



**UNIVERSIDAD ESTATAL  
PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Estudio Citogenético Clásico A Partir De Embriones De  
*Echinometra vanbrunti*.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Previo a la obtención de Título de:**

**BIÓLOGO**

**AUTOR**

**Zambrano Segovia Zehila Nicolle**

**TUTOR**

**Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D**

**La Libertad- Ecuador**

**2023**

**UNIVERSIDAD ESTATAL  
PENÍNSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Estudio Citogenético Clásico A Partir De Embriones De  
*Echinometra vanbrunti.***

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Previo a la obtención de Título de:**

**BIÓLOGO**

**AUTOR**

**Zambrano Segovia Zehila Nicolle**

**TUTOR**

**Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D**

**La Libertad- Ecuador**

**2023**

## DEDICATORIA

A Dios, al universo y a la vida.

A mi padre Celso Zambrano Macías y a mi madre Jéssica Segovia Criollo, por haberme inculcado desde siempre la importancia de la preparación profesional, su apoyo, comprensión e incondicionalidad han sido los cimientos que me han permitido alcanzar este objetivo compartido como familia. Ustedes han sido mi firmeza y guía en cada camino recorrido.

A mi abuelita Mariana Criollo Ayala por tenerme en sus oraciones y brindarme su apoyo incondicional, su cariño es un legado que atesoro y que me impulsa a superarme día a día.

A mi hermana Zeline Zambrano Segovia, y a mis hermanos Zachs y Zed Zambrano Segovia, quienes no solo son mi familia, sino también mis amigos y confidentes, como su hermana mayor, aspiro a ser una guía y modelo a seguir en este camino de la vida, o por lo menos que aprendan de mi cómo no se deben hacer las cosas.

A mis amigos Frowen García Pinargote, Johan Zea Bermúdez, Sebastián Pozo Orrala y Michael Roca quienes han estado a mi lado desde el principio hasta el final de esta etapa universitaria, donde nos hemos apoyado mutuamente y crecido juntos.

Gracias a todos ustedes por ser parte de mi historia y por llenar cada capítulo con amor, amistad y aprendizaje.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento y gratitud:

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, a las autoridades, personal académico, de limpieza y seguridad de la Facultad de Ciencias del mar, principalmente al Decano el Blg. Richard Duque Marín, M.Sc., y al secretario el Lcdo. Pascual Roca, así como al director de la Carrera de Biología el Ing. Jimmy Villón Moreno M.Sc., por su predisposición, guía y apoyo en el desarrollo del trabajo de integración curricular.

A la Reserva de Producción de Fauna Marino Costera Puntilla de Santa Elena (REMACOPSE), por el apoyo económico y de logística en el desarrollo de este proyecto a través de su programa de manejo de diversidad y fomento a la investigación, especialmente a la Blg. Beatriz Ladines, la Blg. Jennifer Montoya y al Lcdo. Anderson Velas.

Al Ing. Celso Zambrano Macías, Sra. Jéssica Segovia Criollo y Sra. Mariana Criollo Ayala por su amor incondicional y por el aporte económico realizado para la culminación de este proceso investigativo.

A la Blg. Janeth Galarza Tipán, PhD., tutora del trabajo de investigación, por su invaluable guía y orientación científica en cada etapa de este proceso de investigación, con su sabiduría, paciencia y comprensión logró impactar de manera significativa mi vida.

Al Blg. Javier Soto, PhD., director del CEB-UPSE, así como al equipo de trabajo del CIBPA, por su colaboración al proporcionarme acceso a las instalaciones de los laboratorios. en especial a la Blg. Sara Ríos y al estudiante Luis Machuca por su valiosa contribución y apoyo.

Al Blg. Sebastián Pozo Orrala por su cariño, apoyo incondicional y colaboración activa a lo largo del desarrollo de esta investigación, su ayuda ha contribuido en gran medida al éxito de esta investigación.

Al Blg. Javier Piguave, Msc., al Blg. Xavier Mera y a la estudiante Nathaly Chiquito por su valiosa colaboración al proveer materiales y implementos necesarios para la realización de esta tesis, en especial al Blg. Michael Roca su generosidad y aliento marcaron una diferencia significativa en un momento crucial.

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:  
RICHARD GONZALO  
DUQUE MARIN

---

**Blgo. Richard Duque Marín, M.Sc.**  
**DECANO DE LA FACULTAD DE**  
**CIENCIAS DEL MAR**



Firmado electrónicamente por:  
JIMMY AGUSTIN  
VILLON MORENO

---

**Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.**  
**DIRECTOR DE LA CARRERA DE**  
**BIOLOGÍA**



Firmado electrónicamente por:  
ISABEL JANETH  
GALARZA TIPAN

---

**Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.**  
**DOCENTE TUTOR**



Firmado electrónicamente por:  
ERIKA ALEXANDRA  
SALAVARRIA PALMA

---

**Blga. Erika Salavarría, Ph.D.**  
**DOCENTE DE ÁREA**



Firmado electrónicamente por:  
MARIA  
MARGARITA  
RIVERA  
GONZALEZ

---

**Ab. María Rivera González,**  
**M.Sc.**

**SECRETARIO**  
**GENERAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

Yo, **ZEHILA ZAMBRANO SEGOVIA**, declaro bajo juramento que la responsabilidad por las ideas, contenido y análisis de los resultados expuestos en este trabajo de integración curricular pertenecen exclusivamente a los autores, y el patrimonio intelectual de los mismos a la Universidad Península de Santa Elena (UPSE).

**ZEHILA ZAMBRANO SEGOVIA**

**CI.1206826628**

## RESUMEN

La citogenética clásica desempeña un rol fundamental en la comprensión genética y la conservación de especies, Considerando esto se llevó a cabo un estudio citogenético a partir de cromosomas en estado metafásico obtenidos de embriones en desarrollo de *Echinometra vanbrunti*, producidos por fecundación *in vitro*.

Durante el proceso de colecta y transporte de los erizos de mar, se evaluaron varias herramientas y recipientes con el objetivo de minimizar el estrés y las lesiones en los especímenes. Se encontró que las espátulas cóncavas y las tarrinas plásticas son efectivas para mantener la integridad de los erizos. En el entorno de aclimatación, se analizaron diversos sustratos con el propósito de permitir una circulación de agua adecuada y facilitar la limpieza del acuario, determinando que las piedras de acuario proporcionaron el soporte necesario para mantener condiciones óptimas y adecuadas para los organismos.

A lo largo del proceso de investigación, se analizaron varios reactivos y concentraciones para debilitar tanto la membrana de fertilización como la membrana del núcleo celular, induciendo a la liberación de cromosomas. En la debilitación de la membrana de fertilización, se constató que la urea resultó efectiva en comparación con el PABA. En cuanto a la ruptura del núcleo celular, se realizaron pruebas con cloruro de potasio y citrato de sodio, ambos con resultados positivos, sin embargo, la concentración de citrato de sodio al 7% demostró un rendimiento superior en términos de liberación de cromosomas al citoplasma celular, permitiendo una visualización más nítida de los mismos.

Siguiendo la metodología establecida, se logró identificar la presencia de cromosomas de tipo metacéntricos submetacéntricos y acrocéntricos de *Echinometra vanbrunti* analizados. Los resultados obtenidos no solo amplían el conocimiento sobre *E. vanbrunti*, sino que también contribuyen al avance de la investigación en citogenética en general.

**Palabras claves:** Erizos de mar, embriones, protocolo, cromosomas.

## ABSTRACT

Classical cytogenetics plays a fundamental role in genetic understanding and species conservation. Taking this into consideration, a cytogenetic study was carried out using chromosomes in a metaphase state obtained from developing embryos of *Echinometra vanbrunti*, produced through *in vitro* fertilization.

During the process of collecting and transporting sea urchins, various tools and containers were evaluated with the aim of minimizing stress and injuries to the specimens. Concave spatulas and plastic containers were found to be effective in maintaining the integrity of the sea urchins. In the acclimatization environment, different substrates were analyzed to allow proper water circulation and facilitate aquarium cleaning. It was determined that aquarium stones provided the necessary support to maintain optimal and suitable conditions for the organisms.

Throughout the research process, various reagents and concentrations were analyzed to weaken both the fertilization membrane and the nucleus membrane, inducing the release of chromosomes. In the weakening of the fertilization membrane, it was found that urea was effective compared to PABA. Regarding the rupture of the nucleus membrane, tests were conducted using potassium chloride and sodium citrate, both yielding positive results. However, a concentration of 7% sodium citrate demonstrated superior performance in terms of releasing chromosomes into the cell cytoplasm, allowing for a clearer visualization of the same.

Following the established methodology, the presence of metacentric, submetacentric, and acrocentric chromosomes in analyzed *Echinometra vanbrunti* embryos was successfully identified. The obtained results not only expand the knowledge about *E. vanbrunti* but also contribute to the advancement of research in cytogenetics as a whole..

**Keywords:** Sea urchins, embryos, protocol, chromosomes.



# ÍNDICE

RESUMEN .....	v
ÍNDICE.....	vii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3 JUSTIFICACIÓN.....	4
4 OBJETIVOS.....	6
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
5 HIPÓTESIS .....	6
6 MARCO TEÓRICO .....	7
6.1 <i>Echinometra vanbrunti</i> .....	7
6.1.1 Descripción Morfológica .....	7
6.1.2 Reproducción.....	8
6.1.3 Importancia.....	9
6.2 Citogenética .....	10
6.2.1 Importancia de los estudios citogenéticos .....	11
6.2.2 Técnicas aplicadas para estudios de la citogenética .....	13
6.3 Citogenética en equinodermos .....	13
6.3.1 Cromosomas .....	15
7 MARCO METODOLÓGICO .....	19
7.1 Selección de especies y sitios de recolección .....	20
7.2 Métodos de Captura y transporte.....	21

7.3	Adaptación al ambiente controlado del laboratorio .....	22
7.4	Protocolo para la obtención de cromosomas .....	24
7.4.1	Inducción al desove .....	24
7.4.2	Fecundación <i>in vitro</i> .....	24
7.4.3	Eliminación de la membrana de fertilización .....	24
7.4.4	Eliminación de la membrana del núcleo celular .....	25
7.4.5	Fijación y Tinción de los cromosomas .....	25
7.5	Proceso de retorno de los erizos a su medio natural. ....	26
7.6	Procesamiento de imágenes .....	26
8	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	27
8.1	Técnicas de colecta y aclimatación .....	27
8.1.1	Métodos de Captura y transporte.....	27
8.1.2	Adecuación del sustrato.....	31
8.2	Evaluación de protocolos de obtención de cromosomas. ....	35
8.2.1	Eliminación de la membrana de fertilización .....	35
8.2.2	Eliminación de la membrana nuclear .....	39
8.2.3	Tipo de cromosomas y características observadas. ....	42
8.3	Protocolo de obtención de cromosomas .....	44
9	DISCUSIÓN.....	48
10	CONCLUSIONES.....	51
11	RECOMENDACIONES.....	52
	BIBLIOGRAFÍA .....	54
	ANEXOS.....	62

## ÍNDICE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> Ejemplar de <i>Echinometra vanbrunti</i> .....	8
<b>Ilustración 2</b> Clasificación y partes de los cromosomas .....	17
<b>Ilustración 3</b> Ubicación Geográfica de la REMACOPSE.....	19
<b>Ilustración 4</b> Sitios de colecta; A. estación 1; B estación 2; C estación 3.....	21
<b>Ilustración 5</b> Herramientas y recipientes evaluados durante le proceso de colecta y transporte de los erizos de mar .....	22
<b>Ilustración 6</b> Métodos y material de colecta; A. banco de erizos; B. registro de coordenadas; C. colecta con espátula plana; D. colecta con cincel; E. colecta con espátula cóncava. ....	28
<b>Ilustración 7.-</b> Inhibición de crecimiento embrionario a causa de PABA en diferentes tiempos; A. óvulo sin fecundar 0min; B. óvulo con la membrana de fertilización alzada 20 min; C. óvulo en primera división 1h30min. ....	35
<b>Ilustración 8.</b> Urea 0.5 M. A células expulsadas de la membrana de fertilizacion a causa de la debilitación de esta. B células embrionarias sin la membrana de fertilización. ....	37
<b>Ilustración 9.</b> A. Concentración de urea a 1M, B. Concentración de urea a 1.5 M; células diseminadas fuera de la membrana celular. ....	37
<b>Ilustración 10</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.005M .....	39
<b>Ilustración 11</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.005M .....	40
<b>Ilustración 12</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.075 M .....	40
<b>Ilustración 13</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 7%.. .....	40
<b>Ilustración 14</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 8%. .....	41
<b>Ilustración 15</b> Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 9%. .....	41

<b>Ilustración 17</b> Célula con cromosomas en solución hipotónica de KCl al 0.005M y Una visión ampliada en la estructura cromosómica .....	42
<b>Ilustración 18</b> Célula con cromosomas en solución hipotónica de citrato de sodio al 9% y una visión ampliada en la estructura cromosómica .....	43
<b>Ilustración 19</b> Proceso de Fecundación <i>in vitro</i> .....	44
<b>Ilustración 20</b> Proceso de tratamiento con Colchicina .....	45
<b>Ilustración 21</b> Proceso de la debilitación de la membrana de fertilización .....	45
<b>Ilustración 22</b> Proceso de la eliminación de la membrana del núcleo celular .....	46
<b>Ilustración 23</b> Proceso de Fijación y tinción de los cromosomas .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Sitios de recolección de erizos de mar y cantidad de organismos capturados en cada lugar .....	21
<b>Tabla 2</b> Colecta de erizos de mar: herramientas utilizadas y resultados obtenidos.....	30
<b>Tabla 3</b> Evaluación de Sustratos para Turbidez del Agua y Sedimentación de Heces y Partículas.....	34
<b>Tabla 4</b> Reactivos y concentraciones utilizados en el proceso de eliminación de la membrana de fertilización .....	38
<b>Tabla 5</b> Materiales y Equipos Utilizados.....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> Reconocimiento de los lugares de colecta en la REMACOPSE .....	62
<b>Anexo 2</b> Salidas de campo y extracción de los organismos. ....	62

<b>Anexo 3</b> Colecta de agua de mar en la REMACOPSE.....	62
<b>Anexo 4</b> Preparación de los reactivos .....	63
<b>Anexo 5</b> Preparación y etiquetado previo a la obtención de gametos .....	63
<b>Anexo 6</b> Inducción al desove de <i>E. vanbrunti</i> <b>Autor:</b> Sebastian Pozo, 2022 .....	63
<b>Anexo 7</b> <i>Echinometra vanbrunti</i> con el polo aboral hacia arriba.....	63
<b>Anexo 8</b> Seguimiento microscopico al proceso de fecundación y desarrollo embrionario de <i>Echinometra vanbrunti</i> . .....	63
<b>Anexo 9</b> Fotografiado de las células obtenidas una vez realizando el protocolo .....	63

## ABREVIATURAS

**DHA.** - Ácido docosahexaenoico.

**FISH.** - Hibridación fluorescente in situ.

**IC.** -Índice Centromérico.

**KCl.** - Cloruro de Potasio.

**MAATE.**- Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica.

**mM.**- Milimolar.

**PABA.**- Ácido para-amino-benzoico.

**m.**- Cromosoma metacéntrico.

**sm.**- Cromosoma submetacéntrico.

**PCR.** - reacción en cadena de la polimerasa.

**RC.**- Radio Centromérico.

**REE.**- Tierras raras.

**REMACOPSE.**- Reserva de Producción de Fauna Marino Costera Puntilla de Santa Elena.

**TA.**- Temperatura ambiental.

**st.**- Cromosoma subtelocéntrico.

**t.** Cromosoma telocéntrico.

## GLOSARIO

**Bioerosión:** Es el proceso mediante el cual organismos vivos, como bacterias, algas o animales, desgastan o erosionan material inorgánico, como rocas o conchas, a través de su actividad biológica.

