

ARTÍCULO ORIGINAL

DESARROLLO EMBRIONARIO DE *HELISOMA PERUVIANUM*
(BRODERIP 1832) (PULMONATA: PLANORBIDAE)
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIOEMBRYONARY DEVELOPMENT OF *HELISOMA PERUVIANUM*
(BRODERIP, 1832) (PULMONATA: PLANORBIDAE)
UNDER LABORATORY CONDITIONSCecilia Matzunaga¹, Giannina Passuni², Jose Pino¹ & José Iannacone³

¹Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú. Casilla 11-058, Lima 11, Perú.
Tel.: +51 6 197000 – 1529; fax: +51 6 197000 –1509.

²Laboratorio de Biología y Sistemática de Invertebrados Marinos, Departamento de Zoología.
Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima, Perú.

³Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal,
Lima, Perú. Correo electrónico: matcce@hotmail.com (C. Matzunaga)

The Biologist (Lima) 8:35-42.

ABSTRACT

The embryonic development stages of *Helisoma peruvianum* (Broderip, 1832) (Pulmonata: Planorbidae) reared under controlled conditions is described. 1 250 embryos located in 31 capsules (Mean = 40. 32) were maintained at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 h of continued artificial light. 7 embryonic stages were recognized: 2 cells, 4 cells, morulae, blastula, gastrula, trochophore "veliger" and juvenile. The greatest mortality occurs at 192 h after being placed on the juvenile. The number of eggs per capsule had a significant difference in comparison to *H. trivolvis*.

Key words: embryonic development, freshwater fauna, gastropod, *Helisoma peruvianum*, mortality.

RESUMEN

Se describe el desarrollo embrionario de *Helisoma peruvianum* (Broderip, 1832) (Pulmonata: Planorbidae) bajo condiciones de ambiente controlado. Se mantuvieron 1250 embriones localizados en 31 capsulas (promedio = 40,32) a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y 24 h continuas de luz artificial. Se reconocieron 7 estadios embrionarios: 2 células, 4 células, mórula, blástula, gástrula, trocófora "veliger" y juvenil. La mayor mortalidad se produce a las 192 h post puesta en el estadio juvenil. Se obtuvieron diferencias significativas en el número de huevos por cápsula en comparación a *H. trivolvis*.

Palabras clave: desarrollo embrionario, fauna dulceacuícola, gasterópodo, *Helisoma peruvianum*, mortalidad.

INTRODUCCIÓN

Los embriones de gasterópodos pulmonados siguen un desarrollo directo a partir de huevos fertilizados hasta caracoles juveniles dentro de una capsula llena de un fluido perivitelino albuminoide (Kuang *et al.* 2002). Los huevos son de tipo telolecito y presentan segmentación en espiral (Baker 1945). El desarrollo es planctotrófico y lecitotrófico (Beadle 1969, Rupert & Barnes 1995, Cowie 2001).

El género *Helisoma* es nativo de América del Norte, pero se ha registrado su presencia en la región Neotropical, especialmente en los andes del Perú, Ecuador y Colombia (Kawano *et al.* 1985). Este género sirve de modelo en una amplia gama de estudios como: neurobiológicos (Jiménez *et al.* 2006, Vavoulis *et al.* 2007, Goldberg *et al.* 2008) ecotoxicológicos; tanto en estadio de huevos (Tchounwou *et al.* 1991), embriones (Aboul-Ela & Khalil 1987, Cole *et al.* 2002), juveniles y adultos (Arthur *et al.* 1987, Camargo & Alonso 2007). Esta selectividad se debe por una parte a su distribución geográfica, su participación en la cadena trófica en ambientes acuáticos y por su cápsula transparente donde se puede observar y seguir el desarrollo embrionario directamente (Passuni *et al.* 2008).

