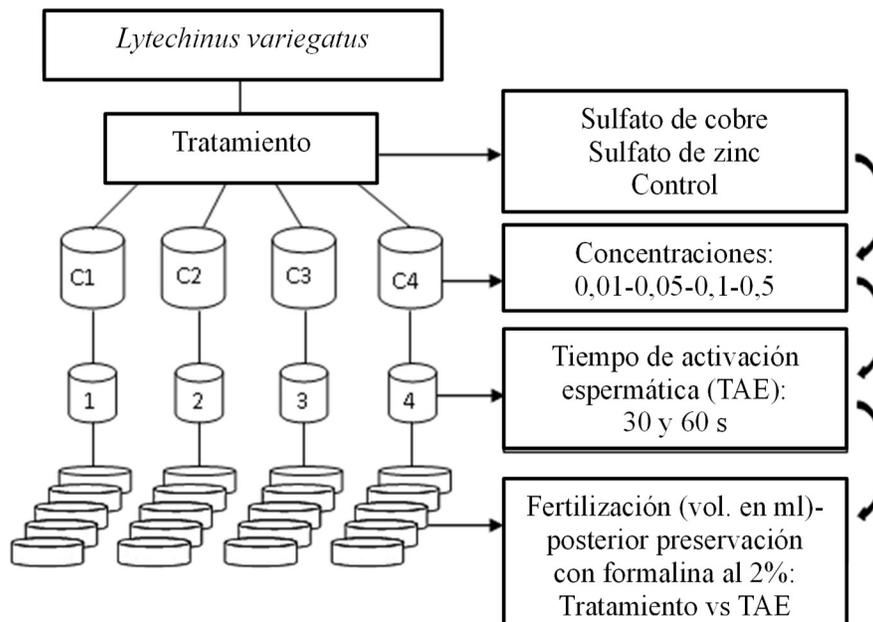


Figura 1. Diagrama del diseño experimental.

Para el análisis estadístico, se aplicó un ANOVA de factores múltiples de efectos mixtos para evaluar diferencias en el número de óvulos fertilizados.

### Resultados

El número obtenido de óvulos fertilizados de *L. variegatus* (Figura 2) utilizando dos TAE (30 s y 60 s) y cuatro concentraciones (0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 mg/l) de cobre y zinc, muestra una tendencia hacia la disminución en ambos TAE a medida que aumentan las concentraciones del cobre y zinc.

( $F=1091,17$ ;  $P<0,0000$ ), y sus interacciones; TAE-compuestos ( $F= 13,60$ ;  $P<0,0003$ ), TAE-concentraciones ( $F= 2,49$ ;  $P<0,0451$ ) y compuestos-concentraciones ( $F= 21,90$ ;  $P<0,0000$ ).

Se evidenciaron efectos citotóxicos en todas las variables estudiadas, observándose óvulos fecundados con malformación de la membrana de fertilización, la cual provoca la ruptura de ésta y seguidamente la expulsión del material citoplasmático (Figura 3B, C). También se visualizaron células con divisiones mitóticas alteradas o disgregación de los blastómeros (Figura 3D), en algunos casos se encontraron óvulos

fertilizados de color oscuro y algunos con talla mayor a la normal (Figura 3E).