**Etapa de escisión:** Es una fase en el desarrollo embrionario donde ocurre la división celular, conocida como segmentación, en la cual el cigoto se divide en varias células más pequeñas llamadas blastómeras.

**Heterocromatina:** Es una forma de empaquetamiento de la cromatina en el núcleo celular, caracterizada por ser más densa y compacta. Contiene regiones genéticas inactivas y generalmente se encuentra en las regiones centroméricas y teloméricas de los cromosomas.

***In vitro:*** En el contexto científico, se refiere a experimentos o procesos que se realizan en un entorno controlado fuera del organismo o células vivas, generalmente en un laboratorio.

**Luz UV:** La luz ultravioleta (UV) es una forma de radiación electromagnética que se encuentra en el espectro de la luz, pero con longitudes de onda más cortas que la luz visible.

**Membrana de fertilización:** Es una capa protectora que rodea al óvulo o huevo en las hembras de muchas especies, y debe ser atravesada por el espermatozoide para permitir la fecundación. La membrana de fertilización previene la entrada de múltiples espermatozoides y ayuda a regular la fertilización.

**Metafases:** Es una etapa específica en la mitosis o meiosis donde los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula. En esta fase, los cromosomas están altamente condensados y son visibles bajo un microscopio.

**Mitosis:** Es un proceso de división celular en el cual una célula madre se divide en dos células hijas genéticamente idénticas. La mitosis es esencial para el crecimiento, desarrollo y reparación de tejidos en los organismos multicelulares.

**Solución hipotónica:** Es una solución en la cual la concentración de solutos es menor que la concentración de solutos dentro de una célula o un compartimento celular. Cuando una célula se expone a una solución hipotónica, puede provocar la entrada de agua a la célula por osmosis.



# 1 INTRODUCCIÓN

Los erizos de mar regulares son miembros del Phylum Echinodermata y se han registrado 850 especies a nivel mundial (Sun & Chiang, 2015). Este grupo de organismos ha despertado un gran interés en diversos sectores, como la producción acuícola, la industria farmacéutica y la investigación en biología molecular y desarrollo, debido a su relevancia filogenética con los cordados (Duffy et al., 2007).

Dentro de este contexto, el erizo Purpúreo del Pacífico (*Echinometra vanbrunti*) se distribuye desde la parte superior del Golfo de California hasta Perú, pasando por las Islas Galápagos (Brusca, 1980). Esta especie ha captado la atención en los sectores acuícola y farmacéutico debido a su abundancia y distribución geográfica. Además, durante su etapa reproductiva, posee niveles significativos de ácidos grasos esenciales omega-3, como el ácido eicosapentaenoico y el docosahexaenoico (DHA), los cuales desempeñan un papel importante en la nutrición humana (Villalba-Villalba et al., 2021).

A pesar de su importancia, los estudios citogenéticos en los erizos de mar regulares, en particular en el erizo Purpúreo del Pacífico, son escasos. El conocimiento del cariotipo, que incluye el número y la morfología de los cromosomas, es fundamental para comprender la genética y la biología de estas especies. Sin embargo, la falta de protocolos estandarizados para la obtención de metafases de calidad a partir de embriones de equinodermos ha dificultado los estudios y mejora genética de estos organismos.

Hasta ahora, únicamente se ha examinado un pequeño porcentaje de las más de 7,000 especies de equinodermos que existen actualmente, aproximadamente el 1.1% de las especies

conocidas (Vargas, 2012). En el caso de los erizos de mar (clase Echinoidea), los primeros estudios cromosómicos se realizaron mediante cortes histológicos de óvulos fertilizados, pero esta técnica no se utiliza actualmente debido a su falta de confiabilidad. Por lo tanto, es crucial llevar a cabo estudios citogenéticos exhaustivos, incluyendo la estandarización de protocolos, para comprender la organización del genoma, basándose en especies como *Echinometra vanbrunti*.

Por lo cual este trabajo de investigación , busca ampliar el conocimiento sobre *Echinometra vanbrunti* al establecer un protocolo para obtener preparaciones metafásicas a partir de embriones de *E. vanbrunti*, lo que facilitará futuros estudios citogenéticos.

## 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las diferentes áreas de producción, el mejoramiento genético está en crecimiento. Los países desarrollados han logrado avances significativos en este campo, utilizando protocolos estandarizados basados en el análisis de los cromosomas como base para lograr una producción de alta calidad. En Ecuador, el cultivo de erizos de mar con miras a la producción acuícola y desarrollo de sustancias nutracéuticas se limita a las provincias de Manabí y Santa Elena.

Sin embargo, a pesar de ser un grupo de gran interés comercial, carecen de estudios citogenéticos, hasta el momento, no se ha registrado ningún esfuerzo en el país para implementar la mejora genética en este ámbito. Además, es necesario contar con protocolos estandarizados y fiables para obtener metafases de alta calidad en equinodermos.

Una revisión bibliográfica exhaustiva (del 2018 a 2023), nos demuestra que existen escasos estudios acerca de los cromosomas en este filo. Es decir que de las 7000 especies de Equinodermos sólo en 80 taxones se han realizado estudios citogenéticos, es decir alrededor del 1,1% de las especies descritas.

Es importante resaltar que los protocolos de obtención cromosómica también desempeñan un papel crucial en la protección y conservación de especies; al comprender la composición cromosómica de los organismos y su variabilidad, se pueden establecer estrategias de conservación más efectivas y tomar medidas para proteger y preservar la diversidad biológica de manera adecuada.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El Phylum Echinodermata es un grupo que despierta gran interés tanto en el ámbito de la investigación en biología molecular y en la biología del desarrollo, debido a su interesante relación filogenética con los cordados, como en la producción acuícola y los servicios ecosistémicos que ofrece.

En Ecuador, la estandarización de protocolos para la obtención de cromosomas en los erizos de mar, tendría un impacto positivo en múltiples aspectos. En primer lugar favorecería a la acuicultura al asegurar una producción de alta calidad; además de contribuir a la conservación de la biodiversidad al preservar la variedad biológica en los ecosistemas marinos del país; por último, promovería la investigación científica al abrir nuevas oportunidades de estudio en los campos de la genética y la biología marina, estos estudios son fundamentales para mejorar el manejo, la conservación y el aprovechamiento sostenible de los erizos de mar.

Ante la limitante que genera la falta de información referente a los estudios citogenéticos en el Phylum Echinodermata, es de especial interés conocer los aspectos fundamentales de la genética de estos organismos, permitiendo ampliar su campo de estudio. Debido a esto con el propósito de aumentar el conocimiento en *Echinometra vanbrunti* este estudio se centra en analizar las técnicas utilizadas en la colecta y aclimatación de la especie, así como en la evaluación de los protocolos existentes para obtener cromosomas en metafase, examinando su aplicabilidad en estudios citogenéticos.

Con base en referencias bibliográficas, utilizar embriones de equinodermos obtenidos mediante fecundación *in vitro* en estudios citogenéticos, en lugar de ejemplares adultos es una práctica menos invasiva y más respetuosa con el ecosistema; la producción de embriones tiene un impacto menor en la población de erizos, que la captura y sacrificio de individuos adultos, ya que tras el desove, los ejemplares pueden devolverse a su hábitat, contribuyendo a preservar el equilibrio natural de los ecosistemas marinos, además de obtener muestras más puras y representativas, lo que permite proporcionar resultados científicos confiables, sostenibles y de fácil replicación en laboratorios.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Realizar un estudio citogenético a partir de cromosomas en estado metafásico obtenidos de embriones en desarrollo de *Echinometra vanbrunti* producidos por fecundación *in vitro*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar técnicas de colecta y aclimatación de *Echinometra vanbrunti* estableciendo condiciones óptimas de mantenimiento en el laboratorio.
- Evaluar protocolos de obtención de cromosomas en *Echinometra vanbrunti* analizando su aplicabilidad en estudio citogenéticos.
- Estandarizar el protocolo para la obtención de cromosomas en estadio de metafases a partir de embriones de *Echinometra vanbrunti* fecundados *in vitro*.

## 5 HIPÓTESIS

H<sub>1</sub>: La aplicación de soluciones hipotónicas en la obtención de cromosomas en estado metafásico de embriones de *E. vanbrunti* produce preparaciones cromosómicas de calidad

## 6 MARCO TEÓRICO

### 6.1 *Echinometra vanbrunti*

#### 6.1.1 Descripción Morfológica

El erizo Purpúreo del Pacífico (*Echinometra vanbrunti*) es una especie que se distribuye desde la parte superior del Golfo de California, pasando por las Islas Galápagos, la zona continental del Ecuador hasta Perú (Brusca, 1980). *E. vanbrunti* se caracteriza por tener un diámetro máximo de 8 cm y presenta espinas de color púrpura oscuro o rojo pardusco; su forma es globosa, achatada en los polos, y la superficie oral está orientada hacia abajo, donde se encuentra la boca; el aparato masticador, conocido como la "linterna de Aristóteles", está compuesto por cinco dientes duros, alrededor de los dientes, se encuentra un labio que rodea el peristoma, el cual está provisto de diminutas espinas y pequeños pedicelarios de cuatro clases distintas: globíferos, oficéfalos, tridentados y trifoliados (Caso, 1961; Benítez y Martínez, 1986; Fischer et al., 1995).

Las espinas primarias del erizo varían en longitud de 8 a 38 mm y son robustas, en algunos casos, pueden ser igual o más largas que el diámetro del caparazón. Estas espinas presentan estrías longitudinales y tienen una forma puntiaguda, siendo más delgadas en su extremo que en la base. Por otro lado, las espinas secundarias son similares a las primarias, pero más delgadas y miden alrededor de 18.5 mm de largo (Caso, 1961; Benítez y Martínez, 1986).



**Ilustración 1** Ejemplar de *Echinometra vanbrunti*.

**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023

## **Clasificación Taxonómica**

**Reino:** Animalia.

**Filo:** Echinodermata.

**Subfilo:** Echinozoa

**Clase:** Echinoidea

**Subclase:** Echinacea

**Orden:** Camarodonta

**Infraorden:** Echinidea

**Superfamilia:** Odontophora

**Familia:** Echinometridae

**Género:** *Echinometra*

**Especie:** *Echinometra vanbrunti* A. Agassiz, 1863

### **6.1.2 Reproducción**

El erizo de mar *E. vanbrunti* es una especie dioica en la que no se observan diferencias visibles entre machos y hembras, en su ambiente natural, la proporción de organismos es equilibrada, con una relación de 1:1 entre sexos (Soriano, 2014). Son reproductores de difusión y su reproducción ocurre mediante fecundación externa, donde los óvulos y



espermatozoides son liberados en la columna de agua, permitiendo la fecundación y el posterior desarrollo larval pelágico. Durante este proceso, se estima que se liberan entre 100.000 y 20 millones de óvulos (Zhadan, et al., 2017).

Los óvulos de *E. vanbrunti* son esféricos y tienen un tamaño promedio de  $65,8 \pm 2,1 \mu\text{m}$  están envueltos por una capa gelatinosa que rodea la membrana vitelina. Por otro lado, los espermatozoides están compuestos por una cabeza en forma de cono con una longitud media de  $5,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , además de la cabeza, los espermatozoides tienen un acrosoma, que es una estructura intermedia o central que está penetrada en el centro por una porción proximal del flagelo (Villalba et al., 2021).

### **6.1.3 Importancia**

Los erizos de mar (Echinodermata: Echinoidea) son un grupo de invertebrados marinos ampliamente distribuidos que poseen una gran importancia ecológica, científica y económica (Villalba, y otros, 2021)

Desde una perspectiva ecológica, los erizos de mar desempeñan un papel crucial en el equilibrio de la dinámica poblacional de las comunidades bentónicas, así como en la regulación, distribución y abundancia de macroalgas en hábitats marinos poco profundos, además de una participación activa en los procesos de bioerosión del ecosistema, su actividad de pastoreo contribuye en la proliferación de corales y el asentamiento de la epifauna (Steneck, 2020), por esta razón son considerados un grupo importante a tener en cuenta en el monitoreo de arrecifes (Segovia et al., 2017).

En el ámbito científico, estos organismos son utilizados como especies bioindicadoras en estudios de toxicología ambiental, su presencia o ausencia permiten evaluar los efectos de

la contaminación y el cambio climático en las funciones biológicas de los organismos, así como la calidad del agua en la que habitan (Zhadan et al., 2017). Además, en la biología reproductiva y del desarrollo los gametos de los equinoideos son ampliamente utilizados como células modelo en la investigación de las propiedades mecánicas y biofísicas celulares, deformación celular, el comportamiento de fuerza-deformación y cambios de rigidez de la membrana durante la fecundación, explorando estudios fundamentales del desarrollo (Villalba, y otros, 2021) (Zhadan, Vaschenko, & Almyashova, 2017). Estas células reproductivas son fáciles de obtener y manipular en condiciones de laboratorio, lo que las hace especialmente adecuadas para estos estudios

Además de su importancia ecológica y científica, las gónadas de los erizos de mar son consideradas un exquisito manjar de gran importancia económica y nutricional que tiene un buen mercado internacional con potencial para ingresos de divisas por concepto de exportaciones, Japón es su principal consumidor de estas huevas, seguido de varios países de Europa, las huevas frescas pueden alcanzar un valor de entre 40-100€/ kg (Rocha, y otros, 2019) (Archana & Babu, 2016). Según la FAO (2021), el volumen global de capturas de erizos de mar y otros equinodermos en el 2019 alcanzó un total de 129.052 toneladas.

## **6.2 Citogenética**

La citogenética es una rama de la genética que se dedica al estudio de los cromosomas, que son las estructuras que contienen el material genético en las células, esta disciplina se enfoca en analizar las características morfológicas, el número y la estructura de los cromosomas, así como su comportamiento durante la división celular.

Dentro de la citogenética, una de las ramas principales es la citogenética clásica, esta técnica se basa en la observación microscópica de los cromosomas teñidos con colorantes específicos, lo que permite identificar su morfología y bandeo cromosómico, de esta manera, se pueden detectar alteraciones estructurales o numéricas en los cromosomas, como translocaciones, inversiones, duplicaciones o deleciones, estas anomalías cromosómicas pueden estar asociadas con enfermedades genéticas y anormalidades del desarrollo (Nikoloff & Arcaute, 2021).

### **6.2.1 Importancia de los estudios citogenéticos**

La citogenética es una disciplina de gran importancia en la ciencia y la investigación, ya que proporciona información fundamental sobre la organización y el funcionamiento del material genético en los organismos, a través de los estudios citogenéticos, se pueden comprender las bases genéticas de diversas enfermedades, identificar alteraciones cromosómicas relevantes para la salud y la reproducción, y estudiar la evolución de las especies (Iannuzzi, 2007; Torres et al., 2018).

