



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros

**“Efecto del ácido retinoico y 1-metiladenina en la
regeneración de la estrella de mar *Linckia guildinguii*
(Gray 1840)”**

TESIS

Que para obtener el título de:

**MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y
COSTEROS**

P R E S E N T A:

Biol. Mar. Giovanna Berenice Gómez Camacho

Director:

Dr. Rodrigo Cuervo González

Tuxpan, Veracruz.

2017

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz; a Noviembre 2016

El presente proyecto titulado “**Efecto del ácido retinoico y 1-metiladenina en la regeneración de la estrella de mar *Linckia guildinguii* (Gray 1840)**” realizado por la c. Biol. Mar. Giovanna B. Gómez Camacho, bajo la dirección del Dr. Rodrigo Cuervo González ha sido aprobada y aceptada para poder llevar a cabo la solicitud de fecha de examen para obtener el grado de:

MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS

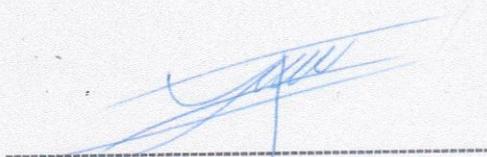


Dr. Rodrigo Cuervo González

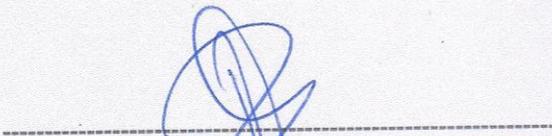
DIRECTOR

La presente tesis titulada “Efecto del ácido retinoico y 1-metiladenina en la regeneración de la estrella de mar *Linckia guildingui* (Gray 1840)”, realizada por la C. Biol. Mar. Giovanna B. Gómez Camacho, bajo la dirección del Dr. Rodrigo Cuervo González, ha sido revisada y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

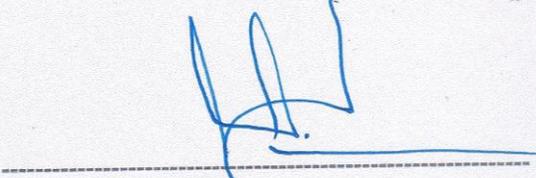
MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS



Dr. Javier Aguilar Fuentes



Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera



Dr. Carlos González Gándara

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver. Noviembre 2016.

DEDICATORIA

A mis padres:

Quienes me inculcaron amor y respeto, por el apoyo incondicional que pusieron sobre mis manos, que con su comprensión y consejos supieron de hacerme una persona de bien y gracias a ellos una de mis metas más anheladas he logrado, es para ellos está presente ya que sin su ayuda nunca hubiese logrado este sueño.

A mis abuelos:

Por estar siempre a mi lado, por ser las personas más queridas y las que siempre me llenaran de confort y de consejos cuando me enfrente obstáculos.

A mis hermanos:

Mis pupilos y los que me dan la fuerza para salir adelante, y ser mi motor de cada día.

A mi esposo:

Porque querer es poder, y atrás de todo buen hombre hay una buena mujer, me alegra ser tu apoyo en todo momento, y sencillamente hoy me toca a mí dedicarte el fruto de tanto esfuerzo, y de todas las cosas buenas que has hecho por mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia:

Por las innumerables palabras de apoyo incondicional, así como su más sincero amor, y nunca dejarme sola, este logro también es para ellos.

A mi director: Dr. Rodrigo Cuervo González

Por su ayuda y por compartir todos sus conocimientos conmigo, por ser más que mi maestro un amigo, le agradezco la confianza y los sabios consejos, así como su valioso apoyo a la realización de este proyecto y facilitarme todo lo necesario para culminar con éxito.

A mi comisión lectora: Dr. Carlos Gándara, Dra. Rosa Idalia y Dr. Javier Aguilar

Gracias por el apoyo y tiempo brindado a la realización de este manuscrito, por las inmensas correcciones tan acertadas para mejorar la calidad, y sobre todo por los valiosos consejos brindados en todo momento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca No. 634016, apoyo que fue utilizado para estudiar la Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros.

Al departamento de Desarrollo Académico por el apoyo otorgado para la consolidación del cuerpo académico Ecosistemas Costeros

A mis compañeros: Shazel, Bianca, Alex y Fabi

Gracias por su apoyo en los muestreos, sin su gran ayuda este trabajo no se hubiese realizado, me voy muy agradecida con ustedes por permitir compartir muchas conversaciones muy amenas y sobre todo brindarme su amistad, éxito en todo lo que realicen.

A mis amigos: Lily, Abraham, Neto, Luis y Ozzy

Chicos, les deseo lo mejor hoy y siempre, espero que en algún momento nos volvamos a encontrar y que la amistad aun perdure, gracias por sus infinitas conversaciones así como por las aportaciones en cada clase y por su gran sentido de humor. A ti Arturo gracias por los ánimos cuando el trabajo era agotador, y por el invaluable apoyo durante todo este tiempo, de todo corazón gracias por tu amistad y el cariño brindado en cada momento, es un placer haberte conocido y te deseo todo el éxito del mundo.

Y a todas aquellas personas que me apoyaron en este camino y no ven reflejado su nombre en estas líneas, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	5
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	33
APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO.....	35
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXO 1.....	43
ANEXO 2.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Representación de las distintas metodologías.....	12
Fig. 2 Representación de los tratamientos realizados.....	15
Fig.3 Brazos de <i>L. guildinguii</i> con gónadas.....	17
Fig. 4 Espermatozoides de <i>L. guildinguii</i>	18
Fig. 5 Corte histológico de un brazo de <i>L. guildinguii</i> con gónadas de macho.....	19
Fig. 6 Relación entre la presencia de gónadas y las tallas de los individuos.....	19
Fig. 7. Brazos de <i>L. guildinguii</i> en proceso de regeneración a diferentes tiempo.....	20
Fig. 8 Brazos regenerando a las cuatro semanas post-amputación.....	20
Fig. 9 Corte longitudinal de <i>L. guildinguii</i> a las ocho semanas de regeneración.....	21
Fig. 10 Regeneración a las 12 semanas.....	22
Fig. 11 Proceso de regeneración a las 16 semanas.....	22
Fig. 12 Brazo en proceso de regeneración a las 20 semanas.....	23
Fig.13 Brazos de <i>L. guildinguii</i> tratadas con 1-metiladenina.....	24
Fig.14 Brazos de <i>L. guildinguii</i> tratada con ácido retinoico.....	25
Fig. 15 Individuos tratados con ácido retinoico a diferentes concentraciones.....	25
Fig. 16 Brazo en proceso de regeneración tratados con el agonista β 2.....	26

RESUMEN

Con el fin de contribuir al conocimiento sobre la biología reproductiva y aspectos involucrados en el desarrollo y regeneración de la estrella de mar *L. guildingui* se realizó el presente trabajo. Se obtuvieron un total de 103 individuos durante un año de colecta, de los cuales 15 fueron machos de entre 3 a 8.1 cm de longitud y el resto fueron organismos sin gónadas. De acuerdo con la prueba de Wilcoxon se determinó que no existe diferencias significativas entre las tallas de los individuos y la presencia o ausencia de gónadas ($W = 443.5$, $p\text{-value} = 0.2437$). El proceso regenerativo al que fueron sometidos durante cinco meses reveló que esta especie no presenta desarrollo gonadal durante la formación de nuevos individuos, y tras ser tratados con 1-metiladenina tampoco desarrollaron gónadas ni fueron capaces de expulsar gametos. Al menos para la zona arrecifal estudiada la reproducción asexual es la más exitosa para esta especie. Los individuos tratados con ácido retinoico tampoco desarrollaron gónadas así como tampoco modificó la morfología de estos mismos. Sin embargo los organismos en proceso de regeneración si reaccionaron al ser tratados con una molécula sintética agonista del receptor de ácido retinoico $\beta 2$ ($RAR\beta 2$) produciendo dos individuos simétricos en el sitio de regeneración en lugar de uno que es lo normal. Este efecto es denominado duplicación en espejo y es la primera vez que se observa en un organismo invertebrado. En definitiva las estrellas de mar son un motivo de

estudio para la comprensión de la reproducción asexual así como las alteraciones durante el proceso de regeneración.

Palabras claves: Regeneración, gónadas, *Linckia guildingii*, 1-metiladenina, ácido retinoico, RAR β 2.

INTRODUCCIÓN

Los equinodermos son invertebrados de gran importancia en los ecosistemas marinos ya que han sido considerados como agentes organizadores en función de su actividad depredadora y por su intervención en el proceso de bioerosión, lo cual es importante para el reciclamiento del carbonato de calcio. Se caracterizan por poseer una simetría pentarradial, un esqueleto de carbonato de calcio (calcita) compuesto por placas intradérmicas independientes y articuladas o espículas calcáreas, y un sistema vascular acuífero único que regula la alimentación, locomoción y otras funciones (Brusca y Brusca, 1990; Cintra, 2001; Pawson, 2007). Se estima que existen unas 7,000 especies las cuales se clasifican en cinco clases: *Asteroidea* (estrellas de mar), *Ophiuroidea* (ofiuras o estrellas serpiente), *Echinoidea* (erizos y galletas de mar), *Holothuroidea* (pepinos de mar) y *Crinoidea* (lirios y plumas de mar) (Brusca y Brusca, 1990).

La extensión litoral de México y su gran sinfín de hábitats han permitido la existencia de 643 especies de equinodermos, aproximadamente el 10% del total mundial. En la actualidad se tiene un registro de 522 especies en el Golfo de México, lo cual denota una diversidad relativamente alta. Para el estado de Veracruz se reportan 100 especies de equinodermos, las cuales aproximadamente el 50% se encuentran en los sistemas arrecifales del centro de Veracruz (Solís-Marín y Laguarda-Figuera, 2011; Solís-Marín *et al.*, 2014).

En general, las estrellas de mar son dioicas y presentan un par de gónadas en cada brazo, los órganos genitales son sencillos y la fecundación es externa, sin

embargo varios equinodermos se reproducen normalmente de manera asexual (Barnes y Ruppert, 1996). La reproducción de las estrellas de mar está controlado por el sistema nervioso, y la mayoría de los equinodermos presentan un sistema hiponeural muy disperso ya que las neuronas son al mismo tiempo secretoras de hormonas que provocan la maduración sexual de los individuos y desencadenan la puesta (Giese, Pearse y Pearse, 1991).

El desove y la fecundación de los óvulos ocurren como parte de una serie de acontecimientos interconectados, impulsados por una hormona que se encarga de madurar los ovocitos; para que se lleve a cabo el desove, los estímulos externos son emitidos por las funciones fisiológicas del sistema nervioso, probablemente los nervios radiales integran las señales ambientales controlando el estímulo de los órganos internos (Giese, Pearse y Pearse, 1991). Las estrellas de mar poseen una hormona peptídica que es secretada por el tejido nervioso en época de reproducción, hasta ahora es la única hormona conocida funcionalmente análoga a la gonadotropina en los vertebrados (Mita *et al.* 2013; Mita *et al.* 2014). La reanudación de la meiosis y la maduración de los ovocitos se desencadena a causa de la 1-metiladenina (1-MeAde), que es producida en las células del folículo ovárico, la acción de 1-metiladenina en las estrellas de mar es actuar sobre la superficie externa del ovocito para provocar un conjunto particular de respuestas intracelulares (Jaffe *et al.* 1993; Mita, 2014). Sin embargo, y como se menciona anteriormente varios *asteroideos* presentan una reproducción asexual de los cuales sólo seis especies poseen la característica de reproducirse por autotomía, de esta forma se puede regenerar la parte perdida e incluso formar un nuevo organismo completo (Mladenov *et al.*, 1989; Barnes y Ruppert, 1996).

