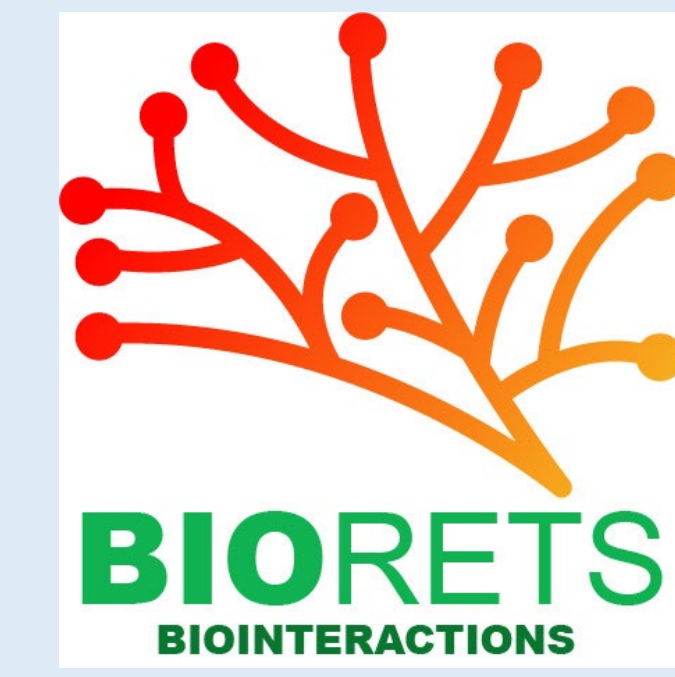


REGENERACIÓN DE TENTÁCULOS DEL PEPINOS DE MAR *HOLOTHURIA GLABERRIMA*: UNA MIRADA A SU ANATOMÍA Y A SU MATERIAL CELÓMICO



Diana Galloza Ramírez^{1,2}; Griselle Valentín², Dr. José García Arrarás²
Escuela Dr. Carlos González en Aguada¹, Departamento de Biología Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras²



Introducción

Los equinodermos son organismos importantes en los ecosistemas de arrecifes de coral y un ejemplar lo es el pepino de mar *Holothuria glaberrima*. A pesar de su morfología relativamente simple y de ser invertebrados, los equinodermos son deuterostomados, y poseen órganos y tejidos complejos, con muchas similitudes en comparación con animales cordados. Estos animales tienen capacidades asombrosas de regeneración, por lo cual se utilizan como modelo de estudio de regeneración de varios tejidos y órganos. Algunas de estas investigaciones se han encaminado en elucidar los procesos que ocurren durante la regeneración del nervio radial luego de una herida. Otras se enfocan en los procesos celulares durante la formación de un intestino nuevo luego de que el animal ha expulsado su sistema digestivo (evisceración). El enfoque principal en esta investigación es estudiar los procesos regenerativos en otro tipo de tejido del pepino de mar, los tentáculos. Inicialmente, para entender la complejidad del animal modelo, se estudiará su anatomía con especial atención a sus sistemas digestivo y nervioso, y a sus tentáculos. Además, se estudiarán las poblaciones celulares presentes en el fluido celómico, ya que estas están documentadas que tienen un rol importante en el sistema inmunológico de los equinodermos. Para llevar a cabo este estudio, se realizará una extracción del fluido celómico para identificar y comparar las poblaciones celulares. Finalmente se describirá la regeneración de tentáculos por métodos cualitativos y cuantitativos, y un análisis estadístico. Este estudio provee diferentes niveles de investigación para adaptar a la sala de clases, en donde se beneficiarán estudiantes de grados entre séptimo y duodécimo. La experiencia investigativa tiene el potencial de ser adaptada en acuerdo con la diversidad de aprendizaje de los estudiantes. Los estudiantes podrán estudiar y analizar los diferentes procesos biológicos en la investigación y exponerse a discutir sus puntos de vista y nuevas ideas para investigar, y promover un ambiente de análisis científico que los anime a involucrarse en futuras investigaciones.

Objetivos

- Anatomía del pepino de mar:** Realizar disecciones de los pepinos de mar para estudiar su estructura interna e identificar los órganos que regeneran. Se estudiará la complejidad de los órganos para hacer comparaciones con otros modelos animales, incluyendo los mamíferos.
- Análisis de celomocitos:** Se extraerán celomocitos y se dividirán para dos estudios. En el primer estudio, se teñirán células vivas con Trypan Blue para realizar conteos utilizando el hemocitómetro. Se dividirán las células observadas y contadas entre dos grupos: grandes y pequeñas. En el segundo estudio, se fijarán celomocitos en 4% paraformaldehído para tinción con Toluidine Blue. Las células teñidas con Toluidine Blue podrán ser analizadas en el microscopio para determinar cualitativamente las diferentes poblaciones celulares presentes en el fluido celómico. Se establecerá la identificación utilizando de referencia datos previamente publicados (Ramírez et al., 2007). Se realizarán conteos y medidas en diferentes etapas de regeneración para análisis estadísticos, tablas y gráficas haciendo uso de Microsoft Excel.
- Regeneración de Tentáculos:** Observaciones cualitativas y cuantitativas en la regeneración de tentáculos. Análisis comparativo de la regeneración de tentáculos de: **GRUPO 1:** Animales con todos los tentáculos amputados, **GRUPO 2:** Animales con tentáculos amputados de forma alternada, **GRUPO 3:** Animales que tiene amputados solo la mitad de los tentáculos.