En el campo de la producción animal, los estudios citogenéticos son herramientas importantes. Mediante el análisis cromosómico, es posible seleccionar animales libres de anormalidades citogenéticas que puedan ser responsables de malformaciones, baja tasa de fertilidad o esterilidad, lo cual es crucial para garantizar la supervivencia de las especies (Iannuzzi, 2007). Además, la citogenética también se utiliza para analizar ambientes contaminados con diferentes tipos de sustancias, utilizando las aberraciones cromosómicas como indicadores del grado de daño que tienen sobre el ADN animal. Estos estudios también contribuyen a dilucidar relaciones filogenéticas y, por lo tanto, contribuyen al estudio evolutivo de las especies (NIH, 2019).

Las anomalías cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales, y se producen durante la meiosis debido a segregaciones cromosómicas erróneas de los gametos. Estas anomalías resultan en cigotos y embriones defectuosos, que generalmente mueren en las etapas tempranas de desarrollo embrionario o pueden causar problemas de fertilidad en los organismos adultos (Torres et al., 2018).

La citogenética evolutiva permite el estudio de los cambios cromosómicos a lo largo del tiempo, lo que proporciona valiosos aportes para resolver problemas taxonómicos, evolutivos y aplicados. Los cromosomas son guías filogenéticas e indicadores de la clasificación sistemática de especies, lo que contribuye al conocimiento del origen y la evolución de diferentes grupos taxonómicos. En este sentido, las técnicas de citogenética clásica y molecular proporcionan información sobre características como la posición del centrómero, el número, tipo y posición de las zonas organizadoras del nucléolo, el tamaño absoluto y relativo de los cromosomas, la cantidad y distribución de heterocromatina, la composición del ADN repetido y el contenido total de ADN (Poggio et al, 2008; Torres et al., 2018)

Además, los cromosomas son uno de los mejores materiales biológicos para evaluar los daños causados por la exposición natural o *in vitro* a mutágenos ambientales. Una amplia variedad de compuestos físicos y químicos pueden causar daños cromosómicos, que se visualizan como roturas de cromosomas, roturas de cromátidas, lagunas, microcromosomas y fragmentos, estos daños pueden afectar la vida de una sola célula o dar origen a procesos de mutación a nivel de ADN, una alta frecuencia de daño cromosómico aumenta la posibilidad de mutación a nivel somático y meiótico (Iannuzzi, 2007).

### **6.2.2 Técnicas aplicadas para estudios de la citogenética**

Las técnicas utilizadas en los estudios de citogenética se centran en examinar la estructura, función y comportamiento del ADN que se compacta durante la división celular y conforma los cromosomas (NIH, 2023). Estas técnicas permiten analizar el número y la forma de los cromosomas. La citogenética clásica se basa en el uso de técnicas de bandeo cromosómico para observar y analizar la estructura y los patrones de bandas de los cromosomas por otro lado, la hibridación in situ fluorescente (FISH) emplea sondas marcadas con fluoróforos para identificar y mapear regiones específicas del ADN en los cromosomas, la citogenética molecular, por su parte, se apoya en técnicas de biología molecular como la PCR para amplificar y detectar secuencias de ADN específicas, además del análisis de la longitud de los telómeros para evaluar la estabilidad cromosómica (Castellano, 2015).

### **6.3 Citogenética en equinodermos**

La citogenética en los erizos de mar (clase Echinoidea) ha experimentado avances significativos a lo largo del tiempo. En los primeros estudios cromosómicos realizados a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, se utilizaron técnicas obsoletas como cortes histológicos de óvulos fertilizados y el montaje de embriones enteros teñidos y aplanados ligeramente con cubreobjetos. Sin embargo, estos métodos no proporcionaban una distribución adecuada de los cromosomas y, por lo tanto, los datos obtenidos se consideran poco confiables en la actualidad (Saotome, 1982).

A partir del año 1952, se introdujeron técnicas más fiables en la investigación citogenética, como el choque hipotónico, la utilización de cultivos celulares y la aplicación de colchicina,

estas técnicas han permitido obtener datos más precisos y confiables en los estudios citogenéticos de los erizos de mar (Castellano, 2015).

A pesar de los avances, todavía tenemos un conocimiento limitado sobre los cromosomas de los equinodermos en general. De las aproximadamente 6000 especies de equinodermos vivos, solo se han obtenido datos cariológicos de alrededor de 47 especies (McClanahan & Muthiga, 2020). En el caso de los erizos de mar, la mayoría de los estudios citogenéticos se han centrado en determinar el número cromosómico de las especies analizadas. Hasta el momento, se ha elaborado el cariotipo de cuatro especies de erizos de mar: *Arbacia punctulata*, *Pseudocentrotus depressus*, *Paracentrotus lividus* y *Strongylocentrotus purpuratus* (Auclair, 1965; Yamanaka et al., 1989; Lipani et al., 1996; Eno et al., 2009).

La aplicación de la citogenética en los erizos de mar se ha vuelto relevante en los estudios ambientales y ecotoxicológicos. Los gametos, embriones y larvas de los erizos de mar se consideran modelos biológicos comunes para evaluar las respuestas fenotípicas de los organismos a los cambios ambientales y los efectos de diversos compuestos. Estos estudios permiten determinar la reducción de los procesos de desarrollo a través de la alteración de la morfología, la expresión génica y los mecanismos de respuesta al estrés (Mazur et al., 2021; Martino et al., 2022).

En investigaciones recientes, se ha analizado el impacto de los microplásticos en el desarrollo embrionario temprano del erizo de mar *Sphaerechinus granularis*, observando efectos citogenéticos y genotóxicos (Trifuoggi et al., 2019). Además, se ha estudiado la toxicidad asociada con elementos de tierras raras (REE, por sus siglas en inglés) en los erizos de mar, evidenciando efectos en procesos como la fertilización, el metabolismo redox, la

embriogénesis, la esqueletogénesis y la regulación de la expresión génica embrionaria. Estos estudios resaltan la importancia de investigar la toxicidad de los REE en la supervivencia de la vida silvestre y plantean la necesidad de futuros estudios en esta área (Martino et al., 2022; Rezg et al., 2022).

En términos de evolución, los estudios citogenéticos en los equinodermos han revelado la conservación del número cromosómico en el phylum Echinodermata. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de cambios cromosómicos a lo largo de la evolución de estos organismos. Es importante destacar que el análisis genético, el desarrollo de marcadores cromosómicos y los estudios filogeográficos pueden proporcionar herramientas útiles para la gestión comercial sostenible de los equinodermos (Duffy et al., 2007; Herrera, 2007; Castellano, 2015).

En el caso específico del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, se han realizado estudios citogenéticos que han contribuido a su caracterización y a la optimización de protocolos para obtener metafases a partir de tejidos adultos y embrionarios, así como para estudiar la herencia del ADN mitocondrial. Además, se han analizado las ubicaciones de genes ribosómicos y genes de copia única como brachyury y genes Hox, lo que permitirá desarrollar mapas de genes y facilitará las comparaciones genómicas entre especies (Kondo & Akasaka, 2012; Castellano, 2015).

### **6.3.1 Cromosomas**

Los cromosomas son estructuras filamentosas presentes en el núcleo de las células de animales y plantas, cada cromosoma está compuesto por una molécula de ADN envuelta en

proteínas, estas estructuras son heredadas de los progenitores y contienen información genética que determina las características únicas de cada organismo, el ADN alberga las instrucciones precisas que hacen que cada ser vivo sea único en su especie (NIH , 2019).

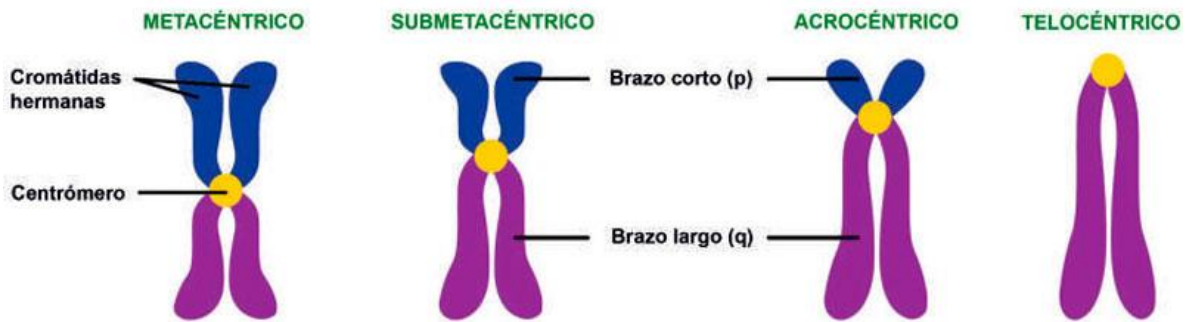
En el estado metafásico de los cromosomas, se pueden observar varias partes distintivas:

- **Brazos del cromosoma:** Los cromosomas constan de dos brazos separados por un estrechamiento llamado centrómero.
- **Centrómero:** Es una región especializada y esencial del cromosoma. Es la zona más estrecha donde se unen las cromátidas hermanas, y en ella se encuentra una estructura proteica llamada cinetocoro. El cinetocoro es el punto de unión del cromosoma con el huso mitótico durante la división celular.
- **Telómeros:** son regiones especializadas situadas en los extremos de los cromosomas. Su función principal es preservar la integridad estructural de los cromosomas y desempeñar un papel crucial en la estabilidad del material genético. Los telómeros evitan la degradación y fusión de los cromosomas, protegiendo así la información genética contenida en ellos.
- **Constricciones secundarias:** Algunos cromosomas presentan un segundo estrechamiento adicional, conocido como constricción secundaria.
- **Satélites:** son secciones redondeadas de longitud variable que se unen al resto del cromosoma mediante una constricción secundaria.
- **NOR (Organizadores nucleolares):** Son estructuras que inducen la formación de los nucléolos, que son importantes en la síntesis de ribosomas.



### 6.3.1.1 Clasificación

La clasificación de los cromosomas se basa en la posición del centrómero y el tamaño relativo de sus brazos (p y q). Durante los estados de metafase y anafase, cuando la condensación de los cromosomas es máxima, se pueden observar con mayor claridad las características morfológicas que permiten su clasificación (Aguilar, 2016).



**Ilustración 2** Clasificación y partes de los cromosomas

Autor: Alcalá, 2021

Los tipos de cromosomas según su morfología son los siguientes:

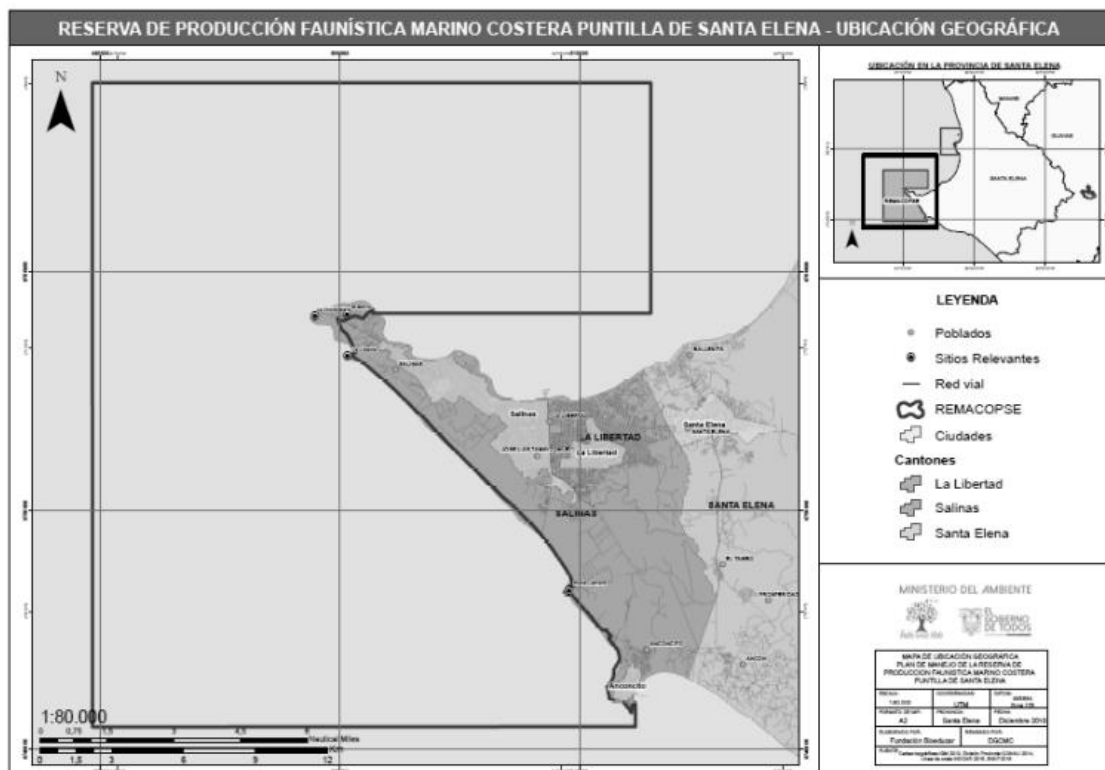
- Metacéntricos: El centrómero se encuentra en una posición central del cromosoma, lo que da lugar a brazos p y q de igual longitud.
- Submetacéntricos: El centrómero se localiza más cerca de uno de los extremos del cromosoma, lo que ocasiona que el brazo p sea más corto que el brazo q.
- Acrocéntricos: El centrómero se sitúa cerca del extremo del cromosoma, lo que resulta en un brazo corto muy reducido. Los cromosomas acrocéntricos a menudo presentan constricciones secundarias en los brazos cortos, formando estructuras conocidas como tallos y satélites.
- Telocéntricos: Tienen el centrómero ubicado en el extremo terminal del cromosoma.

- Subtelocéntricos: El centrómero está muy próximo a uno de los extremos del cromosoma, lo que resulta en un brazo p diminuto. Estos cromosomas carecen de brazos cortos o los tienen muy pequeños.
- Holocéntricos: Son cromosomas que no tienen un centrómero específico y localizado. Se encuentran en muchos invertebrados, como nematodos, lepidópteros y escorpiones, así como en plantas y protistas (Nikoloff & Arcaute, 2021; Torres et al., 2018).

Estas diferentes formas de los cromosomas reflejan la variabilidad en la organización y estructura del material genético en las células de diferentes especies. La clasificación de los cromosomas según su morfología es útil para estudios citogenéticos y proporciona información valiosa sobre la evolución y la diversidad genética de los organismos.

## 7 MARCO METODOLÓGICO

Este trabajo se llevó a cabo con el permiso de investigación emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica bajo el código MAATE-ARSFC-2022-2359, dicho permiso, autorizó la recolección de ejemplares de *Echinometra vanbrunti* en la zona intermareal de la Reserva de Producción de Fauna Marino Costera Puntilla de Santa Elena (REMACOPSE) del cantón Salinas, provincia de Santa Elena, Ecuador.



**Ilustración 3** Ubicación Geográfica de la REMACOPSE

**Fuente:** Ministerio del Ambiente, 2020; **Elaboración:** SGMCC, 2020

Asimismo, se adecuó un espacio en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (CEB-UPSE) para llevar a cabo las pruebas experimentales. Este espacio fue adecuadamente acondicionado y equipado para garantizar un entorno controlado en el desarrollo de la presente investigación.