La regeneración es un fenómeno comúnmente utilizado para reconstruir partes externas brazos, apéndices, como las espinas o pedicelarios y órganos internos como los intestinos (Edmonson, 1935; Barnes y Ruppert, 1996); sin embargo la regeneración puede ser mediante dos procesos, el primero denominado epimorfosis que se caracteriza por la formación de una estructura denominada blastema y el segundo llamado morfálaxis que consiste en la sustitución de la parte perdida por remodelación del tejido restante (Rinkevich y Rinkevich, 2013).

Esta condición, en donde las estrellas de mar regeneran la mayoría de sus órganos, les permite tener un alto potencial de supervivencia y éxito reproductivo, ya que la regeneración es un fenómeno esencial en el ciclo de vida (Candia-Carnevali 2006; Kondo y Akasaka, 2010).

Se sabe que muchos organismos que se reproducen por regeneración dejan de hacerlo mediante gametos y suele haber ausencia de alguno género (macho o hembra) (Strenberg y Saura, 2009). La estrella *Linckia guildinguii* ha sido descrita como una estrella de mar, con un pequeño disco, y normalmente con cinco brazos largos, cilíndricos y de punta roma, estos son fácilmente desprendibles, se han localizado estrellas con 2 o 7 brazos, esta especie se distribuye en aguas tropicales de Florida hasta Brasil, y desde las Islas Bahamas hasta el Caribe Mexicano; en numerosas islas del Caribe y complejos arrecifales de la parte suroeste del Golfo de México, a excepción de la zona oriental del Pacífico. Se trata de una estrella de mar de aguas poco profundas, pero se ha encontrado a una profundidad de más de 100 metros (Downey, 1973; Clark y Downey 1992). Su reproducción asexual es la forma más dominante, en donde involucra la separación voluntaria de los brazos para formar un nuevo individuo (conocido

como autotomía), el nuevo individuo tiene una composición genética idéntica al original (Stropes, 2003).

El ácido retinoico (AR) es un morfógeno derivado de la vitamina A que regula la proliferación, diferenciación celular y que en altas o bajas concentraciones durante la embriogénesis causa malformaciones, dicha función del AR se lleva a cabo a través de la unión de los receptores del ácido retinoico (RAR) la cual regula la transcripción de genes específico (Escriva *et al.*, 2002). Durante el desarrollo embrionario los retinoides actúan como un importante morfógeno, participando en la regulación de diversos procesos biológicos, tales como regionalización antero-posterior y la diferenciación, así como la especificación del destino celular (Maden, 2002; Ting *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Además de su papel en la regionalización y organogénesis, investigaciones recientes han indicado que el ácido retinoico (AR) desempeña un papel esencial durante la regeneración de los tejidos dañados (Maden y Hind, 2003) y aunque el papel del AR es variado y diverso, se conserva en una gran variedad de vertebrados e invertebrados (Brockes, 1997; Maden, 1998; Kikuchi *et al.*, 2011).

Por todo lo mencionado anteriormente, este trabajo tiene como finalidad ampliar los conocimientos sobre el mecanismo regenerativo así, como la capacidad de los nuevos individuos de *L. guildinguii* para reproducirse de manera sexual mediante el uso de hormonas, ácido retinoico y sus derivados. A pesar de que se sabe que el ácido retinoico y sus derivados son parte esencial en la reproducción, gametogénesis y regeneración en diversos invertebrados, son pocas las investigaciones que se conocen en estrellas de mar.

ANTECEDENTES

Por su relación filogenética cercana a los vertebrados y sus capacidades regenerativas, los equinodermos son un atractivo modelo para determinar cuáles son los procesos celulares y moleculares que se requieren para lograr una regeneración así como entender el origen evolutivo de la regeneración en los deuterostomados (García y Domaltov, 2010). Yokoyama y Amaral (2010) mencionan que la regeneración no es un proceso aislado en el ciclo de vida de los equinodermos; si no que está presente de manera significativa en las poblaciones estudiadas en su hábitat natural, donde existen diversos factores como depredación y el oleaje. Sin embargo, se ha comprobado que diferentes especies de asteroideos tienen distintas capacidades de regeneración para reconstruir un individuo completo, como es el caso de *Echinaster sepositus* es necesario como mínimo la mitad del disco, *Astropecten* las tres cuartas partes con el madreporito, y *Marthasterias glacialis* el disco completo (King, 1900). Las estrellas de mar tienen muy desarrollada la facultad de regeneración: los brazos fraccionados experimentalmente o por autotomía son reemplazados rápidamente por otros que genera el propio disco, a pesar de eso, un brazo aislado cicatriza su herida y permanece vivo durante algunas semanas, pero acaba por morir al agotar sus reservas, sin embargo hay una excepción a esto último, constituido por el género *Linckia*, cuyos brazos aislados regeneran el disco y los cuatro brazos restantes formando un nuevo individuo (Edmonson, 1935; Hyman, 1955).

En el caso de *L. guildinguii*, este proceso regenerativo es completado a las cinco semanas después de la amputación, sin embargo durante este proceso *L. guildinguii* no presenta blastema, lo que alude a un proceso de morfálaxis (Cortés-Rivera *et al.*, 2016). Durante el presente estudio ninguno de los individuos utilizados para los experimentos presentó gónadas femeninas y tampoco indicios de desove, manifestando así que esta especie tiene muy marcada su reproducción asexual por autotomía.

Los equinodermos también presentan una reproducción sexual a pesar de que no poseen un sistema endocrino bien desarrollado, sin embargo las interacciones químicas que producen las células están implicadas en el control de la reproducción, gametogénesis y el desove. Actualmente existen estudios que indican que los equinodermos poseen un sistema hormonal semejante en cierta medida a la gonadotropina que poseen los vertebrados; esto se debe a los polipéptidos de una hormona peptídica denominada sustancia estimulante de las gónadas (GSS o factor de nervio radial) y es producido por los nervios radiales de los asteroideos y está presente en ambos sexos de estrellas de mar (Kanatani, 1973; Kishimoto *et al.*, 1984; Pinder *et al.*, 1999; Voronina y Wessel, 2003; Lubzens *et al.*, 2010). Esta hormona actúa sobre las células intersticiales testiculares y células de los folículos ováricos, por lo que producen un factor activo intergonadal (Kubota, Nakano y Kanatani, 1977). La primera evidencia sobre el efecto de la hormona peptídica producida por el nervio radial fue por Chaet y McConnaughy (1959), quienes dieron a conocer la capacidad del extracto de los nervios radiales de *Asterias forbesi* para inducir derramamiento de gametos cuando es introducido en la cavidad celómica de los individuos maduros, este

estudio dio hincapié a diversas investigaciones sobre la maduración y desove de gametos en estrellas de mar. Wessel y Reich (2010) lograron el desove de hembras y machos de *Patiria miniata* al coleccionar un fragmento de las gónadas y tratarlas con 1-MeAde, consiguiendo así fecundarlos por inseminación y cultivar embriones por varios días en agua de mar filtrada alcanzando la fase de blástula. Es evidente que 1-metiladenina cumple con la función de maduración y reanudación meiótica de los ovocitos, sin embargo Terasaki y Runft (2010) encontraron que la maduración de los ovocitos mediante 1-MeAde en *Asterina miniata* se lleva a cabo en dos procesos; el primero al tratar los ovarios a una dosis de 0.5µM de 1-MeAde ocasionando la ruptura de la vesícula germinal, posteriormente a los 10 min se exponen nuevamente los ovocitos a una dosis mínima 0.005µM siendo este lo suficiente para iniciar la maduración de los ovocitos.

El ácido retinoico es una molécula derivada de la vitamina A (retinol) sintetizado mediante dos enzimas, alcohol deshidrogenasa y retinaldehído deshidrogenasa; que lleva a cabo la oxidación de retinol a retinal y de retinal a ácido retinoico respectivamente (Marlétaz *et al.*, 2006) y es importante durante el desarrollo embrionario, ya que establece el patrón del eje anterior-posterior. Por otro lado se sabe desde hace muchos años del efecto del ácido retinoico en el desarrollo embrionario, así como también en la regeneración en los vertebrados. En particular se ha estudiado en las extremidades de los anfibios causando la duplicación en el eje anterior-posterior de las extremidades (Maden, 1982; Wanek *et al.*, 1991; Holder y Hill, 1991). El ácido retinoico y su precursor retinoide son

conocidos por ser capaz de reprogramar la identidad posicional de las células del blastema (Maden, 1982), cuando dichas células están expuestas a bajos niveles de ácido retinoico se produce un brazo entero sin embargo la extensión de la proximalización depende de la dosis y el tiempo, el blastema es más sensible al ácido retinoico durante su formación temprana cuando las células se diferencian y proliferan, de tal manera que el ácido retinoico reprograma la identidad posicional. Maden (1982) menciona que la proximalización inducida por el ácido retinoico en la salamandra es dependiente de la dosis, de modo que a bajas concentraciones el blastema duplica sólo los elementos más distales del antebrazo, y a concentraciones mayores se generan más elementos del brazo. Pero los efectos del ácido retinoico no solo se reflejan en las extremidades sino también en las gónadas, en la cual estimula la expresión del gen *Stra8*, precursor del inicio de la meiosis en las células germinales en ratones y pollo (Koubova *et al.*, 2006). Sin embargo el ácido retinoico es degradado por la enzima CYP26B1 el cual inhibe la meiosis en los testículos del ratón ya que los niveles de *Stra8* son muy bajos, mientras que en los ovarios se lleva a cabo la transición mitosis/meiosis (Trautmann *et al.*, 2008). De tal manera se ha demostrado que la administración de ácido retinoico a pequeñas concentraciones durante los 9 a 14 días del desarrollo embrionario en pollos causa la aparición de células germinales en los testículos mientras que en los ovarios se incrementa el número de ovocitos durante la profase meiotica, este hecho indica que el ácido retinoico es capaz de inducir a entrar en meiosis a las células germinales masculinas sin embargo la exposición a corto plazo no es suficiente para avanzar a las etapas posteriores de la meiosis (Trukhina *et al.*, 2015).