Métodología

- Anatomía del pepino de mar (*Holothuria glaberrima*)**
- Tratamiento con anestesia:** Se colocaron los animales en solución anestésica por 15-20 minutos previo a la disección. La composición de la solución anestésica es la siguiente: 0.2% de anestésico disuelto en agua de mar: 1, 1, 1 – trichloro—methyl-2- propanol hydrate 98% (Sigma Aldrich 11 205-4).
 - Se procedió con la disección del animal para la observación de los órganos internos.



Tinción y análisis de celomocitos

- Extracción y preparación de celomocitos:** Se utilizaron 4 animales para la colección de fluido celómico previo a la disección. Luego cada animal fue pesado para determinar el volumen colectado y determinar si existe relación entre el peso y el volumen colectado por animal. Para cada muestra de fluido celómico por animal, se añadió el mismo volumen de agua de mar sin calcio y sin magnesio, y EDTA 30mM, para evitar que las células se aglutinarian.
- Trypan blue.** El teñir con trypan blue facilita el conteo de células viables versus el material de desechos.
- Toluidine blue.** Se preparan laminillas tratadas con poly-L-lysine con tres gotas de la suspensión de células y se teñen con solución de Toluidine blue para ser observadas en el microscopio.

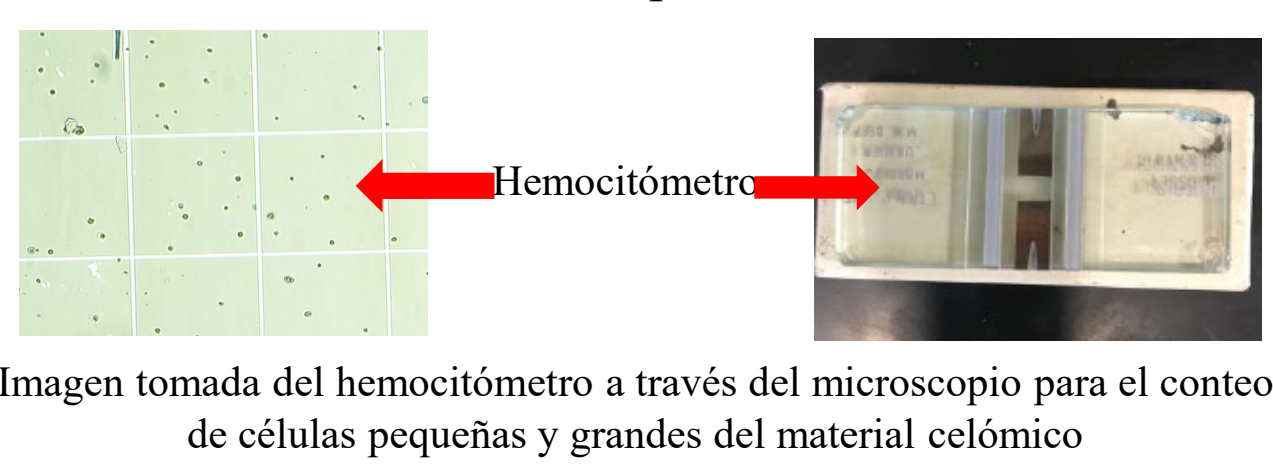
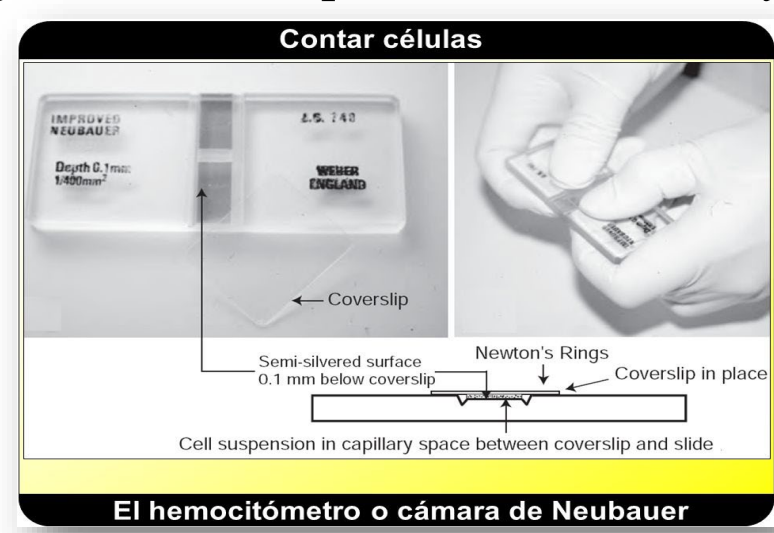


Imagen tomada del hemocitómetro a través del microscopio para el conteo de células pequeñas y grandes del material celómico