### **7.1 Selección de especies y sitios de recolección**

La selección de los organismos se realizó siguiendo criterios científicos que aseguraron la recolección de individuos sexualmente maduros, con potencial reproductivo y madurez sexual, tomando en consideración que los individuos deben contar con un diámetro mínimo de 45mm; estar en buen estado sanitario, es decir, sin manchas ni deformaciones en su estructura; y que las espinas se encuentren completas (Galarza, 2014).

La recolección de los organismos se llevó a cabo en 3 estaciones seleccionadas mediante un enfoque de muestreo aleatorio dirigido. Estas estaciones fueron identificadas como áreas geográficas con una alta presencia de erizos de mar (*E. vanbrunti*) en zonas rocosas intermareales que proporcionan las condiciones necesarias para su desarrollo. Además, se tuvo en cuenta la accesibilidad y seguridad de los sitios, garantizando que las salidas de campo sean de riesgo mínimo.

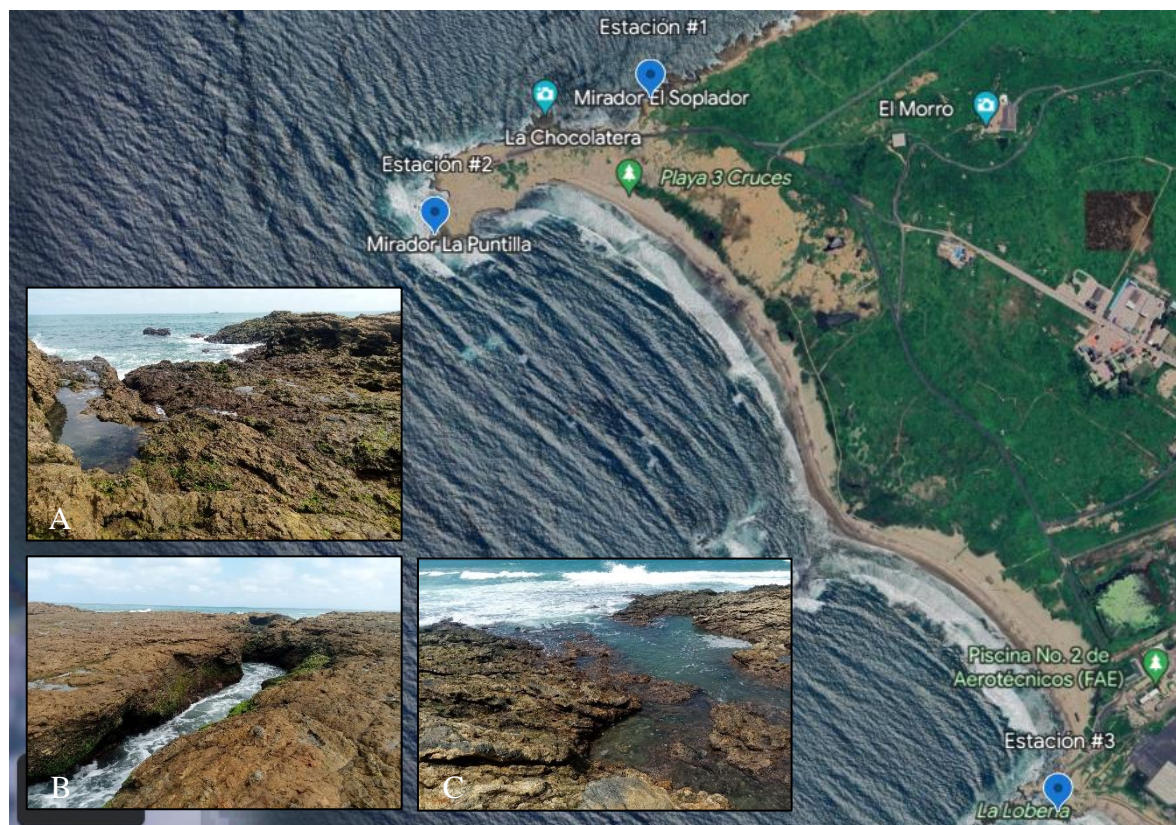
A continuación, se presenta una ilustración y una tabla que muestran las coordenadas geográficas de los sitios de recolección, así como la cantidad de erizos de mar capturados en cada estación. Durante el estudio se recolectaron un total de 42 erizos de mar, con una cantidad de 7 erizo por cada una de las 6 salidas de recolección realizadas desde noviembre

2022 hasta junio 2023 **Ilustración 2. Tabla 1.** Los erizos de mar fueron mantenidos en el laboratorio en promedio durante 1 mes antes de ser devueltos a su hábitat natural.

**Tabla 1** Sitios de recolección de erizos de mar y cantidad de organismos capturados en cada lugar

Puntos de colecta	Georeferenciación	# de individuos capturados por punto
<b>Estación 1</b>	Lat. -2.1868355°	10
	Long. -81.0058586°	
	Altitud. 6.3083825 m	
<b>Estación 2</b>	Lat. -2.1900288	14
	Long. -81.0108918°	
	Altitud. 2.7665362m	
<b>Estación 3</b>	Lat. -2.2036709	18
	Long. -80.995855	
	Altitud. 5.3590825 m	
<b>Total:</b>		<b>42</b>

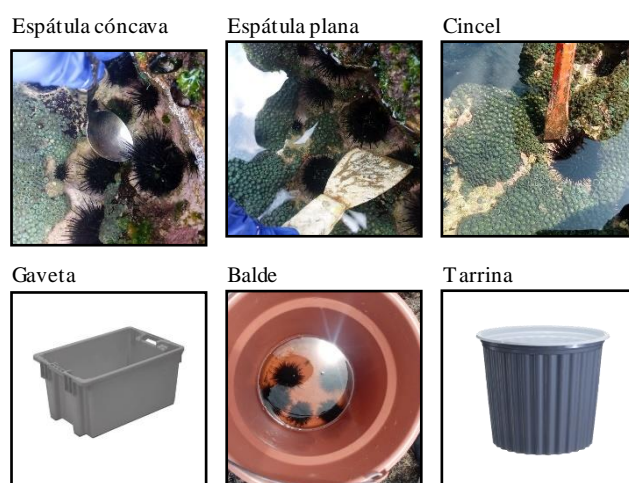
## 7.2 Métodos de Captura y transporte



**Ilustración 4** Sitios de colecta; A. estación 1; B estación 2; C estación 3.

**Fuente:** Google Earth 2023; **Elaboración:** Zambrano-Segovia, 2023

Durante la colecta, se evaluaron diversas formas de extracción de equinodermos utilizando herramientas como espátulas cóncavas y planas, además de un cincel. Estos métodos fueron probados para determinar su eficacia, adecuación a la zona de recolección, teniendo en cuenta la facilidad de manejo necesaria para manipular a los erizos de mar y su entorno. Durante las colectas se emplearon diversos recipientes como tarrinas plásticas de 1 litro, gavetas y baldes para el traslado de los erizos de mar adultos, llevándose a cabo una revisión continua de su estado de salud externo. Se tomaron todas las precauciones necesarias para evitar un estrés drástico en los organismos durante este proceso, además, se controló cuidadosamente el tiempo transcurrido desde el lugar de colectas hasta las instalaciones (CEB-UPSE), asegurando un traslado eficiente y seguro.



**Ilustración 5** Herramientas y recipientes evaluados durante el proceso de colecta y transporte de los erizos de mar

### **7.3 Adaptación al ambiente controlado del laboratorio**

Los erizos de mar fueron aclimatados en peceras de dimensiones 30 cm (altura) x 45 cm (largo) x 30 cm (ancho) con una capacidad de 40 L. Para crear un ambiente adecuado, se instalaron dos oxigenadores JAD conectados con mangueras de acuario flexibles en la parte

inferior de las peceras. El agua de mar utilizada fue recolectada en bidones de agua de 20L desde el sitio de colecta hasta el CEB.

Cada 3 días se realizó un recambio parcial de aproximadamente de un 25% del volumen total de agua, para evitar la acidificación del medio. Para simular las corrientes naturales y promover una mejor oxigenación, se incorporó una bomba de agua en las peceras, generando movimiento y flujo continuo de agua, además, cada 15 días se llevó a cabo un mantenimiento total del acuario que incluyó la limpieza de los implementos y la esterilización de las piedras mediante calor seco y exposición a luz ultravioleta. (Anaguano, 2023)

Se proporcionó a los erizos de mar una dieta basada en *ulva sp*, una macroalga predominante en el lugar de recolección. Para fomentar el forrajeo y asegurar una alimentación adecuada, se distribuyó el alimento en diferentes áreas zonas del acuario. La cantidad de alga suministrada se ajustó en función de la cantidad que los erizos de mar consumían, evaluando si era suficiente o requería un ajuste en la alimentación, el cambio de alga se realiza cada 8 días (Anaguano, 2023).

Se realizó un análisis comparativo de diferentes sustratos tales como arena, conchillas y piedras de acuario con el fin de determinar cuál es el más adecuado y tiene mayores ventajas para su uso en el laboratorio, evaluando la capacidad de sedimentación de las heces de los erizos de mar, permitiendo seleccionar el sustrato que proporcione una mejor capacidad de filtración y reducción de turbidez.

## **7.4 Protocolo para la obtención de cromosomas**

### **7.4.1 Inducción al desove**

De acuerdo con el protocolo estandarizado de fecundación, cultivo de embriones y larvas de erizos de mar presentes en el Ecuador, realizado por Galarza, (2014) y en el trabajo realizado por Tourón et al., (2020) la obtención de gametos se realiza mediante tratamiento químico.

Se aplicó 1 ml de KCl 0,5 M a cada organismo a través de la membrana peristomal, diagonal y opuesta a la boca, con el fin de inducir la liberación de gametos, los organismos fueron colocados sobre placas Petri con el polo aboral hacia abajo.

### **7.4.2 Fecundación *in vitro***

Para la obtención de embriones, la fecundación *in vitro* se realizó en un vaso precipitado, donde se mezclaron una relación 1000:200 óvulos y 1000:5 de espermatozoides en agua de mar filtrada y esterilizada con luz uv, inmediatamente después de la obtención de los gametos debido a la viabilidad temporal de los mismos (Galarza, 2014). Para mantener condiciones óptimas el recipiente se mantuvo dentro de una cámara de flujo laminar a una temperatura de aproximadamente  $\pm 20^{\circ}\text{C}$ . Se realizó un control constante del proceso de fecundación y desarrollo de los organismos mediante un microscopio óptico con cámara marca BOECO Germany modelo.BM 120, bajo un lente de 10x y 40x.

### **7.4.3 Eliminación de la membrana de fertilización**

En el proceso de obtención de preparaciones cromosómicas, es crucial la eliminación de la membrana de fertilización. Para determinar las mejores condiciones de eliminación, se tuvieron en cuenta los estudios previos realizados por Saotome (1982), según estos estudios se añade ácido 4 para-amino-benzoico (PABA) en una concentración de 3mM en el medio



de fecundación. Se analizaron los efectos de su ausencia y presencia, así como su adición a los 20 min con el alza de la membrana de fertilización y a la 01H30 en la etapa de dos células.

Posteriormente se realizó un análisis independiente utilizando urea en ausencia de PABA, aplicando concentraciones de 0,5 M; 1M y; 1,5M, manteniendo las muestras en reposo durante 15 min, con el fin de determinar si se produce debilitación en la membrana de fertilización.

#### **7.4.4 Eliminación de la membrana del núcleo celular**

Una vez que en los cultivos embrionarios exista la presencia relativamente abundante de embriones en etapa de escisión entre 8 y 16 blastómeros, se procedió a tratarlos durante 1 h con 1,0 mg / ml de colcemid (Saotome, 2002).

La suspensión celular se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (TA), siguiendo el protocolo descrito por Castellano (2015). Los blastómeros resultantes se trataron con soluciones hipotónicas en diferentes concentraciones, Cloruro de Potasio (KCl) al 0.05 M; 0.075; 0.1 M, y Citrato de Sodio al 7%; 8%; 9%, a 37°C durante 15 min. (Saotome, 2002; Duffy, 2007)

#### **7.4.5 Fijación y Tinción de los cromosomas**

La suspensión celular se fijó mediante tres lavados con Carnoy, para cada lavado, las muestras se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min. Al finalizar la primera centrifugación se dejó en reposo durante 15 min, mientras que para la segunda y tercera centrifugación 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la tinción de Giemsa al 2,5%, durante 15 min.

Finalmente se colocaron alícuotas de 10  $\mu$ l en portaobjetos esparciendo los blastómeros y colocando el cubreobjetos (Saotome, 2002; Duffy, 2007; Eno et al., 2009; Castellano, 2015).

### **7.5 Proceso de retorno de los erizos a su medio natural.**

Una vez concluido el proceso de obtención de gametos, se llevó a cabo un monitoreo continuo de la salud y el comportamiento de los erizos de mar para asegurar que estuvieran en condiciones óptimas antes de ser liberados en su medio natural.

Para el transporte de los organismos, desde el Centro de Investigación hasta el lugar de liberación, se seleccionaron recipientes apropiados que se utilizaron a lo largo del trabajo de investigación, tanto en la colecta como en la liberación de los organismos.

Se identificaron sitios adecuados en el medio natural que cumplieran con los requisitos ecológicos de los erizos de mar, como la presencia de sustrato adecuado, corrientes marinas favorables y disponibilidad de alimento. Se programó la liberación de los organismos en momentos óptimos considerando factores como las condiciones climáticas y que la marea se encuentre en el nivel más bajo posible. Durante la liberación, se manipularon cuidadosamente los erizos de mar para evitar daños y se los colocó suavemente en el agua, permitiendo que se adaptaran gradualmente a su entorno.

### **7.6 Procesamiento de imágenes**

Las imágenes obtenidas se editaron mediante el software Adobe Photoshop versión 7.0 para Windows, realizando correcciones en el brillo y contraste de cada fotografía, en cuanto a la identificación cromosómica se trabajó con el software ToupView para Windows, siguiendo el siguiente orden brazo pequeño (p) - brazo largo (q), el brazo pequeño (p) para lograr la identificación y clasificación de los cromosomas.

## **8 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

### **8.1 Técnicas de colecta y aclimatación**

#### **8.1.1 Métodos de Captura y transporte**

Para garantizar el bienestar de los erizos de mar durante la colecta, se llevaron a cabo evaluaciones de diferentes herramientas de extracción y recipientes de transporte, se puso especial énfasis en seleccionar herramientas que permitieran una extracción segura, evitando cualquier riesgo de lesiones en sus pies ambulacrales o fracturas en la testa, de esta manera, se procuró asegurar el cuidado y protección de los organismos recolectados.

Con relación a las herramientas utilizadas, se encontró que el cincel, con su forma hexagonal compuesta por cabeza, mango y cuña, fue útil en situaciones donde la ubicación del erizo permitiera su inserción en la cavidad de la roca, esto permitió extraer a los organismos formando palanca, sin necesidad de aplicar una fuerza excesiva que pudiera dañar alguno.

Por otro lado, se evaluaron también las espátulas planas, herramientas que consisten en una lámina de metal delgada y flexible con una agarradera (Darrigran et al., 2007). Sin embargo, se observó que estas espátulas no se adaptaban adecuadamente a la forma de las cavidades de los erizos ni al organismo en sí. Durante la extracción del medio natural, era necesario realizar ajustes constantes de la herramienta, para evitar posibles fracturas en el caparazón del erizo, además se debía seleccionar exclusivamente animales que estuvieran fuera de su cueva, lo que dificultaba y retrasaba el tiempo de colecta, debido a que eran muy pocos los que se encontraban fuera de su escondite y presentaban tamaños adecuados para la investigación.



