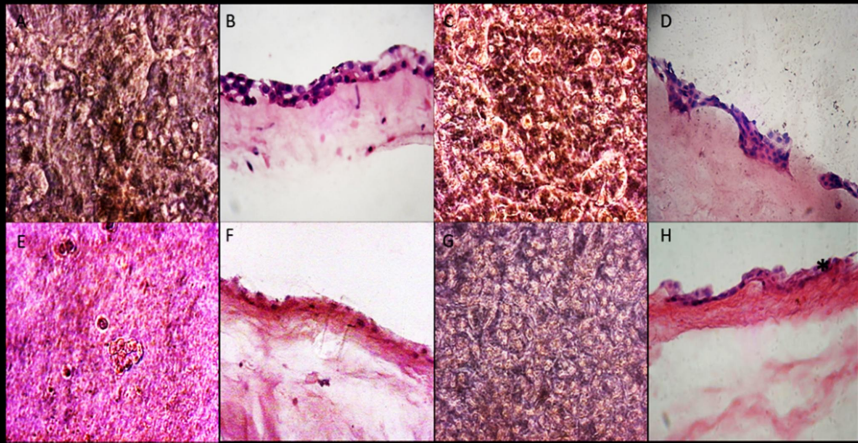


ACTA BIOLOGICA VENEZUELICA

Fundada en 1951



VOL. 43
N° 2

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE ZOOLOGÍA Y ECOLOGÍA TROPICAL

PORTADA

Evaluación morfológica de las Células Epiteliales de la Membrana Amniótica Humana (CEMAH) cultivadas sobre EMAH. Figura 4 en Navaro *y col.* (p. 185).



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA Y ECOLOGÍA TROPICAL



Acta Biologica Venezuelica

VOLUMEN XLIII No. 2 JULIO-DICIEMBRE 2023

VE ISSN 001-5326 Depósito Legal 195102DF414

Publicada por el Instituto de Zoología y Ecología Tropical,
Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Directora – Editora:

Dra. Ana Bonilla

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

Editora Invitada:

Dra. María Lorena Márquez

Editores:

Dr. Héctor López Rojas

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

Dra. María Beatriz Barreto

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

Dra. María Eugenia Grillet

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

Dr. Juan Carlos Navarro

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV.

Dr. Antonio Machado-Allison

Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

Dr. Nelson Ramírez

Instituto de Biología Experimental, UCV

INSTITUTO DE ZOOLOGÍA Y ECOLOGÍA TROPICAL
Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela,
Paseo Los Ilustres, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela.
Apartado postal 47058 - Caracas 1041-A, VENEZUELA
Teléfono: +58-212-605.1406 Fax: +58-212- 605.1204

CÉLULAS MADRE EN LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS

Elizabeth Merentes

Instituto de Biología Experimental (IBE), Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
emerentes@gmail.com

La investigación en células madre es un tema de gran actualidad debido a las grandes expectativas que se han generado para su utilización en la medicina del futuro, así como también su aplicación en la biología del desarrollo, creando modelos *in vitro* que permitan analizar diferentes eventos que ocurren durante el desarrollo y que son difíciles de estudiar en el embrión completo, tales como diferenciación, interacción, inducción epitelio-mesénquima, entre otros. Asimismo, hoy en día se busca obtener células madre de diferentes fuentes para su uso en la reconstrucción de neotejidos *in vitro*, un nuevo campo emergente denominado Bioingeniería de Tejidos que tiene un enorme potencial médico y se presenta como un método alternativo para la sustitución de tejidos dañados en el humano, ya que se puede reconstruir tejidos y órganos *in vitro* a partir de células obtenidas del mismo paciente, para esto se toma una pequeña biopsia de tejido, se disgregan las células y se cultivan para luego ser implantadas *in vivo*, luego de cierto tiempo estas células contribuyen a la regeneración del tejido dañado. Se pueden obtener equivalentes de tejidos a partir de estas células autólogas, pero también se han planteado otras alternativas para la obtención de células y su uso en la bioingeniería de tejidos, la utilización de células madre de origen embrionario o de tejidos adultos, tales como el tejido adiposo (Zhang *y col.*, 2020), las cuales pueden ser canalizadas a diferenciarse en un determinado linaje celular dependiendo del microambiente *in vitro*.

Uno de los aspectos básicos en la bioingeniería es producir una gran cantidad de células que mantenga su identidad histológica similar al tejido nativo, para esto se deben establecer los cultivos primarios en monocapas y luego amplificar las poblaciones celulares a través de los subcultivos utilizando diferentes factores en los medios nutritivos, así como también se debe tener en cuenta la densidad de siembra porque es importante la interacción célula-célula (Merentes, 2016). Además, otro elemento clave es el tipo de sustrato que se utilice, un andamio donde las células puedan adherirse, promoviendo así la migración, la proliferación y diferenciación celular que van a permitir la formación del nuevo tejido *in vitro* (Lan *y col.*, 2020). El uso de biomatrices en los cultivos celulares permite entonces ubicar las células espacialmente y así poder regular sus funciones, lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo en particular.

Uno de los más antiguos biomateriales empleados como sustrato es la membrana amniótica humana. Recientemente se está utilizando como matriz tridimensional donde pueden crecer las células y diferenciarse para ser usadas

en la medicina regenerativa, específicamente se ha utilizado en el tratamiento de tejidos dañados en pacientes con osteoartritis, vitiligo (Díaz-Prado *y col.*, 2011; Redondo *y col.*, 2011), así como también como una nueva fuente de obtención de células madre epiteliales y mesenquimales (Fénelon *y col.*, 2021). La membrana amniótica puede ser utilizada con su estructura íntegra, ya sea con el epitelio amniótico (MA íntacta) o sin este (MA desnuda). Para usarlo como sustrato nativo es importante mantener las características morfológicas y fisiológicas cuando el estroma es criopreservado a bajas temperaturas.

En las últimas décadas se han logrado grandes avances en la implementación de las técnicas de cultivo celular, con esta biotecnología en conjunto con el aporte de las técnicas de histología, se han podido crear y caracterizar modelos que permiten generar un mayor conocimiento en áreas básicas tales como la biología del desarrollo y que en el futuro podrían servir de gran utilidad para la comprensión de los mecanismos de diferenciación de las células madre adultas y su aplicabilidad en la ingeniería de tejidos. En este sentido las células de la línea germinal masculina son de gran interés ya que podrían ser una fuente alternativa de células madre adultas. Estas células, las espermatogonias, residen en los testículos de los organismos en donde sufren un proceso de proliferación y diferenciación estimulado y mediado por diversos factores y por el nicho celular en donde se encuentran. Recientemente se ha logrado un gran avance recapitulando la organogénesis *in vitro* de gónadas fetales humana (Yuan *y col.*, 2020).

LITERATURA CITADA

- Díaz-Prado, S., E. Muiños, T. Hermida-Gómez, C. Cicione, M. Rendal, I. Fuentes, F. De Toro y F.J. Blanco. 2011. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* 1: 162 – 171.
- Fénelon M., S. Catros, C. Meyer, J.C. Fricain, L. Obert, F. Auber, A. Louvrier y F. Gindraux. 2021. Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. *Membranes* (Basel). May 25;11(6):387. doi: 10.3390/membranes11060387. PMID: 34070582; PMCID: PMC8227127.
- Lan D., P. Binh, N. Giang *y col.* 2020. Isolation and differentiation of amniotic membrane stem cells into keratinocytes. *Cell Transplantation* 2020;29. doi:10.1177/0963689720964381
- Merentes, E. 2016. *Manual de técnicas básicas del cultivo celular*. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas
- Redondo, P., A. Giménez, L. Marques, M. García-Guzmán, E. Andreu y F. Prosper. 2011. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatology Res. Practice*. Article ID 532139, DOI: 10.1155/2011/532139
- Yuan Y., L. Li, Q. Cheng, F. Diao, Q. Zeng, X. Yang *y col.* 2020. *In vitro* testicular organogenesis from human fetal gonads produce fertilization competent spermatids. *Cell Res.* 30:244-255
- Zhang, J., L. Yuzhe, Y. Chen, L. Yuan, H. Liu, J. Wang, Q. Liu y Y. Zhang. 2020. Adipose-derived stem cells: Current applications and future directions in the regeneration of multiples tissues. *Stem Cell International* ID: 8810813.

PRIMER REGISTRO CONFIRMADO DEL PETREL CENICIENTO *Calonectris diomedea borealis* EN VENEZUELA

Nohelys Díaz¹, Sandra Giner^{*2}, Miguel Lentino³,
Gianco Angelozzi-Blanco⁴ y Ramón Rivero⁵

¹Refugio de Fauna Silvestre Cuare, Dirección de Diversidad Biológica, MINEC;

²Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela,

³Colección Ornitológica W.H. Phelps, ⁴Department of Biology, Mount Allison University, ⁵Dirección de Diversidad Biológica, MINEC.

*sandrabginer@gmail.com

RESUMEN

Las aves pelágicas tienen registros ocasionales en Venezuela, pues generalmente se encuentran fuera de la plataforma continental en aguas abiertas, alejadas de la costa. El Petrel Ceniciento *Calonectris diomedea* es una de ellas, con escasos registros visuales en el país. En el presente trabajo reportamos la presencia de esta especie con base en la captura de un individuo encontrado vivo, pero en malas condiciones físicas sobre una playa arenosa del Parque Nacional Morrocoy, en diciembre de 2021. Basados en las características de su plumaje y morfometría, y tras compararlas con las descripciones de las dos subespecies (*C. d. borealis* y *C. d. diomedea*) concluimos que el ejemplar colectado corresponde a una hembra de la subespecie *C. d. borealis*, confirmando así la ocurrencia definitiva de la especie en Venezuela.

Palabras clave: aves marinas, *Calonectris*, Caribe, Parque Nacional Morrocoy, pelágicas.

First confirmed record of Cory's Shearwater *Calonectris diomedea borealis* in Venezuela

ABSTRACT

Pelagic birds have occasional records in Venezuela, as they generally occur outside the continental shelf in open waters, far from the coast. The Cory's Shearwater *Calonectris diomedea* is one of them, with few visual records in the country. In this paper we document the presence of this species based on the capture of an individual found alive, but in poor physical condition on a sandy beach in the Morrocoy National Park, in December 2021. Based on the characteristics of its plumage and morphometry, and after comparing them with the descriptions of the two subspecies (*C. d. borealis* and *C. d. diomedea*) we conclude that the collected individual corresponds to a female of the subspecies *C. d. borealis*, thus confirming its definitive occurrence.

Keywords: *Calonectris*, Caribbean, Morrocoy National Park, pelagic, seabirds.

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, las aves pelágicas son conocidas por registros puntuales ocasionales en aguas abiertas alejados de la costa, sobre la plataforma continental. Entre las especies pelágicas incluidas en la lista de las aves de Venezuela (Miranda *y col.*, 2021), hay siete especies de Procellariiformes: el Albatros Pico Fino *Thalassarche chlororhynchos* (Diomedidae) y el Petrel de las Tormentas *Oceanites oceanicus* (Oceanitidae), ambas consideradas errantes; la Golondrina de Mar *Hydrobates leucorhous* (Hydrobatidae) una especie migratoria boreal; y cuatro especies de Procellariidae, el Petrel Cauicho *Ardenna gravis*, considerado errante; el Petrel Garrapatero *Puffinus lherminieri*, la única especie residente; y dos especies consideradas hipotéticas el Petrel Cabecinegro *Pterodroma hasitata* y el Petrel Ceniciento *Calonectris diomedea* (Phelps y Meyer de Schauensee, 1979, Ascanio *y col.*, 2017).

Los miembros del género *Calonectris* son aves pelágicas que se encuentran principalmente en latitudes templadas y subtropicales, y anidan en islas (Bird, 1994, Howell, 2012). El mismo reúne tres especies: la Pardela Rayada *C. leucomelas*, restringida al Indo-Pacífico; el Petrel de Cabo Verde *C. edwardsii*, una especie que se reproduce exclusivamente en el archipiélago de Cabo Verde e inverna en el Atlántico sur; y el Petrel Ceniciento, *C. diomedea* (del Hoyo *y col.*, 2020). Para esta última, se reconocen dos subespecies: *C. d. diomedea* y *C. d. borealis* (Clements, 2021), aunque algunos autores las tratan como especies separadas (Howell, 2012, del Hoyo, 2020, Gill *y col.*, 2022). La subespecie nominal *C. d. diomedea*, anida en islas del mar Mediterráneo, desde la costa Ibérica hasta el mar Adriático y Egeo, mientras que *C. d. borealis* se reproduce en el este del Atlántico, desde Galicia en el noroeste de España y las islas Berlengas, frente a Portugal, hasta el oeste de las Azores y al sur de las islas Canarias y en las islas Madeira y Salvajes (del Hoyo *y col.*, 2020). Asimismo, *C. d. diomedea* inverna en el oeste África, en las aguas de las corrientes de las Canarias y Benguela, mientras que *C. d. borealis* migra entre seis grandes áreas del Atlántico: la corriente de Benguela, la corriente de Agulhas, el Atlántico sur central, la Corriente de Brasil, el noroeste del Atlántico y la Corriente de las Canarias (Dias *y col.*, 2011, Reyes-González y González-Solis, 2011).

Su distribución en la región Neotropical incluye el sureste del Caribe (Bond, 1985) en Bahamas, Cuba, Antigua y Barbuda, Guadalupe, Martinica y Barbados (Raffaele *y col.*, 1998), con registros ocasionales para Trinidad y Tobago (Kenefick *y col.*, 2007, French, 2012), Aruba, Bonaire y Curazao (Luksenburg y Sangster, 2013), y al norte de Sudamérica en el Atlántico occidental, en Surinam (Ottema *y col.*, 2009), Guyana Francesa (Tostain *y col.*, 1992, Pusineri *y col.*, 2022) y Guyana (Snyder, 1966). En el Caribe occidental, su presencia se conoce por reportes de individuos encontrados muertos. Ruiz-Guerra y

Cifuentes-Sarmiento (2010) lo registran en la bahía de Cispatá, departamento de Córdoba, Colombia; mientras que Solano-Ugalde y Herrera (2005), en playa Tortuguero, El Limón, Costa Rica.

Aunque en Venezuela el Petrel Ceniciento posee registros visuales de su presencia, no cuenta con evidencia fotográfica o ejemplares en ningún museo nacional. El primer reporte, fue realizado el 27 de diciembre de 1997, dos individuos observados al norte de la península de Paria (10°59'N, 62°29' O) (Murphy, 2002); el segundo fue en diciembre de 1999, en una laguneta temporal del litoral en la península de Araya, estado Sucre (10°39'00" N, 64°15'30" O), donde se encontró gran parte del esqueleto y la piel de un individuo muerto (Marín *y col.*, 2002). Adicionalmente, existen dos reportes en el portal eBird (<https://ebird.org>), un registro de seis individuos volando mar afuera el 13 de febrero de 1999 en Playa Macuto, estado Vargas (10°36'24,8" N, 66°53'35,3" O) (Beadle 1999) y otro de dos individuos, aguas afuera, el 25 de junio de 2007 cerca de la isla de Cubagua (10°52'04,4" N, 64°10'54,1" O) en el estado Nueva Esparta (Froehlich, 2007). La ocurrencia de la subespecie *C. d. borealis* en Venezuela es referida por Restall *y col.* (2006) con base en los reportes de Marín *y col.* (2002). En este sentido, el presente trabajo da a conocer un nuevo reporte del Petrel Ceniciento en Venezuela con evidencia física y fotográfica, confirmando definitivamente su presencia en el país. Adicionalmente, determinamos la subespecie y el sexo tras analizar sus datos biométricos y el plumaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad. El ave se encontró en la línea de playa del área recreativa de Punta Brava (10°47'45,29" N, 68°18'3,69" O), en el Parque Nacional Morrocoy, noreste de Tucacas, en el estado Falcón. Esta zona se caracteriza por presentar lagunas poco profundas influenciadas por las mareas y rodeadas de manglares e islas cubiertas de mangle con extensas playas de arena (Lentino y Bruni 1994).

Material examinado. El 7 de diciembre de 2021, a las 14:00 h, un individuo del Petrel Ceniciento fue encontrado vivo, pero en pobre condición física y muy débil para volar (Figura 1A); el ave murió pocas horas después (16:26 h). El ejemplar fue trasladado y depositado en el Museo de la Estación Biológica de Rancho Grande en El Limón, estado Aragua, registrado con el número de catálogo MEBRG-13715 (Figura 1B).

Identificación de la especie, subespecie y sexo. Para la identificación de la especie se revisó el ejemplar, comparando su plumaje con la descripción de las dos subespecies *C. d. diomedea* y *C. d. borealis* dada por Bird (1994), del Hoyo *y col.* (2020), Howell (2012), en especial, el patrón de coloración de las plumas primarias y sus coberteras (Gutiérrez 1998, Flood y Gutiérrez, 2021). Asimismo, se tomaron las siguientes medidas: longitud total, tarso, ala,

envergadura, cola, cabeza, pico (longitud del culmen, altura del pico, altura del pico en las narinas, ancho del pico), así como la peso, las cuales fueron comparadas con la información de la literatura existente de esta especie (Gómez y col., 2006, 2009 y Howell, 2012).

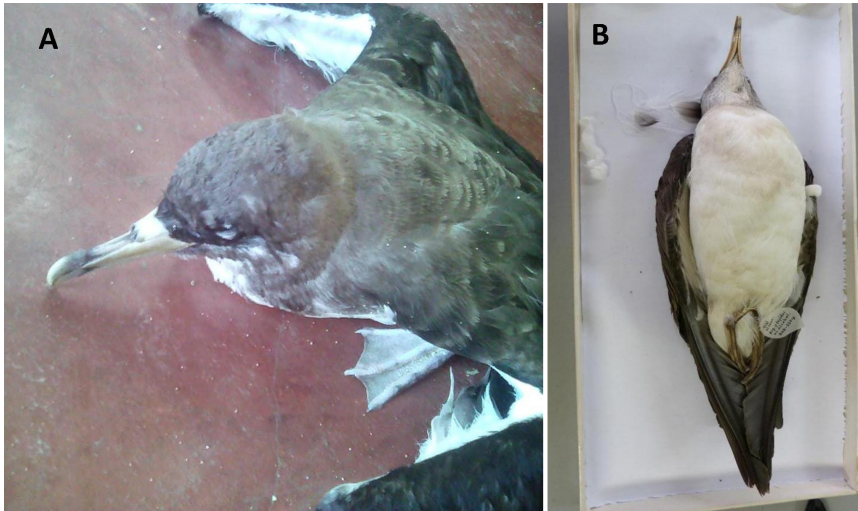


Figura 1. (A) Individuo de Petrel Ceniciento *Calonectris diomedea* donde se aprecia la precaria condición de salud en el momento cuando fue encontrado en el Parque Nacional Morrocoy, Falcón. (B) el individuo una vez preservado fue depositado en la colección de aves del Museo de la Estación Biológica de Rancho Grande (MEBRG), Aragua. Fotos: P. Urquiola (A) y S. Giner (B).

Debido a que el ejemplar no fue sexado durante la preparación de la piel y sus medidas corporales corresponden a un individuo inmaduro, se aplicó la fórmula de Análisis de Función Discriminante para individuos juveniles desarrollada por Karris y col. (2013) para *C. diomedea*:

$$D = 0.003 W + 0.386 BL + 0.431 BW + 0.077 HL - 30.701$$

En que W es el peso, BL la longitud del pico, BW el ancho del pico y HL la longitud de la cabeza, donde los valores de $D > 0$ identifican machos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ejemplar se identificó como el Petrel Ceniciento *Calonectris diomedea borealis*. Este individuo se caracterizó por presentar la cabeza color pardo grisáceo, más oscuro en la frente y lores, pardo-marrón en la corona aclarando ligeramente hacia la nuca; en el dorso, las coberteras y la rabadilla eran pardo

oscuro con las plumas orilladas pardo claro, dando apariencia escamada; coberteras supracaudales pardo claro, contrastando con las plumas de la cola pardo-negruczo oscuras; coberteras de primarias, secundarias y terciarias pardo, las terciarias orilladas de pardo claro; las primarias y secundarias pardo negruzco; garganta, pecho y coberteras subcaudales blanco, vientre blanco con jaspeado grisáceo en los flancos, coberteras subalares blancas, a excepción de las dos coberteras subalares primarias más externas (CP9 y CP10), que mostraron una marca grisácea en la porción distal. Pico robusto, amarillo pálido, con la punta más oscura y negruzco en la porción media (Figura 2A), patas color carne, el iris pardo oscuro. Las medidas de tarso, ala, culmen, largo total, envergadura y cola (Tabla 1) indican que el individuo se encuentra dentro del intervalo reportado en la bibliografía para las hembras de *C. d. borealis*. Esto es confirmado con los resultados obtenidos con el análisis discriminante para juveniles de Karris *y col.* (2013) el cual fue negativo ($D=-2,311$), indicando que el ejemplar es una hembra.

La característica diagnóstica que permite diferenciar a las subespecies del Petrel Ceniciento es la coloración de la parte inferior del ala, siendo la punta del ala ancha y oscura, con la base de las primarias con poco o nada de blanco en *C. d. borealis*, mientras que en *C. d. diomedea* las primarias muestran una cuña blanca que se proyecta visiblemente hacia la punta oscura del ala (Gutiérrez 1998, Howell, 2012, del Hoyo *y col.*, 2020, Flood y Gutiérrez, 2021). De esta manera, en el ejemplar colectado encontramos que la coloración de las primarias era negro-grisáceo en casi toda su extensión y sólo una pequeña cuña blanca en la base, que no se proyecta visiblemente hacia la porción distal de las primarias (Figura 2B y 2C). En este sentido, la subespecie del individuo colectado corresponde a *C. d. borealis*. Este hallazgo representa el primer registro confirmado para el Petrel Ceniciento en Venezuela, con base a un ejemplar preservado para el país.

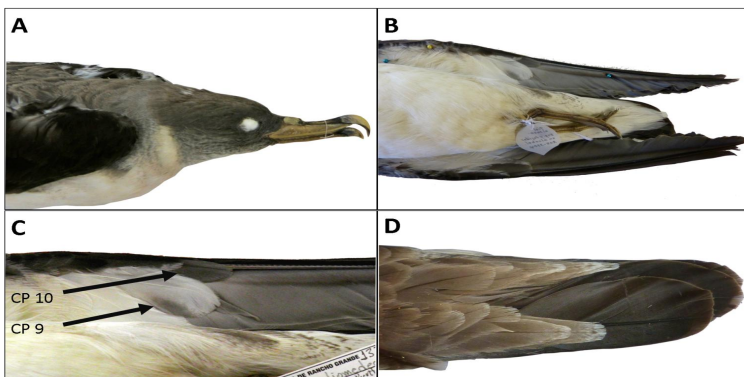


Figura 2. (A) Vista lateral de la cabeza. (B) Vista del vientre y la décima primaria de ambas alas. (C) Detalle de las coberteras primarias externas (CP) 9 y 10. (D) Vista dorsal de las coberteras supracaudales y las rectrices. Fotos: M. Lentino.

Tabla 1. Datos morfométricos de las subespecies *Calonectris d. borealis* y *C. d. diomedea* obtenidos en la literatura científica, comparados con la información obtenida del ejemplar del Petrel Ceniciento colectado en Falcón (MEBRG-13715). Longitud en milímetros; peso en gramos.

		<i>C. d. borealis</i>	<i>C. d. diomedea</i>	MEBRG 13715
Tarso*	Machos	58,70 ± 1,66	55,64 ± 1,81	57,4
	Hembras	56,49 ± 1,50	53,77 ± 1,90	
Ala*	Machos	371,04 ± 7,88	355,62 ± 7,73	360,0
	Hembras	362,56 ± 7,28	347,97 ± 8,70	
Largo cabeza/pico*	Machos	115,89 ± 3,14	109,25 ± 3,15	103,3
	Hembras	110,10 ± 2,67	104,88 ± 3,34	
Culmen*	Machos	55,79 ± 2,08	51,67 ± 2,14	50,4
	Hembras	52,61 ± 1,79	49,00 ± 2,43	
Alto de pico*	Machos	21,49 ± 0,86	19,44 ± 1,42	12,1
	Hembras	19,42 ± 1,02	17,83 ± 1,17	
Alto de pico narinas*	Machos	15,74 ± 0,85	14,16 ± 0,96	12,5
	Hembras	14,25 ± 0,76	12,89 ± 0,89	
Ancho de pico***	Machos	-	13,1 ± 0,93	9,2
	Hembras	-	12,3 ± 1,03	
Largo Total**	-	480-560	440-490	480
Envergadura**	-	1130-1240	1100-1210	1210
Peso**	-	605-1060	544-738	340
Cola**	-	121-144	117-135	137

* Gómez y col. (2009)

** Howell (2012)

*** Karris y col. (2013)

La subespecie *C. d. borealis* ha sido reportada en diferentes zonas de la costa norte de Suramérica, desde la costa Caribe de Colombia (Ruiz-Guerra y Cifuentes-Sarmiento, 2010), en la Guyana francesa (Pusineri y col., 2022), y en Trinidad y Tobago (Collins 1969, ffrench, 2012).

La mayoría de los registros del Petrel Ceniciento en la costa de Venezuela han sido durante el período no reproductivo, en diciembre (Marín y col., 2002, Murphy, 2002 y reporte actual), en febrero (Beadle, 1999), solo uno durante el periodo reproductivo, en junio (Froehlich, 2007, Figura 3). En el norte de Suramérica existen registros durante el período de reproducción, en mayo, en Colombia (Ruiz-Guerra y Cifuentes-Sarmiento, 2010), entre mayo y julio en Surinam (de Boer y col., 2014), con abundancias máximas en junio (Willems y col., 2017) y en Brasil entre abril y junio (Cardoso de Sousa y col., 2005). Mientras que en la Guyana Francesa los registros son prácticamente todo el año, entre marzo y septiembre, y en enero (Pusineri y col, 2022) y entre octubre y noviembre (Martínez y col., 2019). Estos registros muestran la presencia de individuos tanto en la temporada migratoria como de reproducción, lo cual puede indicar que son individuos inmaduros todavía en proceso de aprendizaje a través de un comportamiento exploratorio. El desarrollo de una estrategia migratoria es un proceso prolongado, complejo y dinámico, mediado por la edad y la experiencia, como ha sido señalado en estudios sobre la estrategia migratoria en individuos inmaduros (Perón y Gremillet, 2013, Campioni y col., 2019, Ramos y col., 2019).

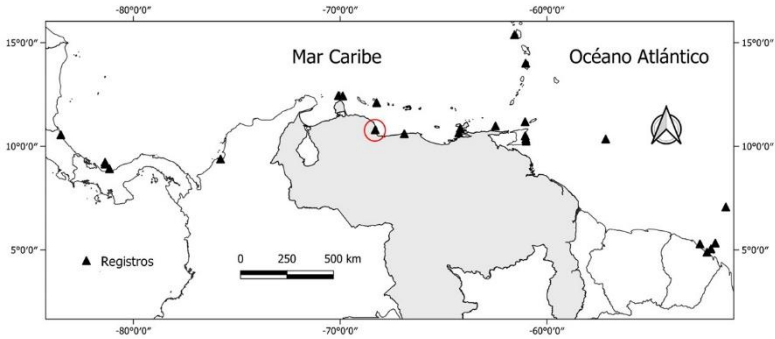


Figura 3. Mapa con los registros conocidos del Petrel Ceniciento *Calonectris diomedea* en la costa norte de Suramérica y Caribe sur. El círculo rojo indica la localidad donde se colectó el individuo del presente trabajo.

Por otra parte, la mayoría de los reportes en las Guayanas son costa afuera, en el océano Atlántico occidental, que forma parte de las principales áreas de migración señaladas para la especie (Howell, 2012, del Hoyo *y col.*, 2020, Pusineri *y col.*, 2022). Mientras que los registros en el mar Caribe, en Costa Rica (Solano-Ugalde y Herrera, 2005; Obando Calderón *y col.*, 2007), Colombia (Ruiz-Guerra y Cifuentes-Sarmiento, 2010), Venezuela (Marín *y col.*, 2002 y reporte actual), Aruba, Bonaire (reportes históricos eBird) y en Trinidad y Tobago (Collins, 1969) son, a excepción de los registros en Panamá (Ridgely y Gwynne, 1989; Campos *y col.*, 2023; Ponce *y col.*, 2023), de individuos muertos o exhaustos que llegan a la costa, donde posteriormente mueren. Se ha sugerido que la presencia de esta especie en zonas costeras al sur del mar Caribe, alejadas de sus áreas de migración, se deba más a condiciones climáticas adversas que arrastren a las aves jóvenes o enfermas a estas costas (Solano-Ugalde y Herrera, 2005; Ruiz-Guerra y Cifuentes-Sarmiento, 2010), como es el caso del registro de este individuo joven en la costa de Falcón.

La escasez de registros de *C. diomedea* en la región Neotropical responde a los hábitos pelágicos de esta especie, por lo cual su distribución es poco conocida en esta región. Por otra parte, ambas subespecies *C. d. diomedea* y *C. d. borealis* son fuertemente migratorias y presentan una gran flexibilidad en el calendario anual, escalas y destinos de invernada (Días *y col.*, 2011). Este trabajo representa el primer registro confirmado, con evidencia física y fotográfica, de esta especie en la costa de Venezuela; más registros permitirán determinar si existe algún patrón en la ocurrencia de esta especie en las costas del país o si efectivamente se trata de individuos errantes que terminan siendo arrastrados a la costa por eventos climáticos.

AGRADECIMIENTOS

A Pauli Urquiola, Bombero forestal, y Alfredo Pacheco, Guardaparques, quienes colectaron el individuo en la línea de playa de Punta Brava, a la Coordinación del Parque Nacional Morrocoy y a la Dirección General de Diversidad Biológica por su apoyo en la preservación del ejemplar.

LITERATURA CITADA

- Ascanio, D., G. Rodríguez y R. Restall. 2017. *Birds of Venezuela*. Helm Field Guides. Christopher Helm, London. 592pp.
- Beadle, 1999. Checklist S12758862. Localidad: Playa de Macuto, Vargas, Venezuela. eBird, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Documento en línea (eBird). URL: <https://ebird.org/checklist/S12758862>. Visitado: marzo 2023.
- Bird, D. 1994. The field characters of distant Great and Cory's Shearwaters. *Birding World* 7:279-282
- Bond, J. 1985. *Birds of the West Indies*. London, Collins Publ. UK. 280pp.
- Campioni, L., Dias, M. P., Granadeiro, J. P., y Catry, P. 2019. An ontogenetic perspective on migratory strategy of a long-lived pelagic seabird: Timings and destinations change progressively during maturation. *Journal of Animal Ecology* 89: 29–43.
- Campos, E., J. Navarro, J. Ríos y M. Ponce. 2023. Checklist S146144160. Localidad: Veragua, Panamá. eBird, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Documento en línea (eBird). URL: <https://ebird.org/checklist/S146144160>. Visitado: marzo 2024.
- Campos, E., J. Navarro, J. Ríos y M. Ponce. 2023. Checklist S149778420. Localidad: Ngäbe-Buglé. eBird, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Documento en línea (eBird). URL: <https://ebird.org/checklist/S149778420>. Visitado: marzo 2024.
- Cardoso de Sousa, M., Fraga, R.T. y Carlos, C.J. 2005. Seabird records from Alagoas and Sergipe states, north-east Brazil. *Cotinga* 24: 112–114.
- Clements, J. F., T. S. Schulenberg, M. J. Iliff, S. M. Billerman, T. A. Fredericks, J. A. Gerbracht, D. Lepage, B. L. Sullivan y C. L. Wood. 2021. The eBird/Clements checklist of Birds of the World: v2021. <https://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>
- Collins, C. 1969. A review of the shearwater records for Trinidad and Tobago, West Indies. *Ibis* 111 (2):251-253.
- De Boer, M., A. C. Williams y J.T. Saulino. 2014. Observations of pelagic seabirds in the waters offshore Suriname, May – July 2012. *Academic Journal of Suriname* 5:474-491.
- Del Hoyo, J., C. Carboneras, F. Jutglar, N. Collar, y G. M. Kirwan. 2020. Cory's Shearwater (*Calonectris diomedea*), version 1.0. In *Birds of the World* (S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg, Editors). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA. <https://doi.org/10.2173/bow.corshe.01>.
- del Hoyo, J. 2020. *All the Birds of the World*. Barcelona, Lynx Edicions, 967pp.
- Dias, M. P., J. P. Granadeiro, R. A. Phillips, H. Alonso, P. Catry. 2011. Breaking the routine: individual Cory's shearwaters shift winter destinations between hemispheres and across ocean basins. *Proc R Soc B* 278: 1786–1793
- frfrench, R. 2012. *A guide to the Birds of Trinidad and Tobago*. 3 ed. Ithaca. USA. Cornell University Press. 407pp.