Sin embargo son pocos los estudios realizados sobre los efectos del ácido retinoico en organismos marinos, Wang *et al.*, (2014) reporta efectos teratogénicos, como columna doblada, cola deformada y edema pericárdico en el desarrollo del pez cebra utilizando concentraciones de 2.47 nM así como también alteraciones en los genes relacionados con los nervios y marcadores de C3a de la médula espinal (Hox). Cabe mencionar que no sólo en vertebrados se han realizado dichas investigaciones, Créton *et al.*, (1994) realizó estudios en moluscos y el uso de ácido retinoico en el desarrollo; demostrando que a bajas concentraciones aplicada durante la gástrula afecta el patrón de la división celular en la etapa temprana de *Lymnaea stagnalis*. En la actualidad aún no se tiene documentado el efecto del ácido retinoico en las diferentes clases de equinodermos, pero sí en aquellos que pertenecen a la clase equinoidea como es el caso en el erizo de mar *Paracentrotus lividus*, al ser expuestos a una concentración de 2 µM de AR los embriones retardan el desarrollo, durante las 48 horas los embriones tratados se encontraban en etapa de *prisma* mientras que los demás estaban en la etapa *pluteus*, después de las 72 horas de desarrollo los embriones tratados se recuperaron y continuaron el desarrollo normal (Sciarrino y Matranga, 1995). Además Sconzo *et al.*, (1996) demostraron que a diferentes concentraciones de AR (5-7µM) en *Paracentrotus lividus* dentro de las 12 horas después de la fertilización se genera degradación parcial del embrión durante la etapa de gástrula.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la 1-Metiladenina y ácido retinoico en la regeneración y gonadogénesis de la estrella de mar *Linckia guildingii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las tallas y proporción sexual de *L. guildingii* (Gray, 1840).
- Determinar el efecto de la 1-Metiladenina en la regeneración y gonadogénesis de *L. guildingii* (Gray, 1840).
- Determinar el efecto del ácido retinoico y de un agonista del receptor de $\beta 2$ de ácido retinoico en la regeneración y gonadogénesis.
- Caracterizar el fenotipo resultante de aplicar 1-Metidalenina, ácido retinoico y agonista del receptor de $\beta 2$ en organismos regenerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECTA Y CLIMATIZACIÓN

La recolecta de *L. guildingui* se realizó en el arrecife Tuxpan que forma parte del Sistema Arrecifal Lobos- Tuxpan (SALT), localizado a 12 km al NE de la desembocadura del río Tuxpan, entre los 21° 01' y 21° 03' de latitud N y los 97° 11' y 97° 12' de longitud W. Se recolectaron 103 organismos de diferentes tamaños durante los meses de marzo 2015 - abril 2016 a una profundidad menor a un metro, *in situ* se les cortó un brazo a las estrellas para determinar la presencia de gónadas y el resto del individuo fue devuelto al arrecife (Permiso de Pesca de Fomento N° PPF/DGOPA-063/14 anexo 2). Otros 40 organismos se trasladaron al laboratorio y se mantuvieron en acuarios equipados con eliminador de proteínas, filtro biológico con piedra coralina y agua del mismo arrecife (35 ups, pH 8.2 y 26 °C). Previo a la experimentación las estrellas se mantuvieron durante una semana en aclimatación y no fue necesario el suministro de alimento ya que son organismos detritívoros.

TALLA Y SEXO

Para registrar la talla de las estrellas se utilizó una regla graduada (precisión 1:0 mm) para medir la longitud del brazo más largo desde el centro del disco hasta el ápice. En los asteroideos se utiliza esta variable debido a que los brazos suelen ser arrancados por depredadores (Herrero-Pérezrul & Luna-Salguero, 2011), y

después son regenerados en su totalidad, una vez hecho el registro de las tallas se realizó una prueba de Wilcoxon para determinar si existe relación entre las tallas y la presencia o ausencia de gónadas. Para determinar del sexo de las estrellas se colocaron en cajas Petri con agua de mar, y con ayuda de una navaja desechable para micrótopo se cortó un brazo de manera transversal sujetando con firmeza seguido de un corte longitudinal al brazo de manera que se observe la parte interna para identificar las gónadas (blancas para el caso de macho y amarillas para las hembras).

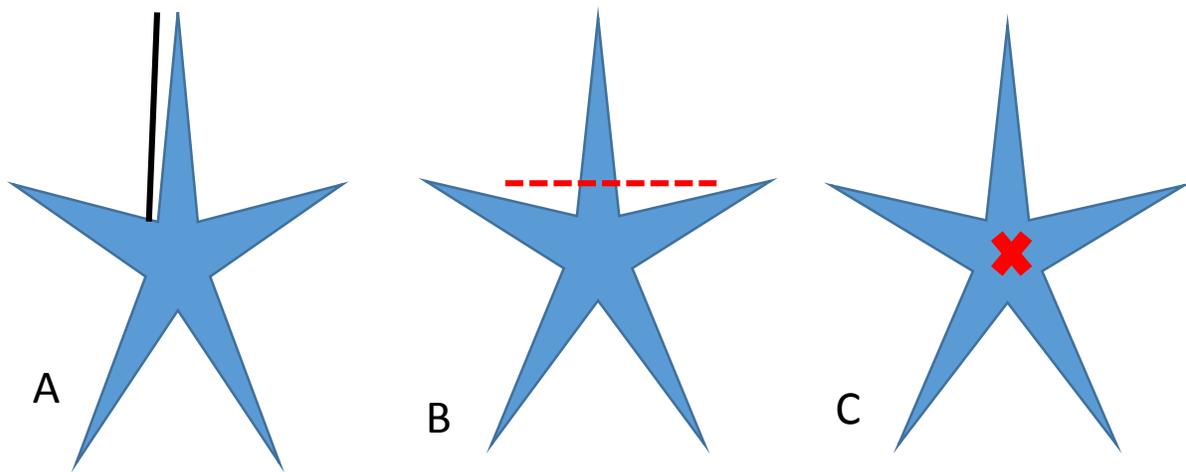


Fig. 1 Representación gráfica de los distintos procedimientos llevados a cabo en las estrellas de mar. A) Medición de las estrellas a partir del centro disco hasta la parte distal, B) amputación del brazo cerca del disco, C) zona de aplicación de 1-MeAde.

REGENERACIÓN E HISTOLOGÍA

Para caracterizar la regeneración en *L. guildingui*, se amputaron los brazos a las estrellas con una navaja desechable para micrótopo, se cortaron de manera transversal y fueron devueltos inmediatamente al acuario junto con los discos centrales. Posteriormente los brazos fueron fijados a diferentes tiempos post-amputación y se procedió a un análisis histológico; por cada brazo fijado a diferente tiempo se realizaron al menos tres repeticiones completando un tiempo de regeneración de 20 semanas.

Las muestras se fijaron en formaldehído al 4% en agua de mar durante 24 horas a una temperatura de 4° C, posteriormente se descalcificaron en ácido acético al 10% durante 24 horas y después se lavaron con agua corriente por 1 hora para posteriormente impregnarlos con una solución de sacarosa al 15% y 30% durante 1 hora respectivamente. A continuación fueron colocados en gel para cortes en congelación durante 24 horas a temperatura ambiente, los cortes se realizaron a 12 μ de grosor en un criostato (Microm HM 520) a una temperatura de -25 °C, posteriormente se colocaron en laminillas previamente cubiertas por poli-L-lisina, y se procedió a la tinción de hematoxilina (véase anexo 1), para después identificar cada etapa del proceso regenerativo y tomar evidencia fotográfica.

TRATAMIENTO CON 1-METILADENINA

Para el tratamiento se prepararon alícuotas de 1-Metiladenina a una concentración de 25 mM disuelta en agua de mar filtrada, cada alícuota contenía 50 μ l de dicha solución. En la primera parte del tratamiento se tomaron cinco estrellas completas y de diferentes tamaños, se colocaron en cajas Petri con agua de mar y sobre la base del brazo con ayuda de una jeringa de insulina se les inyectó 0.05 ml tomada de las alícuotas, posteriormente se dejaron reposar durante 4 horas para observar si se producía el efecto de desove, posteriormente se incorporaron en peceras diferentes a las demás. Para la segunda etapa del tratamiento se tomaron cuatro estrellas y mediante el proceso de amputación anteriormente mencionado se procedió a retirar los brazos, posteriormente los brazos fueron colocados en cajas Petri tomando una como control y tres repeticiones; con ayuda de una micro pipeta se tomó una alícuota de 50 μ l de 1-Metiladenina y se mezcló en 50 ml de agua de mar filtrada, posteriormente se vertió en cajas Petri completamente estériles junto con los brazos, después fueron cubiertos con papel aluminio para evitar el paso de la luz y se dejaron reposar por 12 horas. Los brazos tratados fueron colocados en frascos de plástico con pequeños agujeros para permitir el paso de oxígeno.

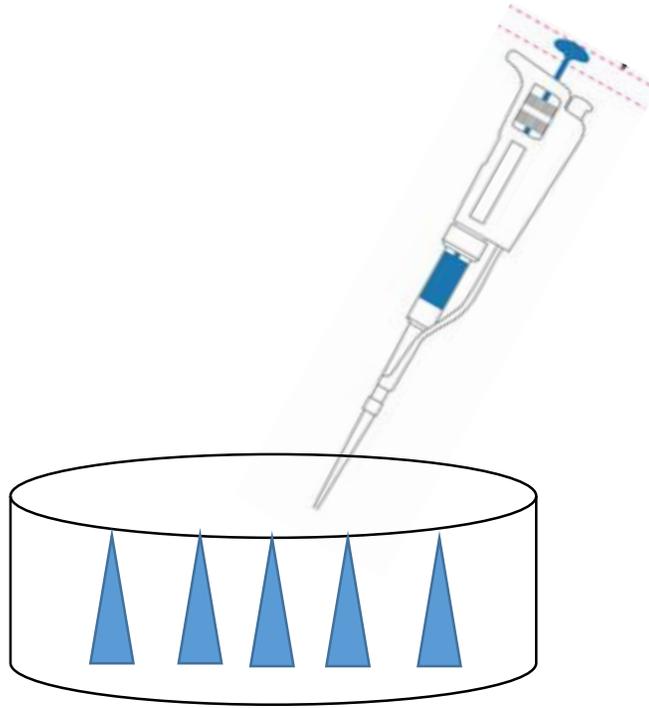


Fig. 2 Representación gráfica de la aplicación de los distintos tratamientos (1-MeAde, Ácido retinoico y Agonista $\beta 2$).

TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO Y AGONISTA $\beta 2$

Para el tratamiento con ácido retinoico se tomaron los brazos a diferentes días post-amputación, y a distintas concentraciones ($25\mu\text{M}$ y $12.5\mu\text{M}$) a partir de un stock 50 mM . Se tomaron 15 brazos con un tiempo de seis días post-amputación, los cuales fueron colocados en cajas Petri con 50 ml de agua de mar filtrada y distribuidos de la siguiente manera, cinco brazos control en agua de mar, cinco a una concentración de $25\mu\text{M}$ y los últimos a una concentración de $12.5\mu\text{M}$. En estas soluciones se dejaron reposar 6 horas totalmente cubiertos para evitar el

paso de la luz, después se regresaron a las peceras en frascos de plásticos completamente sellados y con pequeños agujeros para permitir el paso de oxígeno y continuar el proceso regenerativo. El procedimiento anteriormente descrito se repite para brazos con 8 y 10 días post-amputación. El tratamiento con agonista β_2 se llevó acabo colocando cinco brazos a una concentración de $12.5\mu\text{M}$ y cinco brazos para el control con agua de mar, se dejaron reposar durante 6 horas y posteriormente fueron devueltos a las peceras.

Las observaciones se realizaron a las 24 horas después de cada tratamiento, y el proceso regenerativo se registró cada semana con ayuda de un microscopio tomando evidencia fotográfica.

RESULTADOS

TALLA Y SEXO

Se obtuvieron un total de 103 individuos durante un año de colecta, de los cuales 15 fueron machos de entre 3 a 8.1 cm de longitud y el resto fueron organismos sin gónadas. Las gónadas se observaron debajo de los ciegos pilóricos en tono blanquecino para el caso de los machos (fig. 3) y mediante histología se pudo apreciar un par en cada brazo (fig. 5), cada gónada presentaba espermatozoides móviles (fig. 4). En total se obtuvieron 15 machos y ninguna hembra, las tallas de acuerdo con el sexo se muestran a continuación (cuadro 1).