**Ilustración 6** Métodos y material de colecta; A. banco de erizos; B. registro de coordenadas; C. colecta con espátula plana; D. colecta con cincel; E. colecta con espátula cóncava.

La espátula cóncava con mango (cuchara) por su parte, debido a su diseño alargado y curvado con una hendidura en el centro, permitió adaptarse a las cavidades presentes en las rocas donde los erizos se refugian. El instrumento fue curvado en un ángulo de entre 45 a 90 grados para adoptar una forma similar a la letra “L”, esta modificación permitió acceder a las cavidades desde diferentes ángulos, facilitando la extracción de los erizos de mar con mayor eficiencia y seguridad. Recomendación personal sugerida por el Blg. Orlando Anaguano.

Además de las herramientas de extracción, otro aspecto crucial que se tuvo en cuenta durante el proceso de colecta de los erizos de mar fue la selección de recipientes de transporte adecuados, se evaluaron diferentes opciones con el propósito de proporcionar un entorno óptimo que redujera el estrés y asegurara el bienestar de los erizos durante el traslado.

Inicialmente, se utilizó una gaveta plástica con aproximadamente 20 litros de agua de mar para el transporte de los erizos colectados (Ayerbe et al., 2017). Sin embargo, se observó que la superficie amplia de la gaveta generaba un movimiento excesivo del agua, lo que provocaba una mayor adhesión por parte de los erizos al recipiente y, en consecuencia, mayor tensión en sus pies ambulacrales, resultando en un mayor grado de estrés en los organismos. Como alternativa, se realizó una prueba utilizando un balde de agua, al tener menos superficie y mayor profundidad el balde logró reducir el movimiento del agua durante el transporte. Finalmente, se implementó un método de transporte individual utilizando tarrinas plásticas que reducían el movimiento del agua al mínimo, estas tarrinas resultaron ser una excelente opción, dado que, al no ser rígidas, permiten sacar a los organismos de la mejor forma posible, ya que, al hundir el recipiente por fuera, el erizo de mar se desprendía sin ocasionar daño alguno en sus pies ambulacrales.

El erizo de mar *Echinometra vanbrunti*, presentó una fuerte respuesta de adhesión en sus pies ambulacrales al entrar en contacto con objetos desconocidos, volviéndose más intensa a medida que el contacto se prolonga. Durante la colecta esta respuesta de fijación representó un desafío, ya que el objetivo es extraer al erizo de manera segura, minimizando el estrés y el daño en sus pies ambulacrales.

El esfuerzo realizado para desprender al erizo del sustrato cuando la adhesión es prolongada puede causar lesiones parciales o totales en sus pies ambulacrales, que se manifiestan con una coloración verdosa, en situaciones extremas, estos daños pueden dificultar e inclusive imposibilitar por completo la movilidad y capacidad de alimentación del erizo, llegando a ocasionar incluso la muerte de los individuos. Además, el estrés se puede ver manifestado en la posición de sus espinas, las cuales tienden a curvarse hacia el cuerpo del erizo en una

posición más recogida y cercana a su cuerpo, el debilitamiento y pérdida progresiva de las espinas también son indicadores de un estrés prolongado en el organismo.

**Tabla 2** Colecta de erizos de mar: herramientas utilizadas y resultados obtenidos

Variable # Colecta	Herramientas de Colecta			Recipiente de Transporte	Erizos Colectados	Erizos en buen estado	Erizos Afectados
	Espátula cóncava	Espátula plana	Cinzel				
1	-	4	3	Gaveta	7	0	7
2	4	2	1	Balde	7	3	5
3	7	-	-	Tarrinas	7	7	0
4	7	-	-	Tarrinas	7	6	1
5	7	-	-	Tarrinas	7	6	1
6	7	-	-	Tarrinas	7	7	0

En la primera colecta se utilizó la espátula, el cinzel y una gaveta como recipiente de transporte, lamentablemente, los resultados fueron desfavorables, ya que los 7 erizos colectados resultaron afectados, mostrando signos de estrés y lesiones en sus pies ambulacrales. Estas observaciones indican que la combinación de estas herramientas no fue adecuada para minimizar el impacto negativo del traslado de los erizos a un laboratorio.

En la segunda colecta, se implementó el uso de la espátula cóncava como herramienta de extracción, en combinación con las herramientas utilizadas anteriormente, y se utilizó un balde como alternativa de recipiente. En esta ocasión se observaron mejorías en el estado de los organismos durante el proceso de aclimatación, puesto que 3 de los 7 erizos extraídos no presentaron signos aparentes de estrés en comparación con la colecta anterior. Esto sugiere que esta herramienta de extracción puede ser más efectiva para minimizar el estrés de los erizos durante la colecta.

En la tercera ocasión, se optó por utilizar exclusivamente la espátula cóncava como herramienta de extracción y se implementaron tarrinas plásticas como recipientes para

continuar mejorando las condiciones de transporte de los individuos. Los resultados demostraron que la combinación de estos implementos fue exitosa, ya que durante el periodo de aclimatación no se observaron erizos de mar en situación de estrés. Las colectas siguientes se realizaron utilizando estos mismos implementos y continuaron dando resultados favorables al tener pocos organismos con síntomas de estrés, 2 durante las colectas faltantes, que únicamente se manifestaron en la presencia de espinas decaídas durante un breve periodo de tiempo.

En esta investigación el tiempo transcurrido desde la colecta hasta las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (CIBE-UPSE), no influyó en las condiciones de estrés del organismo, esta evaluación minuciosa garantizó que los organismos llegaran en óptimas condiciones a su destino.

### **8.1.2 Adecuación del sustrato**

Durante el montaje y adecuación del acuario para los erizos de mar en el laboratorio, se llevó a cabo un proceso de selección y evaluación de diferentes sustratos. El sustrato desempeña un papel fundamental en la creación de un entorno adecuado y saludable para los organismos acuáticos (Schliewen,2016), y se busca encontrar aquel que brinde las mejores condiciones de sedimentación, filtración y reducción de turbidez en el agua.

En este contexto, se realizaron pruebas utilizando distintos sustratos, como la arena, las conchillas y las piedras de acuario, con el objetivo de determinar cuál de ellos ofrecía mayores ventajas y resultados positivos determinar la turbidez del agua y la sedimentación de heces y partículas se realizó por medio de la comparación visual.

Inicialmente, se probó la arena como sustrato, tanto de forma individual como en combinación con conchillas y piedras de acuario, sin embargo, se observó que la arena presentaba desventajas significativas. La constante generación de corrientes de agua dentro del acuario necesaria para la adaptación del organismo en el laboratorio dificultaba el asentamiento adecuado del sustrato, por lo tanto, las heces no podrían sedimentarse de una manera correcta. Es importante mencionar que esta prueba no se llevó a cabo con erizos dentro del acuario.

Por otro lado, se evaluó el uso de conchillas como sustrato, y se obtuvieron resultados prometedores en términos de reducción de la turbidez del agua. Las conchillas permitieron mantener una circulación adecuada del agua sin generar turbidez, lo que contribuyó a crear un entorno más limpio para los erizos, además, las heces se asentaban de manera adecuada en el sustrato, evitando la contaminación del agua por heces, sin embargo, se observó que las conchillas tenían una mayor tendencia a acumular residuos y desechos, lo cual requería una limpieza más regular para mantener la calidad del agua.

Finalmente, se optó por utilizar una mezcla de piedras de acuario para el sustrato. Esta mezcla incluyó piedras pequeñas y grandes además de cuarzos, el uso de las piedras ofrecía varias ventajas importantes, por un lado, permitió una adecuada circulación del agua, evitando la formación de turbidez y asegurando un entorno limpio para los erizos, además de que las piedras de acuario resultaron ser más fáciles de mantener y limpiar, ya que los residuos podían ser aspirados o eliminados con mayor facilidad, contribuyendo a mantener una calidad de agua óptima.



### ***Turbidez del agua:***

1. *Agua cristalina.* El agua se ve completamente clara, sin ninguna partícula en suspensión, y se puede ver a través de ella con facilidad.
2. *Moderadamente cristalina.* El agua muestra una ligera turbidez con algunas partículas en suspensión, pero aún se puede ver a través de ella con claridad.
3. *Ligeramente turbia.* El agua muestra una ligera turbidez con algunas partículas suspendidas que afectan ligeramente la visibilidad, pero aún se pueden distinguir los objetos en el fondo del acuario.
4. *Turbia.* El agua presenta una turbidez considerable con una cantidad apreciable de partículas en suspensión, lo que afecta la visibilidad, pero aún se pueden distinguir objetos en el fondo del acuario.
5. *Muy turbia.* El agua está muy opaca debido a una alta cantidad de partículas suspendidas, lo que dificulta ver objetos incluso a corta distancia en el acuario.

### ***Sedimentación de heces y partículas:***

1. *Poca sedimentación.* Se observa que las heces y partículas se asientan rápidamente en el sustrato, manteniendo el agua relativamente limpia.
2. *Alguna sedimentación.* Se observa que las heces y partículas se asientan moderadamente en el sustrato, manteniendo el agua relativamente limpia, pero con una cierta cantidad de partículas en suspensión.
3. *Moderada sedimentación.* Las heces y partículas se asientan en el sustrato, pero no tan rápidamente, lo que puede provocar una cierta turbidez en el agua.

4. *Considerable sedimentación.* Las heces y partículas se asientan con dificultad en el sustrato, lo que provoca una mayor turbidez en el agua y requiere una limpieza más regular para mantener la calidad del agua.
  
5. *Poca o nula sedimentación.* Las heces y partículas permanecen suspendidas en el agua sin asentarse en el sustrato, lo que contribuye significativamente a la turbidez del agua.

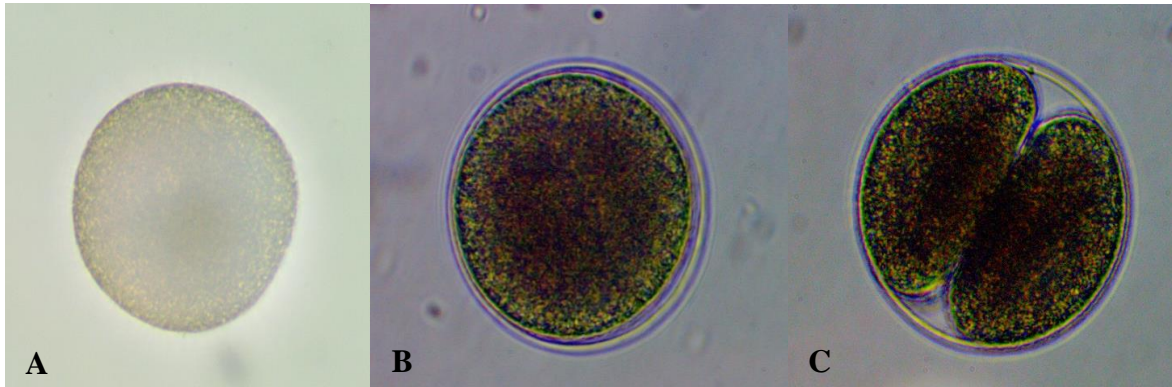
**Tabla 3** Evaluación de Sustratos para Turbidez del Agua y Sedimentación de Heces y Partículas

<b>Sustrato</b>	<b>Turbidez del Agua</b>	<b>Sedimentación de Heces y Partículas</b>
Arena	<b>5</b> ( <i>Muy turbia</i> )	<b>5</b> ( <i>Poca o nula sedimentación</i> )
Arena + Conchillas	<b>3</b> ( <i>Ligeramente turbia</i> )	<b>2</b> ( <i>Alguna sedimentación</i> )
Conchillas	<b>2</b> ( <i>Ligeramente turbia</i> )	<b>3</b> ( <i>Moderada sedimentación</i> )
Mezcla de Piedras	<b>1</b> ( <i>Agua cristalina</i> )	<b>1</b> ( <i>Poca sedimentación</i> )

## 8.2 Evaluación de protocolos de obtención de cromosomas.

### 8.2.1 Eliminación de la membrana de fertilización

Para la eliminación de la membrana de fertilización, se realizó una comparación y análisis de la efectividad entre dos métodos: el empleo de PABA (ácido 4 para-amino-benzoico) y el uso de urea. La eliminación de la membrana de fertilización es importante porque permite acceder a las células del embrión de erizo de mar de manera individualizada, lo cual facilita su preparación para análisis citogenéticos posteriores. Al remover la membrana de fertilización, se facilita la visualización individual de los cromosomas, lo que es esencial para analizar su morfología, tamaño, número y estructura.



**Ilustración 7.-** Inhibición de crecimiento embrionario a causa de PABA en diferentes tiempos; A. óvulo sin fecundar *0min*; B. óvulo con la membrana de fertilización alzada *20 min*; C. óvulo en primera división *1h30min*.

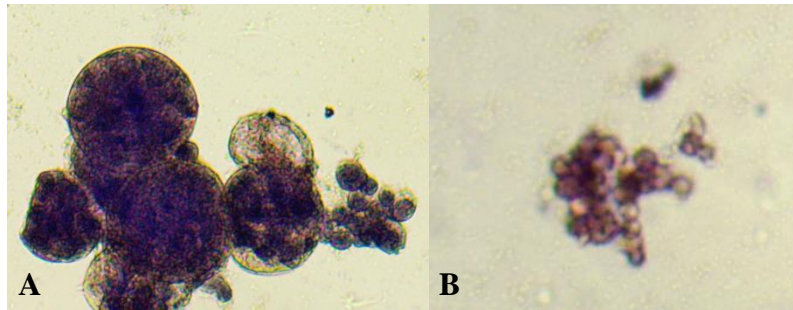
**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023

En el primer experimento, se empleó PABA en una concentración de 3 mM en el medio de fecundación para la eliminación de la membrana de fertilización, protocolo descrito por Saotome (1982). El PABA se agregó al inicio, a los 20 minutos después del proceso de fecundación (cuando la membrana de fertilización ya estaba levantada, y a la 1 hora y 30 minutos, en la etapa de 2 células, para analizar su eficacia en la eliminación de la membrana de fertilización.

Sin embargo, los resultados del primer experimento no fueron favorables, ya que no hubo fecundación por parte de los espermatozoides al óvulo. Estos resultados se replicaron para descartar la posibilidad de error en la preparación del reactivo. Además, se contrastaron los resultados en un medio de cultivo sin PABA para determinar si el problema residía en el PABA o si existía algún otro problema. Las pruebas realizadas revelaron que la presencia de PABA en el cultivo inicial impedía la fecundación de los gametos.