- Froehlich, D. 2007. Checklist S50343029. Localidad: Ferry Route near Isla Cubagua, Nueva Esparta, Venezuela. eBird, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Documento en línea (eBird). URL: <https://ebird.org/checklist>. Visitado: marzo 2023.
- Gill, F., D. Donsker y P. Rasmussen (Eds). 2022. IOC World Bird List (v12.2). doi:10.14344/IOC.ML.12.2. <http://www.worldbirdnames.org/>
- Gómez-Díaz, E., J. González-Solis, M.A. Peinado y R. Page. 2006. Phylogeography of the *Calonectris* shearwaters using molecular and morphometric data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41 (2):322–332.
- Gómez-Díaz, E., J. González-Solis y M. Peinado. 2009. Population structure in a highly pelagic seabird, the Cory's shearwater *Calonectris diomedea*: An examination of genetics, morphology and ecology. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 382: 197-209. DOI:10.3354/meps07974.
- Gutiérrez, R. 1998. Flight identification of Cory's and Scopoli's Shearwaters. *Dutch Birding* 20:216-225.
- Flood, R.L. y Gutiérrez, R. 2021. Field separation of Cory's *Calonectris borealis* and Scopoli's *C. diomedea* Shearwaters by underwing pattern. *Marine Ornithology* 49: 311–320.
- Howell, S. 2012. Petrels, Albatrosses, and Storm-Petrels of North America. A Photographic Guide- Princeton, Princeton University Press. 483pp.
- Karris, G., E. Thanou, S. Xirouchakis, M.D. Voulgaris, S. Fragedakis-Tsolis, S. Sfenthourakis y S. Giokas. 2013. Sex Determination of Scopoli's Shearwater (*Calonectris diomedea*) Juveniles: A Combined Molecular and Morphometric Approach. *Waterbirds* 36 (2):240-246.
- Luksenburg, J. y G. Sangster 2013. New seabird records from Aruba, southern Caribbean, including three pelagic species new for the island. *Marine Ornithology* 41:183-186.
- Marín, G., J. Muñoz, S. Guevara y J. R. Rodríguez. 2002. *Calonectris diomedea*, nuevo procelárido para Venezuela. *Ornitología Neotropical*. 13:91–92.
- Martínez, L., D. Geraldés, A. Suardi, V. Wyss, E. Dutrieux y C. Chaineau. 2019. New sightings records of marine mammals and seabirds off French Guiana. *Latin American Journal of Aquatic Research* 47(5):753-763.
- Miranda, J., J. G. León y G. Angelozzi. 2021. Lista oficial de las aves de Venezuela. Versión Agosto 2021. http://uvo.ciens.ucv.ve/?page_id=2134.
- Murphy, W. L. 2002. Observations of pelagic seabirds wintering at sea in the southeastern Caribbean. En: *Studies in Trinidad and Tobago Ornithology Honouring Richard French* (F. E. Hayes and S. A. Temple, eds.). Dept. Life Sci., Univ. West Indies, St. Augustine. Pp. 104-110.
- Obando Calderón, G., L. Sandoval, J. Chaves, J. Villareal Orias, W. Alfaro Cervantes. 2007. Lista oficial de las aves de Costa Rica 2006. *Zeledonia* 11: 1–71.
- Ottema, O.H., J.H.J.M. Ridot y A.L. Spaans. 2009. Annotated Checklist of the Birds of Suriname. WWF Guianas- World Wildlife Fund, Paramaribo, Suriname. 144pp.
- Péron C. y D. Grémillet, 2013. Tracking through Life Stages: Adult, Immature and Juvenile Autumn Migration in a Long-Lived Seabird. *PLoS ONE* 8(8): e72713. doi:10.1371/journal.pone.0072713.
- Phelps, W. H. y R. Meyer de Schauensee, 1979. *Una Guía de las Aves de Venezuela*. Gráficas Armitano, C.A. 484pp.
- Ponce, M., D. González, E. Campos, I. Mujica, J. Cubilla, J. Rios, R. Morales 2023. Checklist S151142986. Localidad: Ngäbe-Buglé, Panamá. eBird, Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, New York. Documento en línea (eBird). URL: <https://ebird.org/checklist/S151142986>. Visitado: marzo 2024.

- Pusineri, C., L. Martinez, B. De Montgolfier, D. Geraldès, P. Lenrume, A. Bordin, A. Safi, A. Suardi, V. Wyss, B. Leclerc y V. Rufroy. 2022. Composition of the seabird community off French Guiana. *Marine Ornithology* 50:81–94.
- Raffaele, H., J. Wiley, O. Garrido, A. Keith y J. Raffaele. 1998. *A Guide to the Birds of the West Indies*. New Jersey, Princeton University Press. 511 pp.
- Ramos, R., V. Morera-Pujol, M. Cruz-Flores, S. López-Souto, M. Brothers y J. González-Solís. 2019. A geolocator-tagged fledgling provides first evidence on juvenile movements of Cory's Shearwater *Calonectris borealis*, *Bird Study*, DOI: 10.1080/00063657.2019.1638341
- Restall, R., C. Rodner y M. Lentino. 2006. *Birds of the Northern of South America: An Identification Guide*. Vol 1: Species Account. Christopher Helm, London. 880pp.
- Reyes-González, J. M. y J. González-Solís. 2011. Pardela cenicienta – *Calonectris diomedea*. En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Salvador, A., Morales, M. B. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org>.
- Ridgely, R. S. y J. A. Gwynne. 1989. *A guide to the birds of Panama, with Costa Rica, Nicaragua, and Honduras*. 2d ed. Princeton University Press, Princeton, NJ. 534pp.
- Ruiz-Guerra, C. y Y. Cifuentes-Sarmiento. 2010. Primer registro del Petrel de Cory (*Calonectris diomedea*) para Colombia. *Ornitología Colombiana* 10: 65-68
- Solano-Ugalde, A. y P. Herrera. 2005. Segundo registro de la Pardela Cenicienta *Calonectris diomedea* (Procellariidae: Aves) en las costas caribeñas de Centroamérica. *Zeledonia* 9: 57–59
- Snyder, D. E. 1966. The birds of Guyana (formerly British Guiana). Salem. Peabody Museum. 308pp.
- Tostain, O, J. L. Dujardin, Ch. Erard, y J. M. Thiollay. 1992. Oiseaux de Guyane. *French Guiana, Société d'Etudes Ornithologiques* 222pp.
- Willems, T., M.N Boer y J. T. Saulino. 2017. Offshore surprises: new at-sea bird records for Suriname (2013–2015). *Revista Brasileira de Ornitologia* 25:190–205.

ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Mauritia flexuosa* EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO TIGRE (ANZOÁTEGUI, VENEZUELA)

Carolina Peña-Comenarez^{1,3} y Elisabeth Gordon-Colón^{2,3*}

¹Postgrado en Ecología, ²Centro de Ecología y Evolución, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, AP: 47058, Caracas. ³Miembros Activos del Grupo Humedales de Venezuela. *egordoncolon@gmail.com

RESUMEN

Mauritia flexuosa (moriche) es la especie más importante del bosque ribereño de la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). Se evaluó entre mayo-2000 y mayo-2001 la estructura poblacional del moriche a lo largo del río en ocho parcelas de 0,1 ha cada una, donde se midieron los diámetros a la altura del pecho (DAP) y se contaron los individuos adultos, los jóvenes y pre-adultos. Las densidades de plántulas nacidas o vivas (PV) y muertas (PM) se determinaron marcándolas en cada muestreo con cintas coloreadas para diferenciar cohortes. El 59,4% de los adultos fueron de la clase DAP: 32-48 cm. Las poblaciones de *M. flexuosa* se caracterizaron básicamente por la presencia de adultos y plántulas, con pocos individuos juveniles y pre-adultos. La mortalidad de plántulas del moriche no varió entre los meses de muestreo, pero, tiende a ser mayor durante la sequía. En general, el porcentaje de PM respecto a las PV fue de 48%. Las curvas de supervivencia de las plántulas de acuerdo a los modelos predichos (Tipos: I, II, III) variaron entre las estaciones de muestreo, de allí que, al tener distintas estrategias de supervivencia, presenta mayor potencial de respuestas ante cualquier cambio ambiental. A través del río, la distribución de especies vegetales y complejidad estructural está influenciada por una combinación de factores bióticos, abióticos y perturbaciones antrópicas, de modo que se configura un mosaico de comunidades, lo que se refleja en que no haya un patrón único en la disposición de las clases de tamaño y edades, densidad de plántulas vivas y muertas y curvas de supervivencia, que determinan la estructura poblacional del moriche en cualquier posición a lo largo del río.

Palabras clave: *Mauritia flexuosa*, plántulas, supervivencia, mortalidad.

Population structure of *Mauritia flexuosa* in the upper basin of the Tigre River (Anzoategui, Venezuela)

ABSTRACT

Mauritia flexuosa (Moriche) is the most important species in the riparian forest of the upper Tigre river basin (Anzoátegui, Venezuela). The population structure of moriche along the river was evaluated between May-2000 and May-2001 in eight plots of 0.1 ha each, where diameters at breast height (DBH) were measured and adult, juvenile and pre-adult individuals were counted. The densities of born or alive (LS) and dead

(DS)seedlings were determined by marking them in each sampling with colored tapes to differentiate cohorts. Of the adults, 59.4% were in the 32-48 cm DBH class. The populations of *M. flexuosa* were basically characterized by the presence of adults and seedlings, with few juveniles and pre-adults. Moriche seedling mortality did not vary between sampling months, but tended to be higher during drought. Overall, the percentage of (DS) with respect to LS was 48%. The fit of the seedling survival curves to the predicted models (Types: I, II, III) varied among sampling stations, hence, having different survival strategies, it presents greater potential for responses to any environmental change. Throughout the river, the distribution of plant species and structural complexity is influenced by a combination of biotic and abiotic factors and anthropogenic disturbances, so that a mosaic of communities is configured, which is reflected in the fact that there is no single pattern in the arrangement of size and age classes, density of live and dead seedlings and survival curves, which determine the population structure of Moriche at any position along the river.

Keywords: *Mauritia flexuosa*, seedlings, survival, mortality.

INTRODUCCIÓN

Las características de las poblaciones de plantas pueden ser de tipo estructural, que incluyen: abundancia, densidad, biomasa total, proporción de edades o clases diamétricas, proporción de sexos y distribución espacial: al azar, agregada y regular (Morláns, 2001; Busch, 2017); o que involucren aspectos dinámicos que determinan los procesos poblacionales, entre las que destacan: crecimiento poblacional, cambios en la distribución de edades, mortalidad, natalidad, dispersión y supervivencia (Krebs, 1978; Begon *y col.*, 2006). La demografía es la base para entender la dinámica de las poblaciones y las historias de vida de las especies, que determina la respuesta de los organismos a la variación ambiental, la cual depende de: longevidad, tiempo de generación, dispersión demográfica, incluyendo combinaciones de las anteriores y muchos otros factores (Halley *y col.*, 2018), ya que las estudia en lo referente a natalidad, mortalidad, movimientos migratorios, edad y sexo, entre otros (Godínez-Álvarez *y col.*, 2008). Estos atributos se pueden medir para comparar diferentes poblaciones o una misma población en diferentes tiempos y espacios (Odum, 1993; Godínez-Álvarez *y col.* 2008; Zamora-Abrego *y col.*, 2016; Escamillo y Bustos, 2017). Las tablas de vida y las curvas de supervivencia son herramientas importantes para la evaluación de la dinámica poblacional, ya que muestran los números reales de individuos sobrevivientes, muertes y tendencias de supervivencia para todas las clases de edad en la población (Rauschert, 2010; Halley *y col.* 2018; Zhang *y col.*, 2020). La supervivencia de las plantas es un factor clave en la dinámica forestal. Las probabilidades de supervivencia a menudo varían según las etapas de la vida, y en el caso de los árboles, son importantes para los silvicultores, conservacionistas, los planificadores urbanos, así como para los biólogos que buscan entender la muerte como un proceso ecológico (Moustakas y Evans, 2015).

Mauritia flexuosa L. f. (Familia Arecaceae, Subfamilia Calamoideae) es una palma dioica, que se encuentra en ambientes amplios y heterogéneos, casi siempre boscosos (Bataglion *y col.*, 2019; van der Hoek *y col.*, 2019), distribuida en la mayor parte del norte de Sudamérica (Trujillo-González *y col.*, 2011), específicamente en las cuencas del Orinoco y del Amazonas (González-B., 2016). El ecosistema dominado por *Mauritia flexuosa* a menudo se considera un recurso vegetal clave en la mayoría de su área de distribución (van der Hoek *y col.*, 2019), por los múltiples servicios ecosistémicos que brinda, los cuales han sido reseñados por Peña-Colmenarez y Gordon-Colón (2019), por lo que debe considerarse una especie prioritaria en la conservación y en los planes de manejo sustentable a través del Neotrópico (Virapongse *y col.*, 2017; van der Hoek *y col.*, 2019). Peña-Colmenarez y Gordon-Colón (2022) mostraron datos sobre fenología y proporción de sexos. En cuanto a las poblaciones se han realizado investigaciones sobre demografía del moriche (Ponce, 2000; Novoa, 2010; Zamora-Abrego *y col.*, 2016; Isaza *y col.*, 2017; Alvarado *y col.*, 2020), patrones de caída de frutos y fauna involucrada en los procesos de dispersión y remoción de semillas (Ponce 2002; Mendieta-Aguilar *y col.*, 2015; Acevedo-Quintero y Zamora-Abrego, 2016), germinación (Ponce *y col.*, 1999; Johansson, 2009; Hernández-Valencia *y col.*, 2017), establecimiento y mortalidad de plántulas (Ponce *y col.*, 1996; Ponce *y col.*, 1999), estructura poblacional y parámetros de aprovechamiento para la hoja (Escamilla y Bustos, 2018), entre otros.

En este trabajo se presentan resultados sobre *Mauritia flexuosa* referidos a densidad de adultos, juveniles, pre-adultos y plántulas, junto con su dinámica a lo largo de la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). Se muestran aspectos clave para determinar sus estados poblacionales y potencialidad de regeneración, con lo cual se pretende contribuir no sólo con el conocimiento de la dinámica de las poblaciones de esta especie, sino también a sentar las bases para emprender acciones que faciliten la conservación y manejo sostenible de dicho ecosistema. Esto es relevante sobre todo por la dependencia de grupos humanos del moriche, con lo cual la determinación de algunos parámetros demográficos de las poblaciones de esta especie y su capacidad de regeneración contribuiría a garantizar el aprovechamiento de los recursos naturales, de una especie considerada vulnerable (V) (Llamozas *y col.*, 2003), principalmente por el uso intensivo por los pobladores, la destrucción de su hábitat por actividades agrícolas, ganaderas y petroleras, el desvío de los cursos de agua, entre otros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El río Tigre se encuentra en la altiplanicie de los Llanos orientales, entre los Municipios Simón Rodríguez, Guanipa, Freitas e Independencia. Desde su nacimiento en la Mesa de Guanipa, recorre 304 km y desemboca en el río Morichal Largo, 10 km antes de la entrada al

caño Mánamo. En los primeros kilómetros recibe la descarga del río Guaranguera; posteriormente sus afluentes principales en la margen izquierda son el Aisme y el Oritupano, que a su vez recibe el Chive y el Ñato y en la margen derecha al Areo (MARNR-PDVSA, 1987). La zona de estudio corresponde a la “cuenca alta del río Tigre”, la cual atraviesa las poblaciones de Cantaura, El Tigre y El Tigrito y cuyas coordenadas UTM son 979.000m – 990.000m de latitud norte y 360.000m – 400.000m de longitud oeste (Figura 1); en dicha figura se muestra la ubicación de las ocho estaciones de muestreo en las localidades que se mencionan a continuación: (I) Fundo Valle del Nílo, (II) Granja Puig (III) Paso La Línea, (IV) Escuela Granja El Vasquero, (V) Fundo El Valle, (VI) Fundo El Rosal, (VII) Fundo Las Rosas, y (VIII) Buena Vista, cuyas coordenadas fueron referidas por Peña-Colmenarez y Gordon-Colón (2019), así como aspectos generales sobre geología, suelos y vegetación del área de estudio, y las distintas actividades antrópicas que se desarrollan en cada sitio de muestreo.

En la zona de estudio, se encuentra una vegetación forestal tipo Palmar de Pantano (“Palm swamp”), dominada así por *M. flexuosa*, seguida de *Virola surinameses*, *Calophyllum brasiliense* e *Inga vera* (Peña-Colmenarez y Gordon-Colón, 2019). Dependiendo de la localidad, la vegetación varía desde un morichal abierto (MA), morichal cerrado (MC), transicional (T) entre un morichal cerrado (MC) y bosque siempre verde de pantano estacionalmente inundado (BSVPEI) y un BSVP propiamente dicho (Tabla 1).

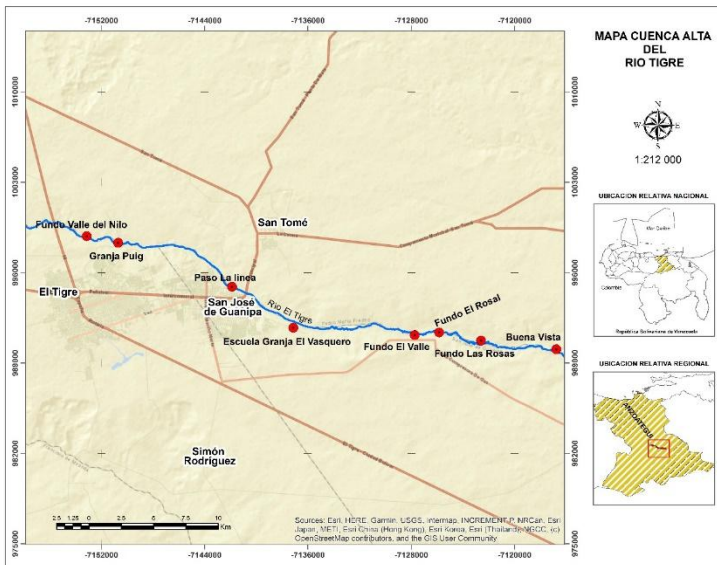


Figura 1. Ubicación relativa nacional y regional del área de estudio (Cuenca alta del río Tigre, estado Anzoátegui, Venezuela). Los puntos rojos muestran la ubicación de las ocho estaciones de muestreo.

Tabla 1. Niveles de perturbación antrópica y tipo de vegetación en cada una de las estaciones de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). MA: Morichal abierto; MC: morichal cerrado; T MC-BSVEI: transición (T) entre un MC y un bosque siempre verde estacionalmente inundado (BSVEI) (Tomado de: Peña-Colmenarez y Gordon-Colón, 2019).

Estación de muestreo	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Nivel de Perturbación								
Leve					x			
Moderada							x	x
Fuerte	x	x	x	x		x		
Tipo de Vegetación	MA	T MC-BSVEI	T MC-BSVEI	MC	BSVEI	BSVEI	BSVEI	MA

Métodos. A lo largo de la cuenca alta del río Tigre se llevaron a cabo siete salidas de campo, desde mayo del 2000 hasta mayo del 2001, cada dos meses, de tal forma que se tuvieron registros de la temporada de lluvias (julio, septiembre y noviembre de 2000), seca (enero y marzo de 2001) y períodos transicionales (mayo de 2000 y de 2001). Para conocer la dinámica de establecimiento de plántulas y la estructura etaria del elemento principal de la comunidad, se consideraron los estados plántula, adulto (individuo que ha desarrollado al menos un evento reproductivo), juvenil (individuos de una altura mayor a 1,00 m, sin un tronco definido) y pre-adulto (aquellos que presentan un tronco definido y aún no han desarrollado el primer evento reproductivo). El componente adulto de *M. flexuosa* se midió en el primer muestreo, mientras que los aspectos sobre la dinámica de las plántulas, juveniles y pre-adultos se siguieron a lo largo de todo el lapso de muestreo.

En el tramo comprendido entre el sector Puente Piedra hasta el sector Buena Vista, que cubre una distancia aproximada sobre el río de 37,67 km (Figura 1), se ubicaron las ocho estaciones de muestreo, donde en cada una se estableció una parcela de 0,1 ha (50 m x 20 m), específicamente sobre el banco a orillas del río (Figura 2). En cuanto a los individuos adultos de moriche dentro de cada parcela se contaron todos aquellos con altura ≥ 2 m, a los cuales se les estimó la altura y se les midió el diámetro de los troncos o tallos a la altura del pecho (1,30 m) (DAP).

La fase plántula puede definirse como el período comprendido entre la emergencia de la radícula y el completo agotamiento de las reservas de la semilla (Ponce *y col.*, 1996); no obstante, en este estudio se consideró como plántulas de *M. flexuosa* aquellos individuos desde una primera hoja hasta 1,00 m de alto, que no presentaban un tronco definido, ni más de cinco hojas. Una plántula se considera plenamente establecida cuando se hace efectivamente independiente de sus reservas como semilla, aun cuando las reservas de la semilla no sean completamente utilizadas (Fenner, 1985). Ponce *y col.* (2000) sugieren que esta fase dura entre 5 y 8 meses dependiendo de las condiciones de irradianza.

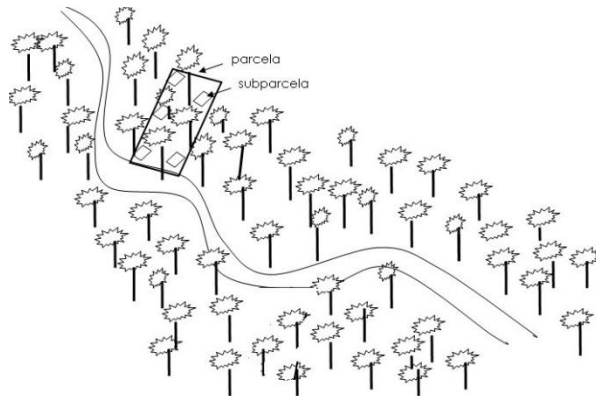


Figura 2. Esquema de ubicación de las parcelas y subparcelas en el banco del río.

El componente de plántulas de *M. flexuosa*, considerado como aquellos individuos de altura ≤ 1 m, se registró en 10 subparcelas ubicadas al azar y permanentes de 1m^2 ($1\text{ m} \times 1\text{ m}$) por cada estación de muestreo (Figura 2). Las plántulas se marcaron con cintas plásticas de diferentes colores en cada período de muestreo, para separar cohortes y determinar la densidad, mortalidad y supervivencia de las plántulas. Los individuos en fase pre-adulto y juveniles del moriche se siguieron en parcelas de 4m^2 ($2\text{ m} \times 2\text{ m}$), igualmente permanentes durante todo el lapso de muestreo y situadas al azar.

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Hammer, 1999-2015a) para determinar si había diferencias significativas en las densidades de plántulas nacidas y muertas respecto a las estaciones y períodos de muestreo. Asimismo, se relacionó la densidad de adultos, juveniles, pre-adultos, plántulas nacidas y muertas a través del coeficiente de correlación de Spearman r_s . El procesamiento de los datos se hizo a través del paquete estadístico PAST Ver. 3.10 (Hammer, 1999-2015b).

Se presentan los resultados de densidad de acuerdo a la estructura de tamaños definidos con base al diámetro a la altura de 1,30 m (DAP), y la altura de los individuos (m). Asimismo, se muestra lo referente a los individuos en fase adulto, pre-adulto y juvenil. La densidad de plántulas nacidas o vivas (PV) y muertas (PM) se muestran respecto a los meses y estaciones de muestreo; igualmente, se exhiben las curvas de supervivencia de las plántulas de la primera cohorte en cada de estación de muestreo, puesto que fueron las plántulas que se registraron durante todo el lapso de muestreo. Con las otras cohortes fue posible estimar la densidad total de plántulas nacidas y muertas por estación y lapso de muestreo. Las curvas de supervivencia para la primera cohorte en cada estación de muestreo se hicieron a partir de una tabla de vida, que se

muestran en el Anexo 1. Si bien, el registro de la mortalidad de las plántulas puede considerarse relativamente corto y en consecuencia los estimados de supervivencia (en este caso un año), como para hacer predicciones de las tendencias a futuro, la primera etapa de vida de una planta es crítica para el mantenimiento de la especie a largo plazo (Zamora-Abrego *y col.*, 2016), sobre todo cuanto los árboles suelen tener una vida extremadamente larga (Moustakas y Evans, 2015).

RESULTADOS

Estructura poblacional. La Figura 3a muestra la altura promedio de *M. flexuosa* a lo largo de las ocho estaciones de muestreo, la cual varía entre 8,7 m en la estación III hasta 15,6 m en la estación VII, con una media de $11,98 \pm 1,99$ m. En la Figura 3b, se observan los cambios en el número de individuos/0,1ha respecto a la estructura de tamaños expresadas en diámetro a la altura del pecho en cm (DAP) a lo largo del río, donde el 59,4% del total de individuos se corresponde con la clase de DAP de 32-48 cm, que mayormente está representada en la estación II; luego le siguen con su presencia en todas las estaciones, la clase de DAP de 16-31cm, con la mayor densidad en la estación VI, y le sigue la estación II. La clase <16 cm solo se halló la estación V con densidad muy baja (4ind /0,1ha), mientras que la de DAP >48 cm se encontró en las estaciones I, III y IV, con densidades entre uno, tres y ocho ind /0,1 ha, respectivamente. En cuanto al número de clases por estación, la Figura 3b denota que en cuatro estaciones: I, III, IV y V estuvieron presentes tres clases de tamaños, mientras que en el resto estuvieron dos clases por estación.

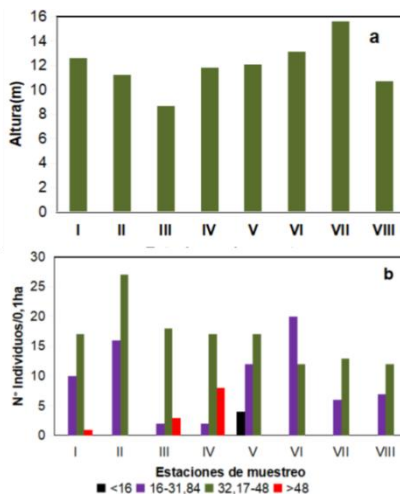


Figura 3. (a) Altura (m) y (b) estructura de tamaños con base al diámetro (cm) a la altura del pecho de *Mauritia flexuosa* a lo largo de la cuenca alta del río Tigre.

En la cuenca alta del río Tigre, la densidad de individuos adultos varió (A) entre 19 y 43 ind/0,1ha dependiendo de la estación de muestreo (Figura 4), y en consecuencia del tipo de vegetación presente en cada una de ellas (Tabla 1). Así, la mayor abundancia de adultos se encontró en la transición entre morichal cerrado (MC) y un bosque siempre verde estacionalmente inundado (BSVEI) (estaciones II y III) con promedio de 33 ind/0,1ha; en tanto que en el morichal abierto (MA) (estaciones I y VIII), el número promedio de individuos fue de 24 ind/0,1ha; en el MC (estación IV), la densidad de adultos fue de 27 ind/0,1ha; por su parte en el BSVEI (estaciones V, VI, y VII), la abundancia promedio fue de 28 ind/0,1ha. En cuanto a la estructura de edades de la palma moriche a lo largo de la cuenca alta del Río Tigre, el número de individuos juveniles (J) y pre-adultos (P-A) por hectárea es mucho menor que la de los de adultos (A) (Figura 4). La presencia de juveniles (J) es casi nula a lo largo de las estaciones de muestreo, con un total de 10 juveniles/0,1ha, hallándose solo en las estaciones IV y VIII. Por su parte, los pre-adultos (P-A), con densidades bajas entre 1 y 12 ind/0,1ha, para un total de 35 P-A/0,1ha en todas las estaciones, sin embargo, estuvieron ausentes solo en la estación VII. Es de hacer notar que la densidad de pre-adultos tiende a aumentar aguas abajo, con excepción de la estación VII (Figura 4). La suma total de adultos, pre-adultos y juveniles entre todas las estaciones fue de 269 ind/0,1ha, con una media de $33,63 \pm 8,45$ ind/0,1ha, cuyos porcentajes representados en la Figura 5, denotan que el valor mayor se obtuvo en la estación II (44 ind/ha; 16% del total) y el menor en la estación VII (19 ind/0,1ha, 7%).

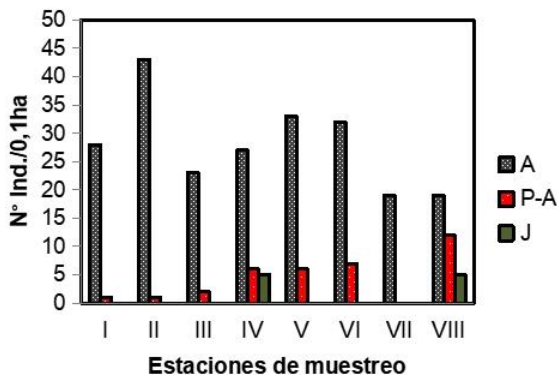


Figura 4. Densidad (ind/0,1ha) de adultos (A), pre-adultos (P-A) juveniles (J) de *Mauritia flexuosa* a lo largo de las estaciones de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela).

En total se registraron 1992/0,1ha plántulas vivas o nacidas (PV), con una media de $249,00 \pm 350,58$ /0,1ha PV. La Figura 6 muestra la variación de la densidad de plántulas nacidas o vivas (PV) en las estaciones de

muestreo, con el 55% concentrándose en la estación II. Después de la estación II, le siguen en densidades las estaciones V y III, con valores de 261 y 216/0,1ha PV, respectivamente. El menor número de PV se encontró en las estaciones I, VI y VII, con valores entre 41 y 55 ind. /ha. Dado que en la estación II las densidades PV y PM respecto al total de plántulas fueron muy superiores en el orden de 55% y 66%, respectivamente, se decidió comparar el número de plántulas con o sin esa estación, a objeto de determinar si en las otras había diferencias estadísticas. Comparando las densidades de los adultos, pre-adultos, juveniles y plántulas vivas entre las estaciones de muestreo mediante la prueba de Kruskal-Wallis dio diferencias significativas, con y sin la estación II ($H=35,96$, $p<0,0003$; $H=31,45$, $p<0,0002$, respectivamente).

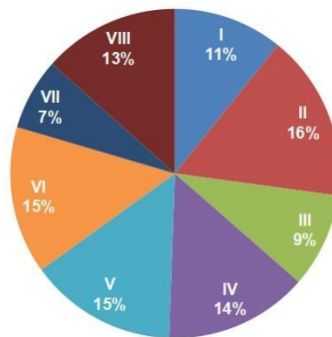


Figura 5. Porcentaje respecto a la suma total de individuos/0,1ha (adultos, juveniles y pre-adultos) por estación de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela).