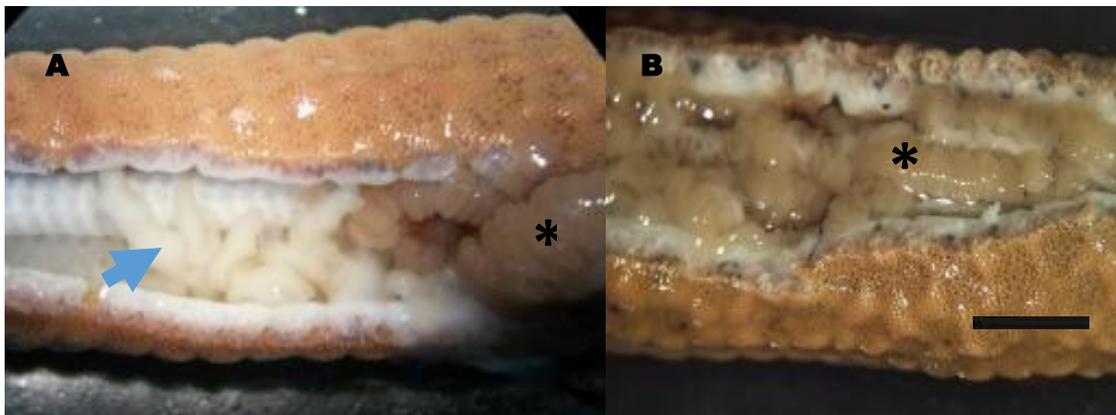


Fig.3 Brazos de *L. guildingui*, A) gónadas masculinas (flecha azul), ciegos pilóricos (asterisco), B) ciegos pilóricos (asterisco), brazo sin gónadas. Barra de escala: 2cm.



Fig.4 Espermatozoides de *L. guildingui* con alta movilidad, obtenidos de un individuo con una talla de 4.6 cm.

Cuadro 1. Tallas de *L. guildingui* con gónadas y sin diferenciar

TALLA	MACHOS	SIN GONADAS
3 - 3.8	2	26
4 - 4.9	4	23
5 - 5.7	2	21
6 - 6.7	3	10
7 - 7.5	2	5
8 - 8.5	2	3

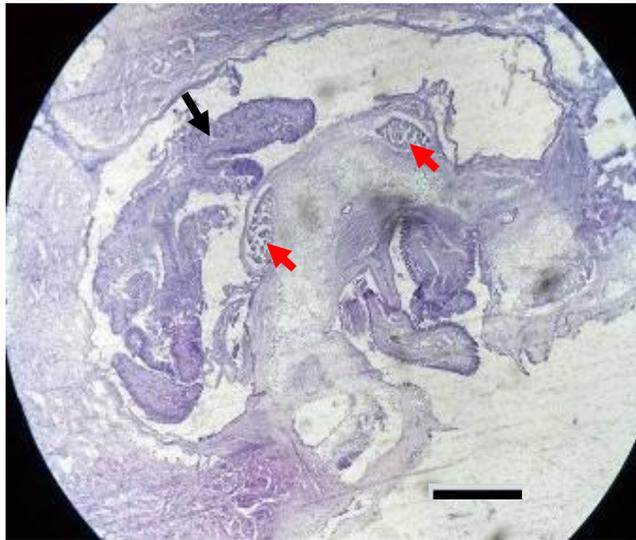


Fig. 5 Corte histológico de un brazo de *L. guildingii*, gónadas de macho (flechas rojas), ciegos pilóricos (flecha negra). Barra de escala: 500 μ m.

De acuerdo a la prueba de Shapiro, los datos de tallas de *L. guildingii* no se ajustan a la normalidad ($p= 0.01406$). La prueba de Wilcoxon refiere que no existen diferencias significativas entre las tallas de los individuos y la presencia de gónadas ($W = 443.5$, $p = 0.2437$) (fig.6).

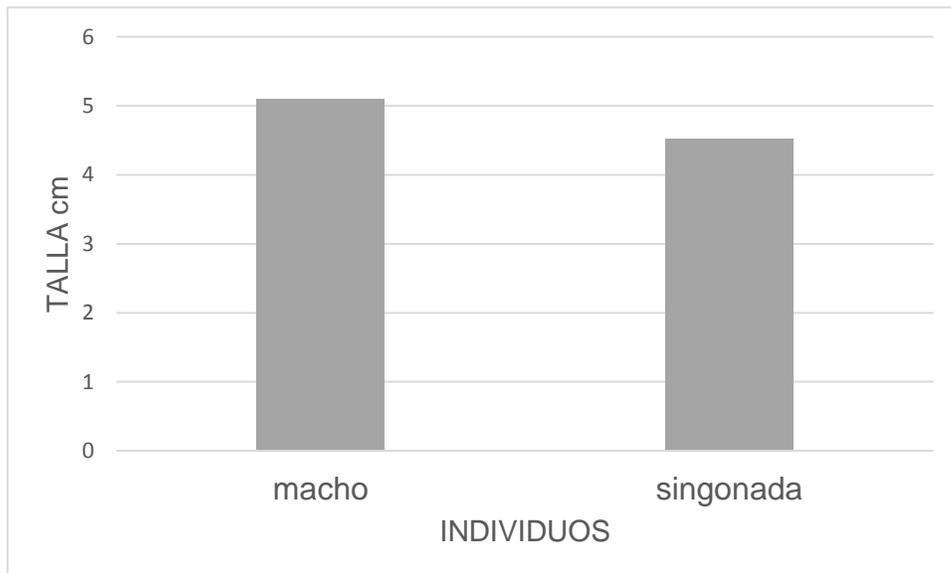


Fig. 6 Relación entre la presencia de gónadas y las tallas de los individuos.

REGENERACIÓN E HISTOLOGÍA

La estructura propia de la estrella *L. guildinguii* se forma en un promedio de cinco semanas a partir de la amputación, sin embargo la regeneración para esta especie es lenta ya que es hasta las 12 semanas cuando se puede observar las estructuras propias del nuevo individuo (fig.7).

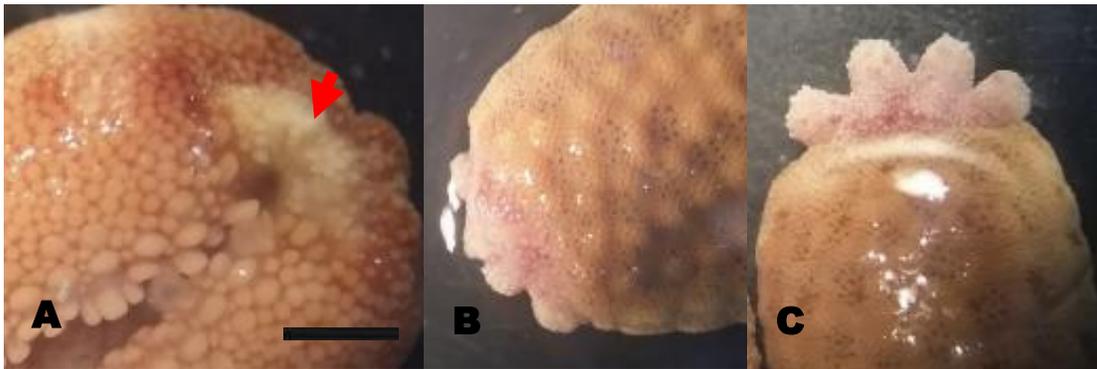


Fig. 7. Brazos de *L. guildinguii* en proceso de regeneración a diferentes tiempo, A) formación del nuevo individuo con cuatro brazos a las cuatro semanas (flecha roja), B) individuo a las 12 semanas de regeneración, C) regeneración a las 16 semanas. Barra de escala. 2cm.

Durante las primeras semanas post-amputación se observó la boca de forma circular y musculosa en el centro del nuevo individuo, así como también la formación del estómago cardiaco (fig. 8).

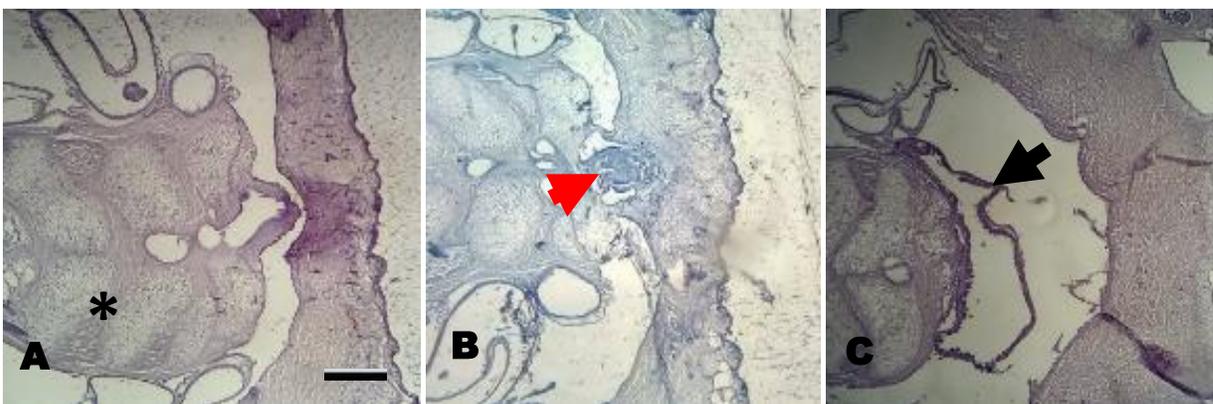


Fig. 8 Brazos a las cuatro semanas post-amputación, A) vertebras (asterisco), B) boca (flecha), C) estomago cardiaco (flecha). Barra de escala: 500µm.

Durante las ocho semanas de regeneración se observó formación del nuevo individuo haciéndose más evidentes los brazos y en ellos la ramificación de los ciegos pilóricos, un par en cada brazo (fig. 9) y que a su vez están conectados con el estómago pilóricos. Los ciegos pilóricos están previstos de células glandulares suspendidas en el interior del celoma del brazo y son indispensables para la digestión tanto intracelular como extracelular.

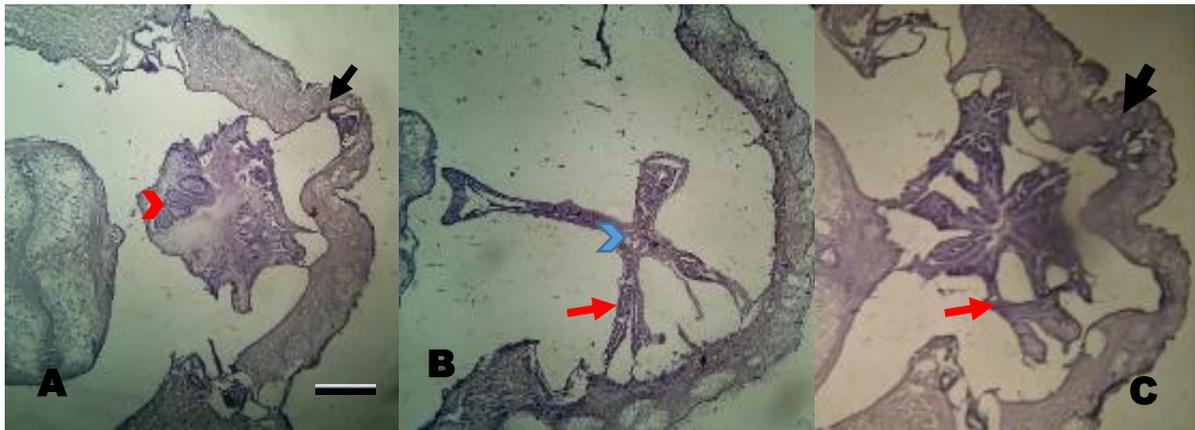


Fig. 9 Corte longitudinal de *L. guildingui* a las ocho semanas de regeneración, A) ciego pilórico (punta de flecha roja), formación de los brazos (flecha negra), B) ramificación de los ciegos pilóricos (flecha roja), boca (punta de flecha), C) ciegos pilóricos a lo largo de los nuevos brazos (flecha roja), brazos del nuevo individuo (flecha negra). Barra de escala: 500 μ m.

