



Efecto del Albendazol a diferentes concentraciones sobre la fecundación y segmentación temprana en *Tetrapygus niger* “erizo de mar”

Effect of Albendazole at different concentrations on fertilization and early cleavage in *Tetrapygus niger* “sea urchin”

Gina Zavaleta Espejo*, Juan Muro Morey, José Saldaña Jiménez, Willian Blas Cerdán, Lurdes Tuesta Collantes

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

Recibido 8 de agosto; Aceptado 30 de Agosto

Resumen

En la presente investigación se evaluó el efecto del Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición sobre el proceso de fecundación y segmentación temprana en *Tetrapygus niger* “erizo de mar”. Cada grupo experimental estuvo conformado por 200 mL, de agua de mar previamente filtrada a un pH 7,3 y temperatura de 20 ± 2 °C; más cinco gotas de óvulos y dos gotas de espermatozoides expuestos a diferentes concentraciones del Albendazol 400ppm; 800ppm y 1200 ppm. La determinación del efecto del Albendazol se realizó a través del recuento del número de conos de fecundación; así como del número de embriones con clivaje normal y anormal. El análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey, demostraron que existen diferencias significativas entre los tratamientos, es decir que al aumentar la concentración del Albendazol disminuye el porcentaje de fecundación y aumenta el porcentaje de embriones con clivaje anormal, por lo tanto se concluye que el Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición afecta el proceso de fecundación y segmentación temprana en *T. niger* “erizo de mar”.

Palabras clave: Albendazol, fecundación, segmentación temprana, *Tetrapygus niger*.

Abstract

In this study we evaluated the effect of Albendazole at different concentrations and exposure times on the process of fertilization and early cleavage in *Tetrapygus niger* "sea urchin". Each experimental group consisted of 200 mL, of previously filtered seawater at pH 7.3 and temperature of 20 ± 2 °C, plus five drops of eggs and two drops of spermatozoa exposed to different concentrations of Albendazole 400 ppm, 800 ppm and 1200 ppm. Determining the effect of Albendazole was conducted by counting the number of cones of fertilization, as well as the number of cleaving embryos with normal and abnormal. The ANOVA and multiple comparison test Tukey averages showed significant differences between the treatments, namely that increasing the concentration of Albendazole fertilization rate decreases and increases the percentage of embryos with abnormal cleavage, so therefore concluded that the Albendazole at different concentrations and exposure times affects the process of fertilization and early cleavage in *T. niger* "sea urchin".

Keywords: Albendazole, fertilization, early cleavage, *Tetrapygus niger*.

1. Introducción

El Albendazol es un quimioterápico que pertenece a la categoría de los antihelmínticos bencimidazólicos, pues es de reconocida eficacia contra varios parásitos del tracto gastrointestinal. Su estructura química es el 5-(propiltio)-2-

carbometoxiamino-bencimidazol. Se caracteriza por poseer una acción antiparasitaria múltiple, presentando un efecto vermícida, y ovicida frente a varias especies de nematodos, cestodos y trematodos (Donal y Ecobichon, 1997). Diversos estudios, muestran que inhibe la

* Autor para correspondencia
Email: gies20041@hotmail.com (G. Zavaleta)

polimerización de la tubulina; impidiendo de esta manera que los procesos de división celular se lleven a cabo con total normalidad. Además otra de las acciones farmacológicas del albendazol es la de inhibir a la enzima fumarato reductasa, la cual participa en la síntesis de ATP (Larrea *et al.*, 2011). Por otro lado, estudios de toxicidad constituyen hoy en día una parte muy importante dentro del desarrollo de un fármaco y tienen como objetivo evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico pueda ocasionar sobre la salud humana, cuando es objeto de exposiciones normales, agudas, crónicas o accidentales (Torrelío *et al.*, 2011). Los equinodermos son uno de los grupos taxonómicos de mayor importancia en la estructura de las comunidades marinas. Su presencia es conspicua en todos los ambientes marinos, desde la zona intermareal hasta los abismos oceánicos y desde las fuentes hidrotermales submarinas hasta las aguas polares (Astudillo *et al.*, 2005).