En el Perú, el género *Helisoma* esta representado por *Helisoma trivolvis* (Say 1817), *Helisoma duryi* (Wetherby, 1879) y *Helisoma peruvianum* (Broderip, 1832), ubicados en la costa norte y central (Ramírez *et al.* 2003). Los escasos trabajos en relación a estos caracoles se refieren solo a distribución, taxonomía y ecología (Paraense 2003, 2004, Letelier *et al.* 2003, Ramírez *et al.* 2003). Recientemente Passuni *et al.* (2008) estudió el efecto de cloruro de mercurio en el desarrollo embrionario de *H. trivolvis*; sin

embargo en *H. peruvianum* y en *H. duryi* no existen reportes sobre su biología y desarrollo temprano.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los estadios embrionarios en *H. peruvianum* a una temperatura constante; la tasa de mortalidad entre los diferentes estadios y, compararlos con algunos detalles del desarrollo embrionario de *H. trivolvis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes de *H. peruvianum* fueron colectados en acuarios de la ciudad de Lima, Perú, en el mes de julio de 2008. En el laboratorio, fueron aclimatados por 30 días en un recipiente rectangular de vidrio de 6 L de capacidad, con agua de grifo de clorinada reposada por 7 días, a una temperatura 20 ± 1 °C y alimentados con comida balanceada para peces en forma de hojuelas. El fotoperiodo empleado fue de 24 h de emisión de luz continua mediante 2 fluorescentes lineales (daylight x 32 watts).

Se juntaron parejas de caracoles de *H. peruvianum* con un diámetro promedio de 18 mm, los cuales se acondicionaron en recipientes cilíndricos (bocales) de 60 mm de alto y 100 mm de diámetro para el cruce y puesta de cápsulas. Para facilitar la obtención de las cápsulas se agregó *Elodea* sp., de esta manera tomando solo las hojas de la planta acuática con una pinza de relojero, se los pudo trasladar a una placa de Petri para su posterior observación al microscopio estereoscópico. Luego de 12 h se confirmó la presencia de cápsulas en cada recipiente (Góngora *et al.* 2007). La temperatura fue similar a la de aclimatación. La concentración de cloro libre fue $0,1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. El monitoreo del desarrollo

embrionario fue a las 0 h, 24 h, 48, 72 h, 144 h y 192 h. El pH promedio del agua fue de 7,4.

Se observó y fotografió el desarrollo embrionario dentro de las capsulas de los estadios de clivaje temprano hasta la respectiva eclosión mediante un microscopio de campo claro Carl Zeiss Jena® donde se adaptó una cámara digital Cannon/Leica®.

Se evaluaron un total 31 cápsulas obtenidas en tres replicas, de las cuales se obtuvo el porcentaje total de cada estadio y el de la mortalidad. Los embriones se consideraron muertos cuando no mostraron movimiento de rotación durante aproximadamente 30 s (Passuni *et al.* 2008).

Para comparar el número de huevos por cápsula entre *H. peruvianum* y *H. trivolvis* se tomaron los datos de Passuni *et al.* (2008), debido a que las condiciones de cultivo de *H. trivolvis* fueron similares. Se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney para comparar el número de huevos en las dos especies mediante el programa SPSS versión 15,0.

RESULTADOS

En la Tablas 1 y 2 y en la Fig. 1 se presentan los resultados del desarrollo embrionario y de mortalidad de *H. peruvianum* bajo condiciones de laboratorio. Para *H. peruvianum* se evaluaron 31 cápsulas conteniendo un número total de 1 250 huevos con un promedio estimado de 40 huevos por cápsula. La capsula consistió en una envoltura doble de naturaleza gelatinosa llena con un fluido albuminoide claro o ligeramente coloreado. Los huevos estuvieron cubiertos por una membrana

vitelina, el citoplasma estuvo teñido de marrón oscuro a claro, el núcleo fue más oscuro. La posición del embrión varió dentro de la capsula.

La mayoría de las puestas ocurrieron durante las horas nocturnas o tempranas en las mañanas, ubicadas adheridas a la pared del recipiente o en las hojas de *Elodea*. Se diferenciaron 7 estadios embrionarios: 2 células, 4 células, mórula, blástula, gástrula, trocófora “larva veliger” y juvenil.

A) Clivaje (Fig. 1a-d).

El huevo fertilizado empieza el proceso de clivaje inmediatamente después de la puesta. Antes de las 4 h se observaron los estadios de dos células resaltando los blastómeros de igual tamaño (Fig. 1a). Posteriormente (aproximadamente 1 h después) observamos el estadio de 4 células (Fig. 1b) y h después a la mórula (Fig. 1c) y blástula (1d).