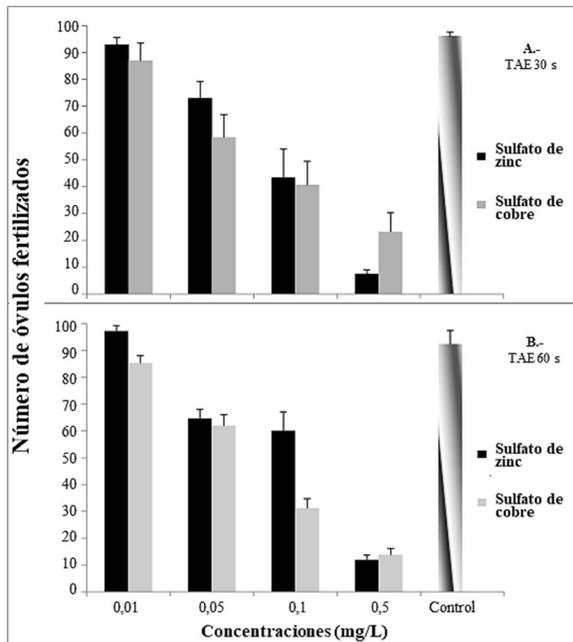
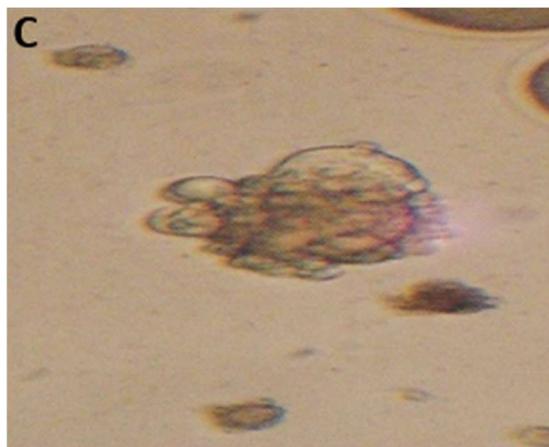
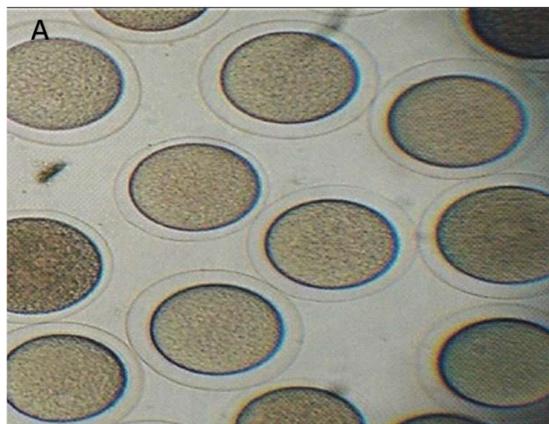


Figura 2. Número de óvulos fertilizados del erizo de mar *L. variegatus* obtenidos utilizando dos TAE, sulfato de zinc y sulfato de cobre a diferentes concentraciones.

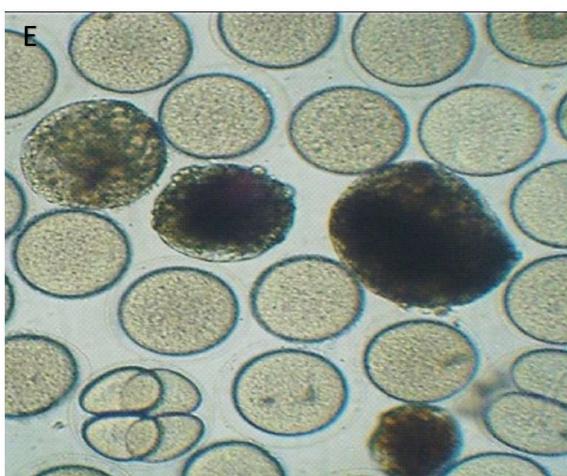
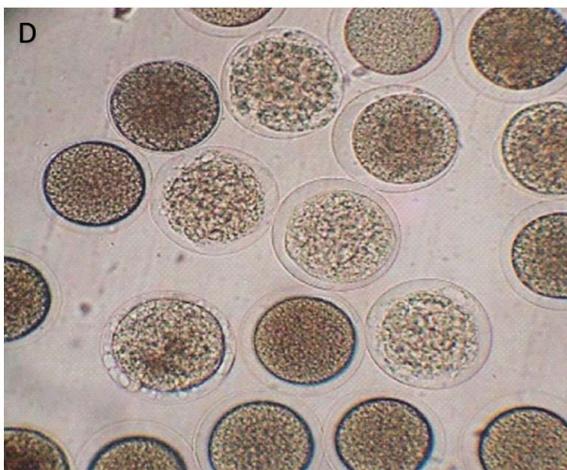
### Discusiones