Todos los equinodermos son dioicos, aunque no presentan dimorfismo sexual externo, una hembra puede expulsar millones de ovocitos en un volumen de 10-20 ml; el macho expulsa los espermios en proporciones similares. Los ovocitos fecundados son oligolecíticos es decir poseen un vitelo que se presenta en forma de finas granulaciones distribuidas de manera uniforme por todo el citoplasma; además poseen segmentación holoblástica desigual que afecta a la totalidad del embrión donde las dos primeras divisiones dan lugar a blastómeros iguales que después pasarán a formar micromeras en el polo animal y macrómeras en el polo vegetal (Gilbert, 2003).

Tetrapygyus niger “erizo de mar” constituye uno de los organismos modelo, más utilizados en los estudios de fecundación y desarrollo embrionario temprano; es una especie que guarda similitud en cuanto a dichos procesos con respecto a los mamíferos. Además es un organismo muy utilizado en estudios de

biología del desarrollo; debido a la fácil obtención de sus gametos. Las etapas de desarrollo temprano pueden ser identificadas claramente y los datos obtenidos pueden ser comparados con el proceso de segmentación temprana en el hombre (Zamora y Stotz, 1993).

El uso de agentes farmacológicos, puede tornarse irracional debido a muchos factores como por ejemplo, el desconocimiento acerca de su dosificación y aplicación, debido a la automedicación por parte de las personas; así como también el exceso de la propaganda farmacéutica entre otros. Lo cual trae como consecuencia que se alteren muchos de los procesos fisiológicos reproductivos, como la fecundación, el desarrollo embrionario, mutaciones, teratogénias, abortos entre otros. No existiendo estudios acerca del Albendazol utilizado a diferentes concentraciones sobre los procesos de fecundación y segmentación temprana en erizos de mar y debido a que este organismo presenta una similitud en dichos procesos en relación con los mamíferos, resulta de vital importancia determinar el efecto del Albendazol a diferentes concentraciones sobre el proceso de fecundación y segmentación temprana en *Tetrapygyus niger* “erizo de mar”.

2. Materiales y métodos

Material Biológico

Ejemplares de *Tetrapygyus niger* “erizo de mar”.

Métodos y técnicas

Se utilizaron 40 ejemplares de *Tetrapygyus niger* “erizo de mar” cuyos pesos oscilaron entre 60 y 80 g, para asegurar la madurez sexual, los cuales fueron recolectados del rompeolas del Puerto Salaverry (La Libertad) con la ayuda de una espátula. En el laboratorio de Biología Celular y Biología de la reproducción, cada individuo se le inyectó 2 mL de KCl 0,1 N por vía oral para inducir la expulsión de gametos por los orificios del polo aboral (Gómez y Gómez, 2005).

En el presente trabajo de investigación se usó el diseño de estímulo creciente multivariante con dos sistemas experimentales I y II. El sistema experimental I se diseñó para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de Albendazol sobre el porcentaje de fecundación, los ovocitos y espermios de *T. niger* se mantuvieron por separado cada uno de ellos con diferentes concentraciones: A: 400ppm B: 800ppm C: 1200ppm, durante cinco minutos de exposición.

Posteriormente se enfrentó a los gametos de cada uno de los grupos experimentales, para que se lleve a cabo el proceso de fecundación. El sistema experimental II se acondicionó para determinar el efecto de las diferentes concentraciones en la segmentación temprana; para lo cual ambos gametos se fueron mezclados y monitoreados cada cinco minutos hasta observar un 50% de óvulos con el cono de fertilización (minuto cero), después se agregó las diferentes concentraciones del Albendazol. El sistema I y II estuvo formado por un grupo testigo y tres grupos experimentales A, B, C; cada grupo estuvo conformado por 200 mL de agua de mar previamente filtrada a un pH 7,3 y temperatura de 20 ± 2 °C; más cinco gotas de ovocitos y dos gotas de espermios. El sistema fue constantemente aireado artificialmente a razón de 10 - 20 mL/min. Cada ensayo se realizó por triplicado (Beltrán, 2000).

Se evaluó la presencia del cono de fecundación en los óvulos de *T. niger*, el cual nos indicó la realización de la fecundación y el inicio de la segmentación. A partir de este cono los diferentes grupos control y experimentales fueron monitoreados cada 10 minutos durante 120 minutos con un microscopio Olympus a 100X y 400X.

Para evaluar los efectos del Albendazol sobre la fecundación se determinó el porcentaje de óvulos que hayan formado el cono de fecundación. Para la determinar el efecto del Albendazol a diferentes

concentraciones sobre el proceso de segmentación temprana, se evaluó el porcentaje de embriones con segmentación normal y anormal a los 120 minutos de exposición. Se realizó un Análisis de Varianza y la prueba de Tukey, considerando un $p < 0,05$ (Steel y Torrie, 1993).