B) Gastrulación y estadios larvales (Fig e - g).

Después del estadio de blástula, el proceso de gastrulación se inicia a partir de las 24 h; encontrando este estadio hasta las 72 h (ver tabla I), sugiriendo que el desarrollo es asincrónico iniciada el clivaje, en consecuencia, encontramos a las 24 h, estadios de mórula (Fig c), blástula (Fig. d) y gástrula (Fig. e), a las 48 h: blástula, gástrula y trocófora, a las 72 h: gástrula y trocófora, a las 144 horas trocófora y “veliger” (Fig f) y finalmente a las 192 h: el estadio juvenil (Fig. g), donde se completa el desarrollo y sucede la eclosión (Tabla 1). La gástrula se caracteriza por un aplanamiento en uno de los polos del embrión (polo vegetal). Hay que destacar que al final de este estadio se observa una rotación del embrión alrededor de la capsula por la presencia de cilios en la superficie externa del mismo. Los estadios larvales se caracterizan por la organogénesis y cefalización del embrión. El porcentaje de

mayor mortalidad se encuentra a las 192 h en el estadio juvenil ($3,56 \pm 8,10$), la segunda mayor mortalidad se encuentra a las 24 h ($2,88 \pm 5,27$). La mortalidad al final del tratamiento fue de $17,15 \pm 12,71$ (Tabla 2). En 31 cápsulas de *H. peruvianum* el número

promedio de huevos fue de 40,32 y en 45 cápsulas de *H. trivolvis* fue de 18,88, con una diferencia significativa (U-Mann & Whitney, $p < 0,001$) para el número de huevos en las dos especies.

Tabla 1. Porcentaje de desarrollo embrionario de *H. peruvianum* post puesta a 20 ± 1 °C en condiciones de laboratorio.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h	192 h
2 células	$14,60 \pm 20,84$					
4 células	$69,70 \pm 20,87$					
Mórula	$7,60 \pm 12,00$	$48,80 \pm 3,61$				
Blástula		$31,14 \pm 28,21$	$47,88 \pm 47,27$			
Gástrula		$10,51 \pm 11,75$	$5,54 \pm 8,92$	$18,29 \pm 34,05$		
Trocófora			$35,46 \pm 39,03$	$38,09 \pm 35,46$	$1,34 \pm 6,13$	
Larva Velíger					$85,31 \pm 11,78$	
Juvenil						$77,58 \pm 22,30$

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad embrionaria de *H. peruvianum* durante 192 h post puesta.

	24 h	48 h	72 h	144 h	192 h
Mortalidad	$2,88 \pm 5,27$	$0,81 \pm 1,65$	$2,01 \pm 5,00$	$1,42 \pm 3,21$	$3,56 \pm 8,10$
Mortalidad acumulada	$9,55 \pm 8,26$	$10,36 \pm 8,69$	$12,37 \pm 10,05$	$13,79 \pm 11,43$	$17,35 \pm 12,71$