Los resultados obtenidos indican que los TAE utilizados tienen el mismo efecto en la obtención de óvulos fertilizados de *L. variegatus* y que a medida que aumenta la concentración de zinc y cobre el número de óvulos fertilizados obtenidos disminuye, lo que puede deberse a que estos compuestos afectan la química de las proteínas y enzimas que forman su estructura y por tal motivo reducen el encuentro óvulo-esperma. Lo anterior concuerda con lo señalado por diversos autores, quienes indican que altas concentraciones de compuestos metálicos pueden inhibir la motilidad de la esperma, posiblemente



Figuras 3A, 3B y 3C. Efecto citotóxico observado: (A) Óvulo normal fertilizado. (B) Expulsión del material citoplasmático (C) Citoplasma expulsado.

porque perjudican su estructura y consecuentemente porcentaje de fertilización de los erizos de mar (Arriza *et al.* 2009; Schäfer *et al.* 2009; De Almeida *et al.* 2013; Montoya *et al.* 2013).



Figuras 3C y 3D. Efecto citotóxico observado: (D) Blastómeros disgregados y (E) huevo de mayor tamaño y de color oscuro.

De cualquier forma, el incremento de la concentración de iones metálicos produce alteraciones en las funciones metabólicas de los ovocitos de los erizos, generando malformaciones en la membrana de fertilización, pérdida de forma y tonicidad, lo que conlleva frecuentemente a la expulsión del material citoplasmático (Cerón *et al.* 2014), dichos efectos citotóxicos se observaron en esta investigación.

## Conclusiones

La exposición de los gametos del erizo de mar *L. variegatus* a diferentes concentraciones de sulfato de cobre y zinc afecta negativamente el proceso de fertilización.

## Referencias

Archbold, V., Asman, T., Grimes, K., Aguado, O., Bartolomei, V. and Smith, M. 2019. The effect of microplastics on *Lytechinus variegatus*. Georgia J. of Sci. 77(1):104.

Arriza, V., Di Fazio, G., Celi, M., Parrinello, N. and Vazzana, M. 2009. Cadmium, copper and tributyltin effects of fertilization of *Paracentrotus lividus* (Echinometra). Ital. J. Anim. Sci. 8(2):839-841.

Bustos, E. y Olave, S. 2001. El cultivo del erizo *Loxechinus albus*. Informe Técnico presentado al FONDEF, Instituto de Fomento Pesquero de Chile, Valparaíso. 22 p.

Cerón, S., Santos, M., Gómez, A., Ospina, G., Imués, M. y Gómez, J. 2014. Evaluación de la toxicidad aguda de un fluido de exploración offshore en la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*. Bol. Invest. Mar. Cost. 43(2):383-405.

De Almeida, W., Cortez, F., Pusceddu, F. y Seabra, C. 2013. Avaliação preliminar da toxicidade de componentes de efluentes domésticos sobre o desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. UNISANTA BioScience 2(2): 115-119.

Mata, E., Vivas, K., Rosas, J., Angarita, Y., Mariño, Y., Marture, L. y Velásquez, A. 2007. Producción de larvas equinopluteus de erizo irregular del género *Clypeaster* (Echinometra: Echinoidea) en condiciones de laboratorio. Acta Científica Venezolana. 58(1): 190 pp.

Montoya, H. y Mata, E. 2013. Efectos del nitrato de plomo Pb(NO<sub>3</sub>) en la obtención de óvulos fertilizados del erizo marino *Lytechinus variegatus*, Laguna de la Restinga, isla de Margarita, Nueva Esparta (Resumen). Simposio Lagunas Costeras del Nororiente de Venezuela.

Montoya, H., Mata, E. y Rodríguez, A. 2013. Efectos del cobre en el desarrollo temprano del erizo *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) (Resumen). X Congreso Venezolano de Ecología, Mérida, Venezuela.

Schäfer, S., Bickmeyer, U. and Koehler, A. 2009. Measuring Ca<sup>2+</sup>-signalling at fertilization in the sea urchin *Psammechinus miliaris*: Alterations of this Ca<sup>2+</sup>-signal by copper and 2, 4, 6-tribromophenol. Comp. Biochem. Physiol. C. 150:261-269.