3. Resultados y discusión

Al evaluar el efecto del Albendazol a diferentes concentraciones de exposición sobre el porcentaje de fecundación y segmentación temprana en *Tetrapygus niger* “erizo de mar”, se encontraron los siguientes resultados. En la Tabla 1, se presentan los valores promedios del porcentaje de fecundación de ovocitos a los diferentes tratamientos. Observándose que el porcentaje de fecundación disminuye; conforme se incrementan las concentraciones del fármaco, de acuerdo con los diferentes tiempos de exposición.

En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de embriones tempranos de *T. niger* “erizos de mar” con clivaje normal y anormal a las diferentes concentraciones y 120 minutos de exposición del Albendazol, observándose que a medida que aumenta la concentración el porcentaje de embriones con clivaje normal va disminuyendo, relacionándose directamente con el porcentaje de fecundación. En la Figura 1 se muestran las imágenes del proceso de fecundación con la formación del cono de fecundación en *T. niger* en el grupo control a los 20 minutos de exposición del Albendazol. En la Figura 2 se muestra un embrión de erizo de mar en el grupo control con una segmentación normal mostrándose embriones con 2 y 4 blastómeras a 60 minutos de exposición del Albendazol.

En las figura 3 y 4 se muestran embriones con un clivaje anormal evidenciándose un embrión con blastómeras disgregadas y mal compactadas a concentraciones de 400 y 800 ppm, a los tiempo de 60 y 120 minutos.

Tabla 1

Promedio del porcentaje de fecundación de ovocitos en *Tretapygus niger* “erizo de mar” expuestos a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición del Albendazol

Concen- tración	Tiempo (min)											
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
0 ppm	26,33	42,29	43,92	62,77	68,49	63,29	26,98	58,81	52,94	35,20	48,72	52,31
400 ppm	41,17	53,33	25,60	26,46	14,70	67,00	71,67	65,96	38,89	56,30	9,48	38,45
800 ppm	28,79	42,86	22,73	30,56	59,72	38,27	14,79	0,00	5,56	41,93	29,40	6,95
1200 ppm	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tretapygus niger “erizo de mar” es un organismo que comúnmente es utilizado para investigaciones científicas que implican procesos reproductivos, sobre todo en temas que abarcan estudios o evaluaciones en el proceso de fertilización, debido a que esta especie presenta, a nivel celular y molecular, una gran similitud con los procesos reproductivos en mamíferos y por ende con el ser humano. El cono de fecundación observado en el ovulo de *T. niger* (Figura 1) nos permitió evaluar el efecto del Albendazol en el proceso de la fecundación; estos gametos al igual que la mayoría de los vertebrados siguen un patrón semejante en el proceso de la fecundación (Karp, 1998).

La fecundación se inicia cuando la cabeza del espermio entra en contacto con la cubierta gelatinosa rica en sulfato de mucosa que en cuestión de segundos induce una reacción en el acrosoma del espermio provocando la despolarización de la membrana por la abertura de canales de calcio (Gilbert, 2003).

Al evaluar el porcentaje de fecundación de óvulos en *T. niger* “erizo de mar” expuestos a las diferentes concentraciones y tiempos de exposición del Albendazol, se hallaron que los porcentajes fueron disminuyendo conforme aumentaron las concentraciones del fármaco, lo cual se debería probablemente a la influencia de éste, así como también a los factores ambientales como la temperatura y que juega un papel muy importante en este proceso.

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los diferentes tratamientos con el

Albendazol (Tabla 1) se observa que los valores van disminuyendo conforme se incrementan las concentraciones, hasta alcanzar un valor de 0 % a la concentración de 1200 ppm a los 10 minutos de exposición. Esta disminución en el porcentaje de fecundación a partir de la concentración de 800 ppm, se debería a que probablemente, el movimiento de los espermatozoides son inhibidos por acción de este fármaco, ya que una de sus acciones es inhibir la enzima fumarato reductasa; la cual participa activamente en la síntesis de ATP, fuente de energía indispensable para que la célula pueda llevar a cabo sus múltiples funciones, entre ellas la hiperactivación del espermatozoide (Doig, 1992).