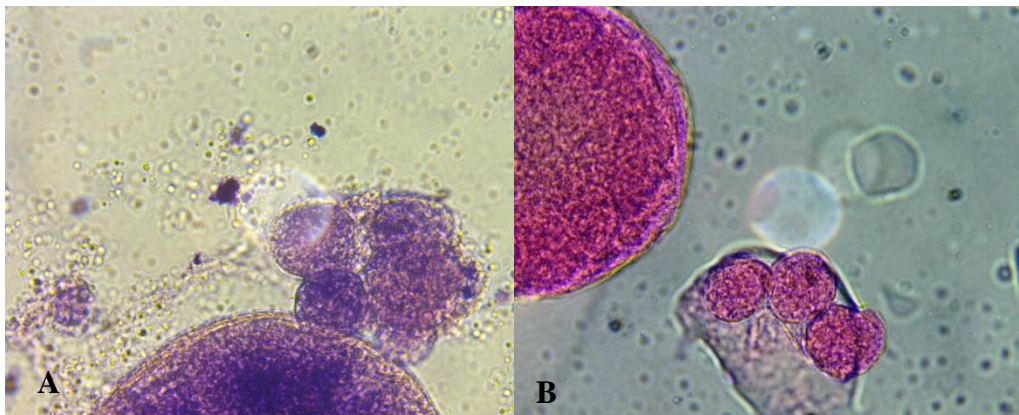
En el análisis del PABA agregado a los 20 minutos después de la fertilización, cuando la membrana de fertilización ya estaba levantada, se incluyó un grupo de control sin este reactivo. Se observó que con la presencia del PABA, la célula fecundada no continuaba su crecimiento y se detenía su desarrollo, sin pasar a la etapa de división para formar dos células.

Finalmente, se realizó una última prueba con PABA a la 1 hora y 30 minutos después del proceso de fecundación, cuando el embrión se encontraba en la etapa de 2 células. Nuevamente, se observó que el desarrollo del embrión no continuaba, lo que llevó a descartar el uso de PABA en el protocolo. Con base en información científica de Eno et al., (2009), como alternativa, se consideró el uso de urea.



**Ilustración 8.** Urea 0.5 M A. células expulsadas de la membrana de fertilización a causa de la debilitación de esta B. células embrionarias sin la membrana de fertilización.

Se empleó urea en diversas concentraciones: 0,5 M, 1 M y 1,5 M. Las muestras se mantuvieron en reposo durante 15 minutos para determinar si se producía una debilitación en la membrana de fertilización y en qué concentración se obtenían mejores resultados. En la primera concentración de urea evaluada de 0,5 M se pudo observar embriones con la



**Ilustración 9.** A. Concentración de urea a 1M, B. Concentración de urea a 1.5 M; células diseminadas fuera de la membrana celular.

**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023

membrana de fertilización con ruptura dando lugar a la disociación celular, esta concentración en todos los ensayos realizados fue en el único que se pudo capturar evidencia de la salida de células de la membrana de fertilización, mostró los mejores resultados y una debilitación más notable de la membrana de fertilización, en varios casos, se observó la

ruptura de la membrana, lo que permitió la salida de las células del embrión en excelente estado.

En la segunda y tercer concentración evaluada de 1M y 1.5M respectivamente, En este proceso se observaron los embriones intactos pero no se observó la presencia de ninguna célula, lo que indica que la concentración 2 y 3 tienen un efecto reducido de debilitar la membrana, así que la concentración que dio resultados fue la concentración 1, urea 0.5M

A continuación, se presenta una tabla que resume los resultados obtenidos:

**Tabla 4** Reactivos y concentraciones utilizados en el proceso de eliminación de la membrana de fertilización

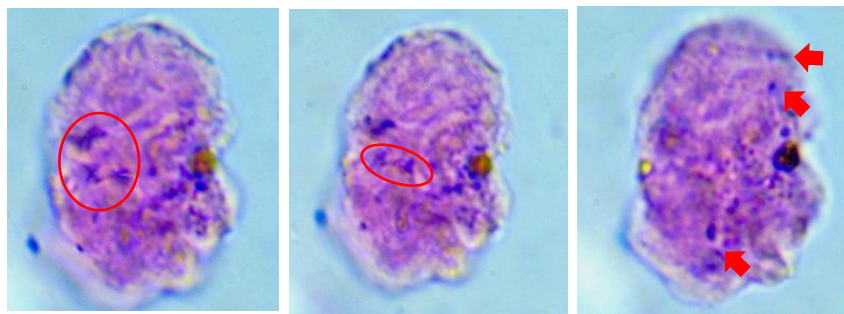
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Resultados</b>
<i>PABA</i>	3 mM	No hubo fecundación por parte de los espermatozoides (Resultados negativos)
<i>PABA+20 min</i>	3 mM	Detención del desarrollo del embrión sin pasar a la etapa de división
<i>PABA + 1H 30</i>	3 mM	Detención del desarrollo del embrión sin continuar su crecimiento
<i>Urea</i>	0.5 M	Debilitación notable de la membrana de fertilización con ruptura observada en algunos casos
<i>Urea</i>	1 M	Resultados no concluyentes
<i>Urea</i>	1.5 M	Resultados no concluyentes
<i>Testigo</i>	-	No existió disociación de los embriones

Estos hallazgos sugieren que la Urea podría ser una alternativa viable para futuros experimentos y estudios relacionados con la manipulación de la membrana de fertilización en los embriones de erizo de mar.

### 8.2.2 Eliminación de la membrana nuclear

En el proceso de eliminación de la membrana del núcleo celular, se utilizaron blastómeros obtenidos previamente. Estas células fueron tratadas con soluciones hipotónicas, específicamente tres concentraciones de Cloruro de Potasio (KCl) y Citrato de Sodio, para determinar cuál induce a la ruptura del núcleo celular y la liberación de los cromosomas de manera más efectiva.

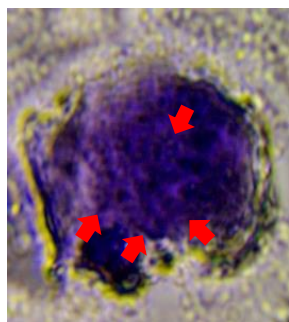
En la primera concentración de KCl, que fue de 0.005 M, se observó la presencia de ruptura del núcleo celular, esto se evidenció mediante la visualización de cromosomas, en algunas células fueron claramente distinguibles, pero no se apreciaron correctamente.



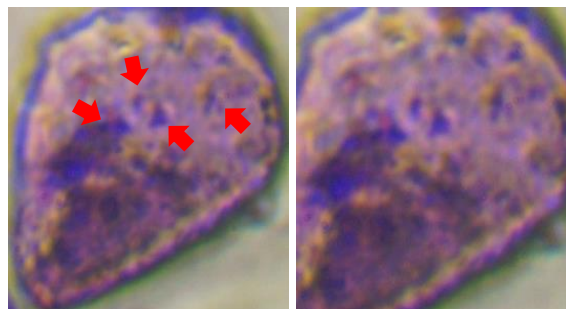
**Ilustración 10** Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.005M

Al analizar la segunda concentración de KCl, que fue de 0.075 M, se observó la presencia de cromosomas en el citoplasma celular. Sin embargo, en algunos casos, la resolución máxima del microscopio y la calidad de la observación de los cromosomas no fue óptima, lo que sugiere que la concentración del reactivo utilizado pudo haber afectado la visualización.

En cuanto a la tercera concentración de KCl, que fue de 0.1 M, no se evidenció la presencia de cromosomas en las células analizadas, lo que indica que no se produjo la ruptura de la membrana nuclear.



**Ilustración 11** Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.005M



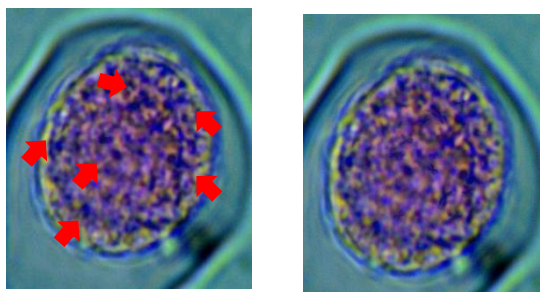
**Ilustración 12** Visualización de cromosomas en célula tratada con KCl 0.075 M

**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023.

Después de realizar un análisis

comparativo de las tres concentraciones de KCl evaluadas, se determinó que la concentración 1, correspondiente a 0.005 M, ofreció los mejores resultados en términos de la ruptura del núcleo celular. En esta concentración, los cromosomas fueron claramente visibles, presentando una mayor nitidez y permitiendo su observación en un mayor número de células, demostrando la mayor eficacia de esta concentración en comparación con las otras evaluadas.

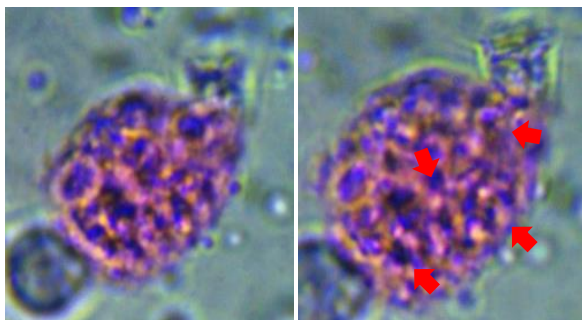
En el análisis de células tratadas con citrato de sodio al 7%, se identificó un aumento notable en la cantidad de cromosomas presentes. Sin embargo, se observó que estos cromosomas presentaban una condensación considerable, lo que dificultaba su visualización y descripción detallada.



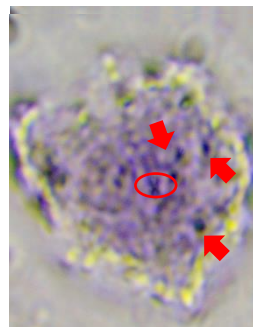
**Ilustración 13** Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 7%..



En el caso del citrato de sodio al 8%, se detectó una menor cantidad de cromosomas en comparación con la concentración anterior. Esto sugiere que la concentración más alta pudo haber tenido un efecto negativo en la liberación y visualización de los cromosomas.



**Ilustración 14** Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 8%.



**Ilustración 15** Visualización de cromosomas en célula tratada con Citrato de sodio al 9%.

Por otro lado, en la concentración de citrato de sodio al 9%, se obtuvieron resultados satisfactorios, similares a los de la concentración anterior en razón a la presencia de cromosomas, pero se destacó la presencia de células que mostraban una mayor nitidez y diferenciación de los cromosomas, lo que podría indicar que esta concentración podría ser favorable para la observación de cromosomas con mayor claridad.

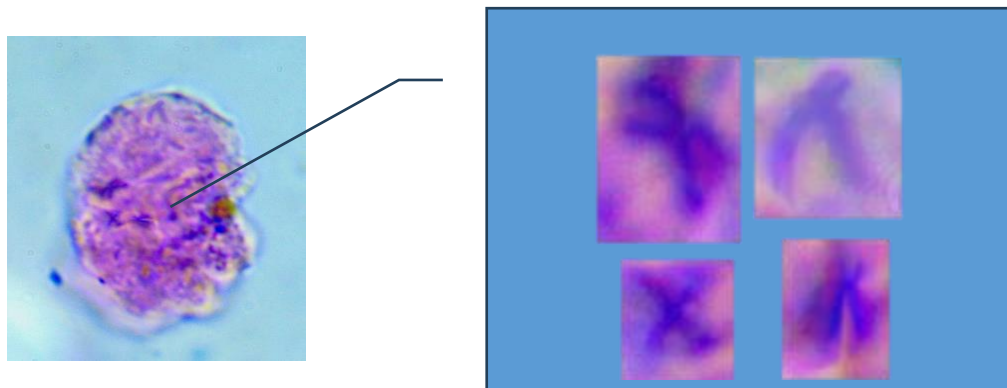
Tras realizar el análisis correspondiente, se pudo determinar que tanto el cloruro de potasio como el citrato de sodio demostraron ser efectivos en su función de ruptura del núcleo celular y liberación de los cromosomas. Sin embargo, al comparar los resultados, se observó que la concentración de citrato de sodio al 7% mostró mejores resultados en términos de presencia de cromosomas en el citoplasma celular, estos cromosomas pudieron ser visualizados con mayor nitidez y se pudieron observar claramente sus características.

### 8.2.3 Tipo de cromosomas y características observadas.

En los resultados obtenidos, se lograron identificar un total de 15 cromosomas bien definidos, en el análisis realizado en tres células, así también, en otras células se observaron varios cromosomas compilados y de tamaño muy reducido, sin embargo, debido a la dificultad de desnaturalizarlos y ampliar la figura sin distorsionar su morfología resultó imposible realizar una descripción cromosómica e identificarlos.

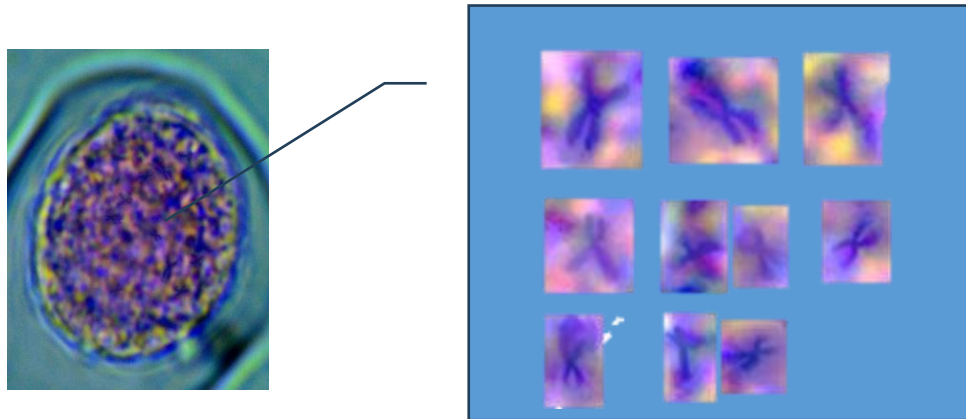
A continuación, se detalla la identificación cromosómica lograda en este trabajo:

En una célula que se trató con una solución hipotónica de KCl al 0.005M, se observaron dos cromosomas acrocéntricos y dos cromosomas metacéntricos.



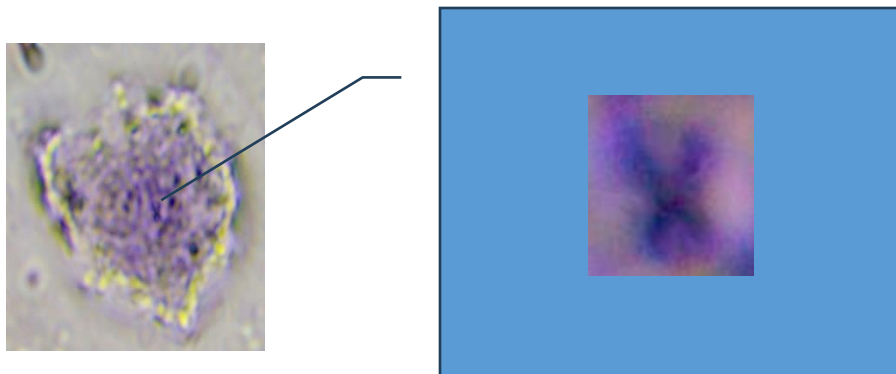
**Ilustración 16** Célula con cromosomas en solución hipotónica de KCl al 0.005M y Una visión ampliada en la estructura cromosómica

Además, en otra célula que se trató con una solución hipotónica de citrato de sodio al 7%, se pudieron observar 4 cromosomas metacéntricos, 4 cromosomas submetacéntricos y 2 cromosomas acrocéntricos.



**Ilustración 16** Célula con cromosomas en solución hipotónica de citrato de sodio al 7% y una visión ampliada en la estructura cromosómica

En una tercera célula tratada con una solución hipotónica de citrato de sodio al 9%, se observó únicamente 1 cromosoma submetacéntrico, también existió la presencia de más cromosomas, pero debido a la compresión y el tamaño de los cromosomas se dificultó su visualización y descripción detallada.