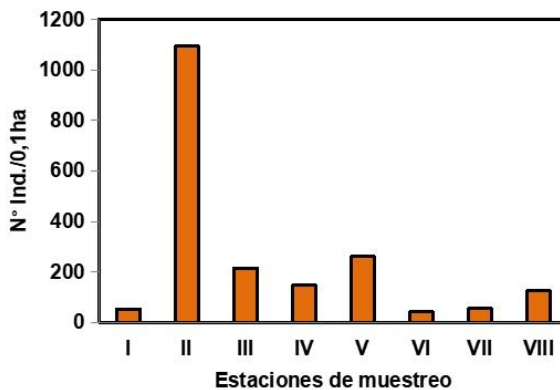


Figura 6. Densidad (ind./0,1ha) total de plántulas de *Mauritia flexuosa* por estaciones de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela).

Dinámica de plántulas. Los cambios de la densidad total de plántulas nacidas o vivas de (PV) de *M. flexuosa* en la cuenca alta del Río Tigre, respecto a las estaciones de muestreo y en el tiempo (meses) se observan en la Figura 7. La densidad más alta de plántulas se halló en la estación II, en la en donde el valor mayor fue en el mes de enero-01 (sequía) con 400/0,1ha de PV, y el menor en la temporada de lluvias (julio, septiembre, noviembre 2000), con promedio de 97/0,1ha de PV. El menor número de PV fue en la estación VI, en la cual la más alta densidad fue en el mes de noviembre-2000. A la estación VI, le sigue en densidades totales <100 plántulas/0,1ha las estaciones I y VII, ambas con valores más altos en el mes de enero 2001. En general, la mayor cantidad de PV se determinó en los meses de sequía (enero y marzo 2001), para un total de 695 plántulas/0,1ha, media: 459±177,48 plántulas/0,1ha. En la temporada de lluvia (julio, septiembre, noviembre 2000), la densidad total de plántulas nacidas o vivas (PV) fue 695/0,1ha, con media: 213±10,79/0,1ha. En los meses transicionales sequía-lluvia (mayo-2000 y mayo-2001) el número total de PV fue 437/0,1ha, con media: 219±61,52/0,1ha. Ahora bien, si se obvia la estación II, el total de plántulas vivas y nacidas fue de 898 /0,1ha, cuyo pico de densidad de plántulas sigue siendo en enero-2001, pero la densidad total para la temporada de lluvias resultó ligeramente mayor (347 /0,1ha) respecto a la de sequía (315/0,1ha) y en los meses transicionales la densidad total fue de 60 /0,1ha.

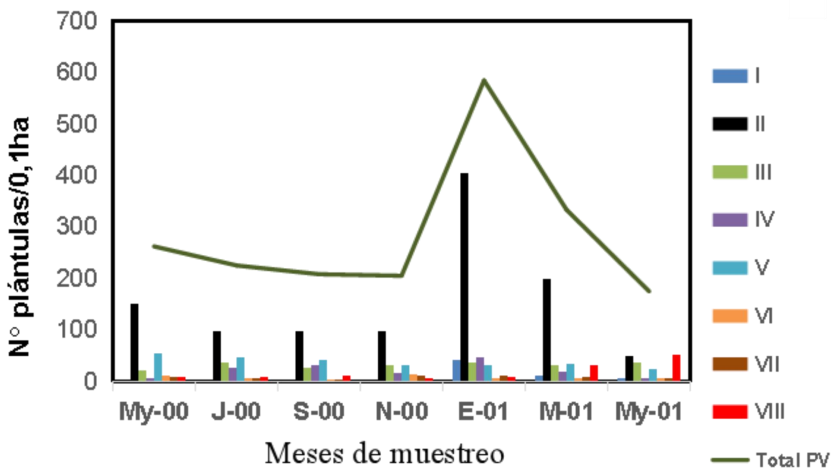


Figura 7. Número de plántulas nacidas o vivas (PV) respecto a las estaciones y meses de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). Mayo 2000 (My-00); julio 2000 (J-00); septiembre 2000 (S-00); noviembre 2000 (N-00); enero 2001(E-01); marzo 2001 (M-01) y mayo 2001 (M-01).

La prueba de Kruskal-Wallis mostró que la densidad de plántulas no difiere significativamente entre los meses de muestreo ($H=2,68$; $p<0,89$), ni entre temporadas del año; en tanto que entre estaciones de muestreo sí difieren significativamente ($H=37,98$, $p<0,0003$). La prueba de Kruskal-Wallis sin la estación II, igualmente evidenció que no hay diferencias significativas entre los meses de muestreo ($H=98$, $p<0,81$), mientras que entre estaciones de muestreo la prueba resultó significativa ($H=26,44$, $p<0,0002$). Así, la prueba a posteriori de Mann-Whitney indicó que la densidad de la estación I no difiere de las estaciones VI ($p<0,24$), VII ($p<0,15$) y VIII ($p<0,09$). La estación III difiere de la VI ($p<0,002$), de la VII ($p<0,002$) y de la VIII ($p<0,05$); la estación IV difiere de la V y VI ($p<0,05$ y $p<0,02$, respectivamente). Por su parte, la estación V difiere de la VI ($p<0,002$), VII ($p<0,002$) y VIII ($p<0,03$). La estación VI no difiere ni de la VII ($p<0,06$), ni del VIII ($p<0,20$).

Mortalidad de plántulas y curvas de supervivencia. La Figura 8 muestra las variaciones en la densidad de plántulas muertas (PM) respecto a las estaciones y meses de muestreo. Al igual que las plántulas nacidas o vivas (PV), la más alta densidad total de plántulas muertas fue en la estación II, que representó el 66% del total de PM (631/0,1ha; media: 105 ± 101 /0,1ha), con la mortalidad más elevada en el mes de marzo-2001 (temporada de sequía). La menor densidad de PM se encontró en la estación VII. En general la densidad total de PM en la temporada de lluvias (julio, septiembre, noviembre-2000) fue de 314 PM/0,1ha, con media: $105\pm 67,25$; mientras que en la de sequía fue de 421 /0,1ha, con media: 211 ± 227 PM/0,1ha. Para todo el período de muestreo, el total de plántulas muertas fue de 949 /0,1ha, que en términos del porcentaje respecto al total de plántulas nacidas o vivas (PV) representó el 48%. Al igual que con las PV, al obviar la estación II, resultó que la mayor densidad de PM se obtuvo en el mes de marzo-2001; la densidad total de PM sin la estación II por temporada, tiende a ser mayor en la época de sequía (115 /0,1ha) respecto a la lluvia (99/0,1ha), para un total en todo el período de 318/0,1ha. El número de PV y PM, después de la estación II, tiende a disminuir aguas abajo (Figuras 7 y 8).

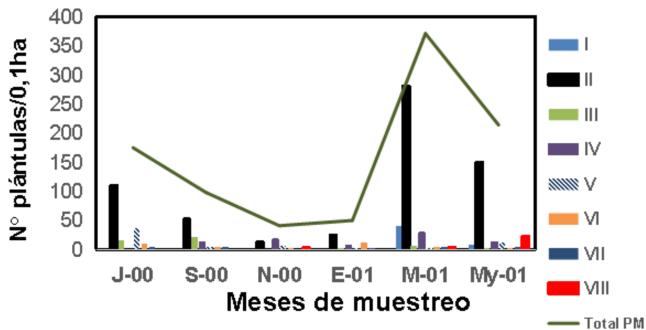


Figura 8. Número de plántulas muertas (PM) en los meses y estaciones de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). Julio 2000 (J-00); septiembre 2000 (S-00); noviembre 2000 (N-00); enero 2001 (E-01); marzo 2001 (M-01) y mayo 2001 (M-01).

La prueba de Kruskal-Wallis entre los meses de muestreo no mostró diferencias significativas ($H=4,79$, $p<0,44$), al repetirla sin la estación II, igualmente resultó no significativa entre los meses de muestreo ($H=5,32$, $p<0,38$). Por su parte, la prueba de Kruskal-Wallis de la densidad de plántulas muertas entre estaciones de muestreo mostró diferencias significativas ($H=19,28$, $p<0,007$), y de acuerdo a la prueba a posteriori de Mann-Whitney, solo la estación II, como era de esperar, difirió del resto de las estaciones ($p<0,005$), las cuales no difirieron entre sí ($H=7,82$, $p<0,25$).

El coeficiente de correlación de Spearman (sin la estación II), no mostró correlación entre la densidad total de las plántulas muertas (PM) con la densidad de la plántulas nacidas o vivas (PV), así como con la de los adultos (A), juveniles (J) y pre-adultos (P-A) por estación de muestreo. Al incluir todas las estaciones de muestreo, la densidad de PM se correlacionó con la de los adultos ($r_s=0,69$, $p<0,05$).

La Figura 9 muestra la alta variabilidad en cuanto la sobrevivencia de las plántulas de *M. flexuosa*, y presentó en tres tipos de curvas dependiendo de la estación de muestreo. Así en las estaciones II, III, VI y V (Figura 9a), se observa la curva típica J invertido, esto es alta pérdida de individuos en las primeras etapas de vida, seguido de un período de mucho menos pérdidas y relativamente constante. Por su parte, en la estación IV (Figura 9b), en los primeros tres a 4 meses la supervivencia se mantiene constante y luego cae abruptamente, esto es, pocas pérdidas al principio en las primeras etapas de vida y después alta mortalidad en la medida que se hacen más viejos. En las estaciones VII y VIII las curvas de supervivencia tienden a una línea recta (con un R^2 de 0,82 y 0,90 respectivamente), lo cual sugiere una mortalidad constante independientemente de la edad (Figura 9c).

DISCUSIÓN

Estructura de tamaños. La dinámica y los cambios en la estructura poblacional de las plantas son el resultado de sus características biológicas y de la interacción con el ambiente (Grubb, 1977). Las historias de vida de las plantas están formadas por influencias abióticas y bióticas del ambiente (Olliff-Yang, 2019). La presencia de una población de plantas en un punto dado del espacio y en el tiempo es consecuencia de una cadena de eventos pasados. Una vez que una población de árboles de determinada edad se establece, es difícil para una nueva clase de edad entrar al dosel, hasta que los individuos establecidos mueran por distintos factores abióticos y bióticos, incluyendo las enfermedades o vejez (Harper, 1977).

Respecto a la estructura de tamaños con base en el diámetro a la altura del pecho (DAP), de los cuales el 59,4% del total de individuos adultos se corresponde con la clase 32-48 cm, con pocos individuos en las clases 16<cm y >48cm; aunque esta última se halló en tres estaciones y la

primera en una sola. En este sentido, Freitas *y col.* (2020), en la cuenca alta del río Putumayo (frontera Perú-Colombia), hallaron una distribución de clases diamétricas para *M. flexuosa* en forma de campana, donde en un bosque de morichal denso la clase con mayor densidad de individuos fue la de DAP entre 31-40 cm, con muy pocos individuos en las clases 10-20 y 41-50, mientras que en un morichal mixto la clase con mayor densidad fue la de 21-30 cm. Freitas *y col.* (2020) explicaron que este comportamiento se puede atribuir al limitado crecimiento lateral de las palmeras, cuyos individuos jóvenes tienen un tallo no ramificado (estipite grueso) que se mantiene hasta a su madurez, de modo que muchos individuos se concentran en la categoría de 30-40 cm de diámetro, lo cual coincide con lo hallado en este caso, con valores, como se mencionó antes, en el intervalo 32-48 cm, con predominancia en la estación II. En la estación V, que se caracterizó por una vegetación tipo BSVEI y una leve perturbación ambiental (Tabla 1) estuvieron casi todas las clases de DAP.

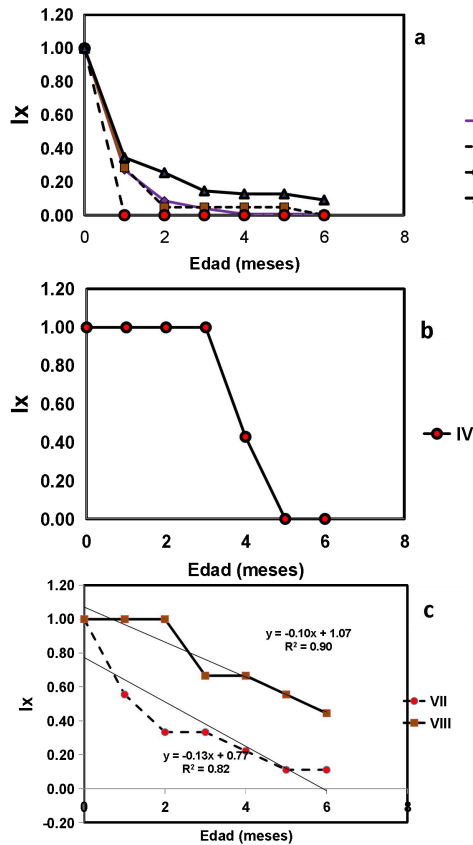


Figura 9. Curvas de supervivencia lx de plántulas de *Mauritia flexuosa*, en: a) estaciones II, III, IV, VI b) estación IV, y c) estaciones VII y VIII de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela).

Los resultados de la estructura de edades, a saber, adultos, pre-adultos, jóvenes, y plántulas, indican que las poblaciones de *M. flexuosa* a lo largo del río, se caracterizaron por la presencia, principalmente de adultos y plántulas, con unos pocos individuos juveniles y pre-adultos. Se supone que solo en los años en los cuales haya una combinación de condiciones óptimas (niveles favorables de agua y humedad del suelo, luz, temperatura y ausencia de inundaciones y sequía extremas) es posible que tenga lugar una germinación masiva y sobrevivencia de plántulas (Bonadie y Bacon, 1999), que les permita llegar a juveniles y pre-adultos y consecuentemente adultos. Si las plántulas no sobreviven, el bosque mostrará una distribución de edades con un número importante de árboles de gran talla (Bonadie, 1998).

En las poblaciones de *M. flexuosa* en la cuenca alta del río Putumayo, reportan que en morichales densos están ausentes los individuos de desarrollo entre una plántula y un árbol joven (brinzal), mientras que en morichales mixtos están presentes, pero en bajas densidades (5 ind/ha) (Freitas *y col.* 2020). En ambos tipos de bosques, las densidades de los adultos fueron más altas en el morichal denso (67,8 ind/ha; 6,78 ind/0,1ha), mientras que en el morichal mixto la densidad fue de 45,3 ind/ha (4,53 ind/0,1ha) (Freitas *y col.* 2020). Escamilla y Bustos (2018), en la zona del Meta (Colombia) encontraron en un morichal afectado por quemas 45,4 ind/0,1ha y en el bosque más conservado donde solo se utilizan las hojas de las palmas 84,2/0,1ha.

En el caso del morichal en la cuenca alta de río Tigre, la distribución de edades o etapas de crecimiento varió a lo largo del río, lo que permite suponer que la presencia de una o más clases de edades dependerá del tipo de vegetación y el nivel de perturbación antrópica. En ésta, la densidad de individuos adultos cambió entre 19 y 43 ind/0,1ha; en promedio la abundancia de individuos adultos varió en el siguiente orden: morichal abierto (MA): 24 ind/0,1ha, morichal cerrado (MC): 27 ind/0,1ha; transición (T) morichal cerrado – bosque siempre verde estacionalmente inundado (BSVEI): 33 ind/0,1ha; BSVEI propiamente dicho: 28 ind/0,1ha; por su parte, los juveniles estuvieron casi ausentes, apenas 0,5 ind/0,1ha en el MC y MA; en tanto que los pre-adultos, aunque estuvieron ausentes en la estación VII (BSVEI) con moderada perturbación (Tabla 1), pero, su abundancia más alta se halló en la estación VIII (MA) con moderada perturbación; en las estaciones I a IV, donde hubo fuertes perturbaciones e independientemente del tipo de vegetación (Tabla 1), la densidad de pre-adultos promedio fue de 0,75 ind/0,1ha.

De estos resultados, se infiere que a lo largo de la cuenca del río Tigre se configura un mosaico de comunidades, donde la distribución de especies vegetales y complejidad estructural es una combinación de factores bióticos, abióticos y perturbaciones antrópicas, por lo que la estructura poblacional de *M. flexuosa* en cualquier posición a lo largo del río, denota tanto la hidrología y su dinámica, la fisicoquímica del suelo y del agua, la

tolerancia de las plantas a la inundación y el nivel de perturbación antrópica (Peña-Colmenarez y Gordon-Colón, 2019), que se refleja en que no haya un patrón único en la distribución de las edades del moriche, es decir que no depende de si es un morichal denso o muy denso, sino de una combinación de factores bióticos, abióticos y disturbios antrópicos.

Dinámica de plántulas. La germinación y el establecimiento de una plántula involucran una serie de eventos abióticos y bióticos, dentro de los cuales se incluye las características externas e internas de la semilla. En cuanto a los cambios en la densidad de plántulas nacidas o vivas (PV) a lo largo de la cuenca alta del Río Tigre, hubo una alta variabilidad entre estaciones, aunque no se halló diferencias significativas entre los meses de muestreo, lo que indica que la germinación se dio durante todo el año, con una ligera tendencia de mayor emergencia de plántulas en la temporada de sequía. Peña-Colmenarez y Gordon-Colón (2022), reportaron para el mismo río, que *M. flexuosa* dispone de frutos durante la mayor parte del año, y que no todos caen al mismo tiempo, esto como estrategia para la regeneración y/o el mantenimiento de los agentes dispersores activos; sin embargo, la intensidad de fructificación fue estacional, con el mayor número de moriches en fruto durante la sequía.

Peña (2004) indicó que el reclutamiento fue mayor en los meses de sequía, señalando que la precipitación y/o aumento del nivel de la lámina de agua no son favorables para la germinación en esta especie. La sincronía de estos procesos durante la sequía se atribuye a que no hay período de latencia, y que estos frutos maduran muy rápido, así como también a que la inundación no es favorable para el establecimiento de las plántulas, lo cual puede considerarse condiciones adversas, puesto que la presencia de una lámina de agua alta sin movimiento y prolongada en el tiempo conduce a un ambiente anóxico (Mitsch y Gosselink, 2000) e incompatible con el intercambio gaseoso (oxígeno) a nivel de las raíces (González 1987; Peña 2004), y al quedar las hojas de las plántulas sumergidas se limita el proceso de fotosíntesis. Así mismo, la estacionalidad puede generar fluctuaciones en la abundancia de polinizadores, dispersores de semillas y depredadores (Ponce, 2002). Contrariamente a lo hallado en este trabajo, Ponce (2000) en el estado Guárico, reportó que el máximo de fructificación y reclutamiento coinciden con el período de lluvias. Cabe mencionar, que el reclutamiento de plántulas se ve impedido si la disponibilidad de semillas es escasa, y a su vez, por limitaciones en la dispersión de semillas, lo cual no solo ocurre en (meta) poblaciones fragmentadas, sino también a lo largo de gradientes de perturbación no fragmentados (van Eck y col., 2005) como sería el caso del río Tigre.

La densidad de plántulas fue distinta en cada estación de muestreo, lo cual puede atribuirse a cambios en las condiciones de radiación, temperatura, características del sustrato que inciden en la germinación y la mortalidad de plántulas, o inundación que afecta los procesos de dispersión y establecimiento de las plántulas o a estrategias de

sobrevivencia de la población. Márquez y Briceño (2000) en el morichal Nicolasito (estado Guárico) reportaron que había más plántulas en el sitio con mayor intervención y con dosel muy abierto. En este caso, la densidad máxima de plántulas se dio en la estación II, donde el dosel del bosque es más abierto e irregular, con perturbaciones fuertes por tala y quema, paso de ganado, cercanía de una granja avícola (Peña-Colmenarez y Gordon-Colón, 2019), y por ende debe haber mayor penetración de luz. Sin embargo, Ponce *y col.* (1999) señalaron que *M. flexuosa* en su fase de plántula puede tolerar condiciones de sombra, generadas por los parentales o por la presencia de un dosel cerrado.

Las semillas grandes, como las del moriche, que no tienen latencia (semillas ortodoxas), que producen plántulas grandes, las cuales tienden a incrementar su viabilidad, germinación y velocidad de emergencia (Banovetz y Scheiver, 1994; Hernández-Valencia *y col.*, 2017), capaces de emerger desde la hojarasca, sin embargo, están sometidas a diversos factores bióticos y abióticos, de manera que las que logran sobrevivir forman un banco de plántulas. La probabilidad de supervivencia de las semillas durante el proceso de germinación está directamente relacionada con su tamaño (peso, tamaño, reservas almacenadas y vigor del embrión, estructuras protectoras del embrión) (Baker, 1972, cit. Gordon, 1999), lo cual determina el tamaño de las plántulas para un corto periodo de tiempo (Howe y Richter, 1982).

En cuanto al tipo de sustrato y su incidencia en la germinación y establecimiento de plántulas, tenemos que los suelos del morichal de la cuenca alta del río Tigre, las características químicas y físicas de ellos varían sustancialmente a través de la zona ribereña, en donde en la estación II con la mayor densidad de plántulas entre todos los sitios de muestreo, son de textura franco-arenosa (Peña-Colmenarez y Gordon-Colón, 2019). Al respecto, Pettit y Froend (2001) en bosques ribereños de Australia, hallaron que la mayor densidad de plántulas estaba asociada a una microtopografía tipo planicie, una textura arenosa y franco arenosa y un suelo húmedo. En este sentido, pequeños cambios en la humedad del suelo y cobertura vegetal pueden generar diferencias significativas en la germinación y por ende en la diversidad florística de la comunidad del vegetal del humedal (Xiong *y col.*, 2003).

Factores físicos como luz, temperatura y disponibilidad de agua, son determinantes para que una semilla germine. Si una plántula se ubica en un bosque que posee un dosel sombreado, disminuye la intensidad de la luz y cambia su calidad en la superficie del suelo, se reduce la tasa de evaporación directa de la superficie, y además se crea una zona generalmente de mayor humedad y temperatura más uniforme. Adicionalmente, la caída de las hojas y sus productos posteriores a la descomposición, cambian las propiedades físicas y químicas del suelo, y pueden cubrir y hundir las semillas que han caído en la superficie. Todos estos cambios alteran la naturaleza del ambiente, tamiz que selecciona aquellas semillas que germinarán (Harper, 1977).

Cintra (1997), en un bosque amazónico, encontró en un estudio del efecto de la hojarasca sobre la sobrevivencia de semillas y plántulas de la palma *Astrocaryum murumuru* y el árbol *Dipteryx micrantha*, que en ambas especies la supervivencia de las semillas fue mayor en sitios con más hojarasca en comparación con suelos desnudos. En el caso de la palma la supervivencia de las plántulas fue significativamente afectada por la hojarasca, con mayor supervivencia en capas de hojarasca poco profundas. Asimismo, la radícula y el primer brote son relativamente lignificados, haciéndolos más duros para romper los materiales que se encuentren por encima, y así son relativamente resistentes a la caída de material vegetal y al ataque de los herbívoros. Estas características anatómicas y estructurales son típicas de especies de árboles tropicales con períodos cortos de latencia y ayudan a las semillas en germinación a perforar la barrera física creada por la hojarasca (Cintra, 1997b). Además, la hojarasca puede incrementar la sobrevivencia de las semillas, al dificultar la detección por parte de los depredadores. En muchos humedales boscosos como en los morichales, se hallan montículos de acumulación orgánica, formados de restos orgánicos, raíces, alargamiento de raíces en la base de grandes árboles o después de la caída de grandes árboles. Estos montículos son más altos y están por encima del suelo, los que algunas veces retienen agua y representan sitios seguros para el establecimiento de plántulas, de manera que puedan sobrevivir, ya que probablemente pueden asegurarse una concentración adecuada de oxígeno (Cronk y Fennessy, 2001).

La densidad de una población de plántulas depende no sólo de la disponibilidad de semillas, sino de la frecuencia de sitios seguros que proveen de condiciones precisas requeridas por cada semilla en particular. Del gran número de semillas presentes en el suelo y de las que arriban a través de la dispersión, sólo una muy diminuta fracción germinará y dará plántulas. En este sentido, el número de plántulas que aparece será una función del número de “sitios seguros” que ofrece el ambiente, de manera que pueda proveer el estímulo necesario para romper la latencia y proporcionar los recursos necesarios (agua y oxígeno, entre otros) para favorecer el proceso de germinación. La densidad de plántulas es mayor en humedales leñosos con más áreas abiertas y micrositos favorables, seguramente por la disponibilidad de luz, tal como se evidenció en la estación II, es decir la formación de claros asociados con prácticas agrícolas de conuco, genera pulsos de reclutamiento de individuos de *M. flexuosa* relacionados con las nuevas condiciones de irradiación. La estructura poblacional en las diferentes comunidades de morichal, tiende a indicar que la germinación y el subsiguiente establecimiento de las plántulas no tienen una recurrencia anual, representando las fases más críticas en el ciclo de vida de la palma (Ponce *y col.*, 1996).

Mortalidad y supervivencia plántulas. La mortalidad de plántulas del moriche no varió entre los meses de muestreo, sin embargo, se aprecia una tendencia a ser mayor durante la sequía, hacia el mes de marzo-2001, es decir

cuando la lámina de agua desciende. En general en todo el periodo, el porcentaje de plántulas muertas respecto a las vivas fue de 48%. Zamora-Abrego *y col.* (2016), hallaron que la mortalidad de las primeras tres categorías de vida (transición semilla a plántula y de plántula a joven fue >95%. La mortalidad de las plántulas puede asociarse a factores bióticos denso-dependientes (Zamora-Abrego *y col.*, 2016), quienes lo explicaron a través del modelo Janzen-Connell (1971, cit. Cintra, 1997a), el cual describe el éxito de reclutamiento como resultado de la distancia espacial al parental. De allí que es mucho más probable que los propágulos que se encuentren lejos de la planta madre escapen de la depredación y logren una alta sobrevivencia, por lo que el máximo reclutamiento de plántulas puede ocurrir a cierta distancia de la planta madre. Aunado a esto, los propágulos de otras especies son capaces de colonizar el espacio vacío alrededor de la planta madre, lo que mantiene la diversidad vegetal (Cintra, 1997a).

Aunado a lo anterior, las causas de mortalidad en plántulas y su importancia relativa dependen de la estructura fisionómica de las comunidades, de la fauna asociada a cada ambiente, así como de la densidad de la población adulta de *M. flexuosa*, en este caso, la densidad de plántulas muertas en la cuenca alta del río Tigre, se relacionó positivamente con la densidad de adultos, lo que permite suponer, que, si hay más plántulas bajo la planta madre, más plántulas morirán al caer una hoja y más recursos habrá para los depredadores y herbívoros; además, si hay alta densidad de adultos, habrá limitaciones en la intensidad de luz que incide sobre el suelo, y consecuentemente afectará el crecimiento y supervivencia de las plántulas

Ponce *y col.* (1996) reportaron que las plántulas de *M. flexuosa* experimentan una alta mortalidad por depredación, presión de herbivoría y muerte accidental. Esta última, por pisoteo, caída de hojas y restos vegetales (hojarasca) provenientes de los adultos, o a factores, como acción de los depredadores (Zamora-Abrego *y col.*, 2016), profundidad de la hojarasca, entre otros. La hojarasca, su cantidad y composición química en el suelo puede facilitar o impedir la germinación y el crecimiento de las plántulas (emergencia, supervivencia y etapas tempranas del crecimiento (Wang *y col.*, 2022), al alterar o reducir la amplitud térmica, la humedad, la disponibilidad de luz (Facelli y Pickett, 1991; Baskin y Baskin, 1998), la composición de la comunidad microbiana, las tasas de ciclaje de nutrientes (Muturi *y col.*, 2017), liberación de sustancias tóxicas, sombrear las semillas y plántulas. Estos factores interactúan entre sí de manera compleja (Facelli y Pickett, 1991), y junto a las características de las semillas y posición de las mismas en la hojarasca (Olliff-Yang y Case, 2018), pueden constituirse en una barrera física que dificulta la emergencia de plántulas y brotes (Facelli y Pickett, 1991; Abbas *y col.* (2023). Wang *y col.* (2022) hallaron que la cubierta de la hojarasca tuvo un efecto negativo general en la emergencia y supervivencia de las plántulas, un efecto neutral en la raíz, hoja, biomasa total, y un efecto positivo en la biomasa del tallo y la altura de las

plántulas. Otro factor importante que regula la mortalidad de las plántulas es la profundidad a la cual germinan, de tal forma que les permita emerger. Muchas especies tienen lo que parece ser un mecanismo censor de profundidad, el cual previene la germinación a profundidades desfavorables. Factores bióticos, como depredación, enfermedades y competencia, también juegan un papel en el mantenimiento de un alto nivel de mortalidad. La competencia con las plantas vecinas (ya sea con individuos contemporáneos o vegetación pre-existente) es el mayor enfrentamiento de la colonización vía plántulas (Fenner, 1985).

Shaojun y Nilsson (1999) observaron que la germinación y el establecimiento de las especies arbóreas se vieron afectados por la hojarasca negativamente y en mayor medida que las hierbas y las gramíneas, al menos al principio de la etapa de colonización; lo cual contrasta con la suposición de que las semillas más grandes, con sus plántulas más altas harán que los árboles sean más tolerantes a la hojarasca. Además, las especies de semillas grandes se ven más afectadas por la química de la hojarasca que las de semillas pequeñas, las que su vez pueden ser fácilmente atacadas por patógenos y depredadores (Gross, 1984).

El tamaño y la morfología de la plántula juegan un papel en la susceptibilidad relativa de diferentes especies a la depredación y por ende en la mortalidad. La respuesta de la plántula al pastoreo es altamente dependiente de las condiciones ambientales. Si se comen los puntos de crecimiento, pero la plántula se encuentra en condiciones favorables de luz, la planta se desarrolla posteriormente y sobrevive, pero si se encuentra en sombra no se desarrolla (Fenner, 1985). Sin embargo, en palmas, el crecimiento a expensas de un único meristemo apical, las hace susceptibles a la mortalidad si este es destruido, por lo que la incidencia de muerte y sus causas son un parámetro importante para la dinámica de las poblaciones de *M. flexuosa* (Ponce y col., 1996).

Isaza y col. (2017), en un estudio demográfico de dos especies de palmas en la Amazonía colombiana, señalaron que, como ocurre en la mayoría de las palmeras, las plántulas tienen la menor probabilidad de supervivencia, que en el caso del moriche fue de 1%, convirtiéndose en un cuello de botella para el crecimiento de la población. Sin embargo, en este trabajo las curvas de supervivencia de las plántulas *M. flexuosa* mostraron una alta variabilidad en la cuenca alta del río Tigre. Así, dependiendo de la localidad (Figura 9a), va disminuyendo la probabilidad de vida de un individuo durante las primeras etapas de la vida, esto es, los individuos inmaduros experimentan una alta mortalidad (Halley y col., 2018). Por su parte, en la estación IV (Figura 9b), pareciera que la población invierte más energía en salvaguardar la descendencia, de modo que la mortalidad sea baja en las primeras etapas de la vida. Mientras que en las estaciones VII y VIII, la curva parece una estrategia de tipo II que se considera intermedia, con una mortalidad relativamente constante a lo largo de la vida (Rauschert, 2010; Halley y col., 2018) (Figura 9c). Esto indica que a medida que

nos alejamos de una estrategia de supervivencia Tipo I hacia una Tipo III, la variabilidad de la población refleja cada vez más la variación ambiental, especialmente en las etapas de vida más tempranas (Halley *y col.*, 2018).

En plántulas de *Astrocaryum* (palma) y *Dipteryx* (árbol), Cintra (1997b) encontró que los patrones de supervivencia dependen del año considerado, en algunos casos de la proximidad al adulto y en otros de la heterogeneidad espacial. Chacón y Armesto (2002) reportaron que la disponibilidad de luz tuvo un efecto positivo sobre la tasa de crecimiento de las plántulas del árbol *Gevuina avellana*, y su supervivencia, mientras que la acción de los herbívoros no tuvo efecto.