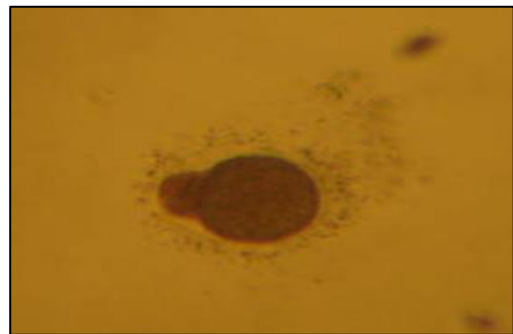


Figura 1. Ovulo fecundado de *T. niger* “erizo de mar”, mostrando el cono de fecundación, expuestos a 20 minutos y 0 ppm del Albendazol (40X).

Por otro lado el albendazol también competiría con algunos receptores de la membrana celular del espermio, encargados de activar a cierto tipo de proteínas G,

conocidas como las Rho – cinasa; que juegan un rol esencial en las vías de transducción de señales, encargados de la hiperactivación del espermio y el reconocimiento celular entre ovocito y espermatozoide (Paniagua, 2003). Al verse inhibido el proceso de hiperactivación, el desplazamiento del espermatozoide hacia el ovocito se dificultaría, esto sería una de las causas del bajo y nulo porcentaje de fecundación hallados a las concentraciones de 800 y 1200 ppm respectivamente (Tabla 1).

Esta disminución del porcentaje de fecundación en los diferentes tratamientos, se debería probablemente, a que eventos moleculares que normalmente ocurren durante dicho proceso como la reacción acrosomal, que lleva a la formación del tubo acrosomal y que hace posible que el espermio atraviese la capa gelatinosa del ovocito, el cambio en el potencial de membrana que impide la polispermia, el aumento en la concentración del Ca^{2+} citosólico, exocitosis de los gránulos corticales, y la disminución del pH extracelular, se vean seriamente alterados, debido a que, la Rho-cinasa se encarga de regular todos los procesos antes mencionado (Gilbert, 2003).

Tabla 2

Porcentaje de embriones de *T. niger* “erizos de mar” con clivaje normal y anormal expuestos a las diferentes concentraciones y 120 minutos de exposición del Albendazol

Concentra- ciones	Porcentaje de embriones	
	Clivaje normal	Clivaje anormal
0 ppm	65,00	35,00
400 ppm	26,31	73,68
800 ppm	5,58	94,11
1200 ppm	0	100

Al analizar los resultados obtenidos del porcentajes de segmentación con clivaje normal y anormal observamos que a medida que aumentan las concentraciones el porcentaje de embriones con un clivaje normal va disminuyendo con respecto a los

embriones con clivaje anormal en los cuales observamos un aumento del 100 % a la concentración de 1200 ppm a los 120 minutos de exposición del Albendazol (Tabla 2).

Así también observamos en las figuras 3 y 4 embriones con una segmentación anormal en donde apreciamos una disgregación de blastómeras a 800 y 1200 ppm y 120 minutos de exposición del Albendazol, respectivamente.

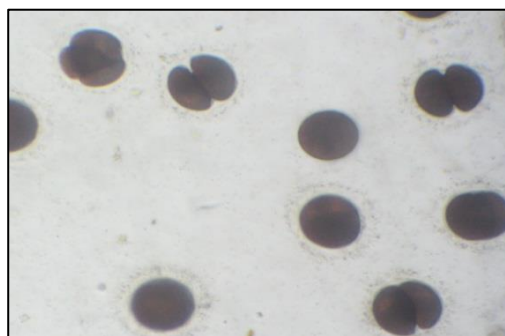


Figura 2. Embriones en proceso de segmentación de *T. niger*, con clivaje normal a 0 ppm de Albendazol y 60 minutos (40X).



Figura 3. Embrión de *T. niger* con clivaje anormal, blastómeras disgregadas, a 400 ppm de Albendazol y 120 minutos (40x).

El clivaje anormal con las blastómeras disgregadas, podría ser debido a la falta de adhesión celular, ya el albendazol estaría interfiriendo este proceso celular, alterando el normal funcionamiento de las cadherinas, cateninas, etc. dependientes del ión calcio.

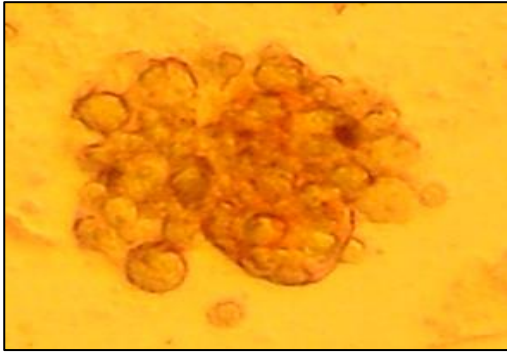


Figura 4. Embrión de *T. niger* con clivaje anormal, blastómeras disgregadas, a 800 ppm de Albendazol y 120 minutos (40x).