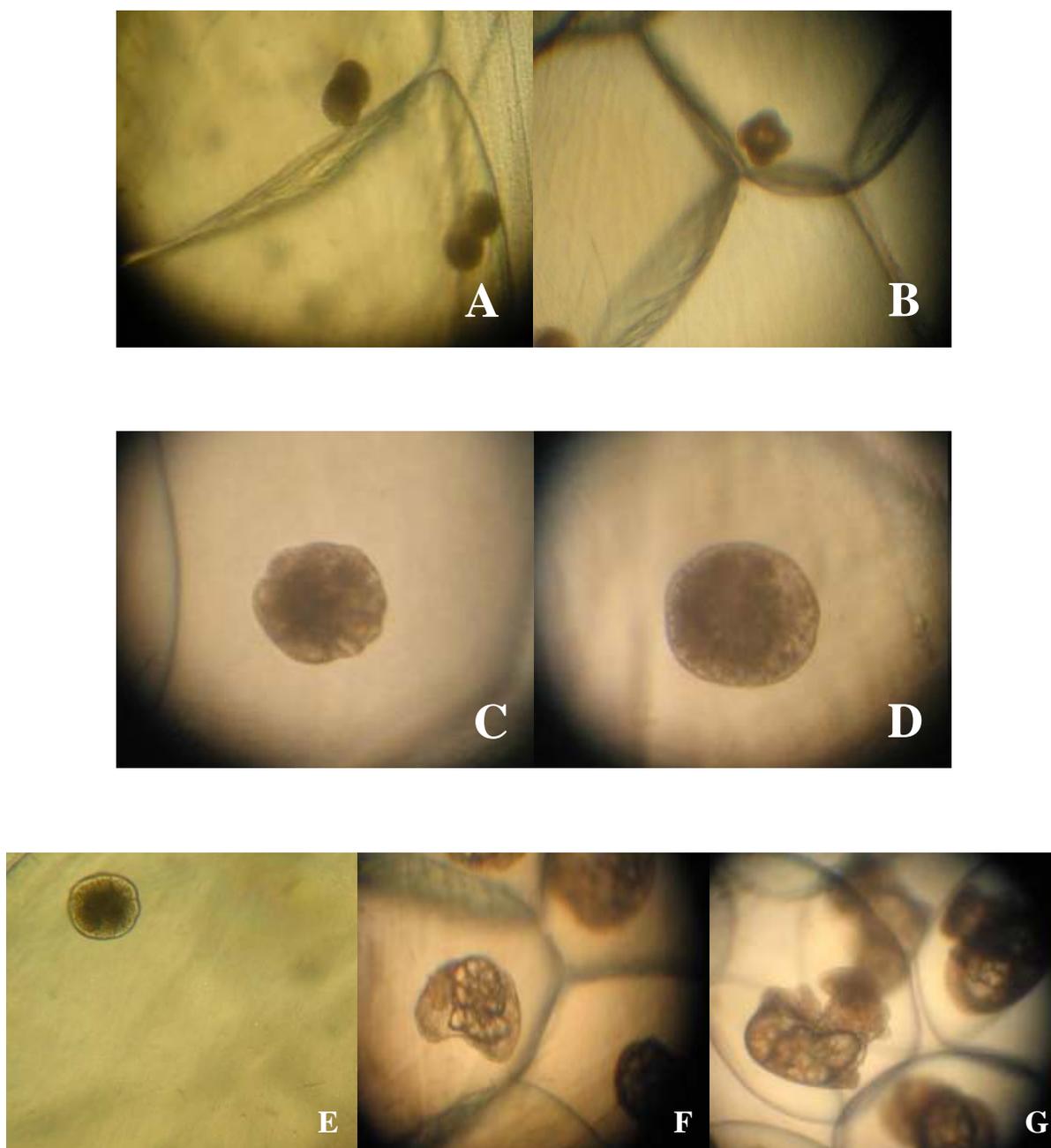


Figura 1. Estadios embrionarios, larvales y juveniles de *H. peruvianum* cultivados en condiciones de laboratorio. A) dos células, B) cuatro células, C) Mórula, D) blástula, E) gástrula, F) larva veliger y G) juvenil. Aumento 100X.

DISCUSIÓN

Experimentos realizados con *H. trivolvis* procedentes de Zempoala, Morelos, México han demostrado que la autofecundación no es una forma alternativa de reproducción tan eficiente en esta especie (Paraense & Correa 1988).

Los embriones de *H. peruvianum*, están individualmente compartimentalizados en cápsulas con un número variable ($x=40,32$) a diferencia de *H. trivolvis* que contiene en las masas de huevos entre 5 a 50 embriones (Goldberg 1995). Los huevos son tipo telolecitos y presentan segmentación en espiral, el desarrollo embrionario es determinado y directo, donde los estadios desde el cigote al juvenil se desarrollan dentro de la cápsula transparente.