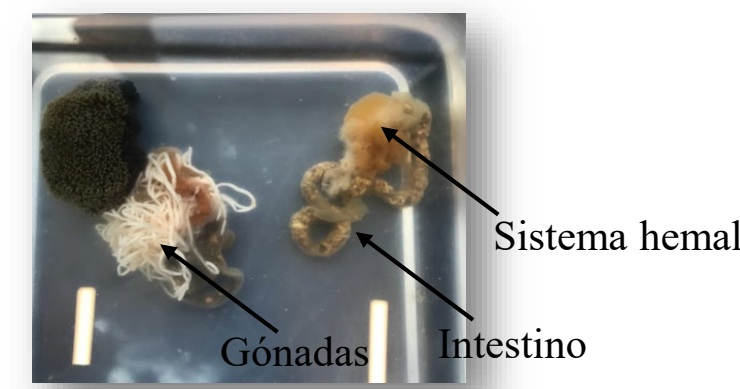
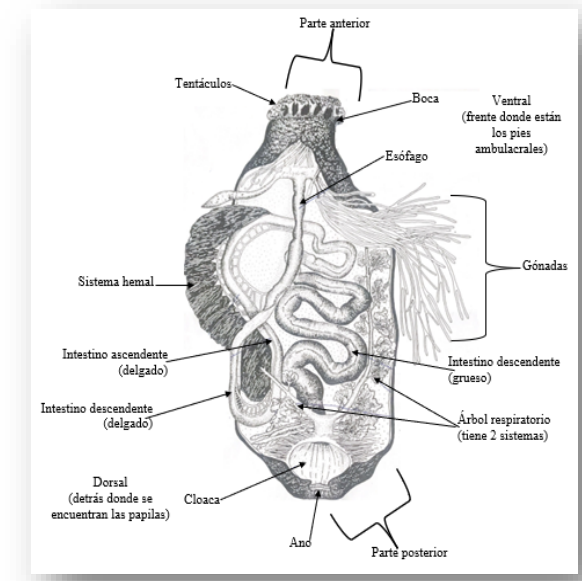
Métodos para contar células - ppt descargar (slidesplayer.es)

Regeneración de Tentáculos

- Solución para la evisceración:** Se utilizó 1mL de KCl 0.35M en agua destilada por animal, para inducir la evisceración.
- Tratamiento con anestesia:** Se colocaron los animales en solución anestésica por 15-20 minutos previo a la amputación.
- Amputación de tentáculos:** Se utilizaron 8 animales a los cuales se les amputaron los tentáculos de la siguiente manera: a un animal se le amputaron todos los tentáculos, a dos animales se les amputó la mitad de los tentáculos todos corridos, y a 5 se les amputaron la mitad de los tentáculos de manera alternada. Posteriormente se amputaron un segundo grupo de animales de la siguiente manera: a un animal se le amputaron todos los tentáculos a profundidad y a otro animal se le amputaron todos los tentáculos, pero no a profundidad, esto es, dejando muñones "stumps".

Resultados

Disección del Pepino de mar (anatomía externa e interna)

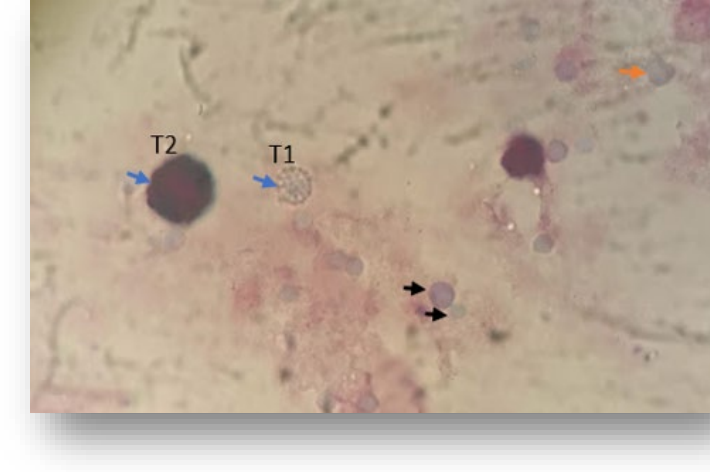


Tinción y análisis de celomocitos

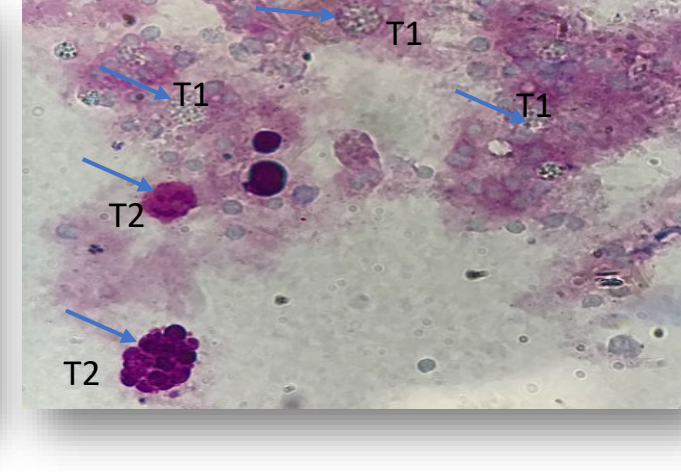
Los animales tienen diferente peso y volumen (ml) de fluido celómico, no existe una diferencia significativa en la cantidad de células que posee cada animal.