Entre los factores ambientales que influyen en la supervivencia de plántulas, está el hidropériodo anual. La inundación puede tener efectos adversos e incluso inhibir la germinación de palmas, como es el caso de *Oenocarpus bacaba* y *Socratea exorrhiza* (Manaos, Brasil), en las cuales también, la herbivoría y la densidad de las plantas adultas tuvo un efecto importante en el establecimiento de ambas palmas (Pacheco, 2001). Una forma de contrarrestar el efecto de la inundación, es la ubicación de la mayoría de las plántulas sobre montículos del suelo en la base de las palmas, como en lo señaló Bonadie y Bacon (1999) para el caso de *Pterocarpus*, quienes sugieren que la ubicación lejos del agua puede ser favorable para el establecimiento de las semillas (Bonadie y Bacon, 1999).

Cualquier actividad humana que perturbe la hidrología o incremente la carga de sedimentos, puede disminuir la habilidad de regenerarse de algunas especies (Cronk y Fennessy, 2001). Construir acequias y talar la vegetación típica de morichales para sustituirla por conucos, induce una tasa de recuperación más lenta respecto a los cultivos perennes sembrados en la vega del morichal. Asimismo, los suelos del morichal no pueden restituir superficialmente sus nutrientes en el tiempo adecuado y se empobrecen con rapidez; el agricultor o indígena conuquero migra hacia otro sector en la misma vega del morichal y en el proceso de regresión ecológica activado por la tala y construcción de acequias induce una sucesión ecológica que genera etapas de restablecimiento distintas a la que originalmente conformaron el morichal, de esta forma se altera el proceso evolutivo intrínseco de este sistema, con variaciones que pueden ser irreversibles (Segovia, 1997). En casos donde la baja supervivencia de plántulas se atribuye a las actividades antrópicas, si ésta no incrementa, entonces el sistema será reducido a niveles insuficientes para soportar la fauna que depende de ello. Se ha observado que las causas de la alta mortalidad de las plántulas son principalmente ambientales, como los cambios en el nivel de agua, aunado a la competencia con los arbustos de rápido crecimiento. Cualquier intento de restauración con implantación de semillas y plántulas puede llevarse a cabo durante la estación en donde la germinación natural es exitosa (Bonadie, 1998).

Por otro lado, la curva de supervivencia juega un papel importante en la sensibilidad de un organismo a la variabilidad climática, especialmente la distinción entre las estrategias de Tipo I, II y III. A menudo se supone que los organismos de Tipo I serán los más vulnerables al cambio climático. Sin embargo, el régimen predicho por los modelos climáticos presenta no solo un calentamiento global direccional sino también una variación climática creciente. Halley y col. (2018) sugieren que es probable que los organismos de Tipo III sean más sensibles a este tipo de variabilidad y, por lo tanto, más vulnerables y también que la efectividad de una acción de conservación específica depende del tipo de historia de vida. En particular, las mortalidades masivas en etapas tempranas intrínsecas a las especies de Tipo III crean una sensibilidad especial a la variabilidad ambiental que se refleja a nivel de población. Por lo tanto, al priorizar las acciones de conservación, debemos tratar a los organismos de Tipo III de manera diferente a los organismos de Tipo I. Mientras que las acciones de conservación más efectivas para las poblaciones de Tipo I es evitar matarlas, para las poblaciones Tipo III (con alta fecundidad y baja inversión parental), los objetivos de conservación deben enfocarse en proteger las etapas tempranas de la vida de los ambientes hostiles (Halley y col., 2018). Asimismo, Halley y col. (2018), indican que las etapas de vida que tienen una mayor mortalidad contribuyen a una mayor variabilidad en las fluctuaciones de la población. De acuerdo a los resultados de *M. flexuosa* en el río Tigre, al tener distintas estrategias de supervivencia, es de suponer que tendrá mayor potencial de respuestas ante la variabilidad climática.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Diego Rodríguez († 2023) por su asesoría sobre estudios poblacionales en plantas. A la Gerencia del Distrito San Tomé de PDVSA y la Coordinación Operacional Oriente de PDVSA, FONACIT y CDCH-UCV por cubrir los aspectos financieros y logísticos de este proyecto desde marzo del 2000 hasta septiembre del 2001. A Jesús Segovia y al personal del Laboratorio de Petróleo de San Tomé - PDVSA, por apoyar todo el trabajo de campo y de laboratorio. A los señores Luis Rafael Yaguare, Franklin Díaz, Juan Guevara, Anselmo Boada y a la Dirección de la Escuela Granja El Vasquero, quienes facilitaron el acceso a las diferentes estaciones o sitios de muestreo.

LITERATURA CITADA

- Abbas, A. M., M.M. Alomran, N.K. Alharbi y S.J. Novak. 2023. Suppression of seedling survival and recruitment of the invasive tree *Prosopis juliflora* in Saudi Arabia through its own leaf litter: Greenhouse and field assessments. *Plants* 12(4):959. <https://doi.org/10.3390/plants12040959>.
- Acevedo-Quintero, J. F. y J. G. Zamora-Abrego. 2016. Papel de los mamíferos en los procesos de dispersión y depredación de semillas de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) en la Amazonía colombiana. *Rev. Biol. Trop.* 64(1): 5-15.

- Banovetz, J. S. y S. M. Scheiver. 1994. The Effects of Seed Mass on the Seed Ecology of *Coreopsis lanceolata*. *The American Midland Naturalist* 131(1):65-74
- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego. 666 pp.
- Bataglion, G. A., W. H. P. Paz, A. A. X. Adrião, J. M. da Rocha Albuquerque, F. M. A. da Silva, I. A. N. Numa, C. F. F. Angolini, G. M. Pastore, y H. H. F. Koolen. 2019. Bioactive compounds of buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.). En: *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts* (Murthy, H. N. y V. A. Bapat, Eds.). *Reference Series in Phytochemistry*, https://doi.org/10.1007/978-3-030-06120-3_29
- Bonadie, W. A. 1998. The ecology of *Roystonea oleracea* palm swamp forest in the Nariva Swamp (Trinidad). *Wetlands* 18 (3): 249-255.
- Bonadie, W.A. y Bacon, P.R. 1999. The structure and ecology of *Mauritia setigera* palm swamp forest in Nariva swamp, Trinidad. *Tropical Ecology* 40 (2): 199-206.
- Begon, M., C. R. Townsend y J. L. Harper. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. 4ta ed. Blackwell Pub., Oxford, UK. 759 pp.
- Busch, M. 2017. Ecología General. 2. Ecología de Poblaciones. Disponible en: <https://www.ege.fcen.uba.ar/wp-content/uploads/2014/05/Teopob1.pdf>. Consulta: 9/6/2021.
- Chacón, P. y Armesto, J. 2002. Interacciones entre luz, metabolitos secundarios y herbivoría: efectos sobre el crecimiento y sobrevivencia de plántulas de *Gevuina avellana* (Proteaceae). *Libro de Resúmenes del VIII Congreso Latinoamericano de Botánica*. Cartagena de Indias, Colombia. 184 pp.
- Cintra, R. 1997a. A test of the Janzen-Connell model with two common tree, species in Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology* 13: 641-658.
- Cintra, R. 1997b. Leaf litter effects on seed and seedling predation of the palm *Astrocaryum murumuru* and the legume *Dipteryx micrantha* in Amazonian forest. *Journal of Tropical Ecology* 13: 709-725.
- Cronk, J. K. y M. S. Fennessy. 2001. *Wetlands Plants: Biology and Ecology*. Lewis Publishers. USA. 462 pp.
- Escamilla Quiroga, D. y T. Bustos. 2018. Estructura poblacional y parámetros de aprovechamiento para la hoja de *Mauritia flexuosa* L.f. en los municipios de Vistahermosa y Puerto López (Meta). T.E.G Ingeniero Forestal, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá D.C.
- Facelli, J. M. y S. T. A. Pickett. 1991. Plant litter: its dynamics and effects on plant community structure. *The Botanical Review* 57: 1-32.
- Fenner, M. 1998. The Phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1: 78-91.
- Freitas Alvarado, Luis, V. Dávila Macedo, P. Pérez Peña, R. Pezo Díaz y K. Mejía. 2020. Estructura poblacional de *Mauritia flexuosa* y *Oenocarpus bataua* en tres comunidades de la cuenca alta del Putumayo, frontera Perú – Colombia. *Ciencia Amazónica* (Iquitos) 8 (2): 151 – 166, <http://dx.doi.org/10.22386/ca.v8i2.294>.
- Godínez-Álvarez, H., M. Jiménez, M. Mendoza, F. Pérez, Roldán, L. Ríos Casanova y R. Lira. 2008. Densidad, estructura poblacional, reproducción y supervivencia de cuatro especies de plantas útiles en el Valle de Tehuacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 393- 403.
- González-B., V. 2016. Los palmares de pantano de *Mauritia flexuosa* en Suramérica: Una revisión. En: *XIV. Morichales, Cananguchales y otros palmares inundables de Suramérica. Parte II: Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina* (Lasso, C. A., G. Colonnello y M. Moraes Eds.). Cap. 2: 45-83. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia.

- Gordon, E. 1999. Effect of size and number of seeds on germination and seedling size on six helophyte species. *Fragm. Flor. Geobot.* 44 (2): 429-436.
- Gross, K.L. 1984. Effects of seed size and growth form on seedling establishment of six monocarpic perennial plants. *Journal of Ecology* 72: 369-387.
- Grubb, P.J. 1977. The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological Reviews* 52(1): 107-145.
- Halley J.M., K.S. Van Houtan y N. Mantua. 2018. How survival curves affect populations' vulnerability to climate change. *PLoS One* 13(9): e0203124.
- Hammer, Ø. 1999-2015a. *PAST Ver. 3.10. Reference manual*. Natural History Museum, University of Oslo. Oslo, Noruega.
- Hammer, Ø. 1999-2015b. *PAST (Paleontological Statistics)*, Version 3.10. <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.
- Harper, J.L. 1977. *Population Biology of Plants*. Academic Press. Londres. 892 pp.
- Hernández-Valencia, I., D. Guitián y V. González. 2017. Efectos del tamaño de semilla y escarificación del endocarpio sobre la germinación de *Mauritia Flexuosa* (Arecaceae). *Acta. Bot. Venez.* 40 (1): 97-118.
- Howe, H. F. y W. Richter. 1982. Effects of seed size on seedling size in *Virola surinamensis*: a within and between tree analysis. *Oecologia* 53: 347-351.
- Isaza, A. C., R. Bernal, G. Galeano y C. Martorell. 2017. Demography of *Euterpe precatória* and *Mauritia flexuosa* in the Amazon: application of integral projection models for their harvest. *Biotropica* 49 (5): 653-664. <https://doi.org/10.1111/btp.12424>
- Johansson, B. 2009. Stay below water! -a strategy to avoid seed predators: -seed survival and germination of *Mauritia flexuosa* in southeastern Peru. Master's thesis. Linköpings Universitet, Suecia. 34 pp.
- Llamozas, S., R. Duno de Stefano, W. Meier, R. Riina, F. Stauffer, G. Aymard, O. Huber y R. Ortiz. 2003. *Libro Rojo de la Flora Venezolana*. Provita, Fundación Polar, Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Tobias Laser", Conservación Internacional. Caracas, Venezuela, 555 pp.
- Krebs, C.J. 1978. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Second Edition. Harper & Row, Nueva York, USA.
- MARNR - PDVSA. 1987. Monitoreo de aguas de los ríos de la Faja Petrolífera del Orinoco. Proyecto del Programa de Protección Ambiental. 140 pp.
- Márquez, L. E. y M. Briceño. 2000. Comparación estructural y florística de tres zonas con distinto grado de intervención en el Morichal Nicolasito, Santa Rita, Estado Guárico. XIV Congreso Venezolano de Botánica, Caracas.
- Mendieta-Aguilar G., L. F. Pacheco & A. I. Roldán. 2015. Dispersión de semillas de *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) por frugívoros terrestres en Laguna Azul, Beni, Bolivia. *Acta Amazonica* 45(1): 45 - 56.
- Mitsch, W.J. y J.G. Gosselink. 2000. *Wetlands*. 3era edición. John y Wiley Sons, INC. New York. 920pp.
- Morláns, M. C. 2004. *Introducción a la Ecología de Poblaciones*. Disponible en: <https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Morlans-2004.pdf>. Consulta: 09/06/2021
- Novoa Ramírez, J. Y. 2010. Evaluación de las principales características poblacionales de *Mauritia flexuosa* frente al cambio climático en el área de conservación municipal asociación hídrica aguajal - Renacal Alto Mayo. Tesis de Grado de Ingeniero, Universidad Nacional de San Martín, Facultad de Ecología, Perú. 61 pp.
- Odum, E. P. 1993. *Ecology and our endangered life-support systems*. 2da. Ed. Sinaeur Associates, INC - Publisher, Sunderland. Massachusetts, USA.
- Olliff-Yang, L. R. y E. J. Case. 2018. The effects of leaf litter on germination in the serpentine endemic *Boechea constancei*. *MADROÑO* 65 (4): 159-167.

- Pacheco, M. W. A. 2001. Effects of flooding and herbivores on variation in recruitment of palms between habitats. *Journal of Ecology* 89: 358–366.
- Peña-Colmenarez, C. 2004. Variaciones en la estructura y composición florística de las comunidades de Morichal en la cuenca alta del río Tigre (Edo. Anzoátegui). Tesis Doctoral, Postgrado en Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Peña-Colmenarez, C. y E. Gordon-Colón. 2022. Algunos aspectos fenológicos y poblacionales de *Mauritia flexuosa* (Moriche) en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela). *Acta Bot. Venez.* 45(1-2):39-61.
- Peña-Colmenarez, C. y E. Gordon-Colón. 2019. Morichal de la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela): Aguas, suelos y vegetación. *Acta Biol. Venez.* 39 (2): 137-228.
- Pettit, N.E. y R. H. Froend. 2001. Variability in flood disturbance and the impact on riparian tree recruitment in two contrasting river systems. *Wetlands Ecology and Management* 9: 13 – 25.
- Ponce, M. E. 2000. Algunos aspectos de la biología poblacional de *Mauritia flexuosa* L.f. (Palma moriche) en los Llanos Sur Orientales del Edo. Guárico, Venezuela. Tesis Doctoral. Postgrado en Ecología, Facultad de Ciencias, UCV. Caracas, Venezuela.
- Ponce, M. E. 2002. Patrones de caída de frutos en *Mauritia flexuosa* L.F. y fauna involucrada en los procesos de remoción de semillas. *Acta Bot. Venez.* 25(1): 119-142.
- Ponce, M. E., F.W. Stauffer, M. L. Olivo & M.A. Ponce. 2000. *Mauritia flexuosa* L.F. (Arecaceae). Una revisión de su utilidad y estado de conservación en la cuenca Amazónica, con especial énfasis en Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 23(1): 19-46.
- Ponce, M. E., J. Brandín, V. González y M. A. Ponce. 1996. Causas de la mortalidad en plántulas de *Mauritia flexuosa* L. f. (Palma moriche) en los Llanos Centro-Orientales de Venezuela. *ECOTROPICOS* 9 (1): 33-38.
- Rauschert, E. 2010. Survivorship Curves. *Nature Education Knowledge* 3(10):18.
- Segovia, J. 1997. Impactos ambientales globales sobre el área de las cabeceras del Río Casshama, altos de la comunidad indígena de Bajo Hondo. Nota Técnica. PDVSA. San Tomé.
- Shaojun X. y C. Nilsson. 1999. The effects of plant litter on vegetation: a meta-analysis. *Journal of Ecology* 87: 984±994
- Trujillo-González, J., M. A. Torres-Mora y E. Santana-Castañeda. 2011. La palma de Moriche (*Mauritia flexuosa* L.f.) un ecosistema estratégico. *Revista Orinoquia* 15(1): 62-70.
- van der Hoek, Y., S. Álvarez Solas y M. C. Peñuela. 2019. The palm *Mauritia flexuosa*, a keystone plant resource on multiple fronts. *Biodiversity and Conservation* <https://doi.org/10.1007/s10531-018-01686-4>.
- van Eck, W. H. J. M., H. M. van de Steeg, C.W.P.M. Blom y H. de Kroon. 2005. Recruitment limitation along disturbance gradients in river floodplains. *Journal of Vegetation Science* 16: 103-110.
- Virapongse, A., B. A. Endress, M. P. Gilmore, C. Horn & C. Romulo. 2017. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Global Ecology and Conservation* 10: 70-92
- Wang Z., D. Wang, Q. Liu, X. Xing, B. Liu, S. Jin y M. Tigabu. Meta-analysis of effects of forest litter on seedling establishment. *Forests* 13: 2-14. <https://doi.org/10.3390/f13050644>.
- Xiong, S., M.E. Johansson, F.M.R Hughes, A. Hayes, K. S. Richards y C. Nilsson. 2003. Interactive effects of soil moisture, vegetation canopy, plant litter and seed addition on plant diversity in a wetland community. *Journal of Ecology* 91: 976 – 986.

- Zhang H., F. Duan, Y. Li, Q. Wang, X. Lu, I. D. X. Gan, Z. Xie y J. Tang. 2020. Population structure and quantitative characteristics of *Tetracentron sinense* (Trochodendraceae) in Leigong Mountain Nature Reserve, China. *Botanical Sciences* 98(1): 86-100. 2020.
- Zamora-Abrego, J.G., E. Ruiz-Martínez, L.E. Urrego-Giraldo, Y.A. Galeano González, J.F. Acevedo-Quintero y M.C. Peñuela-Mora. 2016. Aproximación demográfica de una población de la palma *Mauritia flexuosa* en la Amazonia colombiana. En: *XIV. Morichales, Cananguchales y otros palmares inundables de Suramérica. Parte II: Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina* (Lasso, C.A., G. Colonnello y M. Moraes Eds.). Cap. 4, pp. 109-130. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia

Anexo 1. Tablas de vida de la primera cohorte de plántulas de *Mauritia flexuosa* en cada estación de muestreo en la cuenca alta del río Tigre (Anzoátegui, Venezuela).

Estación II	X	Nx	lx	dx	qx	Lx	Estación III	X	Nx	lx	dx	qx	Lx
may-00	0	151	1,000	110,0	0,73	96	may-00	0	21	1,000	14,0	0,67	14,0
jul-00	1	41	0,272	28,0	0,68	27	jul-00	1	7	0,333	6,0	0,86	4,0
sept-00	2	13	0,086	7,0	0,54	9,5	sept-00	2	1	0,048	0,0	0,00	1,0
nov-00	3	6	0,040	5,0	0,83	3,5	nov-00	3	1	0,048	0,0	0,00	1,0
ene-01	4	1	0,007	0,0	0,00	1,0	ene-01	4	1	0,048	0,0	0,00	1,0
mar-01	5	1	0,007	0,0	0,00	1,0	mar-01	5	1	0,048	0,0	0,00	1,0
may-01	6	1	0,007				may-01	6	0	0,000	0,0	0,00	0,0
Estación IV	X	Nx	lx	dx	qx	Lx	Estación V	X	Nx	lx	dx	qx	Lx
may-00	0	7	1,000	0,0	0,00	7,0	may-00	0	55	1,000	33,0	0,60	38,5
jul-00	1	7	1,000	0,0	0,00	7,0	jul-00	1	22	0,400	8,00	0,36	18,0
sept-00	2	7	1,000	0,0	0,00	7,0	sept-00	2	14	0,255	6,00	0,43	11,0
nov-00	3	7	1,000	0,0	0,00	7,0	nov-00	3	8	0,145	1,00	0,13	7,5
ene-01	4	3	0,429	4,0	1,33	1,5	ene-01	4	7	0,127	0,00	0,00	7,0
mar-01	5	0	0,000	3,0	0,00	0,0	mar-01	5	7	0,127	2,00	0,29	6,0
may-01	6	0	0,000				may-01	6	5	0,091			
Estación VI	X	Nx	lx	dx	qx	Lx	Estación VII	X	Nx	lx	dx	qx	Lx
may-00	0	10	1,000	10,0	1,00	5,0	may-00	0	9	1,000	4,00	0,44	7,0
jul-00	1	0	0,000	0,0	0,00	0,0	jul-00	1	5	0,556	2,00	0,40	4,0
sept-00	2	0	0,000	0,0	0,00	0,0	sept-00	2	3	0,333	0,00	0,00	3,0
nov-00	3	0	0,000	0,0	0,00	0,0	nov-00	3	3	0,333	1,00	0,33	2,5
ene-01	4	0	0,000	0,0	0,00	0,0	ene-01	4	2	0,222	1,00	0,50	1,5
mar-01	5	0	0,000	0,0	0,00	0,0	mar-01	5	1	0,111	0,00	0,00	1,0
may-01	6	0	0,000				may-01	6	1	0,111			
Estación VIII	X	Nx	lx	dx	qx	Lx							
may-00	0	9	1,000	0,0	0,00	9,0							
jul-00	1	9	1,000	0,0	0,00	9,0							
sept-00	2	9	1,000	3,0	0,21	7,5							
nov-00	3	6	0,667	0,0	0,00	6,0							
ene-01	4	6	0,667	1,0	0,50	5,5							
mar-01	5	5	0,556	1,0	0,00	5,0							
may-01	6	4	0,444										

DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DEL TEJIDO ADIPOSO HACIA EL LINAJE EPITELIAL

Marian Rodríguez O.¹, Elizabeth Merentes^{1*} y Elena Velasco²

¹Instituto de Biología Experimental. Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. ²Facultad de Medicina. Unidad de Microscopía Electrónica. Universidad Central de Venezuela. *emerentes@gmail.com

RESUMEN

Estudios *in vitro* han demostrado que el tejido adiposo es una fuente importante de células madre mesenquimales (MSCs) que bajo condiciones específicas de cultivo se pueden diferenciar hacia varios tipos celulares de origen mesodérmico. Recientemente se ha demostrado que las MSCs pueden dar origen a linajes celulares de origen ectodérmico. En tal sentido en nuestro trabajo se estudió el potencial de diferenciación de las células mesenquimales provenientes del tejido adiposo humano hacia el linaje epitelial, simulando un microambiente específico *in vitro*. Para ello, las células fueron aisladas a partir de muestras de abdominoplastias. Las células obtenidas fueron caracterizadas morfológicamente mediante inmunohistoquímica contra vimentina y CD49d. Para inducir la diferenciación epitelial, las MSCs se cultivaron con Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) e Insulina y se comparó con una mezcla de medios condicionados obtenidos de queratinocitos y fibroblastos de ratón. Las células cultivadas bajo estas condiciones fueron caracterizadas morfológicamente y también se evaluó la expresión de PanCK y E-cadherina. Los datos obtenidos mostraron que las MSCs del tejido adiposo pueden diferenciarse hacia células similares a epiteliales, las cuales expresaron PanCK y E-cadherina siendo los resultados más significativos con los medios condicionados. Esto sugiere que las MSCs del tejido adiposo poseen la capacidad de diferenciarse hacia células epiteliales y por lo tanto podrían ser utilizadas en ingeniería de tejidos, terapia celular del tejido epitelial y en estudios de diferenciación celular.

Palabras clave: Células mesenquimales, tejido adiposo, linaje epitelial, medios condicionados, diferenciación.

Differentiation of human mesenchymal stem cells adipose tissue into the epithelial lineage *in vitro*

ABSTRACT

In vitro studies have shown that adipose tissue is an important source of mesenchymal stem cells (MSCs) that under specific culture conditions can be differentiated into various cell types of mesodermal origin. It has recently been shown that MSCs can give rise to cell lineages of ectodermal origin. In this sense, in our work we studied the differentiation potential of MSCs from human adipose tissue towards the epithelial lineage, simulating a specific microenvironment *in vitro*. Mesenchymal stem cells were isolated from abdominoplasty samples and were characterized by immunohistochemistry against vimentin and CD49d. To induce epithelial differentiation, MSCs were cultured with Epidermal Growth Factor (EGF) and insulin; and compared to a mixture of conditioned media obtained from mouse keratinocytes and fibroblasts. Cells grown under these conditions were morphologically characterized and

the expression of PanCK and E-cadherin was also evaluated. The data obtained showed that MSCs from adipose tissue can differentiate into epithelial-like cells, which expressed PanCK and E-cadherin, being the most significant results with conditioned media. Moreover, the establishment of cell junctions was observed through electronic microscopy. This suggests that MSCs from adipose tissue can differentiate into epithelial cells and therefore could be used in tissue engineering, cell therapy of epithelial tissue and cell differentiation studies.

Keywords: mesenchymal stem cells, adipose tissue, epithelial lineage, conditioned media, differentiation.

INTRODUCCIÓN

Las células madre mesenquimales (MSCs) han sido definidas como una población de células capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse hacia distintos tipos de células especializadas no solo morfológicamente sino también funcionalmente (Jiang *y col.*, 2002; Raff, 2003; Caplan, 2004; Dominici *y col.*, 2006; Gimble *y col.*, 2007; Orbay *y col.*, 2012). Las MSCs de tejidos adultos se localizan entre las células especializadas de un tejido en particular. La principal función de estas células es mantener y reparar el tejido en el cual se encuentran. Sin embargo, los diferentes tipos de tejidos del organismo poseen una mayor o menor capacidad de reparar por sí mismo los daños que sufren. Esto junto con la pérdida de la homeostasis celular contribuye al desarrollo de diversas enfermedades degenerativas.

Las MSCs de tejidos adultos se aislaron y caracterizaron originalmente a partir de la médula ósea y diversos estudios han demostrado que se pueden mantener, expandir y manipular en condiciones *in vitro* siendo capaces de diferenciarse a numerosos tipos celulares incluyendo: adipocitos, mioblastos, osteoblastos, condrocitos, queratinocitos, entre otros (Pittenger *y col.*, 1999; Rodríguez, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Witkowska-Zimny *y col.*, 2011). Sin embargo, las MSCs también se han aislado de otros tejidos como el cordón umbilical, pulpa dental, músculo y tejido adiposo. Este último al igual que la médula ósea se deriva del mesodermo embrionario y ha sido considerado como fuente importante de células madre adultas con una gran potencialidad de diferenciación (Zuk *y col.*, 2002; Mizuno *y col.*, 2003; Gimble y Guilak, 2003; Baer y Geiger, 2012, Orbay *y col.*, 2012). La utilización de estas células madre para su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades es de gran significado hoy en día, si se tiene en cuenta la facilidad de obtención de estas células del tejido graso, su expansión *in vitro* y su potencial de diferenciación múltiple (Bertassoli *y col.*, 2013, Czerwiec *y col.*, 2023). Además, estas células secretan numerosos mediadores, citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la cicatrización de heridas de la piel (Almaski, 2022) y en la regeneración de órganos (Al Ghadban *y col.*, 2023). Estas características las hace una fuente ideal de células madre para la investigación de la ingeniería de tejidos y terapia celular. En este sentido,

recientemente se ha planteado su enorme potencial terapéutico en la medicina regenerativa, numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que las células mesenquimales del tejido adiposo pueden regenerar órganos tales como hueso, cartilago, piel, hígado entre otros (Yang y col., 2019, Zhang y col., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los cultivos celulares. Las MCS del tejido adiposo humano fueron aisladas a partir de 10 muestras de abdominoplastia de pacientes entre 35 y 45 años de edad. Las cuales fueron suministradas por el Centro Médico de Caracas bajo el consentimiento del paciente. Las muestras de tejido adiposo fueron colocadas en un tampón fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) y se seccionaron en pequeños trozos. Seguidamente, se realizó disgregación enzimática con colagenasa tipo I (SIGMA) al 0.075%. La viabilidad celular fue determinada con el colorante de exclusión azul tripano y se cuantificó el número de células con un hemocitómetro y se sembraron a una densidad celular de 7×10^5 a 2×10^6 .

Las células obtenidas fueron mantenidas en medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO), 100 U/ml penicilina G y 2 mg/ml anfotericina e incubadas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, se realizaron los subcultivos, los cuales fueron utilizados para los ensayos de caracterización y diferenciación celular. Paralelamente se establecieron los cultivos de fibroblastos embrionarios y de células epidérmicas obtenidas de embriones de ratón de 11 a 13 días de gestación y neonatos de ratón respectivamente (Merentes, 2016). Los fibroblastos fueron mantenidos con medio DMEM suplementado con 10% de SFB, antibióticos y antimicóticos, mientras que las células epidérmicas fueron cultivadas con medio DMEM suplementado con 10% SFB, 10 ng/ml Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), 100 U/ml penicilina G y 2 mg/ml anfotericina. Ambos cultivos fueron mantenidos a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia con cambios de medios periódicos, luego de lo cual se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población de fibroblastos y células epidérmicas que fueron utilizados para obtener los medios condicionados.

Caracterización de las MSC del tejido adiposo humano. Con la finalidad de observar las características morfológicas y desarrollo *in vitro* de las células en los cultivos, se llevaron a cabo observaciones periódicas en el microscopio invertido de contraste de fases y microscopía de luz. Adicionalmente, para observar la heterogeneidad u homogeneidad de los

cultivos primarios y subcultivos se llevó a cabo una evaluación histológica con Hematoxilina-Eosina siguiendo el protocolo histológico estándar. También se evaluó la presencia de adipocitos y gotas de lípidos con Sudan III.

Para caracterizar y evidenciar la población de MSCs en los cultivos *in vitro* se determinó la expresión de vimentina (anticuerpo monoclonal de ratón, dilución 1:100, Dako) y CD49d ($\alpha 4$ -integrina) (anticuerpo policlonal de conejo, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology). La determinación antigénica se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar del sistema inmunohistoquímico ABC de Santa Cruz Biotechnology.

Inducción de la diferenciación epitelial. Una vez que los cultivos de MSCs alcanzaron la confluencia, se procedió a realizar los ensayos de diferenciación celular hacia el linaje epitelial. Para ello se tomaron células del 3er subcultivo que fueron disgregadas enzimáticamente con Tripsina 0.125%-EDTA 0.02%. La suspensión celular obtenida se resuspendió en medio nutritivo y luego se sembró en placas de 6 pozos (Nunc) a una densidad de 3×10^5 células por pozo.

Inicialmente las células fueron cultivadas con DMEM suplementado con 10% SFB, antibióticos y antimicóticos. A las 24 horas el medio fue reemplazado por el medio control e inductores (Tabla I). Finalmente se incubó a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por 6 a 12 días con cambio de medio periódicos, luego de lo cual se realizaron las evaluaciones histológicas, inmunohistoquímicas y ultraestructurales correspondientes.

Tabla 1. Factores ensayados en el medio base DMEM para inducir la diferenciación de las células MSC del tejido adiposo humano hacia el linaje epitelial.

Medio	Medio	Suero	Suplementación
Control	DMEM	10 % SFB	Antibióticos y antimicóticos.
Medio inductor 1	DMEM	10 % SFB	Medio condicionado de fibroblastos y células epidérmicas (1:1), antibióticos y antimicóticos
Medio inductor 2	DMEM	10 % SFB	EGF 10 ng/ml, insulina 10 μ g/ml, antibióticos y antimicóticos.

Caracterización de la diferenciación. Con el fin de observar los cambios morfológicos que ocurrieron durante la diferenciación *in vitro* de las MSCs del tejido adiposo humano, se llevaron a cabo observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases (Olympus IX50) tomándose los registros fotográficos correspondientes. Para observar las características histológicas de las células tanto en el control como en condiciones inductoras, las monocapas fueron fijadas *in situ* con metanol y conservadas en etanol 70% a 4°C para posteriormente realizar los ensayos inmunohistoquímicos correspondientes.

Para determinar si las MSCs del tejido adiposo de humano no solo presentaron cambios morfológicos sino también funcionales bajo las condiciones inductoras evaluadas, se realizó un ensayo inmunohistoquímico para evidenciar la expresión de algunas proteínas específicas del linaje epitelial como la expresión de queratinas y E-cadherina. Para ello se utilizaron anticuerpos primarios Pan-CK (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce a las CK 4,5,6,8,10,13 y 18, aislado de la A-431 carcinoma epidérmico humano; dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology) y como marcador de la morfogénesis epitelial temprana se utilizó un anticuerpo contra E-cadherina (anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce los aminoácidos 600-707 dentro del dominio extracelular de E-cadherina; dilución 1:100; Santa Cruz Biotechnology).