A las 12 semanas de regeneración se logró apreciar con mayor claridad cada una de las estructuras y órganos, ocupando la mayor parte del cuerpo el estómago y los ciegos pilóricos que van desde el estómago pilórico a cada uno de los brazos, (fig. 10) sin embargo el desarrollo de las gónadas siguen sin apreciarse durante las siguientes semanas (fig. 11).

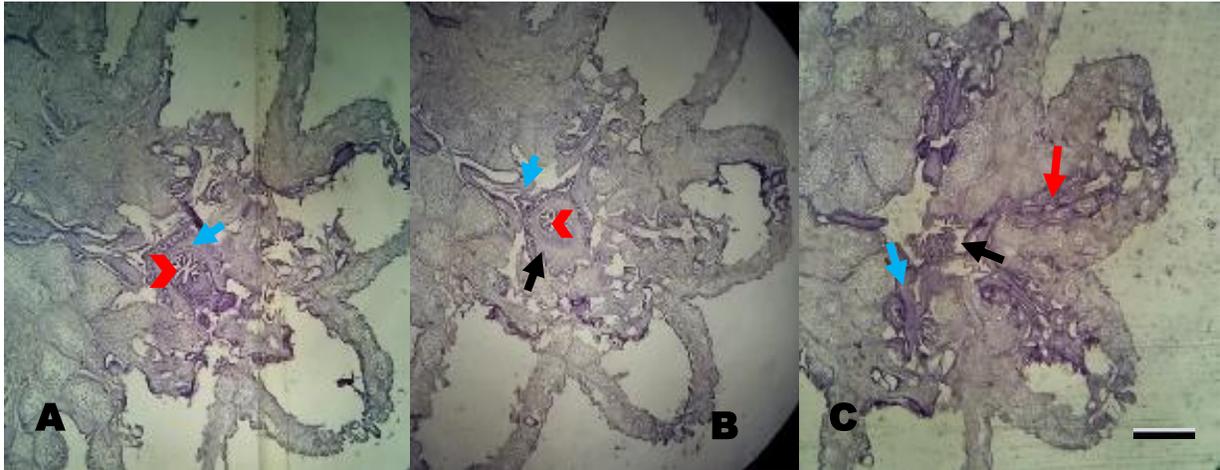


Fig. 10 Regeneración a las 12 semanas, A) boca (punta de flecha roja), estomago pilórico (flecha azul), B) boca (punta de flecha roja), estomago pilórico (flecha negra, ciegos pilóricos (flecha azul), C) estomago pilórico (flecha negra), ciegos pilóricos (flecha azul), pies ambulacrales (flecha roja). Barra de escala: 500 μ m.

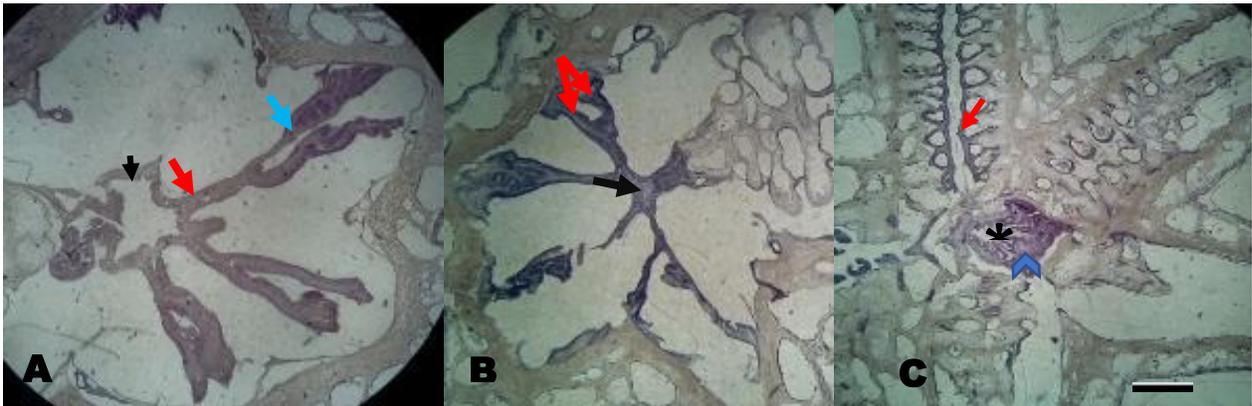


Fig. 11 Proceso de regeneración a las 16 semanas, A) conducto pilórico (flecha roja), ciegos pilóricos (flecha azul), estomago pilórico (flecha negra), B) ramificación de los ciegos pilóricos (flechas rojas), estomago pilórico (flecha negra), C) boca (asterisco), estomago pilórico (punta de flecha azul), vertebras (flecha roja). Barra de escala: 500 μ m.

Durante las 20 semanas de regeneración se observó el mismo patrón de crecimiento y regeneración en el nuevo individuo (fig. 12).

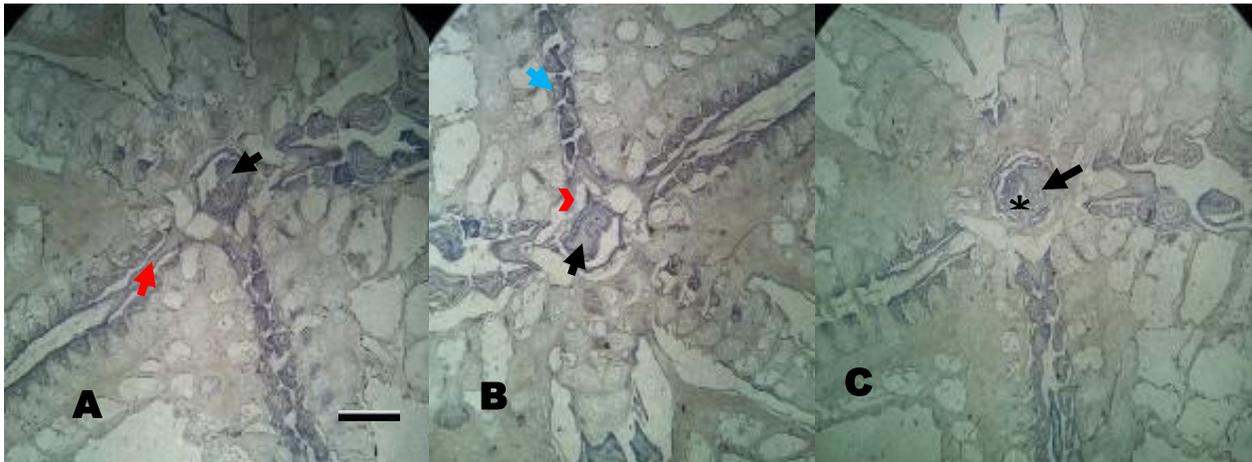


Fig. 12 Brazo en proceso de regeneración a las 20 semanas, A) estomago pilórico (flecha negra), ramificación de los ciegos pilóricos (flecha negra), B) estomago cardiaco (punta de flecha roja), estomago pilórico (flecha negra), pies ambulacrales (flecha azul), C) boca (asterisco), estomago pilórico (flecha negra). Barra de escala: 500 μ m.

TRATAMIENTO CON 1-METILADENINA

No se observó el desove, ya que los organismos no presentaban gónadas y en los machos esta sustancia no surtió ningún efecto; en la segunda parte del tratamiento, tampoco hubo diferencias significativas en el control y los tratados. Durante la regeneración sólo se aprecia la formación de la boca, estómago y ciegos pilóricos, donde no tuvieron ninguna alteración (fig. 13).

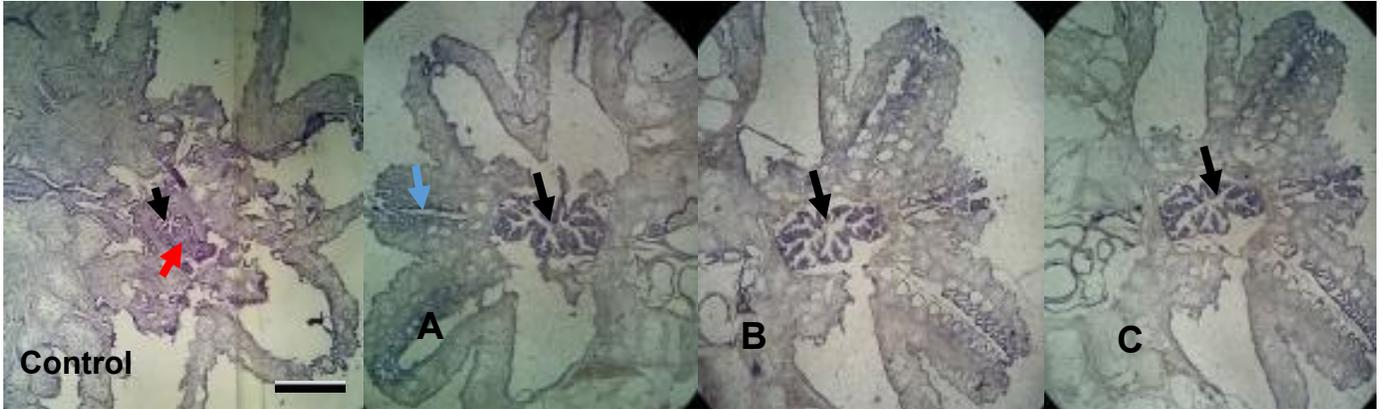


Fig.13 Brazos de *L. guildingui* a las 12 semanas de regeneración sometidos a un tratamiento con 1-metiladenina, en el control se puede apreciar claramente la boca (flecha negra) y el estómago pilórico (flecha roja), tanto en la siguientes imágenes A-C se muestra la formación del estómago pilórico (flecha negra) y surcos ambulacrales (flecha azul). Barra de escala: 500 μ m.

TRATAMIENTO CON ÁCIDO RETINOICO (AR)

Los individuos tratados con AR fueron comparadas con el control, y no se encontró diferencias significativas en cada uno, identificando la boca muy bien definida así como también los ciegos pilóricos y el estómago muy bien desarrollados (fig. 14), en todas las muestras hay ausencia de formación de gónadas o alteración en alguna de las estructuras, por lo que AR tampoco propició la formación de gónadas.