El desarrollo embrionario de *H. peruvianum* se efectúa en 8 días, similar periodo es descrito por Naranjo (2003) en *H. trivolvis*. Una diferencia observada con respecto a *H. trivolvis* fue que durante el desarrollo en una misma cápsula se puede tener diferentes estadios, de este modo se observó el estadio de 2 células, 4 células y mórula como los estadios iniciales, incluyendo en este último los estadios de más de 4 células; luego se observó una blástula con la presencia del blastocele; seguido de una gástrula donde se puede observar la diferencia entre un ectodermo y mesodermo; en la trocófora hay un giro y rotación evidente; en la larva velíger; la región cefálica y pedal se distinguen muy bien, igualmente los órganos; finalmente se observa la etapa de juvenil donde el embrión está completamente formado y desaparece el velo y se abre paso a través de la cápsula para emerger al medio.

Para este estudio hemos considerado el estadio transicional trocófora-juvenil (Diefenbach *et al.* 1991) como el estadio de “veliger”, debido a que presenta una rotación característica y además posee un velo ciliado lo que es típico de este período de desarrollo.

Los estadios que tuvieron mayor duración fueron gástrula y trocófora debido a que en éstos hay organogénesis y rotación, siendo crucial en el desarrollo embrionario, mientras que los estadios de 2 y 4 células y juvenil son mas cortos debido a la rapidez inicial de la división celular y en el caso del estadio juvenil el embrión solo adquiere tamaño y peso.

Durante el proceso de desarrollo se observó algunas anomalías en los embriones, tamaño más pequeño o no formación de conchilla incompleta, en ambos casos, estos individuos no lograban eclosionar. También se observó dentro de una misma cápsula mas de un embrión, entre 2 hasta 3 embriones, en la mayoría de los casos sólo uno de ellos desarrolló completamente y los otros no eran viables; como también se dio el caso de que ambos embriones se desarrollaron y eclosionaron. La eclosión de los juveniles en *H. peruvianum* es mas precoz que lo registrado en *H. trivolvis* (Naranjo 2003), donde el autor no precisa la temperatura utilizada, si bien indica en forma general una temperatura óptima mayor de 25°C.

En el agua de cultivo se observó protozoarios y nemátodos que ocasionaron daños durante el desarrollo de los embriones. *Vorticella* sp. era uno de los protozoos mas abundantes adheridos en el contorno de las cápsulas. Los nemátodos (no identificados) tienen una acción más dañina, ya que se introducen en la cápsula y matan a los embriones. Para evitar la contaminación de las demás cápsulas se eliminaron las que presentaron nemátodos.

El gran porcentaje de mortalidad observado en el estadio juvenil podría ser debido a que todos no eclosionan al mismo tiempo. Los que eclosionan primero abren la cápsula y exponen el material albuminoide al medio ocasionando un ambiente propicio para hongos, bacterias, protozoarios y demás organismos oportunistas.

AGRADECIMIENTO

A Carlos Paredes Quiroz, Jefe del Laboratorio de Biología y Sistemática de Invertebrados Marinos, Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú por la identificación taxonómica de *H. peruvianum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboul-Ela, I. A. & Khalil, M.T. 1987. The chronic toxicity of three pollutants upon the freshwater snail *Helisoma trivolvis*. Proceedings of the Zoological Society A. R. Egypt, 13:17-29.
- Arthur, J.W.; West, C.W.; Allen, K.N. & Hedtke, S.F. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 38:324-331.
- Baker, F. C. 1945. *The Molluscan Family Planorbidae*. The University Of Illinois Press. 578 p.
- Beadle, B. 1969. Salt and water regulation in the embryos of freshwater pulmonate molluscs. Journal of Experimental Biology, 5: 491 -499.
- Camargo, J.A. & A. Alonso. 2007. Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático. Ecosistemas, 16: 1-13.
- Cole, A. G.; Mashkournia, A.; Parries, S. C. & Goldberg, J. 2002. Regulation of early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis*. Journal of Experimental Biology, 205: 3143-3152.
- Cowie, R. H. 2001. Can snails ever be effective and safe biocontrol agents?. Internationak Journal of Pest Management, 47: 23-40.
- DeJong, R.; Morgan, J.; Lobato-Paraense, W.; Pointier, J.; Amarista, M.; Ayeh-Kumi, P.F.K.; Babiker, A.; Barbosa, C.S.; Brémond, P.; Canese, A.P.; Pereira de Souza, C.; Dominguez, C.; File, S.; Gutierrez, A.; Incani, R.N.; Kawano, T.; Kazibwe, F.; Kpikpi, J.; Lwambo, N.J.S.; Mimpfoundi, R.; Njiokou, F.; Poda, J.N.; Sene, M.; Velásquez, L.E.; Yong, M.; Adema, C.M.; Hofkin, B.V.; Mkoji, G.M. & Loker, E.S. 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. Molecular Biology and Evolution, 18: 2225-2239.
- Diefenbach T. J.; Koehncke N. K. & J.I. Goldberg. 1991. Characterization and development of rotational behavior in *Helisoma* embryos: role of endogenous serotonin. Journal of Neurobiology, 22: 922-934.
- Goldberg, J. 1995. Neuronal development in embryos of the mollusk, *H. trivolvis*: multiple roles of serotonin. Advances in Neural Science, 2: 67-87.
- Goldberg, J.; Doran, S.; Shartau, R.; Pon, J.; Ali, D.; Tam, R. & Kuang, S. 2008. Integrative biology of an embryonic