**Ilustración 17** Célula con cromosomas en solución hipotónica de citrato de sodio al 9% y una visión ampliada en la estructura cromosómica

### 8.3 Protocolo de obtención de cromosomas

#### 1. Preparación de los organismos.

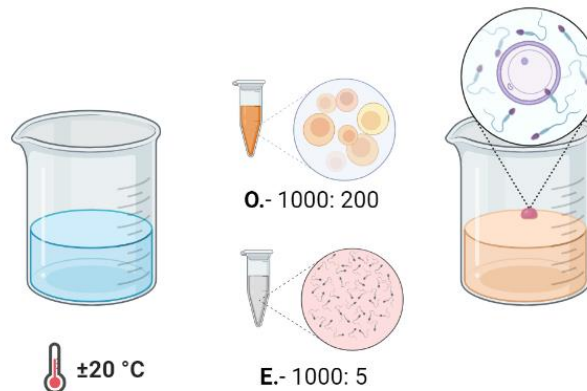
- Asegurar que los erizos estén en óptimas condiciones de salud y bienestar, evitando espinas quebradas o decaídas, ni pies ambulacrales dañados.
- Proporcionar una alimentación adecuada a los erizos para acumular reservas energéticas necesarias para la reproducción.
- Realizar un acondicionamiento previo a los organismos previo al desove, si es necesario

#### 2. Inducción al desove

- Aplicar 1 ml de KCl 0,5 M en jergas de insulina a cada organismo en la membrana peristomal, diagonal y opuesta a la boca.
- Colocar los organismos en placas Petri con el polo aboral hacia abajo.

#### 3. Fecundación *in vitro*

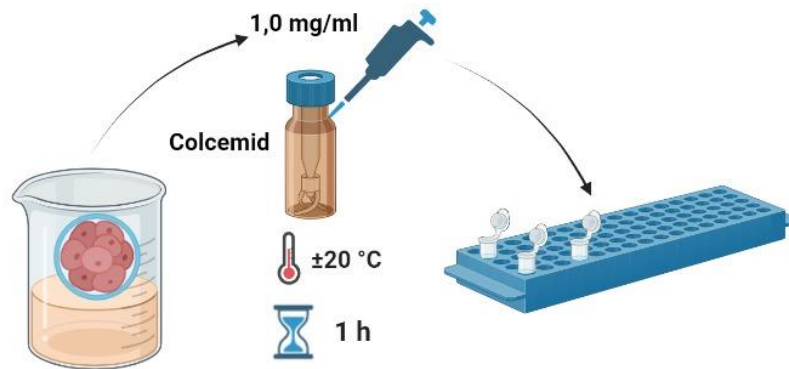
- En un vaso precipitado, mezclar una relación de 1000:200 óvulos y 1000:5 espermatozoides en agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV (inmediatamente después de la obtención de los gametos).
- Controlar constantemente el proceso de fecundación y desarrollo de los organismos y mantener una temperatura de aproximadamente  $\pm 20^{\circ}\text{C}$ .



**Ilustración 18** Proceso de Fecundación *in vitro*

#### 4. Tratamiento con colchicina

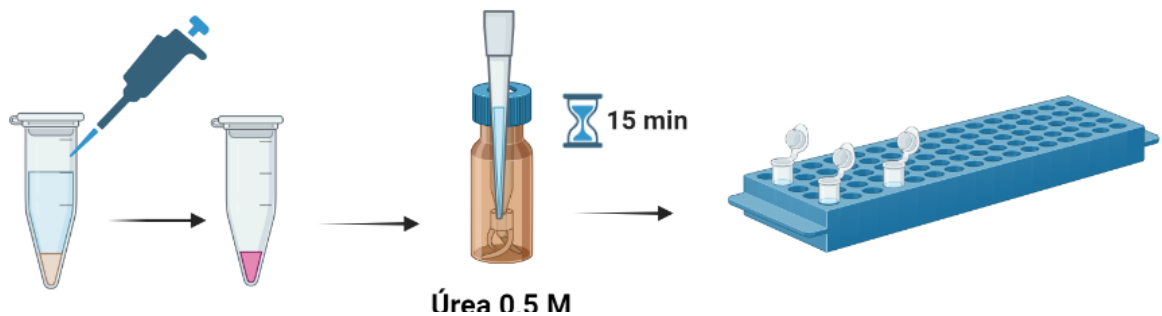
- Al existir gran presencia de embriones en etapa de escisión entre 8 y 16 blastómeros, tratar los cultivos embrionarios durante 1 hora con 1,0 mg/ml de colcemid.



**Ilustración 19** Proceso de tratamiento con Colchicina

#### 5. Debilitación de la membrana de fertilización:

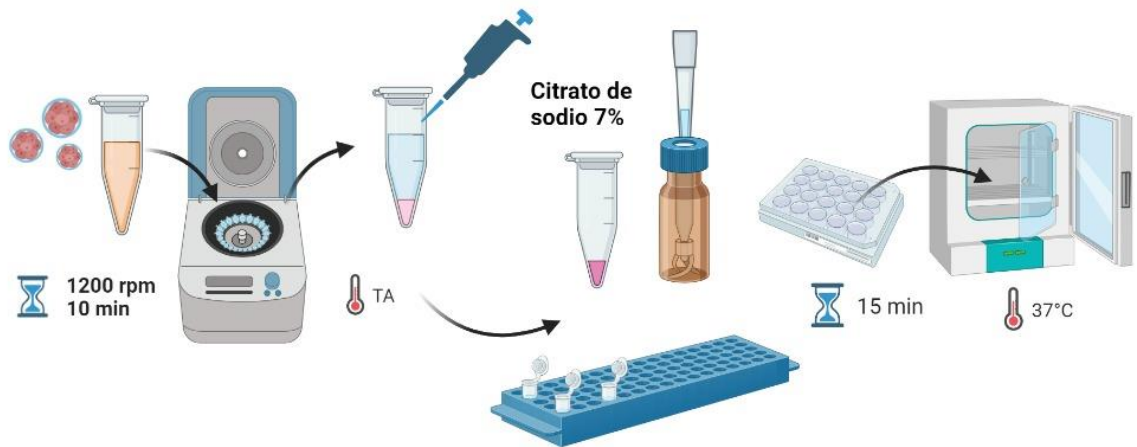
- Dejar asentar a los embriones y extraer el AMF utilizada en la fecundación
- Tratar los blastómeros con urea al 0.5 M durante 15 minutos



**Ilustración 20** Proceso de la debilitación de la membrana de fertilización

## 6. Eliminación de la membrana del núcleo celular

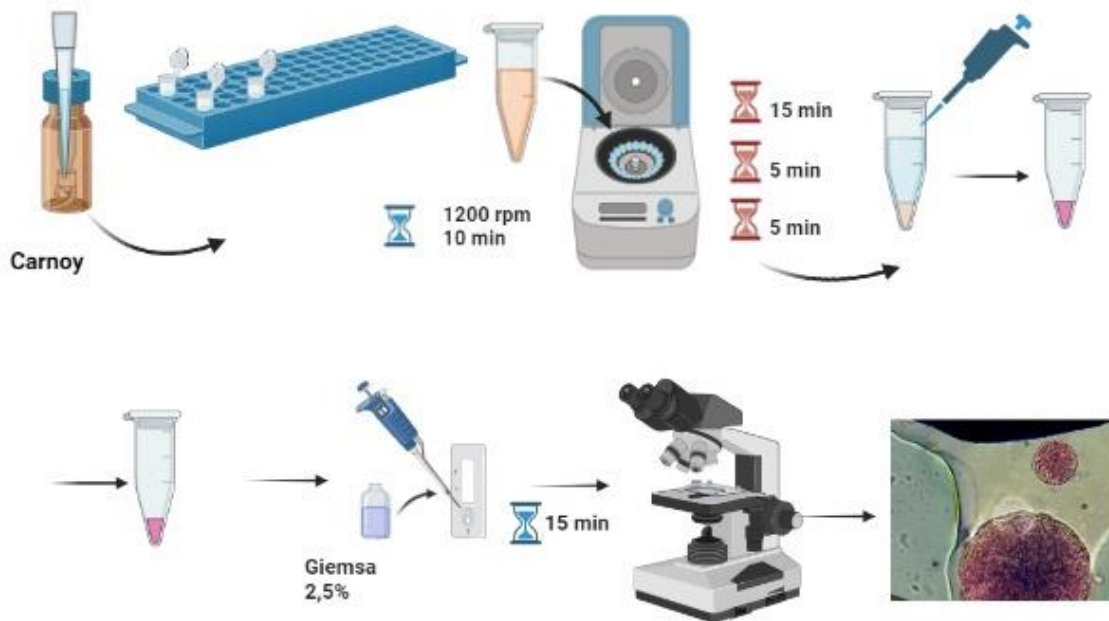
- Centrifugar la suspensión celular a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Tratar los blastómeros resultantes con solución hipotónica de citrato de sodio 7% a 37°C durante 15 minutos y retirar el sobrenadante



**Ilustración 21** Proceso de la eliminación de la membrana del núcleo celular

## 7. Fijación y tinción de los cromosomas

- Fijar la suspensión celular mediante tres lavados con Carnoy. Para cada lavado, centrifugar las muestras a 1200 rpm durante 10 minutos. En la primera centrifugación, dejar en reposo durante 15 minutos. En la segunda y tercera centrifugación, dejar en reposo durante 5 minutos.
- Realizar la tinción de Giemsa al 2,5% durante 15 minutos.
- Colocar alícuotas de 10  $\mu$ l en portaobjetos, esparcir los blastómeros, colocar el cubreobjetos
- Observe al microscopio.



**Ilustración 22** Proceso de Fijación y tinción de los cromosomas

### Materiales, reactivos y equipos

Antes de comenzar con el estudio de citogenética en erizos de mar, es esencial contar con los materiales, equipos y reactivos necesarios. A continuación, se presenta una lista detallada de los elementos indispensables que deben estar disponibles antes de iniciar el estudio

**Tabla 5** Materiales y Equipos Utilizados

Reactivos	Materiales	Equipos
Carnoy	Agua de mar	Cámara de flujo laminar
Citrato de sodio 7%	Microtúbulos	Centrifuga
Colchicina	Micropipetas	Incubadora
Carnoy	Placas Petri	
Giemsa	Porta objetos	

## 9 DISCUSIÓN

En trabajos previos, como el realizado por Anaguano (2023), donde se comparó el efecto de dos dietas experimentales en el erizo de mar *Echinometra vanbrunti* en un sistema de cultivo, y en manuales como el de Ayerbe et al. (2017), se emplearon métodos que buscan minimizar el impacto físico en los erizos de mar durante el proceso de colecta y aclimatación, siendo este proceso fundamental para permitir el desarrollo de sus investigaciones, en línea con estas necesidades, en nuestra investigación evaluamos diversas técnicas de colecta y aclimatación, encontrando que el uso de la espátula cóncava como herramienta de extracción y las tarrinas plásticas como recipientes de transporte resultaron ser las opciones más eficientes, en comparación con las espátulas planas y las gavetas, estos materiales demostraron ser efectivos para minimizar el impacto físico en los pies ambulacrales de los erizos de mar, contribuyendo así a su bienestar y supervivencia.

En cuanto al sustrato utilizado en el acuario, se determinó que las piedras de acuario fueron la mejor opción. Estas piedras permitieron una adecuada circulación del agua, redujeron la turbidez y facilitaron la limpieza del acuario. Estos resultados son consistentes con información publicada por Schliewen, (2016) en donde se destacó la importancia de seleccionar sustratos adecuados para mantener un ambiente óptimo y saludable para los organismos acuáticos, la elección de un sustrato adecuado es esencial para crear un entorno que promueva el bienestar de los erizos de mar y contribuya a su salud y supervivencia.



En estudios previos sobre la obtención de cromosomas en equinodermos, se ha empleado tradicionalmente el ácido para-amino-benzoico (PABA) como inhibidor de la enzima ovoperoxidasa, facilitando así la eliminación de la membrana de fertilización (Lipani et al., 1996; Eno et al., 2009; Vacquier, 2011). Sin embargo, nuestros resultados difieren de estos estudios, ya que encontramos que el uso de PABA en *Echinometra vanbrunti* fue ineficiente y obstaculizó el proceso de fecundación y desarrollo embrionario. Estos hallazgos podrían sugerir que existen diferencias en la respuesta de las especies a este compuesto o en las características de la membrana de fertilización en *Echinometra vanbrunti*. Es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos involucrados en la eliminación de la membrana de fertilización en esta especie y evaluar la eficacia de otros compuestos o métodos alternativos. Es importante destacar que el uso de urea en una concentración de 0.5 M resultó efectivo para debilitar la membrana de fertilización y permitir la liberación de las células embrionarias. Estos resultados son consistentes con investigaciones anteriores que han utilizado urea como un agente efectivo en la debilitación de la membrana de fertilización en otros organismos marinos (Saotome y Komatsu, 2002). Estos hallazgos resaltan la importancia de realizar estudios específicos para cada especie y no asumir la eficacia de un protocolo basado únicamente en resultados obtenidos en otras especies.

Con relación a la ruptura del núcleo celular, se evaluaron dos soluciones hipotónicas diferentes, cloruro de potasio (KCl) y citrato de sodio, con el objetivo de determinar cuál de ellas permitía una mejor visualización de las metafases mitóticas en *Echinometra vanbrunti*. Los resultados indicaron que tanto el KCl en una concentración de 0.005 M como el citrato de sodio al 7% fueron efectivos en la liberación de los cromosomas en el citoplasma celular,

proporcionando una visualización clara y características bien definidas. Estos hallazgos concuerdan con un estudio previo realizado en la especie *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae), donde también se utilizó KCl y citrato de sodio como soluciones hipotónicas para determinar el número de cromosomas. En dicho estudio, se encontró que el KCl permitió visualizar mejores metafases que el citrato de sodio en esa especie (Molleda, 1999). Estos resultados sugieren que la eficacia de las soluciones hipotónicas puede variar entre diferentes especies y que es importante seleccionar el reactivo más adecuado para obtener metafases de alta calidad en cada caso específico.

La obtención de preparaciones metafásicas a partir de embriones de erizo de mar ofrece una alternativa menos invasiva en comparación con la obtención a partir de individuos adultos. Esto resulta especialmente relevante en el caso de especies amenazadas, ya que permite que los ejemplares adultos sean devueltos a su hábitat natural (Castellano, 2015).

En el caso de *Echinometra vanbrunti*, se identificaron un total de 15 cromosomas en las células analizadas. Los cromosomas que se obtuvieron de un total de 3 células analizadas que fueron posibles de identificar los cromosomas, se encontraron la presencia de cromosomas, metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos, por otro lado, Eno describe en su estudio que *Strongylocentrotus purpuratus* presenta dos pares grandes, ocho medianos y diez pequeños de especies cromosómicas autosómica. La optimización de un protocolo que permita obtener metafases de alta calidad a partir de embriones de erizo de mar ampliaría las posibilidades de utilizar esta especie como modelo en estudios citogenéticos y de biología del desarrollo. Además, podría impulsar su utilización en investigaciones relacionadas con la explotación pesquera. Estos avances representan una oportunidad para profundizar en el

conocimiento genético y cromosómico de los erizos de mar y su aplicación en diferentes áreas de investigación.