En cuanto al grupo control (Figura 2), se pudo observar que en porcentaje de embriones con clivaje normal es alto no presentando alteraciones en cuanto a la adherencia y forma celular. Por otro lado, este fármaco al interferir con la acción reguladora, de la proteína Rho, la que actúa a manera de un “interruptor molecular”, la cual desencadena entre otros procesos, la polimerización de los filamentos de actina, lo cual resulta esencial en la formación del citoesqueleto, por lo tanto al ser alterada esta proteína por el albendazol, estaría alterando la adherencia celular (Doig, 1992; De Robertis et al., 1997).

4. Conclusiones

El Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición afecta el proceso de fecundación y altera la segmentación temprana en *Tetrapygnus niger* “erizo de mar”. El Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición disminuyen el porcentaje de fecundación *Tetrapygnus niger* “erizo de mar”. El Albendazol a diferentes concentraciones y tiempos de exposición alteran el proceso de segmentación temprana en *Tetrapygnus niger* “erizo de mar”, obteniéndose embriones con blastómeras disgregada.

Referencias Bibliográficas

- Astudillo, D.; Rosas, J.; Velásquez, A.; Cabrera, T.; Maneiro, C. 2005. Crecimiento y supervivencia de larvas de *Echinometra lucunter* (Echinoidea: Echinometridae) alimentadas con las microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana*. *Rev. Biol. Trop.* 53: 377-344.
- Beltrán, R. 2000. Efectos de la piridina irradiada con Láser Ultravioleta (337nm) en la fecundación y segmentación temprana de *Tetrapygnus niger* L. Trabajo de habilitación para promoción docente de profesor auxiliar a profesor asociado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- De Robertis, E.; Hib, J.; Ponzio, R. 1997. *Biología Celular y Molecular*. 12ava edic. Buenos Aires, El Ateneo.
- Doig, D. 1992. Aspectos celulares y moleculares de la fecundación in vitro de erizo de mar. Trabajo de capacitación para obtener el título de Biólogo, Universidad Nacional de Trujillo.
- Donal, J.; Ecobichon, E. 1997. *The Basis of Toxicity Testing*. 2ª Edición- CRC Press, ISBN 0-8493-8554-7. Disponible en <http://www.iqb.es/basicas/farma/farma05/tox/tox01.htm>.
- Gilbert, F. 2003. *Biología del desarrollo*. Editorial panamericana. 7ma edición. Pág. 197-246.
- Gómez, M.; Gómez, G. 2005. Desarrollo embrionario y larval de *Lyttechinus variegatus* (echinoidea: toxopneustidae) en condiciones de laboratorio en la Isla de Margarita-Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53: 313-318.
- Karp, G. 1998. *Biología Celular y Molecular*. Edit McGraw-Hill Interamericana, México.
- Larrea, N.; Torres, F.; Tello, M.; Gutiérrez, E. 2011. Efecto de la administración de albendazol en los niveles de hemoglobina entre ocho y doce años con enterobiosis intestinal. *Revista Peruana de Epidemiología* 15: 1-4.
- Paniagua, R. 2003. *Biología Celular* 2º ed. Editorial Mc. Graw-Hill. Madrid – España.
- Steel, R.; Torrie, J. 1993. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da edición. Editorial Mc. Graw Hill S.A. México.
- Torrelío, A.; Vño, L.; Mamani-Linares, W.; Loza, M. 2011. Determinación de la eficiencia antihelmíntica del Albendazol y Febendazol en *Moniezia expansa* (Rudolphi 1810) & *Thysanosoma actinioides* (Diensing 1834) (Castoda: Anoplocephalidae) en ovinos criollos infectados naturalmente en una estancia da la comunidad de Comanche, Provincia Pacajes Departamento de La Paz, Bolivia. *Journal of the Selva Andina Research Society* 2(1): 2 – 16.
- Zamora, S.; Stotz, W. 1993. Ciclo reproductivo de *Tetrapygnus niger* (Echinodermata: Echinoidea) en los localidades de la IV Región, Coquimbo, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 66: 155-169.