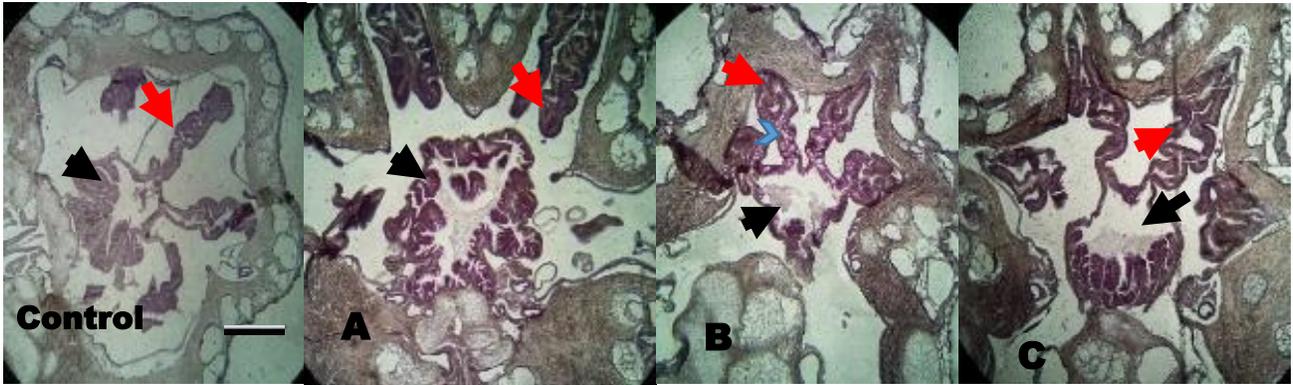


Fig.14 *L. guildingui* a las 12 semanas de regeneración con ácido retinoico, en el control se observa el estómago pilórico (flecha negra) y ramificaciones de los ciegos pilóricos (flecha roja), A-C se puede apreciar el estómago pilórico (flecha negra), ciegos pilóricos (flecha roja) y el conducto pilórico (punta de flecha azul). Barra de escala: 500 μ m.

Durante el tratamiento no se presentó ninguna modificación de manera interna como de manera externa, exponiéndolos a concentraciones y tiempos post-amputación diferentes (fig.15).

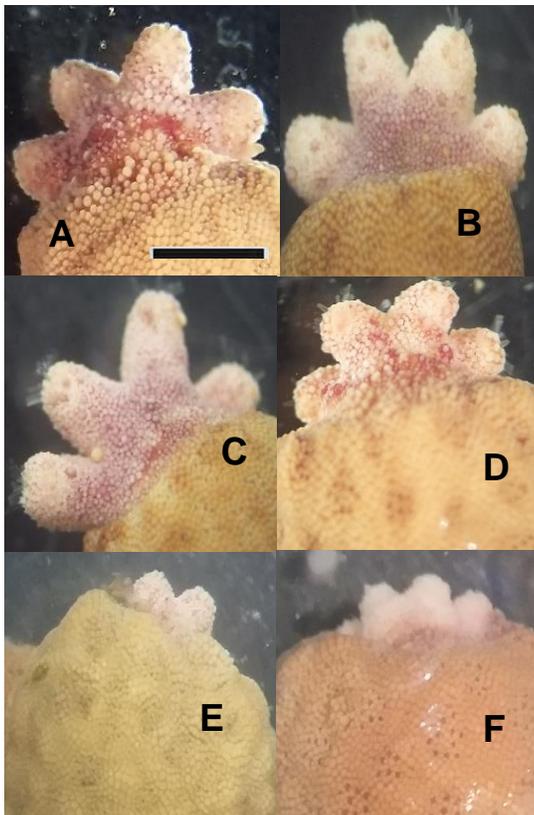


Fig. 15 Individuos tratados con ácido retinoico a diferentes concentraciones, (A-B) 6 días post amputación a una concentración de 12 μ M y 25 μ M respectivamente; (C-D) 8 días post amputación, (E-F) 10 días post amputación. Barra de escala. 2cm.

TRATAMIENTO CON $\beta 2$

Para el tratamiento con agonista $\beta 2$ se observó la regeneración de los brazos sin gónadas sin embargo se encontró una anomalía no reportada en los invertebrados. Esta alteración es comúnmente conocida como duplicación en efecto espejo, ya que la estructura propia del individuo en formación presenta un individuo extra, justamente de manera simétrica al original como si de su reflejo en él se trata (fig. 16).

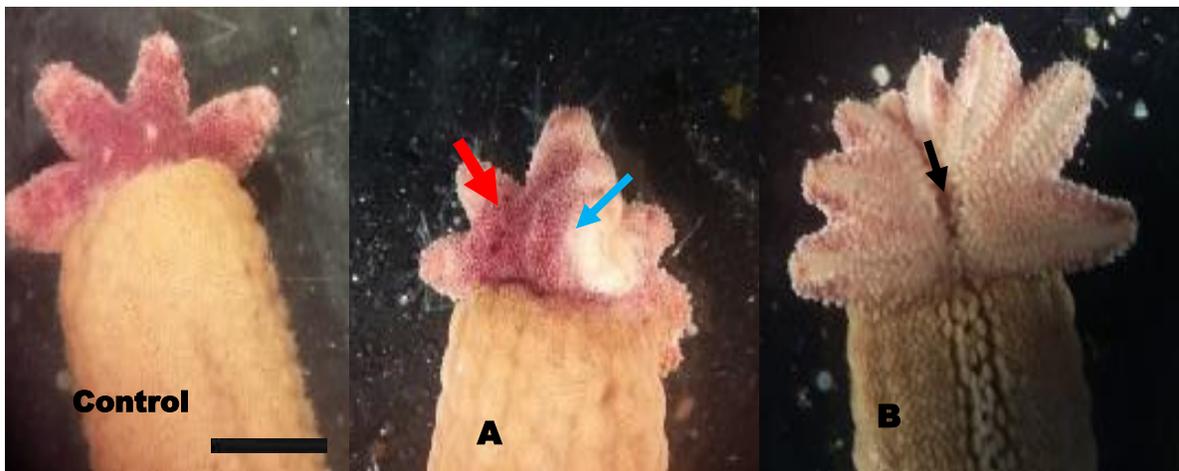


Fig. 16 Brazo en proceso de regeneración a las 16 semanas, en el control se aprecia la nueva estrella de manera normal, sin embargo en las siguientes se genera un efecto reflejo, A) nuevo individuo en proceso de regeneración (flecha roja) y la duplicación del individuo (flecha azul), B) vista ventral, separación de los dos individuos (flecha negra). Barra de escala: 2 cm.

DISCUSIÓN

En la mayoría de los equinodermos la proporción sexual es de 1:1, como es el caso de *P. unifascialis* (Herrera-Escalante, 2005), *P. pyramidatus* (Sánchez-Villalobos, 2012), la estrella *L. columbiae* (McAlary, 1987) y otros equinodermos como en el erizo *S. droebachiensis* (Munk, 1992), en los holoturoideos *Actinopyga echinites* (Conand, 1982) y el ofiuroideo *Odontaster validus* (Stanwell-Smith y Clarke, 1998), sin embargo para el caso de *L. guildingui* se desconoce la proporción sexual, dado que en el presente trabajo sólo se registraron machos, esto se atribuye al tipo de reproducción que presentan.

En el presente trabajo se registraron individuos de *L. guildingui* sexualmente maduros a una talla de 3 cm, más grandes a *L. columbiae* reportados por McAlary (1987), donde los individuos maduros más pequeños fueron de 2.1 cm y los reportados por Minchin (1987) para la estrella *Marthasterias glacialis* donde las tallas de los individuos desovantes fueron de 2.5 a 26 cm y de 9 a 22 cm (machos y hembras respectivamente). Cabe mencionar que la formación de óvulos en los seres vivos es un proceso más costoso energéticamente que la formación de espermatozoides por ello es posible que las condiciones en las que vive esta especie en la zona de estudio no sean las ideales y por ello prevalezca la reproducción por autotomía y sólo algunos pocos organismos machos puedan desarrollar gametos viables.

El proceso regenerativo para *L. guildingui* es lento aunque su capacidad de generar un nuevo individuo sin la porción del disco es característico sólo para su género y para *Coscinasterias* (Barnes y Ruppert, 1984; Cortes-Rivera *et al.*, 2016), aunque se han reportado ambas como especies dioicas no se han estudiado en circunstancias o entornos en los que la proporción de sexos sea diferente y se reproduzcan principalmente de manera asexual. Encontramos que en esta especie la formación de gónadas durante la regeneración es nula, aspectos que no están reportados ni estudiados. Yamaguchi (1977) revela que *L. leavigata* es capaz de reproducirse de manera asexual o por autotomía, pero al mismo tiempo y de acuerdo a los factores ambientales puede reproducirse de manera sexual. Este tipo de reproducción está presente durante el verano aunque no todos los individuos presentan gónadas completamente maduras, caso contrario con *L. guildingui* que es más frecuente la reproducción asexual, y los organismos producidos por este medio no generan gónadas siendo incapaces de reproducirse de manera sexual. Esta preferencia reproductiva puede ser específica de la zona arrecifal estudiada y/o depender de las condiciones ambientales de esta zona.

En el presente trabajo se realizó el tratamiento con 1- metiladenina, pero no se obtuvo éxito en la maduración gonadal y desove, ya que los individuos eran machos y en el resto de los casos no presentaban gónadas, por lo que desconocemos qué pase con las hembras y si hay algún momento breve en el que formen gónadas y liberen óvulos aptos para ser fecundados. Se reportaron que en las costas de Australia *L. guildingui* presenta una época de reproducción en verano, llevándose a cabo la liberación de óvulos y espermatozoides (Stropes,

2003). Yamaguchi (1977) logró un desove exitoso en individuos maduros de *L. laevigata* usando 1-Metiladenina en organismos con gónadas claramente funcionales. Sin embargo 1-metiladenina no es la única que provoca la maduración y liberación de ovocitos en asteroideos; Dorée *et al.*, (1976) reportaron que 1-benziladenina y 1-etiladenina son muy eficientes al ser añadidos en gónadas de *Marthasteria glacialis* y *Asterias Rubens* siendo dos veces más efectivo en ambas especies a concentraciones menores a las alcanzadas con 1-metiladenina, a pesar de este reporte, MacAlary (1987) logró inducir un desove en individuos maduros de *L. columbiae*, al inyectar sobre la base del brazo 1-Adenosina monofosfato, esto se realizó en los meses de agosto-septiembre cuando esta especie presenta su época de reproducción, comparando estos datos es evidente que 1-metiladenina no es eficiente en *L. guildingui* así sea de manera directa inyectándolas en la cavidad celómica y en organismos regenerados, ya que no hubo ningún efecto a pesar que está comprobado que esta hormona es eficaz en estrellas de mar de diferentes géneros.

Como se mencionó anteriormente, 1-metiladenina no es funcional en la especie *L. guildingui* en comparación con *L. laevigata*, a pesar de que pertenecen al mismo género; sin embargo ambas especies se distribuyen en diferentes zonas, en el Anfiatlántico e Indo-pacífico respectivamente (Durán *et al.*, 2005; Baptiste y Jakimovski, 2011) esta distribución y las condiciones ambientales presentes puede afectar el ciclo reproductivo para *L. guildingui* prefiriendo una reproducción asexual, manifestando mayor éxito en esta área de estudio, ya que durante la colecta no se reportó hembras y en algunos casos el sexo era indiferenciado ya que

no presentaban rastro alguno de gónadas a pesar de ser organismos de talla adulta. Esto resulta biológicamente interesante de estudiar a mayor detalle, pues *L. guildingui* se sabe que es dioica con reproducción sexual, pero la preferencia o ventaja de la reproducción asexual por autotomía no se ha estudiado para esta especie en ecosistemas específicos con características propias que pudieran favorecer un tipo de reproducción sobre otro. En la zona donde se colectaron los organismos para este estudio es muy común encontrar “cometas” o estrellas en formación a partir de brazos autotomizados, lo que evidencia la preferencia de esta especie por la reproducción asexual.