La determinación antigénica se llevó a cabo utilizando el protocolo estándar del sistema inmunohistoquímico ABC de Santa Cruz Biotechnology. Adicionalmente, y con la finalidad de observar los cambios de la inducción de la diferenciación hacia el linaje epitelial a nivel ultraestructural, se analizaron los cultivos en monocapa mantenidos con medio control e inductor 1 que contiene medio condicionado Epi/Fib. Para ello se siguieron los pasos convencionales de microscopía electrónica como: fijación, lavado, deshidratación, infiltración, inclusión, corte y contraste (Desmond, 1965). Las observaciones y registros fotográficos se realizaron en un Microscopio Electrónico Philips CM 10.

RESULTADOS

Caracterización morfológica e inmunohistoquímica de las células en los cultivos primarios y subcultivos. En los cultivos primarios de las células del estroma del tejido adiposo de humano, se evidenció una población de células con morfología fusiforme tipo fibroblasto, con núcleo ovalado y central, varios nucléolos y delgadas prolongaciones citoplasmáticas con una gran proporción de granulaciones (Figura 1A, 1B). En estos cultivos no se observaron células positivas al Sudan III (Figura 1C).

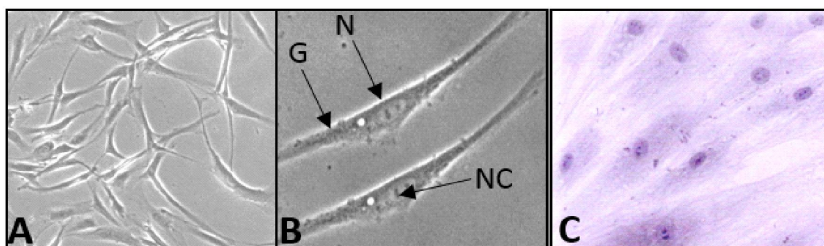


Figura 1. (A) Cultivo primario 3 días de cultivo. Se observa una población de células fusiformes. Contraste de fases 100X. (B) Detalle de las células fusiformes, con núcleo ovalado (N), varios nucléolos (NC) y granulaciones citoplasmáticas (G) 400X. (C) Células negativas a Sudan III presente en los cultivos primarios 400X.

La confluencia de los cultivos primarios se alcanzó entre los 10 y 15 días. Luego de lo cual se procedió a llevar a cabo los subcultivos, donde las células con morfología fusiforme se mantuvieron hasta el 8vo pasaje, sin cambios morfológicos aparentes asociados a la diferenciación y senescencia. Para observar la presencia de células de origen mesodérmico y la expresión de uno de los marcadores de la población de células del tejido adiposo humano en los cultivos celulares, se determinó la expresión de vimentina y CD49d, observándose que las células expresan vimentina en el citoplasma y CD49d en la membrana celular (Figura 2A, 2B, 2C).



Figura 2. (A) Población de células con morfología fusiforme positiva a vimentina en toda la extensión del citoplasma 400X. (B) Detalle de las células que expresan vimentina 1000X. (C) Población de células con zonas positivas en la superficie celular a nivel de la membrana celular (MP) 400X.

Inducción de la diferenciación. Al analizar el aspecto morfológico de las células provenientes del tejido adiposo de humano y el comportamiento *in vitro* en los cultivos en monocapa, se pudo observar que durante todo el período de estudio, en el cultivo control las células mostraron una morfología fusiforme semejante a fibroblastos (Figura 3A), y además, estas fueron negativas a Pan-CK (Figura 3B), mientras que en los cultivos mantenidos con el medio inductor tipo 1, las células presentaron una morfología fusiforme hasta el cuarto día, cuando se observó que las células se agruparon con un crecimiento similar a las células epiteliales donde algunas células cambiaron de fusiforme a células redondeadas, poligonales y otras similares a células cuboidales, con núcleo redondeado y de ubicación central (Figura 3C). En estos cultivos, algunas de las células que presentaron cambios morfológicos expresaron Pan-CK (Figura 3D). Además, bajo esta condición también se observó, a nivel de las interacciones celulares, positividad al inmunomarcaje con E-cadherina (Figura 3E).

Por otra parte, en los cultivos mantenidos con el medio inductor 2 se evidenció a los 5 días de cultivo una población de células que mantuvieron morfología fusiforme (Figura 3F) que fueron negativas a la determinación antigénica contra Pan-CK y E-cadherina, mientras que otras células mostraron una morfología redondeada o poligonal similar a las observadas en las células cultivadas con el medio inductor 1, las cuales expresaron Pan-CK (Figura 3G), pero fueron negativas a E-cadherina.

Características ultraestructurales. Para complementar los resultados obtenidos se realizó un análisis ultraestructural de las monocapas de las células fusiformes del tejido adiposo humano bajo la condición control e inductora con el medio inductor 1, permitiendo evidenciar diferencias ultraestructurales en cuanto a la forma celular, establecimientos de contactos celulares, cantidad y organización de los organelos.

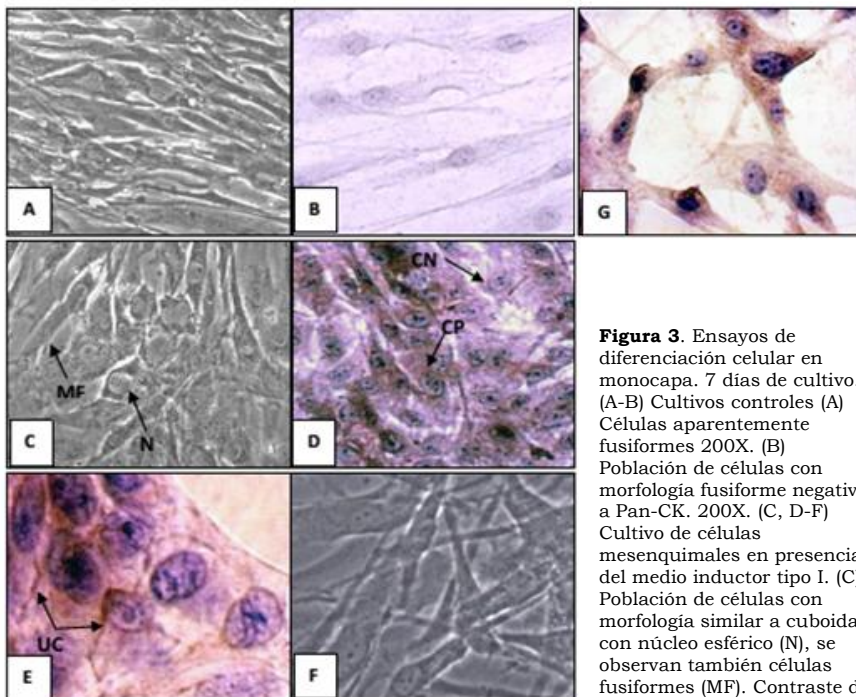


Figura 3. Ensayos de diferenciación celular en monocapa. 7 días de cultivo. (A-B) Cultivos controles (A) Células aparentemente fusiformes 200X. (B) Población de células con morfología fusiforme negativas a Pan-CK. 200X. (C, D-F) Cultivo de células mesenquimales en presencia del medio inductor tipo I. (C) Población de células con morfología similar a cuboidal con núcleo esférico (N), se observan también células fusiformes (MF). Contraste de fases 200X.

(D) Se observan células con morfología similar a cuboidal intensamente positivas a Pan-CK (CP) y algunas negativas (CN) 200X. (E) Células que expresan E-cadherina en las uniones celulares (UC) 1000X. (F-G) Cultivo en monocapa de las células mesenquimales del tejido adiposo inducido con el medio inductor tipo 2. (F) Células con morfología fusiforme. Contraste de fases 400X. (G) Células positivas a Pan-CK 400X.

De esta manera, en los cultivos control se observaron células aisladas con morfología fusiforme, con un núcleo ovalado y alargado. El nucléolo se encuentra cerca de la envoltura nuclear. En el citoplasma se evidenció RER alargado, mitocondrias electrondensas, vesículas, lisosomas, algunas mitocondrias y figuras mielínicas (Figura 4A), mientras que en los cultivos celulares mantenidos con el medio inductor 1, se evidenció aparentemente una mayor densidad celular que en el control, donde las células presentaron un núcleo prominente con invaginaciones leves en la envoltura nuclear y el nucléolo presentó una disposición abierta. En el citoplasma se evidenció gran

cantidad de RER con cisternas dilatadas, numerosas mitocondrias de distintas electrodensidades y tamaños, ribosomas libres y vesículas pinocíticas cercanas a la membrana celular y en el espacio intercelular, donde una vesícula aparentemente de catrina hace contacto con la superficie celular de una célula vecina (Figura 4B). Además, las células bajo esta condición aparentemente comenzaron a establecer uniones celulares con las células adyacentes, evidenciadas por el contacto, engrosamiento y presencia de zonas electrodensas a nivel de las membranas celulares (Figura 4B).

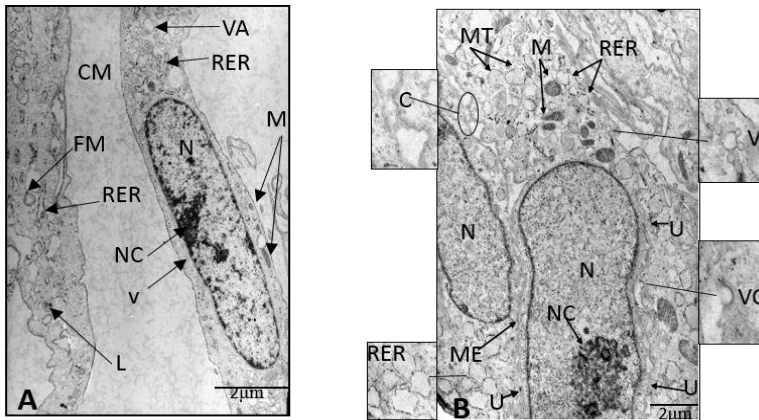


Figura 4. Cultivo en monocapa control (A) e inducidas con el medio inductor 1 Epi/Fib (B) de las células mesenquimales del tejido adiposo humano. 8 días de cultivo A. En la micrografía se observan células con morfología fusiforme. Núcleo ovalado y alargado (N), con un nucléolo cercano a la envoltura nuclear (NC). A nivel del citoplasma se aprecian algunas mitocondrias electrodensas (M), retículo endoplasmático rugoso (RER), vesículas pinocíticas (V), figuras mielínicas (FM), algunas vacuolas (VA) y lisosomas (L) 52.000X. (B) En la micrografía se observa una densidad celular mayor constituidas por dos porciones citoplasmáticas de 2 células, una de ellas presenta un núcleo prominente con invaginaciones leves en la envoltura nuclear, nucléolo, citoplasma reducido, pero se logran observar vesículas pinocíticas y ribosomas libres, además esta célula comienza a establecer contacto con la células adyacentes evidenciado por el engrosamiento de la membrana (ME) y zonas electrodensas que sugieren el establecimiento de una unión celular específica (U). En las porciones citoplasmáticas vecinas se observa gran cantidad de retículo endoplasmático rugoso, numerosas mitocondrias electrodensas (M) y electrotransparentes (MT). Así como el inicio del contacto celular (C) entre las membranas de 2 células. Además, se observan vesículas pinocíticas (V) en el espacio intercelular 66.000 X.

DISCUSIÓN

Las condiciones brindadas a las células en cultivo, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de la población de células fusiformes del tejido adiposo humano. En la etapa inicial de los cultivos primarios las células fusiformes proliferaron rápidamente en las condiciones *in vitro* suministradas siendo la morfología similar a las

observadas en los diferentes estudios que se han realizado sobre estas células (Zuk y col., 2002; Mizuno y col., 2003; Brzoska y col., 2005; Ando y col., 2008; Kiseleva y col., 2009; Loskutoff y col., 2010). Diferentes grupos de investigadores han demostrado que los métodos de cultivo de células multipotentes del tejido adiposo en presencia y ausencia del SFB, presentan diferencias importantes, ya que en medio libre de SFB se mantienen los preadipocitos y el potencial de diferenciación adipogénico. Por el contrario, ante la presencia de SFB, la cantidad de preadipocitos va disminuyendo y se pierde el potencial de diferenciación de las células que pudiesen estar comprometidas con el linaje adipogénico, permitiéndoles canalizarse hacia otros linajes celulares según el microambiente circundante (Rodríguez y col., 2004; Gomillion y col., 2006; Fuchs, 2007; Gimble y col., 2007).

En los cultivos después de varios pasajes se mantienen las células tipo fusiformes. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores (Gimble y col., 2007; Ando y col., 2008; Kiseleva y col., 2009; Vossmerbaeumer y col., 2009), quienes obtuvieron un cultivo celular compuesto por células fusiformes, las cuales expresan vimentina. Esta es una proteína que pertenece a la familia de filamentos intermedios presentes en el citoesqueleto y es altamente expresada en células de origen mesenquimal, por lo que actualmente es empleada como un marcador de las mismas e indica el origen mesodérmico de las células en los cultivos. Además, algunas células presentes en los subcultivos también expresaron CD49d (α -4 integrina). Esta molécula de adhesión celular también ha sido relacionada con las células progenitoras del tejido adiposo (Gronthos y col., 2001; Zuk y col., 2002; Pawitan, 2009; Kiseleva y col., 2009).

Estos resultados sugieren que el sistema de cultivo empleado permite obtener poblaciones de células fusiformes de origen mesodérmico con potencial de diferenciación. Se ha demostrado que la población de células con potencial de diferenciación del tejido adiposo no parece requerir de muchos factores específicos para proliferar y mantener su potencial de diferenciación (Zuk y col., 2002; Pawitan, 2009; Kiseleva y col., 2009). Sin embargo, en estudios *in vitro* se ha observado la presencia de subpoblaciones de células tipo fibroblasto que pueden variar en cuanto a potencialidad de diferenciación, tamaño y granularidad (Baer y Geiger, 2012). Igualmente, se ha señalado que la densidad del cultivo es crítica ya que puede modular los patrones de expresión de genes específicos en las poblaciones heterogéneas mesenquimales del tejido adiposo (Kim y col., 2014). Adicionalmente, estas características pueden variar de un organismo a otro (Blau y col., 2001; Nakagawa y col., 2005; Fu y col., 2006; Schneider y col., 2008). Esto agrega una variable a los cultivos, lo que resulta importante para la selección, pureza y comportamiento de las células en cultivo.

Como se ha reportado en estudios previos, las MSCs del tejido adiposo parecen tener la capacidad para diferenciarse hacia células epiteliales, esta diferenciación depende del microambiente circundante. En este

sentido, los resultados muestran la necesidad de la simulación de un microambiente similar a las condiciones *in vivo* donde proliferan y se diferencian las células epiteliales, dicho microambiente está constituido por factores solubles específicos tales como KGF, EGF, IGF, TGF- α y TGF- β , que pueden regular de forma paracrina la proliferación y diferenciación celular. Algunos autores han señalado que estas MSCs del tejido adiposo pueden inclusive transdiferenciarse y coexpresar marcadores epiteliales en la piel cuando son trasplantadas a ratones (Derby *y col.*, 2014), así como también en células epiteliales del pulmón cuando se utilizan andamios descelularizados provenientes de pulmón de rata (Méndez *y col.*, 2014).

En este trabajo al observar las características morfológicas de los cultivos en monocapa sin añadir factores al medio nutritivo se pudo apreciar que no ocurrieron cambios morfológicos y no fueron positivas a los marcadores epiteliales Pan-CK y E-cadherina. No obstante, bajo las condiciones inductoras mostraron cambios morfológicos y expresión de marcadores del linaje epitelial, donde se puede destacar que en los cultivos mantenidos con los medios condicionados algunas células cambiaron su morfología de fusiforme a poligonales y similares a cuboidales. Algunas de estas células fueron positivas a Pan-CK, pero solo una proporción de células expresaron E-cadherina bajo la inducción de la combinación de medios condicionados.

Los cambios morfológicos y la expresión de marcadores epiteliales evidenciados en los cultivos en monocapa han sido reportados por diversos autores con diversos factores inductores como HGF, IGF, KGF, EGF, BMP-7, ácido trans-retinoico, activina (Brzoska *y col.*, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Ando *y col.*, 2008, Griesche *y col.*, 2012) y con medios condicionados de fibroblastos (Huang *y col.*, 2008) y de células epiteliales (Vossmerbaumer *y col.*, 2009). Aunque en este estudio se observó cambios morfológicos y expresión de Pan-CK con el medio inductor que contenía EGF e insulina, los resultados más significativos se obtuvieron con la combinación de medios condicionados de queratinocitos y fibroblastos. Diversos autores han señalado que en dicho medio se encuentran factores solubles como: KGF, EGF, IGF, TGF- α y TGF- β (Marinero *y col.*, 1999; Lanza *y col.*, 2007; Prowse *y col.*, 2007). Estos factores solubles cumplen un rol fundamental en los eventos de proliferación y diferenciación hacia el linaje epitelial.

Diversos investigadores han señalado que la síntesis de las diferentes CK no es estimulada por todos los factores solubles involucrados en el proceso de diferenciación epitelial, pero ha sido relacionada específicamente con la activación del EGFR por los factores de crecimiento EGF y TGF- α . Otro de los factores importantes en la diferenciación epitelial presente en los medios condicionados es el TGF- β , el cual activa la síntesis de CK8, CK18 y posteriormente CK 5 y CK14 que

expresan las células poco diferenciadas del estrato basal del epitelio epidérmico. Además, el TGF- β estimula la síntesis de colágeno y fibronectina (Huang *y col.*, 2008). Estas CK5 y CK14 son las primeras que se expresan durante el desarrollo de los epitelios y posteriormente son sustituidas por las CK secundarias específicas de cada fenotipo epitelial (Brzoska *y col.*, 2005; Paunescu *y col.*, 2007; Huang *y col.*, 2008).

Por otra parte, la expresión de E-cadherina en los cultivos de MSCs de tejido adiposo humano está relacionada con el establecimiento y mantenimiento de uniones celulares que promueven la integridad celular. Como se conoce la E-cadherina es una glucoproteína transmembrana que está involucrada en el establecimiento de uniones intercelulares, la cual es específica de los epitelios y es importante para mantener la integridad de los epitelios. Esta característica es fundamental en los tejidos epiteliales (Geneser, 2003, Sueblinvong *y col.*, 2007; Schneider *y col.*, 2008). Asimismo, algunos autores han señalado que la expresión de E-cadherina está relacionada con la morfogénesis temprana epitelial (Sueblinvong *y col.*, 2007; Schneider *y col.*, 2008; Vossmerbaeumer *y col.*, 2009). Los resultados obtenidos en estos ensayos de diferenciación celular en monocapa, sugieren que en los medios condicionados se encuentran una combinación de factores solubles que generan parte del microambiente epitelial que permite canalizar de forma dinámica la diferenciación epitelial, llevando consigo cambios morfológicos, síntesis y expresión de marcadores epiteliales en una población de células fusiformes del estroma del tejido adiposo humano.

Se ha planteado recientemente que en el medio condicionado de las células mesenquimales del tejido adiposo producen un subtipo de vesículas extracelulares de alrededor de 30 a 200 nm, denominados exosomas, los cuales contiene diferentes moléculas que pueden participar en múltiples procesos biológicos, tales como proliferación, diferenciación. Se ha considerado que estos exosomas de las células mesenquimales pueden ser una plataforma con un gran potencial terapéutico en terapias libres de células para tratar diferentes patologías en la medicina regenerativa (Al-Ghadban *y col.*, 2022).

En este estudio del potencial de diferenciación de las MSCs del tejido adiposo hacia el linaje epitelial, se tomaron los resultados más resaltantes de los cultivos en monocapa para observar las diferencias a nivel ultraestructural de las células mantenidas bajo la condición control y con el medio inductor 1. Mediante este análisis ultraestructural se pudo apreciar en los cultivos control de MSCs del tejido adiposo humano, células aisladas y fusiformes donde los organelos seguían manteniendo la morfología característica de estas células. Adicionalmente se observaron algunas mitocondrias y figuras mielínicas. Estas características ultraestructurales concuerdan con las observadas en microscopía de contraste de fases.

En contraste con el control, las células cultivadas con el medio inductor tipo 1 mostraron aparentemente una mayor densidad celular y cambios a nivel ultraestructural, entre los que se destaca una mayor proporción de RER que sugiere una alta síntesis de proteínas. Adicionalmente se observaron numerosas mitocondrias de diferentes electrodensidades, lo que sugiere la coexistencia de poblaciones distintas de mitocondrias, lo cual puede estar relacionado con la alta actividad energética de las células.

Por otra parte, se evidenciaron múltiples vesículas pinocíticas en el citoplasma y una vesícula aparentemente recubierta por clatrina que pareciera hacer contacto con la membrana celular de una célula vecina. Esto evidencia una gran actividad celular donde posiblemente las proteínas sintetizadas por RER son liberados por exocitosis y mediante endocitosis son incorporadas a las células vecinas, probablemente se trata de factores solubles como factores de crecimiento, enzimas, entre otros que podrían canalizar la diferenciación de las células adyacentes. Estas moléculas solubles son denominadas morfógenos y pueden especificar la vía de diferenciación de más de un tipo celular (Scott, 2006). A nivel de la proporción de los organelos se puede decir que cualitativamente se aprecia una mayor proporción de RER, mitocondrias, vesículas y ribosomas libres en las células cultivadas en los medios condicionados que en los controles. Esto representa una diferencia entre los dos tipos de cultivo que permite sugerir que evidentemente ocurren cambios a nivel ultraestructural en las células bajo la influencia de los medios condicionados. Estas diferencias han sido reportadas en la transición mesénquima-epitelio donde ocurre un aumento gradual en la cantidad de los organelos anteriormente señalados (Ullman *y col.*, 2007; Eastham *y col.*, 2007).

Además de la actividad celular y la proporción de organelos, el aspecto más resaltante bajo esta condición fue el establecimiento de contactos con las membranas de las células adyacentes evidenciado por el engrosamiento de la membrana y la presencia de zonas electrondensas, que sugiere que se podría estar iniciando el establecimiento de uniones específicas. Esto podría estar relacionado con la síntesis de CK y E-cadherina observada en los cultivos en monocapa. Estos resultados concuerdan con los de Schneider *y col.* (2008) quienes observaron que las MSCs de la médula ósea bajo factores inductores epiteliales se conectaban entre sí mediante uniones específicas. Adicionalmente se ha reportado que la expresión de CK 8 y CK18 es paralela con la formación de uniones específicas tipo desmosoma (Huang *y col.*, 2008).

Finalmente, con base en los resultados obtenidos se ha evidenciado que las células mesenquimales del tejido adiposo pueden diferenciarse hacia células similares epiteliales, por lo tanto, podrían ser utilizadas como una fuente de células madre en la bioingeniería y terapia celular del tejido epitelial, así como en estudios de diferenciación celular.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado por el FONACIT y la Universidad Central de Venezuela.

LITERATURA CITADA

- Almaski, S.G. 2022. Adipose-derived mesenchymal stem cells and wound Healing. Potential clinical applications in wound repair. *Saudi Med J.* 43 (10): 1075-1086.
- Al-Ghadban, S., M. Artiles y B. Bunnell. 2023. Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine: Looking Forward. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:837464.doi: 10.3389/fbioe.2021.837464.
- Ando, Y., M. Inaba, Y. Sakaguchi, M. Tsuda, G.K. Quan, M. Omae, K. Okasaki y S. Ikehara. 2008. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cells facilitate colonic mucosal recovery from 2,4,6, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 14(6):826-838.
- Baer, P.C. y H. Geiger. 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal/StemCells: Tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells International* Article ID 812693, doi:10.1155/2012/812693.
- Blau, H. M., T.R. Brazelton y J.M. Wiman. 2001. The evolving concept of stem cells: Entity or function. *Cell* 105:829-841.
- Bertassoli, B. M., A. Chaves de Assis, F. Delys de Oliveira, M.A. Machado, J.S. Pires, J. Barbosa da Silva, G. Conceição, y P. Beltrão. 2013. Mesenchymal stem cells-emphasis in adipose tissue. *Brazilian Archives Biol. Technol.* 56 (4):607-617.
- Brzoska M., H. Geiger, S. Gauer y P. Baer. 2005 Epithelial differentiation of human adipose-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 330:142-150.
- Caplan, A.I. 2004. The mesengenic process. *Clin Plast Surg.* 21:429-435.
- Czerwiec, K., M. Zawrzykraj, M. Deptuła, A. Skoniecka, A. Tyminińska, J. Zieliński, A. Kosiński y M. Pikuła. 2023. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells in Basic Research and Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 24(4), 3888; <https://doi.org/10.3390/ijms24043888>.
- Derby, B., H. Dai, J. Reichensperger, L. Cox, C. Harrison, N. Cosenza, M. Yang, R.A. Bueno y M. Neumeister. 2014. Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: a mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthetic Surgery J* 34(1):142-153.
- Desmond, H. 1965. Techniques for electron microscopy. Blackwell Scientific Publications. Philadelphia, USA.
- Dominici, M., K. LeBlank, I. Mueller, I. Slaper-Conterbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
- Eastham, A., H. Spencer, F. Soncini, S. Ritson, C. Merry, P. Stern y C. Ward. 2007. Epithelial-mesenchymal transition events during embryonic stem cells differentiation. *Cancer Res* 67: 11254-11262.
- Fu, X., L. Fang, X. Li, B. Cheng, Z. Sheng. 2006. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen* 14:325-335.
- Fuchs, E. 2007. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437:275-280.

- Geneser, F. 2003. *Histología*. 3era. Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 227-230 pp.
- Gimble, J. y F. Guilak. 2003. Differentiation potential of adipose derived adult stem (ADAS) cells. *Curr Top Dev Biol* 58:137-60.
- Gimble, J., A. Katz y B. Bunnell. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249-1260.
- Gomillion, C. y K. Burg. 2006. Stem cells and adipose engineering. *Biomaterials* 27:6052-6063.
- Griesche, N., J. Bereiter-Hahn, H. Geiger, R. Schubert y P. Baer. 2012. During epithelial differentiation of human adipose-derived stromal/stem cells, expression of zonula occludens protein-1 is induced by a combination of retinoic acid, activin-A and bone morphogenetic protein-7. *Cytotherapy* 14(1):61-69.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Stroma y J. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189:54-63.
- Huang, H., Q. Gao, B. Tao y S. Jiang. 2008. Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 44:193-203.
- Jiang, Y., B. Jahagirdar, L. Reinhardt, R.E Schwartz, C. Keene, X. Ortiz-González, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, D.M. Jingbo, S. Aldrich, A. Lisberg, W. Low, D. Largaespada, y C.M. Verfaillie. 2002. Pluripotent nature of adult marrow derived mesenchymal stem cells. *Nature* 418:41-49.
- Kim, D.S., M.W. Lee, K.H. Yoo, T.H. Lee, H.J. Kim, I.K. Jang, Y.H. Chun, H.J. Kim, S.H. Park, M.H. Son, H.L. Jung, K.W. Sung y H. H. Koo. 2014. Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density. *PLoS ONE* 9(1): e83363. doi: 10.1371/journal.pone.0083363.
- Kiseleva, E., E. Chermnykh, E. Vorotelyak, A. Volozhin, A. Vasiliev y V. Terskikh. 2009. Differentiation capacity of stromal fibroblast-like cells from human bone marrow, adipose tissue, hair follicle dermal papilla and derm. *Cell Tissue Biol* 3:42-49.
- Lanza, R.P., R.S. Langer y J. Vacanti. 2007. Principles of tissue engineering. 3rd Edition. San Diego CA. Academic Press.
- Loskutoff, D. y F. Samada. 2010. The adipose and homeostatic balance in obesity: studies of PAI-1. *J American Heart Association* 18:1-6
- Marinero, J., E. Hendrich, K. Leeding y Bach, L. 1999. HaCat human keratinocytes express IGF-II, IGFBP-6 and an acid-activated protease with activity against IGFBP-6. *Am J Physiol Endocrin Metab.* 276: 536-542.
- Mendez, J., M. Ghaedi, D. Steinbacher y L. Niklason. . 2014. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Engineering Part A*. 20(11-12):1735-1746.
- Merentes, E. 2016. Manual de técnicas básicas del cultivo celular. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Mizuno, H. y H. Hyakusoku. 2003. Mesengenic potential and future clinical of human processed lipoaspirated cells. *J Nippon Med Sch* 70:300-306.
- Nakagawa, H., S. Akita, M. Fukui, T. Fujii y K. Akino. (2005) Human mesenchymal stem cells successfully improve skin substitute wound healing. *Br J Dermatol* 153:29-36.
- Orbay, H., M. Tobita y H. Mizuno. 2012. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells International*, Article ID 461718, doi:10.1155/2012/461718.

- Pawitan, J.A. 2009. Prospect of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Cell Tissue Transplantation Therapy* 2:7-9.
- Păunescu, V., E. Deak, D. Herman, I. Raluka, G. Tănăsie, C. Bunu, S. Anghel, C. Tatu, T. Oprea, R. Henschler, B. Ruster, R. Bistrián y E. Seifreid. 2007. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med* 11:502-508.
- Pittenger, M., A. Mackay, S. Beck, R. Jaiswal, R. Douglas, J. Mosca, M. Moorman, D. Simonetti, S. Craig y D. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Prowse, A., L. McQuade, K. Bryant, H. Marcal y P. Gray. 2007. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res* 6: 3796-3807.
- Raff, M. 2003. Adult stem cells plasticity: fact or artefact? *Annu Rev. Cell Dev Biol* 19:1-22.
- Rodríguez, V. (2005) Células madres: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientarum* 10:5-14.
- Rodríguez, A.M., C. Elabd, F. Delteid, J. Astier, C. Vernochet y P. Saint-Mare, 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cell established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 315:255-263.
- Schneider, R., S. Neuss, R. Stainforth, N. Laddach, M. Bovi, R. Knuechel y A. Perez-Bouza. 2008. Three dimensional epidermis-like growth of human mesenchymal stem cells on dermal equivalents: contribution to tissue organization by adaptation of myofibroblast phenotype and function. *Differentiation* 76:156-167.
- Scott, G. 2005. *Biología del Desarrollo*. 7ma edición. Edit. Medica Panamericana.
- Sueblinvong, V., R. Loi, P. Eisenhauer, I. Berstein, B. Suratt, J. Spees, D. Wiss. 2007 Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med* 177:67-100.
- Ullman, U., P. Veld, G. Gilles, M. De Rycke y H. Van de Velde. 2007. Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Mol Hum Rep.* 13:21-32.
- Vossmerbaeumer, U., S. Ohnesorge, S. Kuehl, M. Haapalahti, H. Kluter, J. Jonas, H. Thierse y K. Bieback. 2009. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 11:177-188.
- Witkowska-Zimny, M. y K. Walenko. 2011. Stem cells from adipose tissue *Cell Mol Biol Lett* 16:236-257.
- Yan, Y., X. Fang, X. Wen, B. Li, Z. Zhou, S. Peng, A. H, Arisha, W. Liu y J. Hua. 2019. Therapeutical applications of adipose derived mesenchymal stem cells on acute liver injury in canines. *Research Veterinary Science* 126: 233-239.
- Zhang, J., L. Yuzhe, Y. Chen, L. Yuan, H. Liu, J. Wang, Q. Liu y Y. Zhang, 2020. Adipose-derived stem cells: Current applications and future directions in the regeneration of multiples tissues. *Stem Cell International* ID: 8810813.
- Zuk, P., M. Zhu, P. Ashjian, D. De Ugarte, J. Huang, H. Mizuno, C. Alfonso, J. Fraser, P. Benhaim y M. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *MBC* 13 (12):4279-95.

MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO BIOSUSTRATO TRIDIMENSIONAL

Eliana Navarro¹, Elizabeth Merentes¹, María Lorena Márquez^{1} y
Enrique González-Terán²*

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ²Clínica Cristóbal Rojas. *lormarmar@gmail.com

RESUMEN

La membrana amniótica humana (MAH) está formada por una capa epitelial de células cuboidales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Se sugiere que la matriz extracelular de la MAH y sus componentes, son un candidato excelente para utilizar como sustrato nativo en la ingeniería de tejidos. En este contexto y en función de los proyectos de investigación relacionados a la bioingeniería tisular que se han venido desarrollando en el laboratorio, se diseñó un sistema de cultivo in vitro con el objetivo de evaluar el uso potencial de la MAH desnuda y comparar la población de células epiteliales de la MAH, con base en sus características morfológicas, propiedades de adhesión y expresión de algunos marcadores característicos, cuando son cultivadas sobre el estroma avascular de la MAH como biosustrato tridimensional, bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación. Las células epiteliales cultivadas sobre el estroma de la MAH en fresco y vitrificada mostraron buena adhesión y crecimiento, además expresaron marcadores típicos del fenotipo epitelial, tales como Pan-citoqueratina y E-cadherina. Estas características nos permiten validar su uso como biosustrato tridimensional para los cultivos celulares.

Palabras clave: membrana amniótica humana, criopreservación, vitrificación, biosustrato, células madre epiteliales.

Human Amniotic Membrane like Three-dimensional Biosubstrate

ABSTRACT

The human amniotic membrane (HAM) is formed by an epithelial layer of cuboidal cells, a thick basement membrane, and an avascular stroma. It is suggested that the extracellular matrix of HAM and its components are an excellent candidate for use as a native substrate in tissue engineering. In this context and based on the research projects related to tissue bioengineering that have been developed in the laboratory, an in vitro culture system was designed to evaluate the potential use of denuded MAH and compare the population of MAH epithelial cells, based on their morphological characteristics, adhesion properties and expression of some characteristic markers, when they are cultured on the avascular stroma of the HMA as a three-dimensional biosubstrate, under the influence of different cryopreservation conditions. Epithelial cells cultured on the stroma of fresh and vitrified HMA showed good adhesion and growth and also expressed typical markers of the epithelial phenotype, such as Pan-cytokeratin and E-cadherin. These characteristics allow us to validate its use as a three-dimensional biosubstrate for cell cultures.

Keywords: human amniotic membrane, cryopreservation, vitrification, biosubstrate, amniotic epithelial stem cells.

INTRODUCCIÓN

La membrana amniótica humana (MAH) es la capa más interna de la placenta y consiste en una delgada, traslúcida, elástica y semipermeable membrana fetal, que se encuentra en contacto directo con el líquido amniótico (Niknejad *y col.*, 2008). En los últimos años ha adquirido una gran importancia debido a la capacidad que tiene para reducir la inflamación, mejorar la cicatrización de heridas, y además a que funciona como un sustrato para la proliferación y diferenciación celular, ya que se ha demostrado que la matriz extracelular de la MAH produce una amplia variedad de factores de crecimiento que la hacen ideal para ser utilizado como sustrato nativo en la ingeniería de tejidos (Elkhajji *y col.*, 2022).

La membrana amniótica puede ser utilizada con su estructura íntegra, ya sea con el epitelio amniótico (MA intacta) o sin este (MA desnuda) (Niknejad *y col.*, 2008). Se ha aplicado como sustrato para la proliferación de condrocitos humanos (Díaz –Prado *y col.*, 2011) y para el cultivo de melanocitos (Redondo *y col.*, 2011), logrando ya su aplicación clínica en pacientes. También se está usando como sustrato para promover la expansión de queratinocitos en la reconstrucción de la estructura dérmica (Huang *y col.*, 2012). La MAH es una nueva fuente de obtención de células madre epiteliales y mesenquimales. Estas células madre pueden diferenciarse en queratinocitos, por lo cual se plantea su utilidad para la regeneración de la piel y su futuro potencial clínico (Lan *y col.*, 2020).

En este trabajo nos planteamos aislar células epiteliales de la membrana amniótica humana y cultivarlas sobre el estroma de la MAH desnuda con el objetivo de evaluar su uso potencial como biosustrato tridimensional que permita la adhesión y expresión de algunos marcadores característicos de las células epiteliales, así como también la proliferación celular bajo la influencia de diferentes condiciones de criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las membranas amnióticas son obtenidas de placentas humanas entre 38-40 semanas de gestación, provenientes de partos por cesáreas, de madres gestantes, a las cuales se les realiza todos los ensayos serológicos de HIV-1/2, Antígeno de superficie de la Hepatitis B, Anticuerpo del Virus de la Hepatitis C (HCV) y Sífilis (VDRL). Las placentas son suministradas por la Clínica Cristóbal Rojas a través del Dr. González Terán y del Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Caracas (HUC), bajo consentimiento informado y con la aprobación del Comité de Bioética del HUC y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

Las placentas se transportaron en envases plásticos estériles al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE, a 4 °C. En una campana de flujo laminar de seguridad biológica se separa manualmente la membrana amniótica del corion de la placenta y seguidamente se lava con Solución Buffer de Fosfato libre de calcio y magnesio (PBS), el cual contiene una mezcla de Antibióticos-Antimicótico (Penicilina, Estreptomycina, Gentamicina y Anfotericina B) al 2%. Posteriormente, se extiende sobre gasas estériles para eliminar los restos de sangre y se corta hasta obtener secciones pequeñas.

Las secciones de tejido obtenidas son incubadas sin agitación con una mezcla de la enzima Dispasa II 1.2 U/mL en base de medio F12 a 4°C durante 18 horas para posteriormente llevar a cabo la denudación de la membrana amniótica. Seguidamente, los trozos de tejido se transfieren a una placa de Petri estéril, donde son extendidos, cortados y con la ayuda de un rastrillo se obtienen las células epiteliales, las cuales son resuspendidas en PBS y se centrifugan en frío a 2446,66 g por 10 minutos. Posteriormente, las células se siembran con medio Eagle Modificado por Dulbecco-F12 en proporción 3:1 suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB), 1% de Aminoácidos no esenciales, 1% de Antibióticos -Antimicótico, 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), 2mM de L-Glutamina y 1mM de Piruvato de Sodio, en placas de cultivo las cuales están cubiertas previamente con una película de Gelatina al 1%.

Criopreservación del estroma de la membrana amniótica. Para la preservación de la membrana amniótica con glicerol se realizó la metodología propuesta por Irfan *y col.*, (2010), con algunas modificaciones. Las secciones de tejido fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en medio de congelación a 4°C, en una proporción 1:1 de DMEM: Glicerol y guardadas en el congelador a -70°C.

Para la vitrificación de la membrana amniótica se realizó la metodología propuesta por Moon *y col.* (2008), con algunas modificaciones. Las secciones de tejido fueron colocadas en tubos de centrifuga e incubadas en una solución de equilibrio, 20% Etilenglicol en PBS con 20% SFB, por 10 minutos. Posteriormente, se descartó el exceso y se incubó en Solución de vitrificación a 4°C, que contenía 40% Etilenglicol, 18% Linfoprep, 0.3M Sacarosa y 20% SFB, y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido a -180°C.

Con el fin de evaluar el efecto del procedimiento de criopreservación sobre la membrana amniótica denudada y sin denudar, las muestras fueron descongeladas en un baño de María a 37°C, se rehidrataron en solución PBS y se fijaron con formalina al 10% para luego realizar la evaluación histológica correspondiente.

Cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica. La población homogénea de células epiteliales con morfología poligonal obtenidas del cultivo primario y de los diferentes subcultivos, son utilizadas para la siembra sobre el estroma de la membrana amniótica siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: luego de realizar el conteo de las células viables se sembraron en placas de 35 mm que contienen un anillo de acero inoxidable que sostiene y delimita el área del biosustrato tridimensional para cada una de las condiciones a ensayar (Figura 1), a una densidad de 2×10^6 células/placa. Posteriormente, se incubó a 37 °C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ con cambios periódicos de medio. Transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se fijaron con formalina al 10% y finalmente se realizaron las evaluaciones histológicas correspondientes. Como control negativo se utilizó al mismo tiempo muestras de membranas amnióticas frescas recién denucladas y fijadas en formalina al 10%, que posteriormente son procesadas para su evaluación histológica.

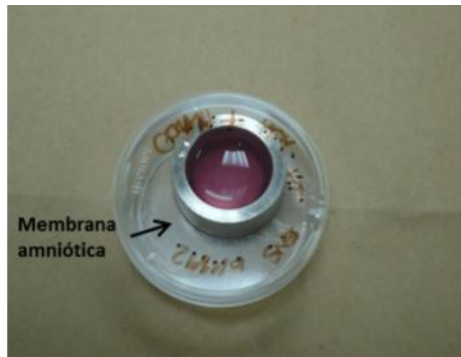


Figura 1. Sistema empleado para el cultivo de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la MAH.

Con el fin de evaluar los cambios morfológicos que ocurrieron durante el cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica, se llevan a cabo observaciones periódicas al microscopio invertido de contraste de fases, tomándose registros fotográficos digitales. Además, se realiza la caracterización histológica e inmunohistoquímica en contra de los anticuerpos Pan-CK (anticuerpo monoclonal que reconoce a la CK 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18 aislado de la A-432 carcinoma epidérmico, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology) el cual es una proteína de filamentos intermedios expresado en el citoesqueleto de las células de origen epitelial y como marcador de la morfogénesis epitelial temprana un anticuerpo contra E-cadherina (anticuerpo que reconoce los aminoácidos 600 – 707 del dominio extracelular E-cadherinas, dilución 1:100, Santa Cruz Biotechnology).

RESULTADOS

En este trabajo se ensayó el cultivo de células epiteliales amnióticas sobre el estroma amniótico avascular fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado usando como estrategia de cultivo, el cultivo tridimensional. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo ha brindado la posibilidad de simular un microambiente y un soporte estructural similar al que se encuentra en condiciones *in vivo* permitiendo examinar las características morfológicas, la proliferación e interacción intercelular de las células epiteliales amnióticas sobre el biosustrato.

Para usar el estroma de la MAH como andamio, se debe remover el epitelio de la membrana amniótica humana para esto se usó la Dispasa II, la evaluación histológica nos reveló una membrana amniótica denudada completamente libre de células epiteliales. Además, se pudo notar la presencia de una membrana basal intacta por debajo de la cual se distinguen claramente las células mesenquimales incluidas en la matriz extracelular (Figura 2). Por otra parte, la población de células epiteliales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana se sembró y se mantuvieron *in vitro* con la morfología poligonal y uniones intercelulares equivalentes al tejido nativo (Figura 3).

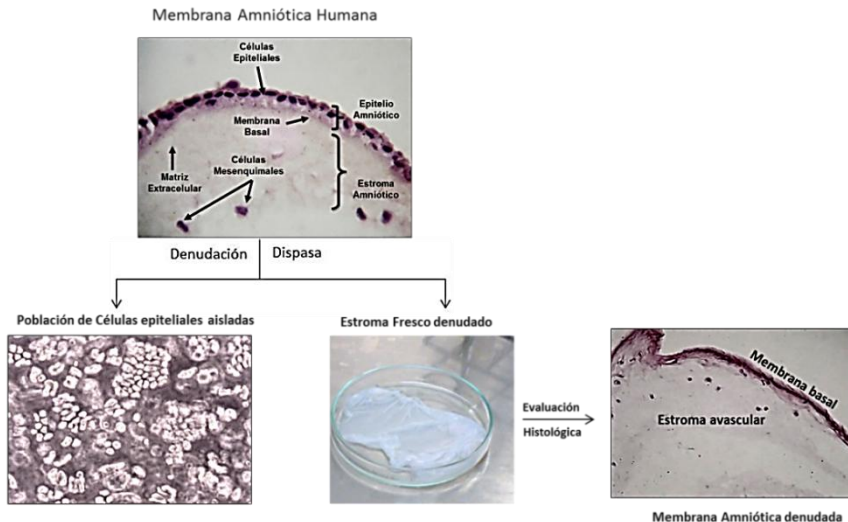


Figura 2. Denudación de la MAH con Dispasa donde se obtiene la población de células epiteliales y el estroma denudado. Evaluación histológica donde se puede apreciar el estroma avascular libre de células epiteliales y la membrana basal.

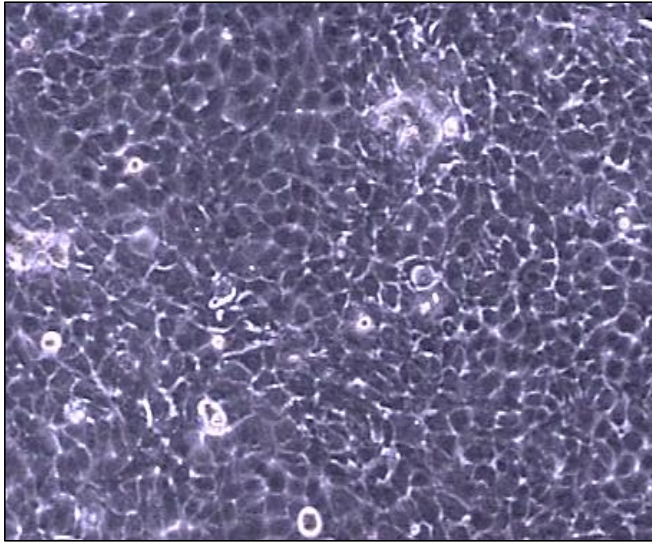


Figura 3. Monocapa de células epiteliales de la membrana amniótica con morfología poligonal. 8 días de cultivo. Contraste de fases 200X.

Los resultados de los cultivos de las células epiteliales amnióticas humanas sobre el estroma de la membrana amniótica humana variaron dependiendo de si el estroma era fresco, criopreservado con glicerol o vitrificado. En este sentido, los resultados evidenciaron que las células epiteliales amnióticas humanas, presentaron diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión y proliferación característica de las células cuando éstas son cultivadas sobre el estroma amniótico fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado. Con respecto a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco (sin criopreservación), se observa una buena adhesión de las células epiteliales sobre dicha capa estromal. A medida que transcurrieron los días, se formó una monocapa (Figura 4A), al realizar los estudios histológicos se pudo apreciar una excelente integración con el tejido, manteniendo la morfología y estructura típica de células epiteliales e incluso mostraron una estrecha unión intercelular, semejante a un epitelio simple cúbico (Figura 4B)

En cuanto a los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada, se pudo distinguir un comportamiento similar a lo observado en los cultivos sobre la membrana amniótica en fresco; es decir, un gran número de células epiteliales adheridas al biosustrato tridimensional vitrificado, las cuales proliferaron rápidamente a medida que transcurrieron los días de cultivo hasta formar una monocapa (Figura 4C). Sin embargo, al observar las

características de estas células epiteliales sobre el estroma vitrificado se pudo evidenciar un tapizado simple de células donde hubo una buena adhesión, pero discontinuo en algunas zonas (Figura 4D).

En contraste a lo observado anteriormente, las células epiteliales amnióticas mostraron una baja adhesión y proliferación de las células epiteliales al sustrato criopreservado cuando fueron cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservada con glicerol, (Figura 4E). Luego de 17 días de cultivo, en las evaluaciones histológicas correspondientes se pudo observar poca interacción entre las células epiteliales y el tejido criopreservado (Figura 4F).

Con base en los resultados anteriores, donde las células del cultivo primario cultivadas sobre la membrana amniótica vitrificada tienen una buena adhesión y proliferación, se decidió evaluar el comportamiento de las células epiteliales que han sido subcultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada. En este sentido, se pudo observar al microscopio de contraste de fases un gran número de células epiteliales amnióticas adheridas al sustrato vitrificado, las cuales proliferaron rápidamente formando una monocapa (Figura 4G). Esto fue corroborado a nivel histológico donde se visualiza la formación de una capa continua y simple de células epiteliales con morfología cuboidal, adheridas al estroma de la membrana amniótica vitrificada, indicando una buena integración de estas células con el tejido vitrificado (Figura 4H).

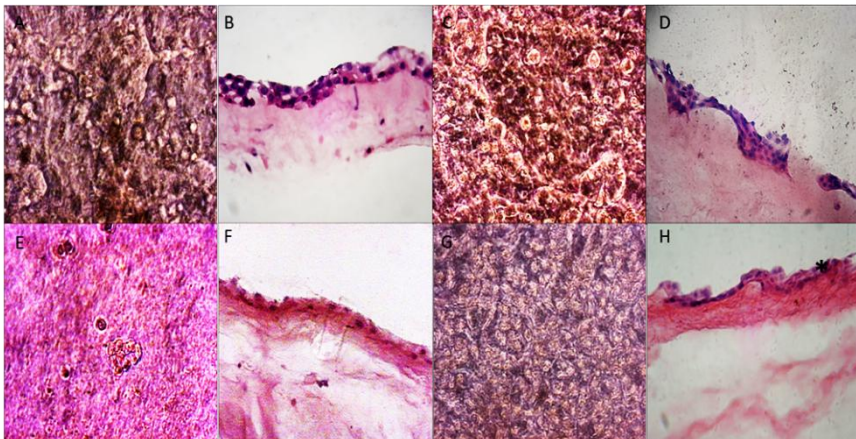


Figura 4. Evaluación morfológica de las CEMAH cultivadas sobre EMAH A-F.- Cultivo primario. A y B.- EMAH fresco. (A) 10 días de cultivo. Contraste de fases 200X. (B) Sección histológica, 17 días de cultivo. Coloración Hematoxilina-Eosina (H/E) 250X. C y D.- EMAH vitrificado. (C) 10 días de cultivo. Contraste de fases 200X. (D) Sección histológica, 14 días de cultivo. Coloración H/E 250X. E y F. EMAH criopreservado. (E) 11 días de cultivo. CF 200X. (F) Sección histológica, 17 días de cultivo. Coloración H/E 200X. G-H. 1er Subcultivo de CEMAH sobre EMAH vitrificado. (G) 5 días de cultivo. CF 100X. (H) Capa simple de células epiteliales(*) 7 días de cultivo. Coloración H/E 250X.

Por otro lado, también se caracterizó inmunohistoquímicamente las células epiteliales en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sembradas sobre el estroma de la membrana como biosustrato tridimensional, determinando así la presencia de Pan-CK y E-cadherina (Figura 5) marcadores característicos del fenotipo epitelial.

Se pudo observar una expresión positiva moderadamente intensa para Pan-CK de las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma amniótico fresco (Figura 5A) y vitrificado (Figura 5B). En cuanto a la expresión de E-cadherina, se aprecia claramente en algunas regiones la expresión de esta proteína en las uniones que se observan entre célula – célula de las células epiteliales amnióticas cultivadas tanto en la membrana amniótica fresca (Figura 5C) como en la vitrificada (Figura 5D).

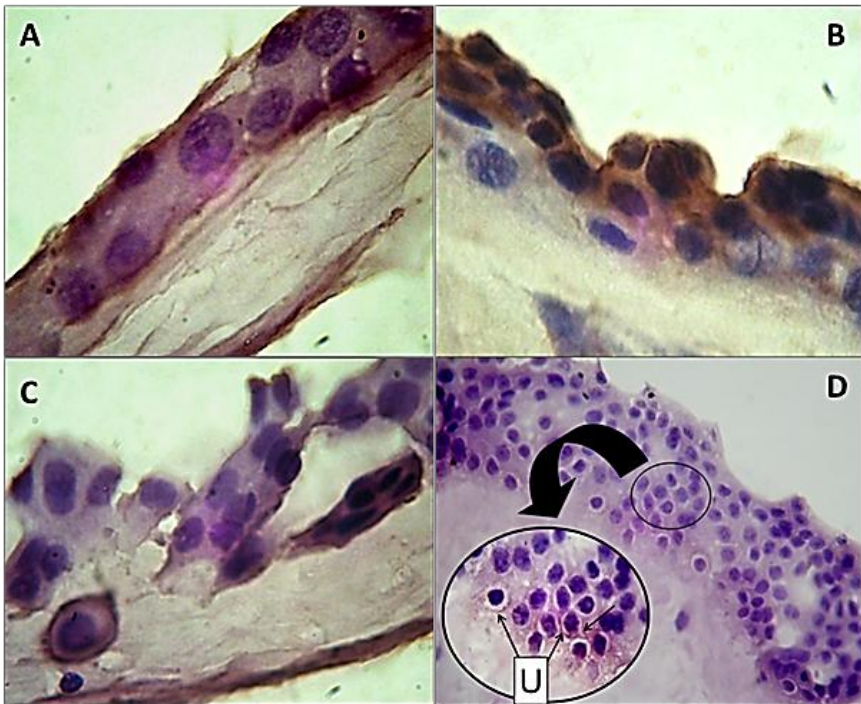


Figura 5. Secciones histológicas de los cultivos de las CEMAH sobre el EMAH. Determinación inmunohistoquímica. A y B.- Pan-CK. (A) EMAH fresca. 10 días de cultivo 1000X. (B) EMAH vitrificado. 10 días de cultivo 1000X. C y D. E-cadherina. (C) EMAH fresca. 10 días de cultivo 1000X. (D) EMAH vitrificado. Células que expresan E-cadherina en las uniones intercelulares (U) se puede ver claramente en la demarcada en el círculo.10 días de cultivo 1000X.

DISCUSIÓN

Actualmente, las células presentes en la membrana amniótica humana son de gran interés ya que se consideran una fuente alternativa de células madre con propiedades de autorenovación y diferenciación para ser empleadas en la Medicina Regenerativa. (Hu *y col.*, 2023). Además, el estroma de la MAH por sus características biológicas puede ser un elemento clave en la bioingeniería de tejidos, un andamio biocompatible natural donde las células puedan adherirse, promoviendo así la migración, la proliferación y diferenciación celular que van a permitir la formación de un nuevo tejido *in vitro*. (Fenelon *y col.*, 2021).

En este trabajo primero se aislaron y establecieron los cultivos de células epiteliales de la membrana amniótica humana y posteriormente se determinó el potencial que posee el estroma avascular de la membrana amniótica para ser usado como biosustrato tridimensional en los cultivos de las células epiteliales amnióticas.

Para usar el estroma de la MAH como andamio, se debe remover el epitelio de la membrana amniótica para esto se usó la Dispasa II, a nivel histológico se pudo evidenciar una remoción completa de las células epiteliales de la membrana amniótica demostrando que la denudación con esta enzima es eficaz ya que rompe las uniones proteicas que existen entre las células epiteliales lo que concuerda con lo reportado por Koizumi *y col.* (2000), ésto sin alterar la membrana basal y el estroma avascular como se ha señalado en estudios similares realizados por varios autores (Ti *y col.*, 2002; Yam *y col.*, 2002; Ohno-Matsui *y col.*, 2005). De la misma forma, en trabajos realizados con otros tipos de tejidos se ha encontrado que tras el tratamiento con Dispasa II se obtienen excelentes resultados en la separación de la epidermis de la dermis (Bello *y col.*, 1998, Merentes, 2016), así como en la remoción de la mucosa nasal (Rodríguez *y col.*, 2001), de la córnea y el limbo (Gipson y Grill, 1982; Geggel y Gipson, 1989; Espana *y col.*, 2003).

A diferencia del EDTA, la Dispasa actúa enzimáticamente a nivel de las uniones tipo hemidesmosomas que se encuentran en la membrana basal por acción proteolítica. Se ha demostrado que esta proteasa neutral obtenida del *Bacillus polymyxa*, tiene una alta especificidad para la fibronectina y el colágeno IV, lo que la hace particularmente adecuada para separar fácilmente el epitelio del tejido conectivo circundante, además permite mantener viables las células epiteliales disgregadas debido a la baja toxicidad de la Dispasa como se ha demostrado en trabajos realizados por Romero *y col.* (1995) y Merentes (2016).

Con el fin de evaluar el efecto de la criopreservación se comparó la acción del glicerol y la vitrificación sobre la membrana amniótica humana completa y denudada con Dispasa. En los resultados se pudo evidenciar

pequeñas diferencias en cuanto a la morfología de las células que componen la capa epitelial y el estroma avascular de la membrana amniótica humana para ambos métodos de criopreservación al comparar estas con las células que conforman la membrana amniótica humana fresca.

Al observar los resultados obtenidos tras el tratamiento de la membrana amniótica humana completa con el glicerol, se puede apreciar que luego de 10 días de haber sido almacenada a -70°C ocurre una pérdida de volumen en los núcleos de las células epiteliales las cuales se evidenciaron picnóticas como ha sido reportada en estudios realizados por Heng (2009) con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea las cuales fueron criopreservadas con glicerol. Se ha encontrado que luego de la criopreservación con glicerol las células epiteliales amnióticas y las células mesenquimales estromales presentan síntomas de daño y no son capaces de mostrar signos de viabilidad, ya sea con algún colorante o en cultivos *in vitro* (Kruse *y col.*, 2000), posiblemente este fenómeno de reducción en el tamaño de los núcleos que se observa en las células epiteliales se deba a este proceso de pérdida de la viabilidad que se ha reportado en trabajos previos. Por su parte, al observar los resultados obtenidos para la criopreservación del estroma de la membrana amniótica humana con glicerol se pudo observar una ausencia total de las células mesenquimales del estroma y alteraciones en la composición de la matriz extracelular que se evidencia por una leve basofilia del estroma avascular en comparación con el estroma de la membrana amniótica vitrificada, lo que no se corresponde con estudios realizados por varios autores (Irfan *y col.*, 2010, Wagner *y col.*, 2018).

Se ha señalado que la membrana amniótica humana acelular puede representar una alternativa más apropiada y biocompatible para su aplicación en la medicina regenerativa más que la membrana intacta, ya que la descelularización estimula la adhesión y proliferación (Hu *y col.*, 2023). Además, previene una respuesta inmunogénica después del trasplante (Leal Marín *y col.*, 2020).

Diferentes investigadores han realizado una serie de determinaciones inmunocitoquímicas con el fin de evaluar la presencia de colágeno (tipo I, III, IV y V) y fibronectina en la membrana amniótica humana luego de ser criopreservada con glicerol, encontrando que si hay expresión positiva hacia los colágenos y la fibronectina en la membrana amniótica criopreservada indicando que este método permite mantener la matriz extracelular luego de la criopreservación (Malak *y col.*, 1999; Fukuda *y col.*, 1999). Debido a las diferencias observadas en la composición del estroma de la membrana amniótica, luego de la criopreservación sería necesario realizar otro tipo de estudios para determinar si bajo nuestras condiciones es posible mantener cada uno de los componentes que conforman la matriz extracelular.

Con respecto a los resultados obtenidos para el método de criopreservación por vitrificación, tanto de la membrana amniótica completa como del estroma de la membrana amniótica humana, se pudo evidenciar que luego de 10 días de almacenamiento a -120°C es posible conservar la membrana amniótica y el estroma sin presentar alguna alteración en las características morfológicas típicas de la membrana basal y el estroma avascular de la membrana, demostrando que la vitrificación es un método eficaz que permite preservar la membrana amniótica humana y el estroma amniótico como en el tejido fresco, sin alterar la integridad del tejido como se ha demostrado en los estudios realizados con células mesenquimales derivadas de la membrana amniótica humana (Moon *y col.*, 2008), de la médula ósea (Bahadori *y col.*, 2009), en ovocitos y embriones humanos (Cho *y col.*, 2001; Kalliopi *y col.*, 2008, Dey, 2016). Al observar los resultados obtenidos para la vitrificación de la membrana amniótica completa se apreció una leve reducción en el tamaño de los núcleos que conforman las células de la capa epitelial, sin embargo está pérdida de volumen ocurre en menor proporción en comparación con las células epiteliales amnióticas que se encuentran en la membrana amniótica criopreservada con glicerol donde es mucho más evidente y en donde además la coloración es intensamente basófila, lo que concuerda con estudios realizados por Bahadori *y col.* (2009), quienes demostraron que por el método de vitrificación es posible obtener una mayor viabilidad celular en comparación con los métodos tradicionales de congelamiento lento, similar a lo obtenido por Kalliopi *y col.* (2008) tras comparar la criopreservación de embriones por glicerol y vitrificación.

En nuestro laboratorio utilizando células madre mesenquimales provenientes del cordón umbilical humano (CMCUH) criopreservadas por vitrificación y descongeladas por un período de 4- 16 semanas, se pudo evidenciar que las células mantuvieron sus características morfológicas, capacidad de adherencia y proliferación, así como también su potencialidad de diferenciación neurogénica. Con base en estos resultados se pudo plantear que la criopreservación por vitrificación es un método eficaz ya que permite que las CMCUH conserven su identidad morfológica y su potencialidad de diferenciación neurogénica después de la congelación (Sánchez, 2018).

En este estudio, se estableció un protocolo de vitrificación donde se empleó el etilenglicol como crioprotector, el cual es muy utilizado para la vitrificación de embriones de ratones (Kasai *y col.*, 2004), blastocistos humanos (Cho *y col.*, 2001) y de células madre embrionarias (Nie *y col.*, 2009) concordando nuestros resultados con los obtenidos por Gajada *y col.* (2007), encontrando que el etilenglicol es mucho menos tóxico para la vitrificación en comparación con otros crioprotectores. Además del etilenglicol, la solución de vitrificación también emplea aditivos con altos pesos moleculares, tales como la sacarosa, los cuales pueden reducir significativamente la toxicidad por disminución de la concentración de agentes permeables necesarios para la solución de vitrificación, y agentes

como el Ficoll o en nuestro caso el Linfoprep, el cual es una macromolécula que promueve la penetración del crioprotector, y que se ha demostrado tiene varias ventajas en cuanto a toxicidad, mayor solubilidad y menor viscosidad (Kasai *y col.*, 2004). Al igual que el etilenglicol se ha encontrado que el glicerol tiene baja toxicidad para la mayoría de las células, sin embargo, el principal inconveniente con este crioprotector es que penetra lentamente en las células a diferencia del etilenglicol (Gil-Loyzaga, 2011).

Se ha señalado que durante el almacenamiento a temperaturas muy bajas (-130°C) los procesos biológicos se detienen y no hay deterioro de las muestras. El daño potencial de la criopreservación tiene lugar durante los procesos de congelación y descongelación. Cuando las células se congelan a 0°C la presencia de solutos impide la formación de hielo, pero si la congelación continúa (-5°C a -15°C) comienza la formación de hielo, preferentemente en el espacio extracelular. La formación del hielo extracelular da lugar a cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula, dando como resultado la salida de agua de la célula. El daño resultante va a depender de la velocidad de descongelación. Si las células se congelan lentamente continúa saliendo agua de la célula y los cristales de hielo crecen, las células se contraen y el contenido celular se concentra como se observa en los resultados obtenidos para la evaluación de la criopreservación con glicerol de la membrana amniótica completa. El incremento de la concentración de solutos dentro de las células puede llegar a niveles tóxicos y es una de las causas más importantes de muerte celular (Rota *y col.*, 2005). La formación de hielo extracelular no es excesivamente peligrosa en el caso de las células en suspensión, pero puede dañar tejidos y órganos, en los cuales el mantenimiento de la arquitectura extracelular es crucial. Cuando la congelación es rápida, las células no son capaces de depender del agua para mantener el equilibrio, sufren un super - enfriamiento y eventualmente, alcanzan el equilibrio por congelación intracelular lo que puede inducir el daño celular (Gil-Loyzaga, 2011). Sin embargo, se ha demostrado que cuanto más rápida es la velocidad de congelación, más pequeños son los cristales, así si el enfriamiento es suficientemente rápido, los cristales que se forman son muy pequeños y las células toleran mejor su presencia aumentando la viabilidad como se observa en los resultados obtenidos para la vitrificación de la membrana amniótica completa y el estroma de la membrana.