Groups	Count	Sum	Average	Variance
Grandes	16	50	3.13	3.05
Pequeñas	16	77	4.81	3.76
Grandes	16	45	2.81	2.30
Pequeñas	16	99	6.19	8.56
Grandes	16	20	1.25	1.40
Pequeñas	16	82	5.13	7.72
Grandes	16	40	2.50	2.80
Pequeñas	16	149	9.31	7.03

Células celómicas: observadas con el objetivo de 40X y teñidas con Toluidine Blue O



Células celómicas: observadas con el objetivo de aceite de inmersión (100x) y teñidas con Toluidine Blue O.



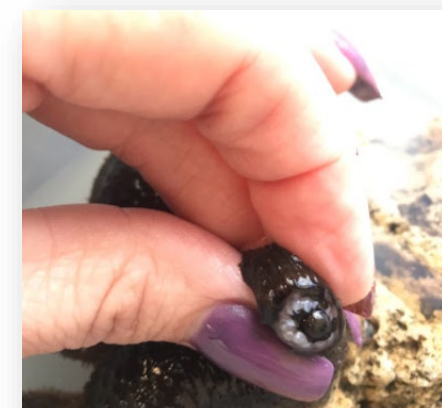
Rotulación	Descripción de imagen de células
Flechas negras	linfocitos y basófilos (purpura), neutrófilos (azul claro).
Flecha azul	Esferculocito Tipo 1 esférulas poco teñida, Tipo2 mórula esférulas coloreada.
Flecha naranja	Fagocito con forma irregular

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	731.22	7	104.4598	22.82236	2.01428E-19	2.08677028
Within Groups	549.25	120	4.577083			
Total	1280.5	127				

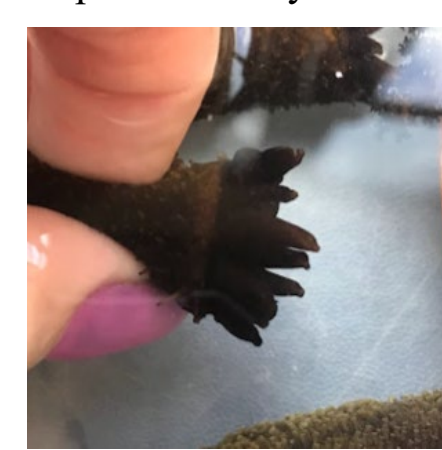
Animal	Células contadas	Peso del animal	Volumen celómico	Total, de células
1	1,116	47.324 g	20 ml	2.792 x 10 ⁷
2	972	42.427 g	13 ml	1.815 x 10 ⁷
3	1,020	37.687 g	10 ml	1.275 x 10 ⁷

Corte Completo

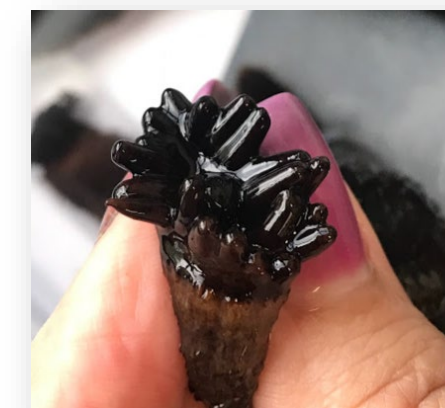
Corte de todos los tentáculos a profundidad.



Crecimiento de muñones a 11 dpa. El de mayor tamaño.



Crecimiento de muñones a 4 días-post amputación (dpa). Todos cortados.



Crecimiento de muñones a 20 dpa. Bifurcaciones incoloras animal 1.



Regeneración de Tentáculos

Corte Alterno

Crecimiento de muñones a 4 dpa. Corte alterno.



Crecimiento bifurcaciones incoloras a los 20 dpa al lado de los tres nuevos tentáculos



Corte a Mitad

Crecimiento de nuevos tentáculos a 20 dpa en animal 4.



Crecimiento de tentáculos a 41 dpa en animal 8. Bifurcaciones abundantes.



Corte a Mitad

Crecimiento de muñones a 11 dpa.