Otros tratamientos para promover la formación de gónadas en *L. guildingui* durante su regeneración, fue mediante ácido retinoico, ya que se ha documentado que cumple un papel importante en la gonadogénesis a pesar de ser poco estudiado dentro de los equinodermos. En el presente trabajo no se encontró ninguna alteración morfológica en la regeneración del nuevo individuo de *L. guildingui* así como tampoco la formación de gónadas, y esto se puede observar en los cortes histológicos así como también en los diferentes individuos tratados a diferentes días post-amputación y concentraciones. Esto no impide que se sigan generando interrogantes sobre los efectos del ácido retinoico en los invertebrados así como para este grupo de organismos; por otra parte en este trabajo se reveló que al exponer los individuos en proceso de regeneración al agonista del receptor de ácido retinoico $\beta 2$ (RAR $\beta 2$) a una concentración de 12.5 μ M ocasionó el efecto de duplicación en dichos individuos, donde cada brazo generó dos individuos provenientes de la zona proximal del brazo, ambos individuos presentaban

movilidad de los pies ambulacrales así como una boca para cada uno. Cabe resaltar que dicho fenómeno se había presentado en otros grupos de organismos siendo más evidente en vertebrados como los ratones, anfibios y aves (pollo), que son organismos bilaterales, pero no para equinodermos que son organismos de simetría radial secundaria.

El anfibio *Xenopus laevis*, que al ser tratado con el inhibidor CYP26 forman duplicaciones en espejo en el 49% de las extremidades en regeneración y con el agonista RAR β 2 a una concentración de 100nM, las extremidades se duplicaron de manera completa y simétrica, en un 65% de los individuos tratados (Cuervo y Chimal, 2013); de igual manera al comparar los resultados del presente trabajo, se puede constatar que agonista RAR β 2 generó resultados similares ya que en ambos tratamientos la duplicación fue completa y simétrica. En este trabajo el efecto de duplicación ocurre en un organismo completo, no en una estructura solamente, además demuestra que el agonista RAR β 2 es funcional tanto en vertebrados como invertebrados. Este resultado implica que incrementar la actividad de las rutas controladas por AR genera un nuevo eje corporal permitiendo la duplicación de un individuo de manera simétrica pero invertida (en espejo).

Lo más notable de este resultado es que normalmente este efecto se conoce para el caso de vertebrados en estructuras como las extremidades, pero en el caso de la estrella de mar la duplicación no es de una porción del individuo sino del individuo completo. También tiene implicaciones en la definición de la simetría bilateral pues las duplicaciones en espejo que se conocen desde hace décadas en

vertebrados se dan en estructuras bilaterales. En el caso de la estrella de mar se supone que tiene simetría radial, por lo que es más difícil entender cómo es que se pudo generar una duplicación en espejo a partir de una estructura proveniente de un organismo radial.

CONCLUSIONES

- Para *L. guildingui* la reproducción es principalmente asexual (por autotomía) en esta área de estudio, ya que solo se tiene reportado presencia de machos durante el año de colecta.
- Los individuos machos con tallas $3 < 3.8$ cm son completamente maduros, presentando movilidad de los espermatozoides pero no los liberan al ser tratados con 1-metiladenina.
- La presencia y madurez de las gónadas para machos de *L. guildingui* corresponde a los meses de mayo-junio, siendo los meses cálidos.
- La 1-metiladenina no es funcional para *L. guildingui*, ya que esta especie en esta zona destaca su reproducción asexual, teniendo mayor éxito a través de la regeneración de nuevos individuos.
- El ácido retinoico no altera ni modifica la morfología interna y externa en esta especie durante el proceso regenerativo.

- *L. guildingui* responde al agonista RAR β 2 generando una duplicación en espejo durante el proceso de regeneración.
- El agonista RAR β 2 actúa de manera análoga en equinodermos como en vertebrados, generando dos individuos provenientes de la misma zona de regeneración.

APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

En México los estudios realizados sobre equinodermos han tenido diversas aplicaciones, desde aspectos generales como listados faunísticos, biogeografía, ecología y biología básica, hasta investigaciones con fines pesqueros (Herrero-Pérezrul *et al.*, 1999; Maluf, 1988; Solís-Marín *et al.*, 1997) aunque la mayor información es descriptiva se conoce muy poco sobre los aspectos que están involucrados en la reproducción.

La peculiar forma en que se reproduce *L. guildinguii* permite conocer más sobre su biología y aspectos involucrados en su desarrollo, ya que recientemente los equinodermos están siendo afectados por una serie de enfermedades virales provocando muertes masivas que hasta la fecha se desconocen las causas. Por tal motivo es importante enfocar el estudio de estos organismos, planteando estrategias efectivas como podría ser la repoblación de estrellas de mar en diversos sistemas arrecifales, debido a la capacidad sorprendente de generar nuevos individuos a partir de un fragmento de su cuerpo aun manteniéndolos en cautiverio.

Actualmente los equinodermos como muchos de los organismos marinos son extraídos con fines comerciales (venta artesanal o acuariofilia) considerándolos como especies exóticas, por ello se requiere el diseño de un plan de manejo que permita controlar la extracción de estos organismos, ya que existe gran cantidad de especies de invertebrados en los arrecifes del norte de Veracruz que no han sido estudiados. Por lo cual es indispensable mantener la conservación y

restauración de áreas naturales, cuya base sea la preservación y el uso adecuado de los recursos naturales, que al final permita adquirir conocimientos sobre la biodiversidad mexicana.

BIBLIOGRAFIA

Barnes, R. y Ruppert, E. 1996. Equinodermos. pp. 926-992. *En: Zoología de los invertebrados.* (ed.). Ed. McGraw-Hill interamericana, D.F., México.

Baptiste, M. y Jakimovski, I. 2011. "*Linckia laevigata*" (on-line), Animal Diversity Web. Accessed Junio 16, 2016 at <http://animaldiversity.org/accounts/Linckia-laevigata/>

Brockes, J. 1997. Amphibian limb regeneration: Rebuilding a complex structure. *Science* **276(5309)**: 81-87 pp.

Brusca, C. y Brusca, G. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts. 992 pp.

Candia-Carnevali, M. 2006. Regeneration in echinoderms: repair, regrowth, cloning. *Invertebrate Survival Journal* **3**: 64-76.

Cintra-Buenrostro, E. 2001. Sinopsis taxonómica y biogeografía ecológica de Asteroideos (Echinodermata: Asteroidea) del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, México.

Chaet A. y McConnaughy, R. 1959. Physiologic activity of nerve extracts. *Biology. Bull.* **117**: 407-408.

Clark, A. y Downey, M. 1992. Starfishes of the Atlantic. Chapman and Hall, London. 794 pp.

Créton, R., Zwaan, G. y Dohmen, R. 1994. Retinoic acid modulates the pattern of cell division in embryos of *Lymnaea stagnalis* (mollusca). *Roux's archives of developmental biology* **204**:70-74.

Cortés-Rivera, Y., Hernández, R., San Martín, P., Zarza, E. y Cuervo, R. 2016. Potencial regenerativo de la estrella de mar *Linckia guildingii*. *Hidrobiológica* **26(1)**: 95-100.

Conand, C. 1982. Reproductive cycle and biometric relations in a population of *Actinopyga echinites* (Echinodermata: Holoturoidea) from lagoon of New Caledonia, western tropical Pacific. pp. 437-442. *En: Balkema, A.A. (ed.). International Echinoderms Conference.* Rotterdam.

Cuervo, R. y Chimal-Monroy, J. 2013. Chemical activation of RAR β induces post-embryonically bilateral limb duplication during *Xenopus* limb regeneration. *Sci. Rep.* **3**, 1886. Downey, M. 1973. Starfishes from the Caribbean and the Gulf of Mexico. *Smithsonian Contributions to Zoology* **126**: 1-160.

Edmonson, H. 1935. Autotomy and regeneration in Hawaiian starfishes. Bernice P. Bishop Museum Occasional Papers. **11**: 8.

Escriva, H., Holland, N., Gronemeyer, H., Laudet, V. y Holland, L. 2002. The retinoic acid signaling pathway regulates anterior/posterior patterning in the nerve cord and pharynx of amphioxus, a chordates lacking neural crest. *Development*. **129**: 2905-2916.

Durán-González, A., Laguarda-Figueras, F., Solís-Marín, F., Buitrón Sánchez, B., Gust, C. y Torres-Vega, J. 2005. Equinodermos (Echinodermata) de las aguas mexicanas del Golfo de México. *Rev. Biología Tropical*. **53 (3)**: 53-68.

Dorée, M., Guerrier, P. y Leonard, N. 1976. Hormonal control of meiosis: specificity of the 1-Methyladenine receptors in starfish oocytes. *Cell. Biology*. **75(5)**: 1669-1673.

Garcia, E. y Domaltov, Y. 2010. Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration. *Curr Pharm Des.*; **16**: 942-955.

Giese, A., Pearse, J. y Pearse, V. 1991. *Reproduction of Marine Invertebrates*. Vol. VI. Echinoderms and Lophophorates. Ed. The Boxwood Press. London.

Hyman, L. 1955. *The invertebrates IV: Echinodermata*. The Coelomate Bilateria. Mc.Graw-Hill Book Co. New York, Toronto, London. 763 pp.

Herrera-Escalante, T. 2005. Dinámica poblacional y reproducción de la estrella de mar *Phataria unifascialis* (Gray 1840) (Echinodermata: Asteroidea) en Pinchilingue, Bahía de la paz, Baja California sur, México. Tesis de maestría.

Herrero-Pérezrul, M., Reyes-Bonilla, H., García-Domínguez, F. y Cintra-Buenrostro, C. 1999. Reproduction and growth of *Isostichopus fuscus* (Echinodermata: Holothuroidea) in the southern Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.* **135 (3)**:521-532.

Holder, N. y Hill, J. 1991. Retinoic acid modifies development of the midbrain/hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development*. **113**: 1159-1170.

Jaffe, L., Gallo, C., Lee, R., Ho, Y. y Jones, T. 1993. Oocyte Maturation in starfish in Mediated by the $\beta\gamma$ - subunit Complex of a G-protein. *Journal of Cell Biology* **121(4)**: 775-783.

Kanatani, H. 1973. Maturation-inducing substance in starfishes, *Int. Rev. Cytology* **35**: 253–298.

King, H. 1900. Further studies on regeneration in *Asterias vulgaris*. *Arch. Entw. Atech.Org.* **9**: 724-737.

Kishimoto, T., Usui, N. y Kanatani, H. 1984. Breakdown of starfish ovarian follicle induced by maturation-promoting factor. *Development. Biology* **101**: 28 – 34.

Kikuchi, K., Holdway, J., Major, R., Blum, N., Dahn, R., Begemann, G., y Poss, K. 2011. Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Developmental Cell*. **20 (3)**: 397-404.