En ambos métodos de criopreservación es posible mantener una membrana basal continua pero solo por medio de la vitrificación es posible obtener un estroma avascular intacto, indicando que el método de criopreservación por vitrificación permite preservar mejor la membrana amniótica desnuda en comparación con la criopreservación con glicerol. Sin embargo, se ha señalado que para la aplicación de la membrana amniótica y del estroma de la membrana amniótica humana como biosustrato y en terapia el requisito primordial es la conservación de la membrana basal y la matriz extracelular mas no de las células epiteliales y/o células mesenquimales estromales (Niknejad *y col.*, 2008; Muiños, 2010).

Con el fin de analizar la capacidad del estroma de la membrana amniótica humana como biosustrato se ensayó el cultivo de células epiteliales amnióticas sobre el estroma avascular fresco, criopreservado por glicerol y vitrificado usando como estrategia de cultivo, el cultivo tridimensional. Particularmente, el uso de este modelo de cultivo, ha brindado la posibilidad de simular un microambiente y un soporte estructural similar al que se encuentra en condiciones *in vivo* permitiendo examinar las características morfológicas, la proliferación e interacción intercelular de las células epiteliales amnióticas cuando son cultivadas sobre un biosustrato tridimensional derivado de la membrana amniótica humana. En este sentido los resultados evidenciaron que el patrón de adhesión de las células epiteliales amnióticas humanas, presentó diferencias en cuanto a la capacidad de adhesión y proliferación característica de las células cuando éstas son cultivadas sobre el estroma amniótico fresco, criopreservado con glicerol y vitrificado.

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar en la evaluación histológica realizada a la membrana amniótica humana recién denudada con la enzima Dispasa II (control negativo), la ausencia de la capa epitelial amniótica indicando que la denudación fue completa y exitosa, y que al momento de realizar el cultivo de las células epiteliales sobre el estroma de la membrana amniótica no había restos de células epiteliales amnióticas sobre este. Además, nos permitió evidenciar la presencia de una membrana basal intacta formando un plano por debajo del cual se distinguen las células mesenquimales incluidas en la matriz extracelular.

Con respecto a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco (sin criopreservación), se pudo apreciar una buena adhesión por parte de las células epiteliales sobre dicha capa estromal, las cuales formaron una monocapa donde se evidenciaron una gran cantidad de células con morfología similar a poligonal organizadas unas al lado de las otras e integradas con el tejido formando un epitelio similar a un epitelio simple que resultaron positivo a la expresión de Pan-CK y E-cadherina, encontrando que las características histológicas de estas células fue similar a las observadas en la membrana amniótica humana completa (Niknejad *y col.*, 2008; Ilancheran *y col.*, 2009; Dobrova *y col.*, 2010; Díaz-Prado *y col.*, 2011). Además, la membrana amniótica humana en fresco provee un microambiente favorable que permite la proliferación y el mantenimiento *in vitro* del fenotipo de las células como se ha encontrado en el trabajo realizado por Yang *y col.* (2006), quienes demostraron que el amnios denudado sirve como sustrato para la construcción de una equivalente de piel humana al cultivar queratinocitos sobre la membrana amniótica denudada.

Por su parte, en los cultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana amniótica vitrificada se observaron células epiteliales adheridas sobre el biosustrato vitrificado y una alta proliferación de las células que fue corroborado por la evaluación

histológica, donde se evidenció una capa epitelial formada por células con morfología poligonal dispuestas a lo largo de la membrana basal con una organización similar a la observada en los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma amniótico fresco, las cuales fueron positivas contra Pan-CK y E-cadherina. Estudios recientes han demostrado que las células madre limbales pueden proliferar rápidamente y formar un epitelio normal sobre la membrana amniótica humana desnuda y vitrificada (Baharvand *y col.*, 2007; Rendal *y col.*, 2012). De igual manera, al realizar los subcultivos de las células epiteliales amnióticas sobre el estroma de la membrana vitrificada se obtuvo la formación de una capa epitelial simple con células poligonales adheridas al estroma e integradas al tejido como habría de esperarse de acuerdo a lo expuesto anteriormente demostrándose que la membrana amniótica humana vitrificada sirve de sustrato para amplificar los cultivos de las células epiteliales amnióticas similar a lo obtenido en cultivos de las células epiteliales del limbo (Meller *y col.*, 2000).

En contraste, al observar los resultados para las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica criopreservado con glicerol, se pudo apreciar baja adhesión de las células epiteliales al estroma amniótico y algunos grupos de células bajo las condiciones de conservación suministradas al estroma. Así mismo, al realizar el análisis histológico se evidenciaron células con morfología poligonal adheridas al estroma criopreservado lo que no concuerda con lo reportado por varios autores al cultivar células epiteliales limbicas (Koizumi *y col.*, 2000; Baharvand *y col.*, 2007), endoteliales de la córnea (Ishino *y col.*, 2004) y melanocitos (Redondo *y col.*, 2011) sobre la membrana amniótica humana desnuda y criopreservada con glicerol. Además, se pudo observar que la tasa de adhesión entre los diferentes cultivos presentó un patrón de diferencia, encontrándose una baja tasa de adhesión al cultivar células epiteliales amnióticas sobre el estroma criopreservado con glicerol en comparación a lo encontrado en los cultivos de las células epiteliales sobre el estroma fresco y vitrificado, donde se obtuvo una alta adhesión y proliferación de las células desde el primer día de cultivo. Estas diferencias en el patrón de adhesión podrían explicarse por las propiedades que presentan los sustratos luego de su criopreservación y además a las interacciones resultantes entre las células y la matriz extracelular (Jin *y col.*, 2007).

Las células epiteliales obtenidas a partir de la membrana amniótica humana mantuvieron la característica morfológica poligonal y aparentes uniones intercelulares que expresan en el tejido nativo. Esto se debe a la simulación de un microambiente constituido por un medio apropiado (DMEM/F12, 15% SFB, EGF) y un biosustrato rico en colágeno y fibronectina, el cual favorece el cultivo de las células epiteliales. Además, se ha señalado que el EGF mantiene y estimula el crecimiento de las células epiteliales manteniéndose las uniones intercelulares y la interacción con la membrana basal.

Como se ha mencionado anteriormente, se han empleado una serie de anticuerpos monoclonales que permiten reconocer específicamente a las células epiteliales. De esta forma en diversos estudios se han utilizado Pan-CK y E-cadherinas. En este trabajo, los resultados obtenidos para las determinaciones inmunocitoquímicas realizadas a las células epiteliales amnióticas cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica humana en fresco y vitrificada mostraron una expresión positiva y una amplia distribución de estos marcadores en las células presentes en la capa epitelial de la membrana amniótica, alrededor del núcleo y en las uniones intercelulares, indicando que las células presentes en el nuevo epitelio formado era de naturaleza epitelial, lo que concuerda con los diferentes estudios que se han realizado sobre estas células epiteliales amnióticas (Regauer *y col.*, 1985; Miki *y col.*, 2005; Ilancheran *y col.*, 2009; Diaz-Prado *y col.*, 2010a; Niknejad *y col.*, 2010; Manuelpillai *y col.*, 2011) y con células epiteliales del iris cultivadas sobre la membrana amniótica desnuda y criopreservada en glicerol (Ohno-Matsui *y col.*, 2006).

El hecho de que las células epiteliales cultivadas sobre el estroma de la membrana amniótica en fresco y vitrificada tenga una buena adhesión, crecimiento, además del mantenimiento de la morfología epitelial expresando los marcadores Pan-CK y E-cadherina nos permite validar su uso como biosustrato tridimensional para los cultivos celulares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) No. 2012000813, y el Proyecto de Grupo CDCH PG-03-8310/2011/1.

LITERATURA CITADA

- Bahadori, M., B. Soltani, E. Mirzajani, P. Babaei, M. Masou, M. Jalali. 2009. Cryopreservations of rat bone marrow derive mesenchymal stem cells by two conventional and open-pulled straw vitrification methods. *Yakhteh Medical Journal*. 11(3): 317 – 326.
- Baharvand, H., M. Heidari, M. Ebrahimi, T. Valadbeigi y G. Salekdeh. 2007. Proteomic analysis of epithelium-denuded human amniotic membrane as a limbal stem cell niche. *Mol. Vis.* 13: 1711 – 1721.
- Bello, G., E. Merentes y F. Arvelo. 1998. Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*, *Gaceta Médica* 106 (4): 491- 495.
- Cho, H., W. Son, S. Yoon, S. Lee, J. Lim. 2001. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.* 17: 2419 – 2422.
- Dey A. 2016. Cryopreservation. *RRJVS* 2:2429.

- Díaz-Prado, S., M. Rendal, E. Muiños, T. Hermida y M. Rodríguez. 2010. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair. *Cell Tissue Bank*. 11(2): 183 – 195.
- Díaz-Prado, S., E. Muiños, T. Hermida-Gómez, C. Cicione, M. Rendal, I. Fuentes, F. De Toro y F.J. Blanco. 2011. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*. 1: 162 – 171.
- Dobrevá, M., P. Pereira, J. Deprest y A. Zwijsen. 2010. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int. J. Dev. Biol*. 54: 761 – 777.
- Elkhenany, H., A. El-Derby, M. Abd Elkodous y col. 2022. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. *Stem Cell Res Ther* 13, 8 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02684-0>.
- Espana, E., A. Romano, T. Kawakita, M. Di Pascuale, R. Smiddy y N. Tseng. 2003. Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44: 4275 – 4281.
- Fênelon, M., S. Catros, C. Meyer, J.C. Fricain, L. Obert, F. Auber, A. Louvrier y F. Gindraux. 2021. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes* (Basel). May 25;11(6):387. doi: 10.3390/membranes11060387. PMID: 34070582; PMCID: PMC8227127.
- Fukuda, K., T. Chikama, M. Nakamura, T. Nishida. 1999. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva. *Cornea*. 18 (1): 73 – 79.
- Gajada, B., L. Katska-Ksiazkiewicz, B. Rynska, M. Bochenek, Z. Smorag. 2007. Survival of bovine fibroblasts and cumulus cells after vitrification. *Cryo. Letters*. 23(2): 271 – 279.
- Geggel, H., I. Gipson. 1985. Removal of viable sheets of conjunctival epithelium with dispase II. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci*. 26: 15 – 22.
- Gil-Loyzaga, P. 2011. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en medicina regenerativa. Editorial Visión Libros. Primera Edición. Madrid, España.
- Gibson, I., S. Grill. 1982. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 23: 269 – 273.
- Heng, B. 2009. Effector rho-associated kinase (rock) inhibitor y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell*. 41(5): 376 – 380.
- Hu, Z., Y. Luo, R. Ni, Y. Hu, F. Yang, T. Du y Y. Zhu. 2023. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. *Mater Today Bio*. 1;22:100790. doi: 10.1016/j.mtbio.2023.100790. PMID: 37711653; PMCID: PMC10498009.
- Huang, G., S. Ji, P. Luo, H. Liu, S. Zhu, G. Wang, P. Zhou, S. Xiao y Z. Xia. 2012. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane. *Cell Transplant*. 22: 1831-1844.
- Ilancheran, S., Y. Moodley y U. Manuelpillai. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*. 30: 2 – 10.
- Irfan, Z., A. Fareeha y A. Wajid. 2010. Technique for processing and preservation of human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *World Acad Sci. Engineering and Technology*. 69: 763 – 766.
- Ishino, Y., Y. Sano, T. Nakamura, C. Connon, H. Rigby, N. Fullwood, S. Kinoshita. 2004. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 45(3): 800 – 806.

- Jin, C., S. Park, B. Choi, K. Lee, C. Kang, B. Min. 2007. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue Eng.* 13: 693 – 702.
- Kalliopi, L., E. Kolibianakis, C. Venetis. 2008. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 90: 186 – 193.
- Kasai, M., T. Mukaida. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod. Biomed.* 9:164 – 170.
- Koizumi, N., T. Inatomi, A. Quantock, N. Fullwood, A. Dota, S. Kinoshira. 2000. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea.* 19: 65 – 71.
- Kruse, F., A. Jousen, K. Rohrschneider. 2000. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Arch. Cli. Exp. Ophthalmol.* 238: 68 – 75.
- Lan D., P. Binh, N. Giang y col. 2020. Isolation and Differentiation of Amniotic Membrane Stem Cells Into Keratinocytes. *Cell Transplantation.* 2020;29. doi:10.1177/0963689720964381.
- Leal-Marin, S., T. Kern, N. Hofmann, O. Pogozhykh, C. Framme, M. Börgel, C. Figueiredo, B. Glasmacher y O. Gryshkov. 2021. Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 109(8):1198-1215. doi: 10.1002/jbm.b.34782. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33319484.
- Malak, T., C. Ockleford, S. Bell, R. Dalgleish, N. Bright y J. Macvicar. 1999. Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta* 14:385-406.
- Manuelpillai, U., Y. Moodley, C. Borlongan y O. Parolini. 2011. Amniotic membrane and amniotic cells: potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis. *Placenta* 32: s320 – s325.
- Meller, D., R. Pires, R. Mack, F. Figueiredo, A. Heiligenhaus, W. Park, P. Prabhasawat y col. 2000. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology.* 107: 980 - 989.
- Merentes, E. 2016. Manual de técnicas básicas del cultivo celular. Ediciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Miki, T., T. Lehmann, H. Cai, D. Stolz y S. Strom. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 23: 1549 – 1559.
- Moon, J., J. Lee, B. Jee, Ch. Suh, S. Kim, H. Lim y H. Kim. 2008. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.* 23(8): 1760 –1770.
- Muñoz, E. 2010. La membrana amniótica humana: caracterización de las células madre y su aplicación en terapia celular para reparar lesiones de cartilago articular humano. Tesis Doctoral. Universidad De Coruña, España.
- Nie, Y., V. Bergendahi, D. Hei, J. Jones, S. Palecek. 2009. Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol. Prog.* 25(1): 20 – 31.
- Niknejad, H., H. Peirovi, M. Jorjani, A. Ahmadiani, J. Ghanavi y A. Seifalian. 2008. Properties of amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cells Mater.* 15: 88 – 99.
- Niknejad, H., H. Peirovi, A. Ahmadiani, J. Ghanavi y M. Jorjani. 2010. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur. Cells Mater.* 19: 22 – 29.

- Ohno-Matsui, K., K. Mori, A. Ichinose, T. Sato, J. Wang, N. Shimada, A. Kojima y col. 2006. In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol. Vis.* 12: 1022 – 1032.
- Redondo, P., A. Giménez, L. Marques, M. García-Guzmán, E. Andreu y F. Prosper. 2011. Amniotic membrane as a scaffold for melanocyte transplantation in patients with stable vitiligo. *Dermatology Res. Practice*. Article ID 532139, DOI: 10.1155/2011/532139.
- Regauer, S., W. Franke, I. Virtanen. 1985. Intermediate filament cytoskeleton of amnion epithelium and cultured amnion epithelial cells: expression of epidermal cytokeratins in cells of a simple epithelium. *J. Cell Biol.* 100: 997 – 1009.
- Rendal, M., A. San Luis, M. Pimentel, I. López, N. Domenech, C. Andión y F. Blanco. 2012. Culture of limbal stem cells on human amniotic membrane. *Cell Tissue Bank.* 13: 513-9.
- Rodríguez, J., L. Romero, E. Merentes, F. Arvelo, J. Hernández, C. Hernández. 2001. Efecto citotóxico de la cocaína en cultivo primario de células del epitelio nasal respiratorio. *Rev. Toxicol.* 18(3): 150 – 151.
- Romero, L., E. Merentes, G. Quijada, F. Arvelo. 1995. Utilización de la lectina griffonia simplicifolia (gsII) como marcador de diferenciación *in vitro* de la mucosa gástrica de ratones. *Acta Científica Venezolana.* 46(1): 27.
- Rota, A., Ch. Milani, G. Cabianca, M. Martini. 2005. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology.* 65: 1848 – 1858.
- Sánchez, A. 2018. Caracterización y potencialidad de diferenciación neurogénica de células madre del cordón umbilical humano criopreservadas por vitrificación. Trabajo especial de grado de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Ti, S., D. Anderson, A. Touhami, C. Kim, S. Tseng. 2002. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 2584 – 2592.
- Wagner, M., P. Walter, S. Salla, S. Johnen, N. Plange, S. Rütten, T.W. Goecke y M. Fuest. 2018. Cryopreservation of amniotic membrane with and without glycerol additive. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 256(6):1117-1126. doi: 10.1007/s00417-018-3973-1. Epub 2018 Apr 5. PMID: 29623460.
- Yang, L., Y. Shirakata, M. Shudou, X. Dai, S. Tokumaru, S. Hirakawa, K. Sayama y col. 2006. New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell. Tissue. Res.* 326: 69 - 77.
- Yam, H., C. Pang, D. Fan, B. Fan, E. Yu, D. Lam. 2002. Growth factor changes in *ex vivo* expansion of human limbal epithelial cells on human amniotic membrane. *Cornea.* 21: 101 – 105.

CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO DE RATÓN

Lorena Colmenares*, Elizabeth Merentes y
María Lorena Márquez

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores. Instituto de Biología
Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

*lorenacolmenam@gmail.com

RESUMEN

El desarrollo de sistemas *in vitro* permite dilucidar parte de los mecanismos de la espermatogénesis que son difíciles de abordar en el organismo. En este contexto, nos planteamos caracterizar cultivos primarios de células madre aisladas del tejido del testículo de ratón recién destetado. Los cultivos obtenidos mostraron una población heterogénea formada por diferentes tipos celulares. Por medio de técnicas histoquímicas, se pudo evidenciar la presencia de células madre de la línea germinal; tipo espermatogonias (SSCs) y espermatocitos, así como también células somáticas; células mioideas peritubulares y las células de Sertoli, estas últimas parecen ser cruciales para el mantenimiento de las SSC *in vitro*, debido a la influencia de diversos factores segregados por ella, que estimulan la proliferación celular. Es importante destacar que bajo las condiciones suministradas *in vitro* se pudo observar, además, células similares a espermátidas lo que pudiera sugerir una diferenciación espontánea a partir de espermatogonias sin utilizar factores inductores conocidos.

Palabras clave: células germinales, células Sertoli, testículo, cultivos primarios.

Characterization of the primary culture of mouse testicle germ cells

ABSTRACT

The development of *in vitro* systems makes it possible to elucidate part of the spermatogenesis mechanisms that are difficult to address in the organism. In this context, we set out to characterize primary cultures of stem cells isolated from the testis tissue of newly weanling mice. The cultures obtained showed a heterogeneous population formed by different cell types. AUsing histochemical techniques, it was possible to demonstrate the presence of stem cells of the germinal line, type spermatogonia (SSCs), and spermatocytes, as well as somatic cells; peritubular myoid cells and Sertoli cells, the latter seem to be crucial for the maintenance of SSCs *in vitro*, due to the influence of various factors secreted by them that stimulate cell proliferation. It is important to highlight that under the conditions provided *in vitro*, spermatid-like cells were also evident, which could suggest spontaneous differentiation from spermatogonia without using known inducing factors.

Keywords: germinal line, testis, primary culture, Sertoli cells.

INTRODUCCIÓN

Las células madre se caracterizan por tres propiedades: la autorrenovación, la capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y el potencial de proliferar extensamente (Bosch *y col.*, 2007). Estas células constituyen el origen y el reservorio de todos los tipos de tejidos del organismo. Así tenemos las células germinales que mantienen su potencialidad y que pueden dar origen al óvulo en el género femenino o al espermatozoide en el masculino (Lechner, 2007).

Los testículos están compuestos por los túbulos seminíferos formados por un epitelio seminífero el cual se encuentra apoyado sobre una lámina basal y una capa de células mioides peritubulares que rodea todo túbulo; el epitelio seminífero está conformado por las células de Sertoli y los diferentes estadios celulares de la línea germinal masculina, es decir, espermatogonias, espermátidas y espermatozoides.

Un grupo de investigadores en el 2011 lograron por primera vez la producción de espermatozoides funcionales por métodos *in vitro*, a partir de fragmentos de tejido testicular de ratones neonatales en un sistema de cultivo de órganos en geles de agarosa, lo que tiene una gran importancia en el campo del cultivo de células de los testículos, ya que este proceso no se había podido reproducir en mamíferos fuera del organismo (Sato *y col.*, 2011). Principalmente, se requiere utilizar sistemas de cultivo tridimensionales, para que ocurra el proceso de espermatogénesis (Sato *y col.*, 2012; Mahmoud, 2012), a través de este método se ha logrado la inducción de células espermatogénicas de ratones inmaduros incluidas células similares a espermatozoides (AbuMadighem *y col.*, 2018).

Recientemente se logró la recapitulación exitosa de la organogénesis de gónadas fetales y se produjeron espermátidas haploides derivadas *in vitro* mostrando que estas sufren la recombinación meiótica. Además, confirmaron que estas espermátidas fueron capaces de fertilizar ovocitos y soportar el desarrollo temprano del embrión (Yuan *y col.*, 2020). En este contexto se plantea que las técnicas *in vitro* son un modelo alternativo para estudiar la meiosis masculina que son difíciles de abordar en los modelos biológicos *in vivo* como por ejemplo, el ratón, aunado a esto es importante considerar los aspectos éticos cuando se aplican los tratamientos físicos y químicos en animales, que inducen daños en el ADN para estudiar su impacto sobre la meiosis, hoy en día es esencial considerar los principios de las 3R en la investigación animal (López Jiménez *y col.*, 2023).

La manipulación *in vitro* de células germinales ofrece la oportunidad de estudiar los mecanismos que subraya la continuación de la línea germinal y desarrollar nuevas técnicas para su modificación o para terapia celular. Así mismo con estos modelos biológicos se puede estudiar el efecto de compuestos que regulan la proliferación y diferenciación de las células tipo espermatogonias (Travers *y col.*, 2013).

Investigaciones con células SSC de línea germinal masculina, demuestran el potencial de estas células para ser la pieza central de una nueva era de aplicación clínica para el tratamiento de la infertilidad y la medicina regenerativa (Kubota y Brinster, 2006; Diao y col., 2022).

En virtud del conocimiento sobre estas células germinales, la importancia que tienen en la producción de un nuevo organismo y los diferentes problemas que se presentan en el momento de la reproducción por el daño o poca funcionalidad de este tipo celular, en este trabajo se ha planteado estudiar el mantenimiento y caracterización de células germinales de testículo de ratón como modelo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones de la cepa NMRI de sexo masculino recién destetados, fueron utilizados debido a que a esta edad los túbulos seminíferos poseen mayor proporción de SSCs en comparación con los de edades más avanzadas, según un trabajo realizado por De Rooij y Mizrack en el año 2008. Los ratones fueron suministrados por el Bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE), de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Central de Venezuela.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para la extracción de los testículos en condiciones de asepsia. Estos se utilizaron para establecer el cultivo primario de las células germinales y/o para el procesamiento histológico y análisis de las características morfológicas del tejido testicular.

Aislamiento y establecimiento del cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón. La disección del animal se realizó bajo una campana de flujo laminar horizontal para evitar cualquier tipo de contaminación. Los testículos de ratón obtenidos se colocan en solución buffer fosfato libre de calcio y magnesio (PBS) eliminando el tejido adiposo y el epidídimo para evitar la contaminación del cultivo con otro tipo celular, además se le desprende cuidadosamente la túnica albugínea. Posterior a esto, el material se disgregó mecánicamente hasta obtener cortes de aproximadamente 2 mm, para la realización de la disgregación enzimática.

Los trozos de tejidos de los testículos de ratón se expusieron a la acción de una solución de Tripsina 0,25% con una solución de Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,04% en una proporción 1:4 a través de pipeteos continuos, a una temperatura de 37°C; inmediatamente completada la disgregación, se inactivó la acción de la enzima agregando medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), 100 µm/mL de Estreptomina y 100 U/mL de Penicilina; la suspensión celular obtenida se centrifugó a 724,5 g por 10 minutos (3 veces) y el taco celular se resuspendió en

medio nutritivo para luego ser sembrado en placas de plástico cuya área depende de la cantidad de células viables obtenidas, determinada por medio del colorante azul Tripano y el uso de una cámara de Neubauer.

Los cultivos primarios fueron mantenidos en incubación en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ a 37°C, y el medio fue reemplazado cada dos o tres días dependiendo de los requerimientos del cultivo, hasta la confluencia de las células en monocapa.

Caracterización morfológica de las células germinales de testículo de ratón. Las células germinales obtenidas en los cultivos fueron caracterizadas morfológicamente realizando diferentes metodologías, a través de registros fotográficos digitales, con coloraciones histoquímicas de rutina May-Grünwald-Giemsa y la coloración con ácido periódico de Schiff; además se realizó la determinación inmunocitoquímica con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vimentina, que reconoce la vimentina en los filamentos intermedios del citoplasma de las células de Sertoli. Para la evaluación mediante histoquímica de lectinas se utilizó la lectina *Dolichus biflorus* (DBA) con afinidad a α -N-acetil-D-galactosamina, ya que se ha sugerido que es un marcador específico para caracterizar las células madre de espermatogonias (Izadyar *y col.*, 2003; Aguilar *y col.*, 2004).

RESULTADOS

En este trabajo se analizó las características morfológicas del tejido testicular de ratón recién destetado para luego establecer y caracterizar los cultivos primarios de las células de testículo de ratón. Con relación a las características histológicas del testículo de ratón recién destetado, se puede apreciar que los túbulos están rodeadas por una membrana basal e inmediatamente se encuentra una capa de células mioides peritubulares con morfología fusiforme, el epitelio es estratificado compuesto por células con variedad fenotípica, observando diferentes estadios de las células espermatogénicas, como las espermatogonias con morfología redondeada que presentan un gran núcleo ovoide y un citoplasma escaso, estas células se localizan en la base del epitelio seminífero; a medida que se van diferenciando se van alejando de la base del túbulo seminífero acercándose al lumen de éste, manteniendo las conexiones citoplasmáticas.

También se encuentran los espermatoцитos primarios que se pueden distinguir por poseer mayor proporción de citoplasma que las espermatogonias y presentan un gran núcleo ovoide (Figura 1A). Además, en la Figura 1B se puede observar una estructura formada por una serie de conductos denominada epidídimo, cada conducto está compuesto por un epitelio y en el lumen de este se puede detectar células tipo espermatogonias.

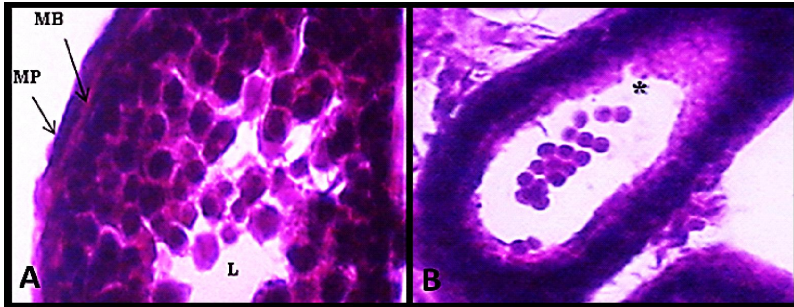


Figura 1. Corte histológico de testículo de ratón recién destetado. (A) Detalle de un túbulo seminífero mostrando diferentes estadios celulares de la espermatogénesis y así como las células mioideas peritubulares (MP) y la membrana basal (MB) 400X. (B) Detalle del epididimo en cuyo lumen (*) se observan células espermatogonias 400X. Coloración Hematoxilina-Eosina.

Establecimiento del cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón. El cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón se estableció de manera eficaz utilizando la técnica de disgregación enzimática con la enzima Tripsina combinada con el agente quelante EDTA. Las condiciones brindadas a las células cultivadas en monocapa, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de las células tipo espermatogonias.

En la Figura 2 se muestra los cultivos primarios de células de testículo de ratón donde se contempla una población celular heterogénea, observándose en general células con un citoplasma irregular y extendido, similares a las células somáticas del testículo, estas células se adhieren fácilmente a la superficie de cultivo formando una monocapa confluyente. El otro tipo celular que se observa son células con morfología redondeadas similares a las células de espermatogonias que generalmente crecen por encima de la monocapa formada por las células somáticas.

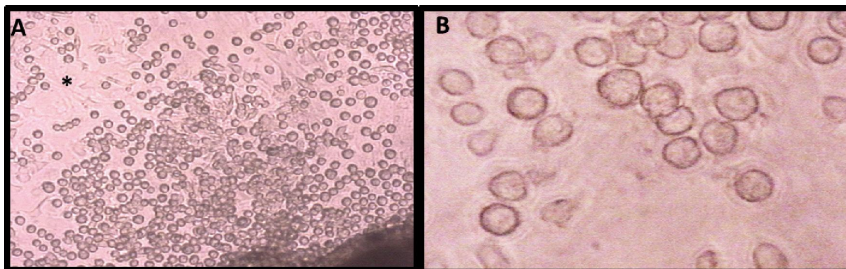


Figura 2. Poblaciones celulares obtenidas por disgregación enzimática con Tripsina-EDTA. Cultivo primario de 20 días. (A) Se observa una heterogeneidad celular. Células con el citoplasma extendido (*) y células redondeadas. Contraste de fases 200X. (B) Detalle de células redondeadas similares a las células de espermatogonias. Contraste de fases 400X.

Las células similares a las espermatogonias en cultivo se pueden encontrar aisladas o formando grupos de diferentes maneras, unas alineadas formando una colonia en hilera y otras se agrupan formando agregados celulares tridimensionales tipo globular (Figura 3A), que de igual forma generalmente crecen sobre la monocapa de células somáticas y se conectan e interactúan a través de puentes citoplasmáticos (Figura 3B).

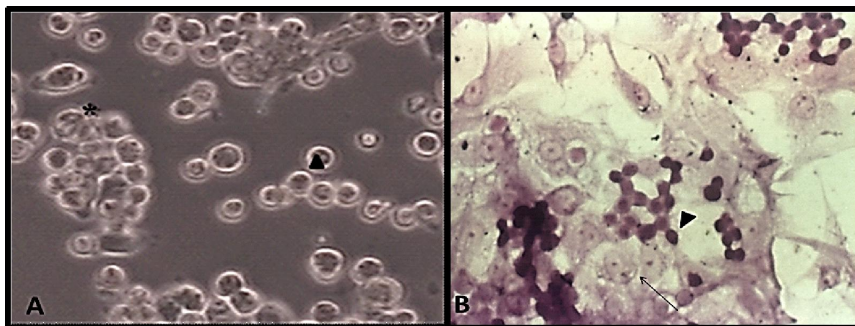


Figura 3. (A) Tipos de colonias formadas por células redondeadas similares a espermatogonias. Se observa un grupo de células alineadas formando una colonia en hilera (punta de flecha) y otros grupos formando agregados celulares tipo globular (*). Contraste de fases 200X. (B) Cultivo primario de 3 días en donde se puede observar células somáticas (flecha) y células similares a espermatogonias (punta de flecha), estas últimas conectadas a través de puentes citoplasmáticos. May-Grünwald-Giemsa 200X.

Las colonias las SSCs se conectan a través de puentes citoplasmáticos constituyendo un sincitio, pudiéndose comunicar entre ellas y sincronizar su desarrollo, estos puentes mencionados pueden indicar una citocinesis incompleta de las SSCs.

En este trabajo caracterizamos a nivel histoquímico los cultivos primarios con la lectina DBA y con el PAS, con lo que se pudo comprobar la presencia de células espermatogénicas en los cultivos (Figura 4). Con la Lectina DBA se observa un marcaje en las células similares a las espermatogonias, mientras que las células somáticas no mostraron marcaje (Fig. 4A), además se puede apreciar claramente las diferentes intensidades del marcaje según la morfología de las células, las más redondeadas mostraron un mayor marcaje y se puede evidenciar la presencia de un núcleo prominente con un nucléolo, estas células presentan escaso citoplasma, mientras que otras células también marcadas pero en menor intensidad presentan forma alargada, con mayor cantidad de citoplasma, presencia de una vacuola y el núcleo desplazado hacia un extremo, estas células son similares a espermátidas alargadas (Figura 4B).