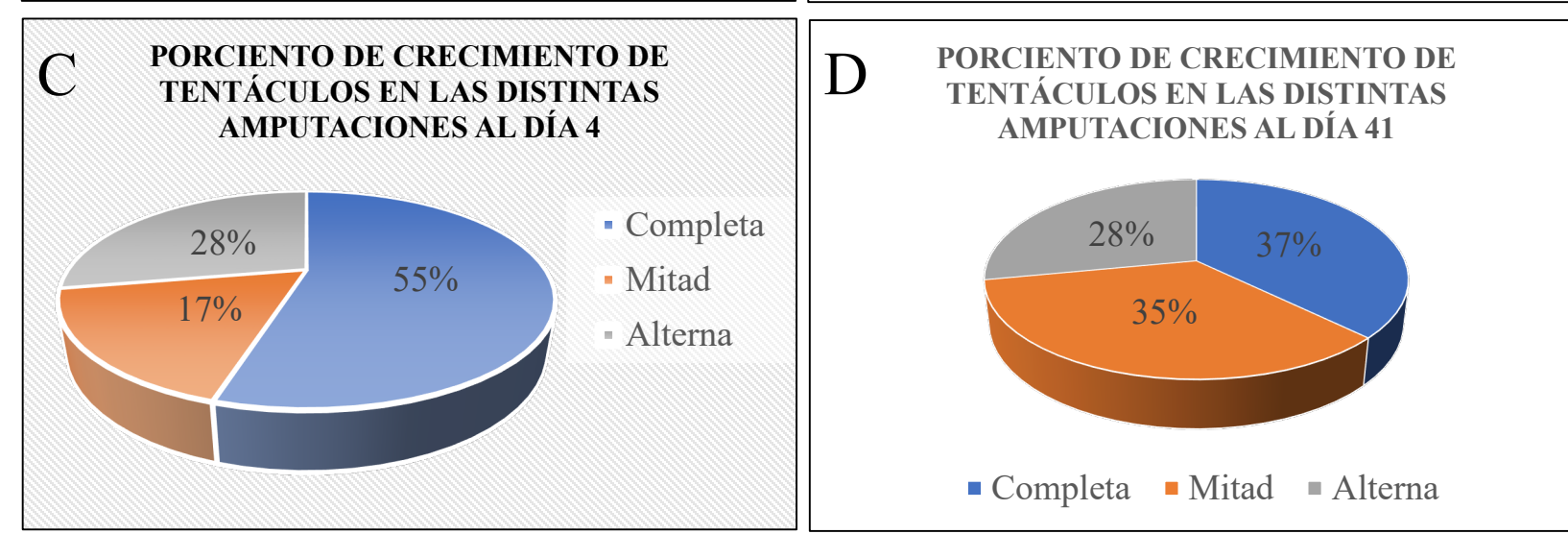
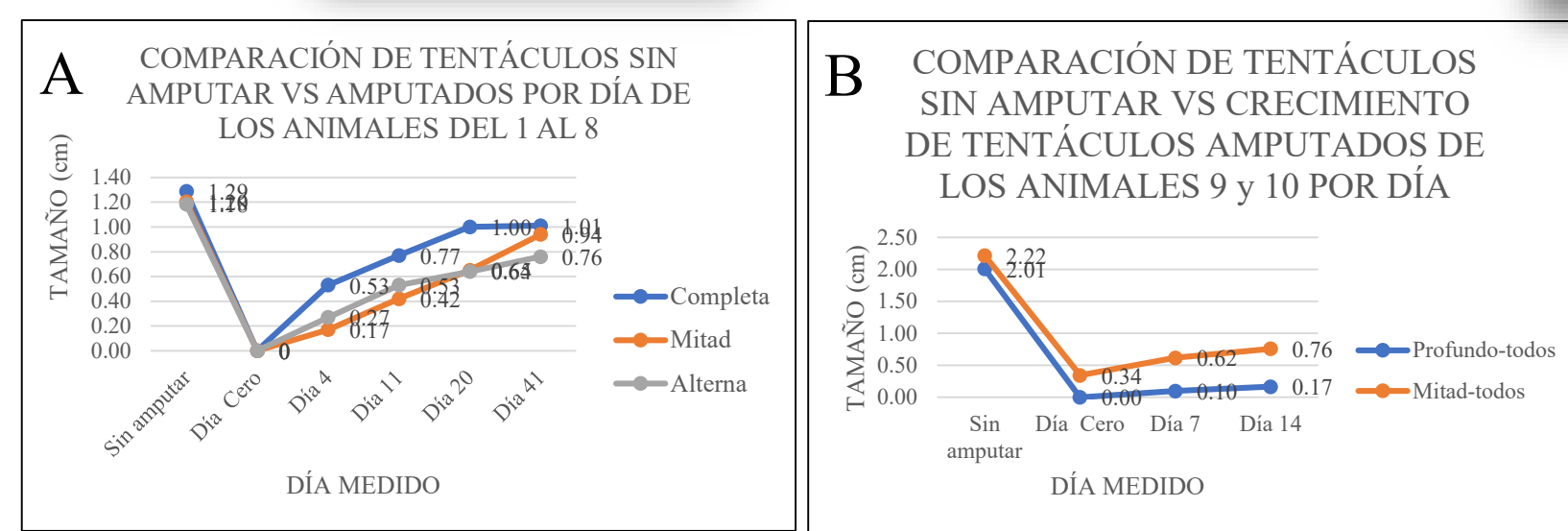
Crecimiento de nuevos tentáculos a los 20 dpa en el lado opuesto.



Crecimiento de tentáculos a 41 dpa en animal 1.

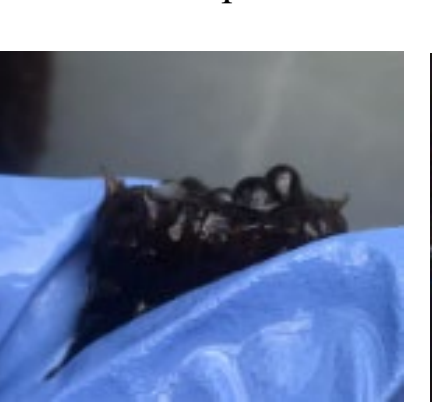


Los tentáculos nuevos del animal 8 a los 41 dpa tiene igual tamaño que los muñones con bifurcaciones incoloras.