- respiratory behaviour in pond snails: the 'embryo stir-bar hypothesis'. *Journal of Experimental Biology*, 211: 1729-1736.
- Góngora, A.; Dominguez, A.; Muñoz, N. & Rodríguez, L. 2007. Obtención de masas ovígeras del caracol lancetilla, *Strombus pugilis* (Mesogastropoda: Strombidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de Biología de Tropical*, 55:183-188.
- Jiménez, C.; Spijker, S.; de Schipper, S.; Lodder, J.C.; Janse, C.K.; Geraerts, W.P.M.; Minnen, J.V.; Syed, N.I.; Burlingame, A.L.; Smit, A.B.; & Li, K. 2006. Peptidomics of a single identified neuron reveals diversity of multiple neuropeptides with convergent actions on cellular excitability. *Journal of Neuroscience*, 26: 518- 529.
- Kawano, T.; Simões, L. & Almeida, L. 1985. Karyotype and nucleolar organizer regions of *Helisoma duryi* (Wetherby, 1897). *Revista Brasileira de Genética*, 8: 285-290.
- Kuang, S.; Regnier, M. & Goldberg, J. 2002. Long-term culture of decapsulated gastropod embryos: a transplantation study. *The Biological Bulletin*, 203: 278-288.
- Letelier, S.; Vega, M.; Ramos, A. & Carreño, E. 2003. Base de datos del Museo Nacional de Historia Natural: moluscos de Chile. *Revista de Biología Tropical*, 51 (Supl. 3): 33-137.
- Naranjo, E. 2003. Moluscos continentales de México: Dulceacuícolas. *Revista de Biología Tropical*, 51 (Supl. 3): 495-505.
- Paraense, W.L. & Correa, L.R. 1988. Self-fertilization in the freshwater snails *Helisoma duryi* and *Helisoma trivolvis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 405-409.
- Paraense, W. 2003. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Peru (Mollusca: Basommatophora). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 767-771.
- Paraense, W. 2004. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 357-362.
- Passuni, G.; López, R.; Pino, J. & Iannacone, J. 2008. Toxicidad aguda del mercurio en embriones de *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) (Mollusca: Planorbidae). *The Biologist (Lima)*, 6:48-53.
- Ramírez, R.; Paredes, C. & Arenas, J. 2003. Moluscos del Perú. *Revista de Biología Tropical*, 51 (Supl. 3): 225 - 284.
- Ruppert, E. & Barnes, R. 1995. *Zoología de los invertebrados*. Mc Graw-Hill interamericana. 6^{ta} Ed. 1114 p.
- Tchounwou, P.B.; Englande, A.J. & Malek, EA. 1991. Toxicity evaluation of Bayluscide and malathion to three developmental stages of freshwater snails. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 351-358.
- Vavoulis, D.; Straub, V.; Kemenes, I.; Kemenes, G.; Feng, J. & Benjamin, P. 2007. Dynamic control of a central pattern generator circuit: a computational model of the snail feeding network. *European Journal of Neuroscience*, 25: 2805-2818.

Fecha de recepción: 06 de enero del 2010.
 Fecha de aceptación: 15 de abril del 2010.