Kondo, M. y Akasaka, K. 2010. Regeneration in crinoids. *Developmental Growth Diff.* **52**: 57-68.

Kubota, J., Nakano, K. y Kanatani, H. 1977. 1 – Methyladenine producing cell in starfish testis. pp. 79-82. *En: A brief summary of neuroendocrine regulation of reproduction in sea stars. General and comparative endocrinology.* The Johns Hopkins University Press. U.S.A.

Li, Z., Wang, W., Zhang, E. y Qiu, G. 2014. Identification of spliced mRNA isoforms of retinoid X receptor (RXR) in the Oriental freshwater praw *Macrobrachium nipponense*. *Genetics and Molecular Research* **13 (2)**: 3914-3926.

Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. y Cerdá, J. 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed *Gen. Comp. Endocrinology* **165**: 367–389.

MacAlary, F. 1987. Population genetics of the autotomous sea star *Linckia columbiae*. *Amer. Zool.* **28 (4)**: 7A.

Maden, M. 1982. Vitamin-A and pattern-formation in the regenerating limb. *Nature* **295**: 672-675.

Maden, M. 1998. Retinoids as endogenous components of the regenerating limb and tail. *Wound Repair and Regeneration*. **6(4)**: 358-365.

Maden M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Rev. Neurosci.* **3**: 843-853.

Maluf, L. 1988. Composition and distribution of central eastern pacific echinoderms. Technical reports 2. *Nat Hist. Mus. L. A. County.* 242 p.

Marlétaz, F., Holland, L., Laudet, V. y Schubert, M. 2006. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int. J. Biol. Sci.* **2(2)**: 38-47.

Mita, M. 1991. Prediction of intracellular amount of 1- metiladenine precursor in ovarian follicle cells of the starfish *Asterina pectinifera*. *Zoological science* **8**:57-62.

Mita, M., Haraguchi, S., Uzwa, H. y Tsutsui, K. 2013. Contribution of de novo synthesis of Gas-proteins to 1-methyladenine production in starfish ovarian follicle cells stimulated by relaxin-like gonad-stimulating substance. *Biochemical and biophysical research communications* **440**: 798-801.

Mita, M., Haraguchi, S., Uzwa, H. y Tsutsui, K. 2014. Involvement of Gas proteins in the action of relaxin-like gonad-stimulating substance on starfish ovarian follicle cells. *General and Comparative Endocrinology* **205**: 80-87.

Minchin, D. 1987. Sea-water temperature and spawning behavior in the sea star *Marthasterias glacialis*. *Mar. Biol.* 95:139-143.

Mladenov, P., Bisgrove, S. Asotra y R.D. Burke. 1989. Mechanisms of arm tip regeneration in the sea star, *Leptasterias hexactis*. *Roux's Archives Developmental Biology* **198**:19-28.

Munk, J. 1992. Reproduction and growth of green urchin *Strongylocentrotus droebrachiensis* (Müller) near Kodiak, Alaska. *J. Shellfish Res.* 11(2): 245-254.

Nikk, E., Von de Vyver, G., y Richelle, E. 2011. Retinoic acid down-regulates the expression of Emh-3 homeobox-containing gene in the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. *Mech. Ageing. Dev.* **122(8)**:779-794.

Rinkevich, B. y Rinkevich Y. 2013. The “Star and Stripes” metaphor for animal regeneration-elucidating two fundamental strategies along a continuum. *Cells.* **2**:1-18.

Stanwell-Smith, D. y Clarke, A. 1998. Seasonality of reproduction in the cushion star *Odontaster validus* at Signy. Island, Antarctica. *Mar. Biol.* 131: 479-487.

Stroper, A. 2003. *Linckia guildingii* (on line), animal diversity web. Accessed february 24, 2016. http://animaldiversity.org/accounts/Linckia_guildingii/

Pawson, D. 2007. Phylum Echinodermata. *Zootaxa.* **1668**: 749-764.

Pinder, L., Porttinger, T., Billingham, Z, y Depledge, M. 1999. Endocrine Function in Aquatic Invertebrates and Evidence for Disruption by Environmental Pollutants. IFE Report number: **WI/T1106817/1**: 23-25.

Sconzo, G., Fasulo, G., Romancino, D. y Giudice, G. 1996. Effect of retinoic acid and valproate on sea urchin development. *Pharmazie* **51(3)**:175-180.

Sciarrino, S. y Matranga, V. 1995. Effects of retinoic acid and dimethylsulfoxide on the morphogenesis of the sea urchin embryos. *Cell Biol. Int.* **19(8)**: 675-680.

Stenberg, P., Saura, A. 2009. Cytology of asexual animals. pp. 63-74. En: Lost sex: The evolutionary biology of parthenogenesis. (ed.) Springer Science & Business media. B.V. New York.

Solís-Marín, F., Laguarda-Figueras, A. 2011. Crinoideos, estrellas, ofiuros, erizos y pepinos de mar (Equinodermata). La biodiversidad en Veracruz estudio de estado, 225-234.

Solís-Marín, F., Reyes-Bonilla, H., Herrero Pérezrul, M., Arizpe-Cobarrubias, O. y Laguarda-Figueras, A. 1997. Sistemática y distribución de los equinodermos de la Bahía de La Paz. Ciencias Marinas **23(2)**: 249-263.

Solís-Marín, F., Laguarda-Figueras, A. y Honey-Escandon, M. 2014. Biodiversidad de equinodermos (Equinodermata) en México. Rev. Mex. Biol. **85**:441-449.

Terasaki, M., Runft, L. 2010. Two-stage dependence for 1-methyladenine induce reinitiation of meiotic maturation in starfish oocytes. Exp. Cell. Research. **316**: 2654-2663.

Trukhina, V., Lukina, A., Nekrasova, A. y Smirnov, F. 2005. Control of entry meiosis of germ cells precursors in chickens. Global Journal of Science Frontier Research **15** (1).

Ting, R., Deng, Y., Chen, Y. y Zhao, H. 2012. Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development. Cell. Biol. **2**:11.

Trautmann, E., Guerquin, M., Duquenne, C., Lahaye, J., Habert, R. y Livera, G. 2008. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. Cell Cycle. **7(5)**:656-664.

Voronina, E. y Wessel, G. 2003. The regulation of oocyte maturation, Curr. Top. Dev. Biol. **58**: 53–110.

Wang, Y., Chen, J., Du, C., Li, C., Huang, C. y Dong, C. 2014. Characterization of retinoic acid induced neurobehavioral effect in developing zebrafish. Environ. Toxicol. Chem. **33(2)**:431-437.

Wessel, G. y Reich, A. 2010. Special Issue: SBiRM: Focus on Model Systems for the Study of Spermatogenesis and Male Infertility. Systems Biology in Reproductive Medicine **56**: 236–245.

Yamaguchi, M. 1977. Population structure, spawning and growth of the coral reef asteroid *Linckia laevigata* (Linnaeus). Pacific science **31(1)**:13-30.

Koubova, J., Menke, B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, D. y Page, C. 2006
Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc.
Natl Acad. Sci. **103**: 2474–2479.

Yokoyama, Q., y Amaral, C. 2010. Arm regeneration in two populations of
Ophionereis reticulata (Echinodermata, Ophiuroidea). Iheringia, Serie Zoology.
100: 123-127.

ANEXO 1

Protocolo para la tinción hematoxilina

Procedimiento

- Sumergir los portaobjetos en Hematoxilina durante 3-5 minutos
- Lavar con agua corriente 2 veces por 5 minutos
- Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos
- Deshidratar en etanol al 70% durante 3 minutos
- Aclarar en xileno al 100% durante 5 minutos
- Montaje final con el cubre objetos por medio de resina

ANEXO 2

PERMISO DE PESCA

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS		DGOPA -PF -01
SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN COMISIÓN NACIONAL DE ACUACULTURA Y PESCA DIRECCIÓN GENERAL DE ORDENAMIENTO PESQUERO Y ACUÍCOLA PERMISO DE PESCA DE FOMENTO		
		FOLIO No.063/14
Permiso de Pesca de Fomento No. PPF/DGOPA-063/14 Vigencia del 14 de abril de 2014 Al 13 de abril de 2015		
Expedido en: Mazatlán, Sinaloa		El día 08 de abril de 2014
Titular del Permiso: Universidad Veracruzana		Clave R.N.P.
Domicilio: km. 7.5 Carretera Tuxpan-Tampico.		
Localidad: Tuxpan	Municipio: Tuxpan	Entidad: Veracruz
Título del Proyecto: "La estrella <i>Licknia guidingui</i> y el coral <i>Acropora palmata</i> como modelos para el estudio de la evolución de la regeneración" "Estudio de las vías WNT y SHH en <i>Amphimedon viridis</i> , un modelo para entender el origen y evolución del desarrollo embrionario"		
Zona de Operación: Aguas marinas de jurisdicción federal del Golfo de México, específicamente en el Sistema Arrecifal Veracruzano SAV (arrecifes Tuxpan, En medio, Tanhujo e Isla de Lobos) y Laguna de Tampamachoco.		
Nombre(s) de la(s) Embarcación(es) Autorizadas:	Número de Matricula(s):	Marca y Potencia (HP) de motor:
DARWIN Rentarán embarcaciones en las localidades de muestreo.	3001643017-7	SUZUKI 115
Artes o Equipos de Pesca Autorizados:		
- Colecta manual - GPS, bolsas, frascos, hielera		
Sitio de Desembarque Autorizado o Puerto Base: Tuxpan, Veracruz, y puerto bases autorizados a las embarcaciones rentadas.		
Nombre del Investigador Responsable: Dr. Rodrigo Cuervo González Institución que respalde Si <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Nombre: Universidad Veracruzana		
Con Base en la(s) Opinión(es) Técnica(s):		
-Instituto Nacional de Pesca: Oficio No.- R/JL/INAPESCA/DGAIPA/291/2013 de fecha 24 de mayo de 2013 -Instituto Nacional de Pesca: Oficio No.- R/JL/INAPESCA/DGAIPA/078/2014 de fecha 12 de febrero de 2014		
Este permiso se expide con fundamento en lo dispuesto en los artículos 1°, 4ª fracción XXXII y 28 fracción II, III, V, 41 fracción V y 84 de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables; 16 fracciones I y II, 20, 25, 29, 30 fracción I inciso b), 31 fracción II inciso c), 69, 71, 72, 74.76 y 73 de su Reglamento; artículo 35 fracciones XXI y XXII de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 1°, 2° inciso d), fracción III y octavo transitorio del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y 2 fracción II del Decreto por el cual se crea la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca, el cual es:		
a) Intransferible. b) Se otorga sin perjuicio de los permisos o autorizaciones que requieran de otras autoridades competentes. c) Los documentos nacionales o extranjeros que se publiquen como resultado de las actividades realizadas, deberán hacer referencia al número del permiso correspondiente otorgado por esta Comisión. d) Sus efectos se extinguirán por cualquiera de las causas señaladas en los artículos 62, 63, 64, 65, 66 y 67 de la Ley General de Pesca y Acuicultura Sustentables o por incumplimiento de las obligaciones que le impone el mismo.		
AUTORIDAD EXPEDIDORA		
VICTOR MANUEL ARRIAGA HARO	DIRECTOR GENERAL	FIRMA
NOMBRE	CARGO	HOJA 1 B
Este Documento no es válido si lleva tachaduras o enmendaduras		
INTERES		