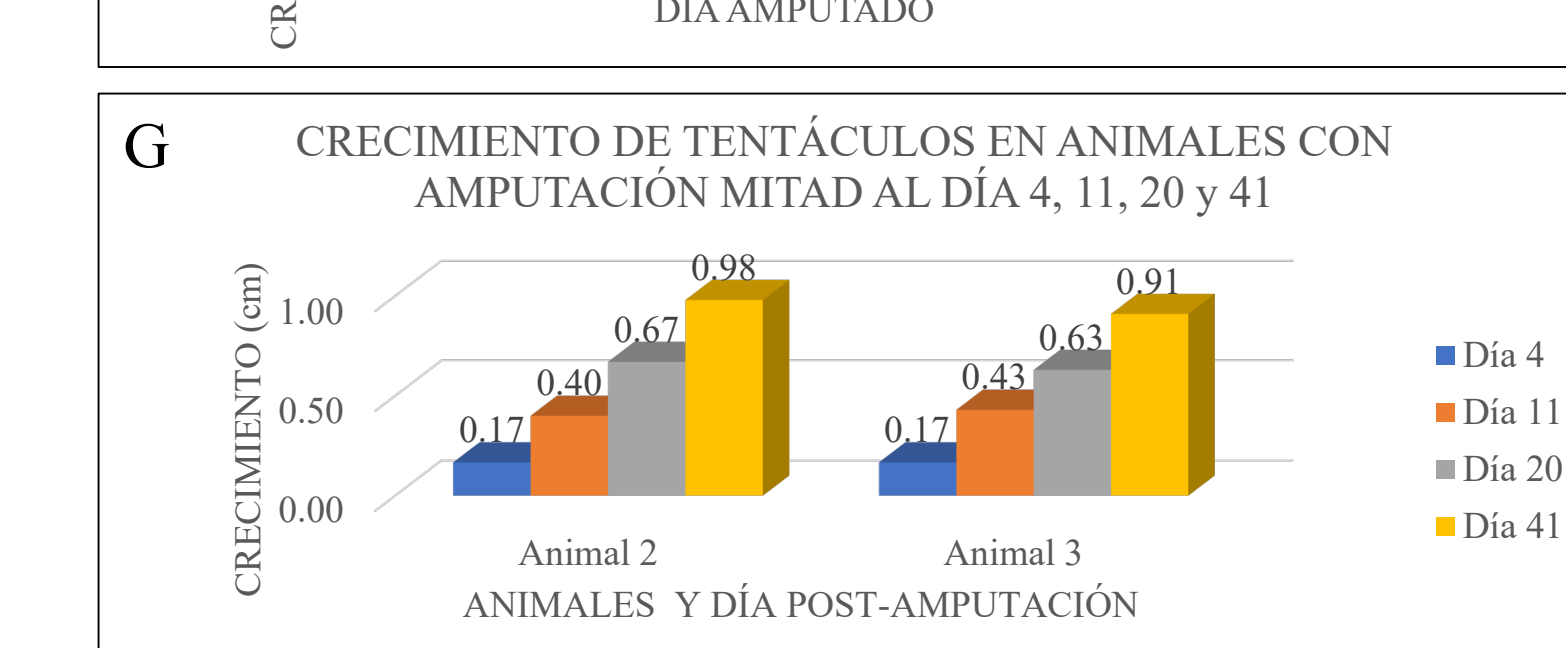
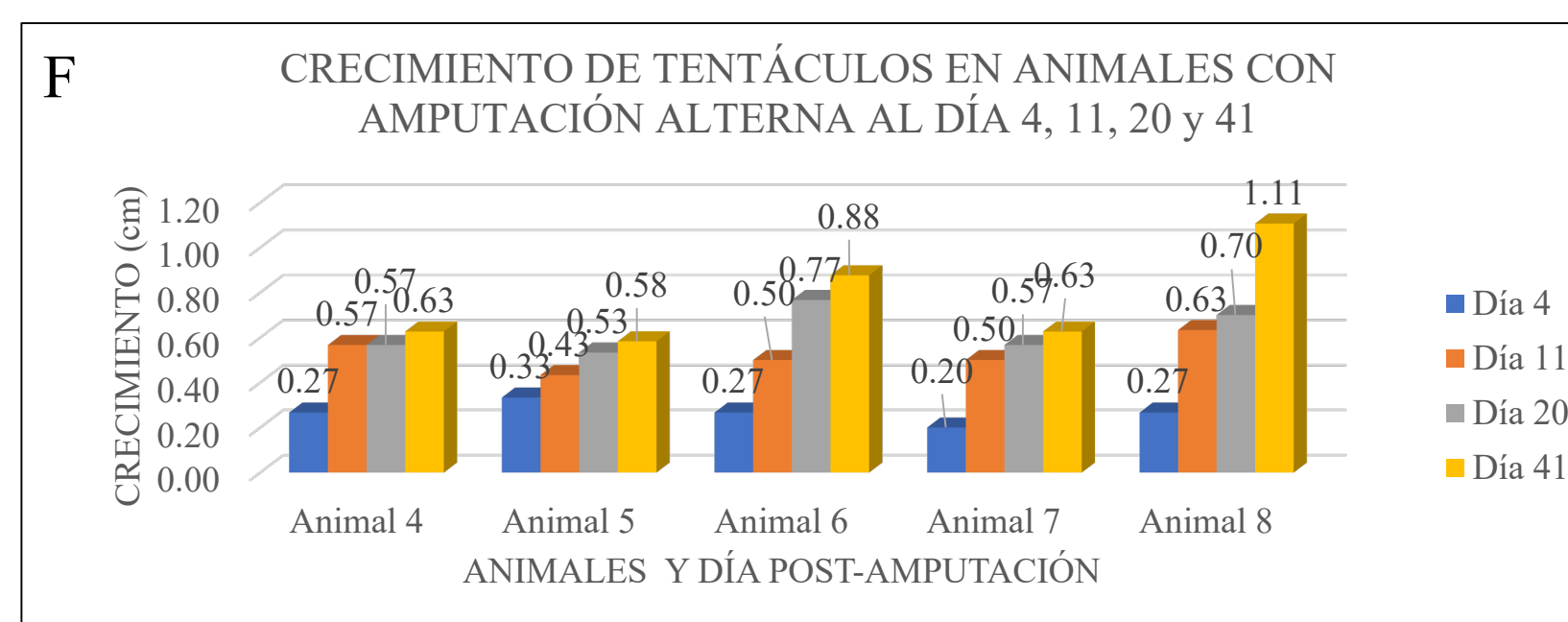