## 10 CONCLUSIONES

- ✓ Los resultados obtenidos de la investigación indican que el uso de espátula cóncava como herramienta de extracción y las tarrinas plásticas como recipientes de transporte fueron las opciones más exitosas para garantizar el bienestar de los erizos de mar durante el proceso de colecta y transporte, estas herramientas minimizaron el estrés y las lesiones en los pies ambulacrales de los erizos, lo que aseguró un proceso más favorable para su salud y supervivencia. En cuanto a los sustratos utilizados en el acuario, los resultados resaltan las ventajas del uso de piedras de acuario, ya que este sustrato permitió una adecuada circulación del agua, evitando la formación de turbidez y asegurando un entorno limpio para los erizos, además, las piedras de acuario demostraron ser más fáciles de mantener y limpiar, lo que contribuyó a mantener una calidad óptima del agua. Estas consideraciones son esenciales para preservar la salud de los erizos de mar y garantizar el éxito de futuras investigaciones y estudios relacionados con ellos.
- ✗ El uso de PABA en la eliminación de la membrana de fertilización resultó ineficaz y obstaculizó la fecundación y el desarrollo embrionario, mientras que la urea en una concentración de 0.5 M demostró ser más favorable al debilitar la membrana y permitir la liberación de las células embrionarias. Además, el análisis comparativo

entre diferentes concentraciones de cloruro de potasio (KCl) y citrato de sodio reveló que el citrato de sodio al 7% fue el reactivo más efectivo para la ruptura de la membrana del núcleo celular y la liberación de los cromosomas, donde se presentaron, metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos.

- ✓ El protocolo desarrollado en este estudio ofrece una metodología eficaz y reproducible para la obtención, identificación y caracterización de cromosomas en embriones de *Echinometra vanbrunti*, en células en división mitótica, brindando información relevante sobre la genética de esta especie.

## 11 RECOMENDACIONES

Basándonos en los resultados obtenidos en este estudio, se pueden realizar las siguientes recomendaciones adicionales para investigaciones futuras:

- ✓ Investigar diferentes momentos y tiempos de suspensión del PABA: Dado que el uso de PABA no fue efectivo en este estudio, se sugiere realizar investigaciones adicionales para determinar si el momento y el tiempo de suspensión del PABA pueden influir en su eficacia para la eliminación de la membrana de fertilización. Explorar diferentes momentos de adición y duraciones de exposición puede brindar información sobre la mejor forma de utilizar este reactivo.
- ✓ Ampliar el rango de concentraciones de urea y citrato de sodio: Aunque se encontraron concentraciones efectivas en este estudio, se recomienda ampliar el rango de concentraciones de urea y citrato de sodio para evaluar si existen otras

concentraciones que puedan brindar mejores resultados en términos de eficacia y visualización de los cromosomas. Esto permitirá identificar las concentraciones óptimas para la ruptura de la membrana de fertilización y la liberación de los cromosomas.

- ✓ Volver a realizar este trabajo para tener una comprensión completa de los protocolos de obtención de cromosomas, y lograr obtener el cariotipo para posteriormente realizar estudios comparativos con otras especies de erizos de mar.
- ✓ Contar con equipos de microscopía de alta resolución para realizar un estudio completo de citogenética

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, M. S. (2016). *Biología molecular y citogenética* (2da ed.). Madrid.
- Alcalá. (2021). ¿Qué es un cromosoma y cuáles son sus principales alteraciones?  
Recuperado de <https://www.formacionalcala.com/articulos/144/que-es-un-cromosoma-y-cuales-son-sus-principales-alteraciones>
- Anaguano, M. (2023). Efecto de la aplicación de dos dietas experimentales sobre el crecimiento del erizo de mar *Echinometra vanbrunti* en la Libertad, Provincia de Santa Elena. Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Auclair, W. (1965). The chromosomes of sea urchins, especially *Arbacia punctulata*; a method for studying unsectioned eggs at first cleavage. *Biological Bulletin of the Marine Biological Laboratory, Woods Hole*, 128(2), 169-176.
- Benitez, L. G., & Matínez, M. E. (1986). Algunos Aspectos Biológicos de Cuatro Especies de Echinodermos [Asteroideo: *Luidia brevispina*, Ophiuroideo: *Ophiocoma aethiops*, Echinoideo: *Echinometra vanbrunti*, Holothuroideo: *Holothuria (Paraholothuria) riojai*] de la Bahía de Mazatlán, Sin., México. (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Eno, C., Böttger, S. A., & Walker, C. W. (2009). Methods for Karyotyping and for Localization of Developmentally Relevant Genes on the Chromosomes of the

Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. Marine Biological Laboratory, 306-312.

FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Roma, Italia.

McClanahan, T. R., & Muthiga, a. N. (2020). Echinometra. En J. M. Lawrence (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Vol. 43). Elsevier B.V. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00028-7>

Modella, P. E., Severeyn, Y. G., Severeyn, H., & Molina, J. (1999). Determinación del número de cromosomas de *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) utilizando dos métodos citogenéticos. *CIENCIA*, 17-22.

National Human Genome Research Institute. (2019). *Citogenética*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Citogenetica>

National Human Genome Research Institute. (27 de Septiembre de 2019). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de *Cromosomas*: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Cromosomas>

Poggio, L., Espert, S. M., & Fortunato, R. H. (2008). Citogenética evolutiva en Leguminosas Americanas. *Rodriguésia*, 423-433.

Saotome, K., & Komatsu, M. (2002). Chromosomes of Japanese Starfishes. *Zoological Science*, 19(10), 1095-1103. doi:10.2108/zsj.19.1095

Ulrich Schliewen. (2016). El acuario. Hispano Europea.

- Villalba, A. G., Chan, L. H., Diaz, I. L., Jiménez, N. Y., Osorio, C. M., Longoria, R. C., & Arce, A. M. (2021). Reproductive cycle of sea urchin *Echinometra vanbrunti* (Echinodermata: Echinoidea) from the Gulf of California. *Marine Biology Research*, 17, 838-852. doi:10.1080/17451000.2022.2029901
- Archana, A., & Babu, R. (2016). Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*. *Food Chemistry*, 197, 597-602. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.003>
- Brusca, R. C. (1980). *Common Inertial Invertebrates of the Gulf of California*. Arizona: The University of Arizona Press.
- Caso, M. E. (1961). *Los Equinodermos de México*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castellano, I. G. (2015). *Estudio citogenético en el erizo de mar Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). (Tesis de grado). Universidade Da Coruña.
- COA. (2017). Código Orgánico del Ambiente. Obtenido de [https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO\\_ORGANICO\\_AMBIENTE.pdf](https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2018/01/CODIGO_ORGANICO_AMBIENTE.pdf)
- Darrigran, G., Vilches, A., Legarralde, T., & Damborenea, C. (2007). Guía para el estudio de macroinvertebrados. I.- Métodos de colecta y técnicas de fijación. Departamento Ciencias Exactas y Naturales; Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. UNLP.



- Duffy, L., Sewell, M. A., & Murray, B. G. (2007). Chromosome number and chromosome variation in embryos of *Evechinus chloroticus* (Echinoidea: Echinometridae): Is there conservation of chromosome number in the Phylum Echinodermata? *Invertebrate Reproduction and Development*, 219-231.
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Niem, V. H., & Carpenter, K. E. (1995). Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico centro-oriental (Vol. I). Roma.
- Galarza Verkovitch, D. C. (2014). Modularidad y heterocronía en dos eventos del desarrollo embrionario de dos especies de erizos de mar (Familia: Echinometridae) con desarrollo planctotrófico y diferente tamaño de huevo.
- Herrera, J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana*, 26-35.
- Kondo, M., & Akasaka, K. (2012). Current Status of Echinoderm Genome Analysis - What do we Know?, 13(2), 134–143. doi:10.2174/138920212799860643
- Lipani, C., Vitturi, R., Sconzo, G., & Barbata, G. (1996). Karyotype analysis of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata): evidence for a heteromorphic chromosome sex mechanism. *Marine Biology*, 127(1), 67-72.
- Marco Trifuoggi, Giovanni Pagano, Rahime Oral, Dijana Pavičić-Hamer, Petra Burić, Ines Kovačić, Antonietta Siciliano, Maria Toscanesi, Philippe J. Thomas, Luigi Paduano,

Marco Guida, Daniel M. Lyons. (2019). Microplastic-induced damage in early embryonal development of sea urchin *Sphaerechinus granularis*.

Mariko Kondo & Koji Akasaka. (2012). Current Status of Echinoderm Genome Analysis - What do we Know? *Current Genomics*, 13(2), 134–143. doi:10.2174/1389202127998606

Martino, C., Chianese, T., Chiarelli, R., Roccheri, M. C., & Scudiero, R. (2022). Toxicological Impact of Rare Earth Elements (REEs) on the Reproduction and Development of Aquatic Organisms Using Sea Urchins as Biological Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2876). doi:https://doi.org/10.3390/ijms23052876

Mazur, A. A., Chelomin, V. P., Zhuravel, E. V., Sergey Petrovich Kukla 1, . V., & Dovzhenko, N. V. (2021). Genotoxicity of Polystyrene (PS) Microspheres in Short-Term Exposure to Gametes of the Sand Dollar *Scaphechinus mirabilis* (Agassiz, 1864) (Echinodermata, Echinoidea). *Journal of Marine Science and Engineering*. doi:https://doi.org/10.3390/jmse9101088

Ministerio del Ambiente 2020. Plan de Manejo de la Reserva de Producción de Fauna Marino Costera Puntilla de Santa Elena. Fundación Ecológica Bioeducar y Conservación Internacional Ecuador. Salinas, Ecuador. 104p.

Nikoloff, N., & Arcaute, C. R. (2021). Introducción a la Citogenética. En *Elementos de Genética para estudiantes de Ciencias Biológicas* (pág. 48). Universidad Nacional de La Plata. Obtenido de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/129625>

- Rezg, R., Oral, R., Tez, S., Mornagui, B., Pagano, G., & Trifuoggi, M. (2022). Cytogenetic and developmental toxicity of bisphenol A and bisphenol S in *Arbacia lixula* sea urchins embryos. Research Square. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1246086/v1>
- Rocha, F., Baião, L., Moutinho, S., Reis, B., Oliveira, A., Arenas, F., Valente, L. (2019). The effect of sex, season and gametogenic cycle on gonad yield, biochemical composition and quality traits of *Paracentrotus lividus* along the North Atlantic coast of Portugal. *Scientific Reports*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39912-w>
- Roger Ayerbe, Sheyla Zevallos, Vicente Castañeda, Fernando Lope, Heydi Bendita, Yhordan Vizcarra, Ygor Sanz. (2017). Manual para el cultivo del erizo comercial *Loxechinus albus* en la región Moquegua
- Sandra Elizabeth Soriano Bailón. (2014). Evaluación de los bancos naturales del erizo negro (*Echinometra vanbrunti*) en la zona intermareal rocosa del balneario de ballenita y comuna la entrada, provincia de santa elena, durante noviembre 2013 – abril del 2014.
- Saotome, K. (1982). A Method for Chromosome Preparation of Sea Urchin Embryos. *Stain Technology*, 103-105.
- Segovia, J., Guerra, G., & Ramos, F. (2017). Riqueza y distribución de equinodermos en los arrecifes rocosos de Punta Amapala y Los Cóbanos, El Salvador. *Revista de Biología Tropical*, 65.

- Steneck, R. (2020). Regular sea urchins as drivers of shallow benthic marine community structure. En J. Lawrence (Ed.), *Sea Urchins: Biology and Ecology* (Vol. 43). Elsevier. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819570-3.00015-9>
- Sun, J., & Chiang, F.-S. (2015). Use and Exploitation of Sea Urchins. En J. M. Lawrence (Ed.), *Echinoderm Aquaculture*, 25-45. doi:10.1002/9781119005810.ch2
- Torres, M. J., Romero, J. C., & Osorio, J. Á. (2018). Fundamentos de citogenética Humana y animal. Bogotá: Sello Editorial UNAD. doi:<https://doi.org/10.22490/9789586516518>
- Tourón, N., Sonnenholzner, J., & Panchana, M. (2020). Manual de cultivo integral del erizo de mar tropical (*Tripneustes depressus*). *AquaTIC*, 15-33.
- Vacquier, V. D. (2011). Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 78(8), 553-564.
- Vargas, P. (2012). El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos. (Vol. Equinodermos). Recuperado el 17 de junio de 2023, de Equinodermos
- Villalba-Villalba, A. G., Perez-Velazquez, M., González-Félix, M. L., & Maldonado-Arce, A. D. (01 de Septiembre de 2021). Fatty Acid Profile and Proximate Composition of Gonads from Wild *Echinometra vanbrunti* during an Annual Cycle: Suitability for Human Consumption. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/10498850.2021.1973636>

Yamanaka, K., Jung-Gang, W., Komagata, N., Suzuki, A., Kuwabara, R., & Hirano, R. (1989). A method of chromosome observation and karyotype in *Pseudocentrotus depressus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(9), 1456.

Zhadan, P., Vaschenko, M., & Almyashova, T. (2017). Effects of Environmental Factors on Reproduction of the Sea Urchin *Strongylocentrotus Intermedius*. En M. Agnello (Ed.), *Sea Urchin - From Environment to Aquaculture and Biomedicine*. Intech Open. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69511>

## ANEXOS



**Anexo 1** Reconocimiento de los lugares de colecta en la REMACOPSE  
**Autor:** Zambrano-Segovia 2023



**Anexo 2** Salidas de campo y extracción de los organismos.

**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023



**Anexo 3** Colecta de agua de mar en la REMACOPSE.

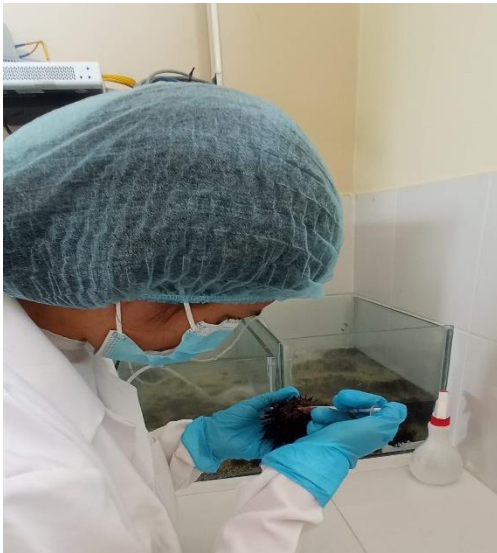
**Autor:** Zambrano-Segovia, 2023



**Anexo 4** Preparación de los reactivos  
**Autor:** Sebastián Pozo, 2023



**Anexo 5** Preparación y etiquetado previo a la obtención de gametos  
**Autor:** Nathaly Chiquito, 2023



**Anexo 6** Inducción al desove de *E. vanbrunti*  
**Autor:** Sebastian Pozo, 2022



**Anexo 7** *Echinometra vanbrunti* con el polo aboral hacia arriba.  
**Autor:** Sebastian Pozo, 2022



**Anexo 8** Seguimiento microscopico al proceso de fecundación y desarrollo embrionario de *Echinometra vanbrunti*.

**Autor:** Nathaly Chiquito, 2023



**Anexo 9** Fotografado de las células obtenidas una vez realizando el protocolo

**Autor:** Sebastián Pozo, 2023