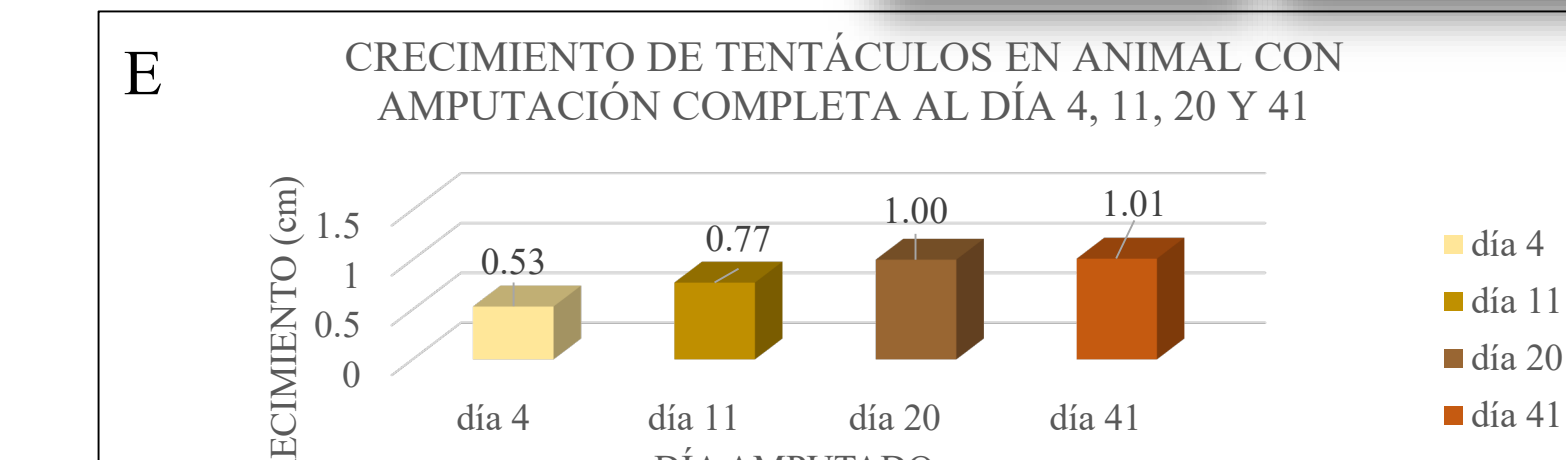


Corte Completo a nuevos animales

Crecimiento de muñones a 7 dpa A y a los 14 dpa B de del animal 9.



Crecimiento de muñones a 7 dpa del animal 10. Se observan el crecimiento de las bifurcaciones (incoloras)



Conclusiones

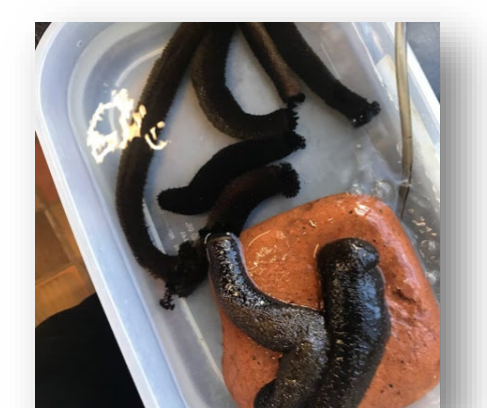
El conocer la anatomía del animal fue de gran ayuda para entender la complejidad del animal con respecto a sus órganos y tejidos. La organización interna de los órganos se puede comparar con la de otros invertebrados y con los vertebrados. Con el estudio de las células del fluido celómico se pudo observar la complejidad de estas poblaciones, y poder entender y asociarlas con las diferentes funciones del sistema inmunológico en invertebrados. El análisis cuantitativo con el hemocitómetro, determinó que no había diferencia significativa de cantidad de células por volumen ni por peso del animal. El teñir las células con Toluidine Blue permitió identificar a través del microscopio luz y el programa Image J las poblaciones celulares en el fluido celómico. Se identificaron los linfocitos y basófilos (púrpura), neutrófilos (azul claro), esferulocitos de tipo 1 y tipo 2, esférulas mórula y fagocitos, las cuales son células que podrían tener un rol importante no solo en el sistema inmunológico, sino también en la regeneración. Con respecto al estudio de regeneración de tentáculos luego de diferentes amputaciones, se determinó que los animales que pierden todos sus tentáculos comienzan a desarrollar los muñones de manera más rápida, considerando que éstos fueron los que tuvieron un crecimiento inicial mayor. El crecimiento subsiguiente no fue tan rápido como el inicial, lo cual puede deberse a que inicialmente el tejido estaba comprometido principalmente a la división celular, y posteriormente a reducir la división y comenzar la diferenciación celular, según se puede observar de manera clásica en modelos animales de regeneración de tejidos. Otra vertiente de este estudio fue la aparición de nuevos tentáculos, lo cual provee dos modelos de regeneración diferentes, ocurriendo paralelamente en un mismo animal. Estos dos modelos son: regeneración del tentáculo amputado (reparación) y aparición de tentáculos nuevos en tejido cercano a la amputación. Este estudio provee información para desarrollar estudios subsiguientes en regeneración. Se dará continuidad a la investigación realizada, dividida en diferentes módulos, de acuerdo con los objetivos que se desean implementar en el salón de clases. Se pretende proveer a los estudiantes el estímulo para el desarrollo de análisis crítico, necesario para diseñar planes de trabajo en la investigación científica. Las técnicas aprendidas en los diferentes módulos podrán ser utilizadas para el logro de los objetivos de investigación: 1) análisis cuantitativos, uso de Excel y estadísticas que provee Excel, 2) toma de fotografías científicas, observación y análisis cualitativos, y 3) preparación de soluciones para experimentos, cálculos matemáticos y cálculos para las concentraciones de los reactivos. Enfatizando que el desarrollado de esta investigación este en acuerdo con las expectativas de los grados escolares.



Animales en pecera



La flecha señala arc blanca y tejido lacerado, indicativo de que el animal podría estar enfermo. Animal 9



Los animales serán liberados a su hábitat natural

Proyección Futura

Se dará continuidad a la investigación realizada sobre la regeneración de tentáculos del pepino de mar (*Holothuria glaberrima*) a través del desarrollo del Club de Investigación DCG. Se crearán protocolos de investigación con las técnicas, métodos y destrezas aprendidas, los cuales podrán ser adaptados a otros modelos biológicos, de manera que impacte el proceso de enseñanza-aprendizaje. Este proyecto podrá ser adaptado en acuerdo con las expectativas de los grados escolares, tanto en la continuidad de la investigación, el club y los módulos creados, en cumplimiento de los estándares y expectativas del currículo escolar.

Agradecimiento

Deseo agradecer primeramente a Dios por guiarme en el camino. A mi familia por su apoyo incondicional. A la Profa. Sylvia Hernández que me motivó a participar en este proyecto. Al Dr. José E. García Arrarás por su mentoría. A la Sra. Griselle Valentín, técnica de laboratorio, por su apoyo en toda esta experiencia en investigación. A los coordinadores del equipo BIORETS por darme la oportunidad de participar del Proyecto BioInteractions. A todos los compañeros maestros que fueron parte de esta gran experiencia. A la National Science Foundation (Grant No. 2147012) por haber subvencionado parte de este trabajo.

Referencias

- Díaz Balzac, R. J. (2017). Regeneración de los tentáculos del pepino de mar *Holothuria glaberrima*, BrdU. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedra, Departamento de Biología Lab. 220.
- García-Arrarás, J. E., & Greenberg, M. J. (2001). Visceral regeneration in holothurians. *Microscopy Research and Technique*, 55(6), 438–451. <https://doi.org/10.1002/jemt.1189>
- García-Arrarás, J. E., Valentín-Tirado, G., Flores, J. E., Rosa, R. J., Rivera-Cruz, A., San Miguel-Ruiz, J. E., & Tossas, K. (2011). Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*. *BMC Developmental Biology*, 11(1), 61. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-11-61>
- Quispe-Parra, D. (2019). Biología del desarrollo: la capacidad regenerativa de *Holothuria glaberrima*. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i8.4570>
- Ramírez Gómez, F., Aponte-Rivera, F., Méndez-Castaner, L., & García-Arrarás, J. E. (2010). Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. *Fish & shellfish immunology*, 29(2), 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.03.013>
- Ramos Ramos, Z. (2012, August 28). *Tras el misterio del "pepino de mar."* Ciencia Puerto Rico. Retrieved 2022, from <https://www.cienciapr.org/es/external-news/tras-el-misterio-del-pepino-de-mar>
- Rodríguez Ramírez, I. (2019, February 11). El pepino de mar, un animal apreciado por pocos | Revista de Biología Tropical. *Portal de Revistas Académicas. Revista de Biología Tropical*, DOI 10.15517/RBT.V012.36152. Retrieved 2022, from <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/36152>
- Ruiz, F. J. (2007). *Morfomería del tubo digestivo y alimentación del pepino de mar *Athyonidium chilensis* (Semper, 1868) (Echinodermata: *Holothuridae*)*. SciELO. Retrieved 2022, from https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572007000300007
- Williams, S. M., Benavides-Serrato, M., García-Arrarás, J. E., Hernández-Delgado, E. A., & Rodríguez-Barreras, R. (2013). Review of Echinoderm research in Puerto Rico, with the Focus on Biological and Ecological Aspects. *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*, 437–469. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20051-9_14