Con la coloración PAS también se pueden distinguir las células espermatoogénicas, las cuales son PAS-positivas mostrando una coloración rosa a diferencia de las células somáticas que no reaccionan al PAS, de igual forma se puede observar la presencia de células alargadas con menor reacción. Las células más redondeadas se ven agrupadas formando colonias en hilera, donde se puede observar los puentes citoplasmáticos que conectan unas células espermatoogénicas con otras de la misma morfología (Figura 4C y 4D).

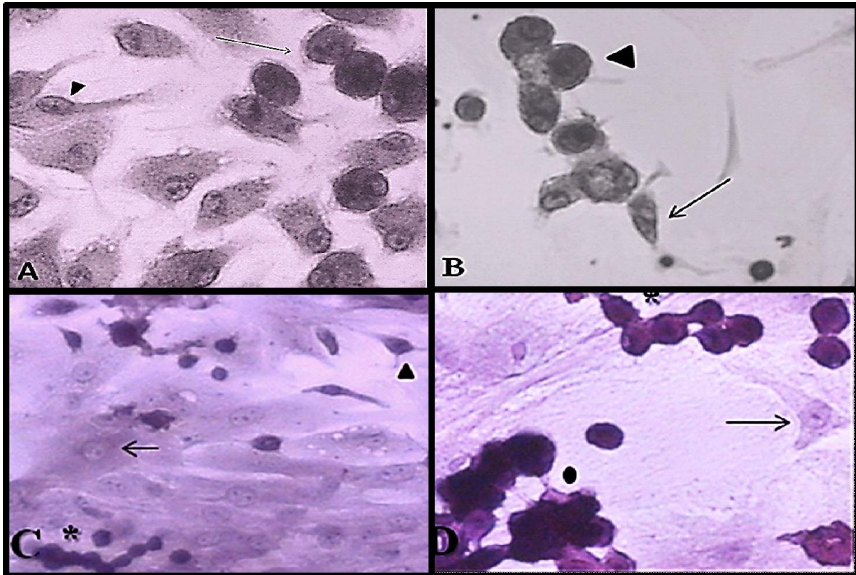


Figura 4. Cultivo primario de células de testículo de ratón de 20 días. (A) Células similares a espermatogonias marcadas con la Lectina DBA con morfología redondeada con marcaje intenso en el núcleo (flecha) y células con morfología alargada con el núcleo desplazado hacia un extremo (punta de flecha) con menor marcaje 400X. (B) Células similares a espermatogonias intensamente marcadas (punta de flecha) y células con morfología alargada similares a espermátidas con menor marcaje (flecha). Lectina DBA 400X. (C) Células similares a espermatogonias PAS+ alineadas formando una colonia en hilera (*), otras células en forma alargada similares a espermátidas con una menor coloración (punta de flecha) y células somáticas PAS-negativas (flecha) 200X. (D) Células similares a espermatogonias donde se observa la intensidad de la reacción al PAS de estas células agrupadas en hilera (*) y formando agregados celulares unidas a través de puentes citoplasmáticos en ambos casos, también se observan células no reactivas al PAS con un núcleo y citoplasma irregular (flecha). PAS 400X.

Por otro lado, se caracterizó un cultivo primario de 6 días, para determinar la presencia de las células de Sertoli, la caracterización se realizó con el anticuerpo anti-vimentina que reconoce los filamentos intermedios. La Figura 5 muestra el marcaje positivo a la inmunocitoquímica en contra de

vimentina de una célula binucleada con gran extensión del citoplasma similar a las células de Sertoli, interactuando con células con características similares a las espermatogonias.

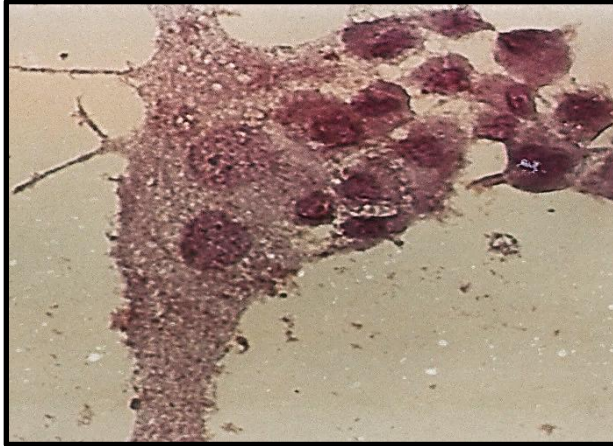


Figura 5. Cultivo de células marcado inmunocitoquímicamente con el anticuerpo anti-vimentina. Se observa sólo el marcaje positivo a la vimentina de una célula binucleada con gran extensión del citoplasma interactuando con las células similares a las espermatogonias 400X.

DISCUSIÓN

Actualmente las células de la línea germinal masculina son de gran interés ya que podrían ser una fuente de células madre adultas. Estas células residen en los testículos de los organismos en donde sufren un proceso de proliferación y diferenciación estimulado y mediado por diversos factores y por el microambiente en donde se encuentran.

Las células germinales masculinas se han logrado aislar y mantener en cultivo bajo diferentes estrategias y microambientes *in vitro*, que han permitido su estudio para ser usadas como fuente de células para la medicina reproductiva y la bioingeniería tisular (Brinster y Avarbock, 1994; Cui *y col.*, 2023). Del mismo modo, se han logrado diferenciar hacia su propio linaje e incluso hacia otros fenotipos celulares en cultivo.

Debido a la importancia que podrían tener estas células madre de espermatogonia como modelo de estudios básicos de la biología del desarrollo testicular y de las grandes posibilidades de aplicación en terapias celulares para el tratamiento de la infertilidad así como de trastornos genéticos (Kubota y Brinster, 2006; Kulibin y Malonina 2023),

en este trabajo presentamos una serie de metodologías que permiten aislar y cultivar las células germinales del testículo de ratón, evaluando el potencial de proliferación y diferenciación de las células madre de espermatogonias.

El cultivo primario de las células germinales de testículo de ratón se estableció de manera eficaz utilizando la técnica de disgregación enzimática con la enzima Tripsina combinada con el agente quelante EDTA. Las condiciones brindadas a las células cultivadas en monocapa, permitieron la proliferación y mantenimiento del potencial de diferenciación de las células tipo espermatogonias.

El cultivo primario presentó una heterogeneidad celular, la cual es dependiente de las características intrínsecas del tejido testicular. Se pudo apreciar la presencia de diferentes fenotipos, entre ellos se observaron células de la línea germinal como espermatogonias y espermatoцитos, además de células somáticas como las células de Sertoli y mioides peritubulares, estas últimas tienen características de células musculares, con morfología alargada tipo fusiforme con un núcleo central de manera similar como se presenta *in vivo* (Vivas, 2007), esta morfología pudo ser apreciada en todos los cultivos primarios establecidos, aunque en una baja proporción con respecto a los otros tipos celulares observados.

En relación a las células espermatogonias tipo A conocidas como las células madre de la línea germinal masculina, las SSCs y su morfología han sido descritas como células redondeadas con el núcleo ovoide prominente con cromatina que abarca la mayor parte de la célula (Ross y Pawlina, 2007) además presentan un citoplasma escaso (Izadyar *y col.*, 2003; Tu *y col.*, 2007). En nuestro trabajo se logró obtener células con la morfología descrita por estos autores, sin embargo, en los cultivos no es posible diferenciar los diversos tipos de SSCs bajo el microscopio de contraste de fases, ya que los cambios morfológicos entre las diferentes poblaciones de espermatogonias tipo A no son muy marcados y en la actualidad no se conocen marcadores específicos que permitan diferenciar inequívocamente cada una de ellas (Nagano, 2011).

Los tipos celulares de la línea espermatogénica encontrados en los primeros días del cultivo primario como se ha mencionado fueron las SSCs y los espermatoцитos, la ausencia de los otros fenotipos como espermátidas y espermatozoides, se debe a que el material biológico utilizado para el establecimiento del cultivo primario fue ratones neonatos de aproximadamente 20 días de nacido, según investigaciones anteriores hay evidencia de que a los 14 días después del nacimiento del ratón, la población de las células germinales testiculares está constituida sólo por SSCs y espermatoцитos (Bellvé *y col.*, 1977; De Rooij *y col.*, 2008), además Nagano *y col.* (2003) reportaron la ausencia de espermátidas en ratones de 18 días de nacidos,

lo que es de relevante importancia en este trabajo para estudiar la caracterización y la diferenciación de las SSCs *in vitro*. Las variantes inherentes a las propiedades biológicas como la edad de los ratones, tienen importantes efectos en el cultivo, pues se ha demostrado que los cultivos de SSCs tienen mayor éxito cuando las células son de testículo de ratón recién nacido (Brinster y Zimmermann, 1994).

En cuanto al comportamiento de los diferentes tipos celulares en el cultivo en monocapa, se observó que al inicio del establecimiento muchas células somáticas se adhieren al sustrato a los primeros días de cultivo formando una monocapa celular, pero un número importante de células germinales que se distinguen por su morfología y tamaño se mantuvieron flotantes en el cultivo, después de ser incubadas 3 días, unas pocas células germinales lograron adherirse al sustrato y la mayoría de ellas sobre la monocapa de células somáticas adherentes, estas observaciones concuerdan con lo reportado por Kanatsu-Shinohara *y col.* (2003). Algunos autores han publicado que las SSCs pueden proliferar en suspensión, pero su proliferación es más activa cuando se encuentran conectadas a una matriz o a una capa de células alimentadoras o “feeder layer” (Tu *y col.*, 2007; Kanatsu- Shinohara *y col.*, 2010; Kossack *y col.*, 2009).

Luego de la adhesión de las SSCs a la monocapa de células somáticas, algunas de ellas se mantuvieron aisladas como células individuales y la mayoría se agruparon formando diferentes tipos de colonias que aumentaron de tamaño al transcurrir los días de cultivo, unas células se alinearon una al lado de la otra formando hileras y otras formaron agregados celulares tipo globular, el mismo comportamiento fue reportado por Koruji *y col.* (2007), quienes aislaron y purificaron los diferentes tipos celulares de testículo de ratón, y observaron la formación de agregados tipo globular de SSCs, al sembrar estas células germinales indiferenciadas sobre una monocapa confluyente de células de Sertoli. En cuanto a las colonias en hilera, esta agrupación celular se ha observado al cultivar las SSCs de testículo de ratón sobre una “feeder layer” en presencia de factores de crecimiento como GDNF, GFR α 1 soluble y FGF2, además se forman agregados celulares tipo globular (Yeh *y col.*, 2007).

Las colonias las SSCs se conectan a través de puentes citoplasmáticos constituyendo un sincitio, pudiéndose comunicar entre ellas y sincronizar su desarrollo, estos puentes mencionados pueden indicar una citocinesis incompleta de las SSCs, y probablemente tienen como función facilitar interacciones bioquímicas que permitan la maduración sincrónica de las células de la línea germinal (Eynard *y col.*, 2008).

Los estudios morfológicos de las células se realizaron a través de coloraciones de rutina Hematoxilina-Eosina y May-Grünwald-Giemsa. Las SSCs se tiñen intensamente con ambas coloraciones mostrando sus características típicas, es decir, el núcleo ovoide prominente se muestra

intensamente basófilo ocupando la mayor parte de las células con el citoplasma teñido levemente, las conexiones citoplasmáticas que conectan a las SSCs se observa claramente con la coloración May-Grünwald-Giemsa, estas características histológicas han sido reportadas por Izadyar *y col.* (2003). En los cultivos de 18 días coloreados con Hematoxilina-Eosina se pudo apreciar la presencia de otra morfología celular similar las de SSCs, pero con modificaciones en el citoplasma; estas células se observaron un poco alargadas, mostrando una transformación estructural de las células en donde pudieran estar ocurriendo cambios a nivel de la organización celular, esto nos permite presumir una diferenciación de las SSCs hacia espermatidas.

Algunos investigadores han señalado el uso de determinaciones histoquímicas como el PAS y la Lectina DBA para caracterizar las células del linaje espermatogénico, ellos sugieren que tanto el reactivo de Schiff (Chang *y col.*, 2001; Aguilar *y col.*, 2004) como la Lectina DBA (Izadyar *y col.*, 2002) son marcadores específicos de las células del linaje espermatogénico.

Posteriormente en el 2007 se pudo determinar que esta lectina DBA puede ser un marcador útil para caracterizar las células madre embrionarias, ya que reconoce epítomos de α -N-Acetil-D-Galactosamina en la superficie de estas células, los cuales van disminuyendo a medida que se diferencian, por esto los autores proponen que la DBA como un marcador de diferenciación que puede predecir la potencialidad del desarrollo (Nash *y col.*, 2007).

Con la coloración PAS también se pueden distinguir las células espermatogénicas, siendo utilizada en otros estudios para comprobar el estado normal de los túbulos seminíferos como en el trabajo realizado por Shawki en el año 2018.

Las diferentes intensidades de reacción y de marcaje descritas anteriormente nos hacen suponer que las células espermatogénicas presentes en los cultivos de células de testículo de ratón se encontraban en diferentes estadios del proceso de espermatogénesis, además con estas determinaciones se pudo evidenciar con mayor exactitud las diferencias morfológicas entre las células de línea germinal masculina.

Las células de Sertoli, *in vivo*, han sido descritas como células cilíndricas con prolongaciones apicales y laterales extensas (Ross y Pawlina, 2007), en cultivo, han sido identificadas con el anticuerpo vimentina (Lu *y col.*, 2020) y se ha señalado que estas células no tienen una morfología definida aunque se observan de gran tamaño con grandes extensiones citoplasmáticas (Izadyar *y col.*, 2003), en nuestro trabajo también se observó esta morfología y se pudo evidenciar, además la presencia de uno o dos núcleos con grandes nucléolos en estas células, siendo negativas a la reacción del PAS de la misma forma que no se marcaron con la histoquímica de Lectina.

Cuando las SSCs y las células de Sertoli estuvieron en contacto se comenzaron a desarrollar las colonias, por lo que al parecer se creó un nicho que favorece su desarrollo, lo que se traduce en que las SSCs necesitan contacto específico con las células de Sertoli en el cultivo. Esta interacción entre las células de Sertoli y las células espermatogénicas es crucial, los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por estas células somáticas en la monocapa influyen en la supervivencia de las SSCs indiferenciadas y proporciona un microambiente para la proliferación, formación de colonias y la diferenciación con lo que se explica la importancia que tienen estas células en el éxito del cultivo de las células espermatogénicas. Se ha señalado que uno de los factores secretado por las células de Sertoli es el GDNF, que estimula las SSCs indiferenciadas, probablemente es el factor de crecimiento más importante que interviene en la regulación, proliferación y simultánea autorenovación de las SSCs (Caires *y col.*, 2010; Meng *y col.*, 2000). Recientemente se determinó que el factor de células madre (SCF) producido específicamente por las células de Sertoli es esencial para la espermatogénesis (Peng *y col.*, 2023).

Las células somáticas adheridas al sustrato, compuestas principalmente por células de Sertoli y mioides peritubulares, juegan un papel importante en la proliferación de las SSCs en cultivo, ya que apoya la proliferación y diferenciación de las células germinales. Las células de Sertoli segregan diversos factores que contribuyen al mantenimiento, proliferación y diferenciación de las SSCs, con lo que se explica la importancia que tienen estas células en el éxito del cultivo de SSCs. Se han estudiado los efectos de factores como GDNF, GFR α 1 y bFGF por separado en cultivos de SSCs de ratón sobre una “feeder layer” con un medio libre de suero, determinando que la presencia del factor de crecimiento GDNF contribuye a la formación de agregados celulares tipo globular, mientras que la ausencia de este factor en el cultivo produce una disminución del número de SSCs en el cultivo, este estudio determina la importancia que tiene la presencia de este factor segregado por las células de Sertoli adheridas al sustrato formando una monocapa confluyente en nuestro estudio (Kubota *y col.*, 2004).

Algunas células mioides peritubulares se encontraron en el cultivo; estas células, *in vivo*, se encuentran en la lámina de la membrana basal rodeando los túbulos seminíferos, y contienen elementos contráctiles que generan ondas peristálticas a lo largo de los túbulos para transportar los espermatozoides inmóviles a la red testicular y al epidídimo. Las células peritubulares soportan la proliferación de las células de Sertoli en el cultivo sin la adición de factores, según lo reportado por Schlatt *y col.* (1996). Estos dos tipos celulares en el cultivo, se asemejan al compartimiento tubular *in vivo*, y de esta forma contribuyen a la proliferación de las SSCs *in vitro*, simulando las condiciones microambientales o nicho en el que se encuentran las células germinales de testículos de ratón en el organismo.

En los cultivos de células de testículo de ratón se llevó a cabo el proceso de diferenciación espontánea de las células SSCs hacia espermatidas, evidenciándose una serie de cambios morfológicos que van desde una morfología redondeada características de las espermatogonias tempranas a una morfología alargada, esto se pudo corroborar con las técnicas histoquímicas mencionadas que además de identificar la morfología como células germinales masculinas, de acuerdo al marcaje con la Lectina DBA y la reacción positivamente con el PAS. Además se pudo apreciar en estas células una morfología alargada con un núcleo ovoide desplazado hacia un extremo de la célula y el citoplasma con una extensión en el extremo opuesto al núcleo, similar al fenotipo de las espermatidas en transformación, también se evidenció en nuestros resultados la presencia de vesículas muy cercanas al núcleo de estas células que se asemeja a la vesícula acrosomal, este es un rasgo característico de las espermatidas durante la espermiogénesis (Nagao *y col.*, 1989; Lassalle *y col.*, 1999; Izadyar *y col.*, 2003).

Otro rasgo importante en la diferenciación de estas células en la alineación de las células espermatogénicas, en nuestros resultados se puede evidenciar esta disposición y se observa además que las células en la colonia presentan diferencias morfológicas, las células alineadas van desde SSCs redondeadas con un núcleo prominente y escaso citoplasma, seguido de espermátocitos con mayor proporción de citoplasma y por último en un extremo de la hilera se observan las espermatidas con su morfología alargada, todas interactuando a través de conexiones citoplasmáticas, esto concuerda con lo reportado por Yeh *y col.* (2007), quienes aseguran que estas alineaciones de las células espermatogénicas es el típico comportamiento de la diferenciación de las SSCs en cultivo, pues en las condiciones *in vivo*, las células espermatogénicas tienen una distribución específica en los túbulos seminíferos, en donde las células menos diferenciadas se ubican en la membrana basal y a medida que se van diferenciando se van alejando de esta y se acercan al lumen del túbulo.

La diferenciación espontánea observada en el cultivo, sin añadir factores inductores conocidos pudo deberse a los diversos factores que contiene el SFB, el suero tiene efectos positivos sobre las SSCs en el cultivo y se ha demostrado que la proporción de las células cultivadas en presencia de suero es mayor que en su ausencia (Nagano, 2011). Por otro lado, investigadores sugieren que el destino de las SSCs, *in vitro*, puede estar influenciado por factores brindados en el microambiente, como los factores presentes en el suero (Kanatsu-Shinohara *y col.*, 2010).

El uso de este sistema de cultivo en monocapa, ha brindado la posibilidad de simular de alguna manera las condiciones *in vivo*, permitiendo retener las funciones para mantener la capacidad de autorrenovación, proliferación y su potencial de diferenciación de las SSCs lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo.

Se ha señalado que las células madre espermatogénicas y su linaje tienen muchos rasgos comunes entre diferentes especies de mamíferos, primates, ratón y humano. Para poder extrapolar las tecnologías de cultivo y llevarlas a una aplicación clínica en el humano es esencial investigar las similitudes y diferencias entre los diversos modelos estudiados (Fayomi y Orwig, 2018).

LITERATURA CITADA

- AbuMadighem, A., R. Solomon, A. Stepanovsky, J. Kapeloshinik, Q. Shi, E. Meese, E. Lunenfeld, y M. Hueihel. 2018. Development of spermatogenesis in vitro in three-dimensional culture from spermatogonial cells of busulfan-treated immature mice. *Int. J. Mol. Sci* 2018, 19, 3804; Doi: 10.3390/ijms19123804.
- Aguilar, J., M. Gonzalvo, A. Clavero, A. Ortiz, E. González, J. Ortiz, L. Peralta y colaboradores. 2004. Células madre espermatogonias. *Rev. Int. Androl.* 2:54-59.
- Bellvé, A., J. Cavicchia, C. Millette, D. O'Brien, Y. Bhatnagar y M. Dym. 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. *J. Cell. Biol.* 74: 68-85.
- Bosch, J., J.M. López-Picazo González, J. García-Foncillas López y F. Prósper Cardoso. 2007. Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral. *Rev. Med. Univ. Navarra.* 51:14-17.
- Brinster, R. L., y M. R. Avarbock. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91,11303-11307. doi:10.1073/pnas.91.24.11303.
- Brinster, R. L., y J. W. Zimmermann. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 11298-11302. doi:10.1073/pnas.91.24.11298.
- Caires, K., J. Broady y D. McLean. 2010. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol.* 205:133-145.
- Cui, H., W. Chen, S. Wu, C.L. Wan y Z. He. 2023. Generation of male germ cells in vitro from the stem cells. *Asian J Androl.* 25(1):13-20.
- Chang, Y., J. Lee, S. Panneerdoss, J. MacLean y M. Rao. 2001. Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *BioTechniques.* 51: 341-344.
- De Rooij, D. y S. Mizrak. 2008. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development.* 135: 2207-2213.
- Diao, L., P.J. Turek, C.M. John, F. Fang y R.A. Reijo Pera. 2022. Roles of spermatogonial stem cells in spermatogenesis and fertility restoration. *Front. Endocrinol.* 13:895528. doi: 10.3389/fendo.2022.895528.
- Eynard, A., M. Vlentich. y R. Rovasio. 2008. Histología y embriología del ser humano. Bases celulares y moleculares. 4ta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Fayomi, A y Orwig, K. 2018. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res.* 29:207-214.
- Izadyar, F., J. Matthijs-Rijsenbilt, K. Den Ouden, L. Creemers, H. Woelders y D. De Rooij. 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J. Androl.* 23: 537-545.
- Izadyar, F., K. Den Ouden, L. Creemers, G. Posthuma, M. Parvimen y D. De Rooij. 2003. Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biol. Reprod.* 68: 272-281.

- Kanatsu-Shinohara, M., N. Ogonuki, K. Inoue, H. Miki, A. Ogura, S. Toyokuni y colaboradores. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69, 612-616. doi:10.1095/biolreprod.103.017012.
- Kanatsu-Shinohara, M., K. Inoue, N. Ogonuki, H. Morimoto, A. Ogura y T. Shinohara. 2010. Serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. <http://www.biolreprod.org/>.
- Koruji, M., M. Movahedin, S. Javad. y H. Gourabi. 2007. Colony formation ability of frozen-thawed spermatogonial stem cell from adult mouse. *Iranian J. Reprod. Medicine.* 5: 109-115.
- Kossack, N., J. Meneses, S. Shefi, H. Nam, S. Chavez, C. Nicholas, J. Gromoll y colaboradores. 2009. Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells.* 27: 138-149.
- Kubota, H. y R. Brinster. 2006. Technology insight: in vitro culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat. Rev. End.* 2: 99-107.
- Kulibin A. y E. Malolina. 2023. In vitro spermatogenesis: In search of fully defined conditions. *Front. Cell Dev. Biol.* 11:1106111. doi: 10.3389/fcell.2023.1106111
- Lechner, V. 2007. Stem cells: proyecciones en ingeniería de tejidos. *Rev. Ped. Elec.* 4:17-21.
- Lassalle, B.; A. Ziyat, J. Testart, C. Finaz y A Lefèvre. 1999. Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Human Reprod.* 14: 388-394.
- López-Jiménez P, I. Berenguer, J. de Aledo, M. Parra, J. Page y R. Gómez. 2023. The organotypic culture of mouse seminiferous tubules as a reliable methodology for the study of meiosis in vitro. <https://doi.org/10.1101/2023.02.03.526942>.
- Lu, L., Q. Zhang, M. Ren, E. Jin, Q. Hu, C. Zhao, y S. Li. 2020. Effects of boron on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle of cultured rat Sertoli cells in vitro. *Biol Trace Elem Res* 196: 223.230.
- Mahmoud, H. 2012. Concise Review: Spermatogenesis in an artificial three-dimensional system. *Stem Cells*, 30:2355-2360.
- Meng, X., M. Lindahl, M. Hyvönen, M. Parvinen, D. de Rooij, M. Hess, A. Raatikainen, y colaboradores. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* 287: 1489-1493.
- Nagao, Y. 1989. Viability of meiotic prophase spermatocytes of rats is facilitated in primary culture of dispersed testicular cells on collagen gel by supplementing epinephrine or norepinephrine: evidence that meiotic prophase spermatocytes complete meiotic divisions in vitro. *Cell Dev. Biol.* 25: 1088-1098.
- Nagano, M., B. Ryu, C. Brinster, M. Avarbock y R. Brinster. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 68: 2207-2214.
- Nagano, M. 2011. Techniques for culturing spermatogonial stem cells continue to improve. *Biol. Reprod.* 84: 5-6.
- Nash, R., L. Neves, R. Faast, M. Pierce y S. Dalton. 2007. The lectin Dolichos biflorus agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells.* 25(4):974-82.
- Peng, Y., X. Tang, H. Shu, W. Dong, H. Shao y B. Zhou. 2023. Sertoli cells are the source of stem cell factor for spermatogenesis. *Development* 150, dev200706. doi:10.1242/dev.200706.
- Ross, M. y I. Pawlina. 2007. Histología. 5ta Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

- Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuk, A. Ogura, Y. Kubata y colaboradores. 2011. In vitro production of functional sperm in culture neonatal mouse tested. *Nature*. 471: 504-508.
- Sato, Y., M. Taniguchi y T. Otoi. 2012. Studying Spermatogenesis by using in vivo and in vitro models: Advantages and disadvantages of these models for practical use. *J Veterinar Sci Technol* 3:115. doi:10.4172/2157-7579.1000115.
- Schlatt, S., D. Kretse y K. Loveland. 1996. Discriminative analysis of rat Sertoli and peritubular cells and their proliferation in vitro: evidence for follicle-stimulating hormone-mediated contact inhibition of Sertoli cell mitosis. *Biol. Reprod.* 55: 227-235.
- Shawki, H., H. Oishi, T. Osui, Y. Kitadate, W. Basha, A. Abdellatif, K. Hasegawa y colaboradores. 2018. MAFB is indispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice. *PLoS ONE* 13(1):e0190800.
- Travers, A., B. Arkoun, A. Safsaf, J. Milazzo, A. Absyde, A. Bironneau, A. Perdrix, L. Sibert, B. Macé, B. Cauliez y N. Rives. 2013. Effects of vitamin A on in vitro maturation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells. *PLoS ONE* 8: e82819.
- Tu, J., L. Fan, K. Tao, W. Zhu, J. Li, y G. Lu. 2007. Stem cell factor affects fate determination of human gonocytes in vitro. *Reproduction*. 134: 757-765.
- Vivas, G., J. Lozano y J. Velasco. 2007, Regulación inmuno-testicular y citocinas. *Invest. Clín.* [online]. 48: 107-121.
- Yeh, J., X. Zhang y Nagano, M. 2007. Establishment of a short-term in vitro assay for mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 77:897-904.
- Yuan, Y., L. Li, Q. Cheng, F. Diao, Q. Zeng, X. Yang, y colaboradores. 2020. In vitro testicular organogenesis from human fetal gonads produces fertilization-competent spermatids. *Cell Res.* 30, 244-255.

PRIMER REGISTRO DE *Octopus insularis* (CEPHALOPODA, OCTOPODIDAE) EN LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

Pedro Rodríguez^{1,2*}, Dilia Morales^{1,2}, Asdrúbal Rodríguez³,
Key Ramos¹, José Lunar¹ y Ángel Fariña^{1,4}

¹Centro Nacional de Investigación de Pesca y Acuicultura (CENIPA), Avenida Lecuna, Parque Central, Torre Este, Piso 13, Caracas, República Bolivariana de Venezuela. ²Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Apartado postal 6304. Calle Principal - La Marina, Boca del Río, Isla de Margarita, República Bolivariana de Venezuela. ³Skull Divers Center, Escuela de Buceo, Isla de Margarita, República Bolivariana de Venezuela. ⁴Universidad de Oriente, Departamento de Biología, núcleo Sucre, República Bolivariana de Venezuela
*pedrodriguezr34@gmail.com

RESUMEN

La taxonomía del género *Octopus* ha presentado numerosos cambios, producto de la aparición de nuevas herramientas y enfoques taxonómicos que han permitido el descubrimiento de nuevas especies, a menudo formando complejos de especies crípticas, siendo el complejo de especies *O. vulgaris* el más estudiado, ya que esta fue considerada por mucho tiempo como una especie cosmopolita, siendo ahora reconocida como un complejo de especies altamente diverso. Material fotográfico proveniente del archipiélago de Los Frailes y el Parque Nacional Mochima, Venezuela, reveló la presencia del pulpo *O. insularis*, constituyendo el primer reporte de esta especie de cefalópodo en el país. Se discuten algunos aspectos taxonómicos, ecológicos y pesqueros de la especie.

Palabras clave: mar Caribe, pulpo, pesquerías, taxonomía.

First record of *Octopus insularis* (Cephalopoda, Octopodidae) from Bolivarian Republic of Venezuela

ABSTRACT

The taxonomy of the genus *Octopus* has undergone numerous changes, as a result of the appearance of new tools and taxonomic approaches that have allowed the discovery of new species, often forming cryptic species complexes, with the *O. vulgaris* species complex being the most studied, since it was long considered a cosmopolitan species, and is now recognized as a highly diverse species complex. Photographic material from Los Frailes archipelago and Mochima National Park, Bolivarian Republic of Venezuela, revealed the presence of the octopus *O. insularis*, constituting the first report of this cephalopod species from the country. Some taxonomic, ecological and fishing aspects of the species are discussed.

Keywords: Caribbean Sea, octopus, fisheries, taxonomy.

INTRODUCCIÓN

Bajo el nombre común de “pulpos” se agrupan todas aquellas especies de moluscos cefalópodos pertenecientes al orden Octopoda Leach, 1818, caracterizadas por la presencia de ocho brazos circunorales, ausencia de tentáculos, ventosas sésiles y ausencia de anillos quitinosos. Sin embargo, son las especies del género *Octopus* Cuvier, 1798 (Octopodidae) las más conocidas, por ser las más comunes en áreas cercanas a las costas, así como de mayor distribución geográfica y de mayor interés comercial (Robaina, 1986).

El género *Octopus* cuenta con 73 especies recientes y válidas (WoRMS Editorial Board, 2023), de las cuales para la República Bolivariana de Venezuela han sido señaladas únicamente las especies *O. joubini* G.C. Robson, 1929, *O. zonatus* G. L. Voss, 1968, *O. hummelincki* Adam, 1936, *O. briareus* G. C. Robson, 1929 y *O. vulgaris* Cuvier, 1797 (Arocha y Urosa, 1982; Robaina, 1986; Carvajal y Capelo, 1993; Capelo y Buitrago, 1998). Debido a la importancia económica que poseen estos cefalópodos, han sido objeto de explotación en el país desde mediados de 1950, inicialmente en forma de captura incidental por la flota industrial de arrastre (Arocha, 1989) y a partir del 2008 por una pesquería artesanal dirigida y regulada (Sauer *y col.*, 2019). Aunque comúnmente algunas de estas especies pueden ser halladas formando parte de una misma captura, ha sido *O. vulgaris* la especie más importante, por ser la de mayor tamaño y mayor abundancia relativa, lo que le ha conferido un gran valor socioeconómico (González *y col.*, 2001, 2015; Eslava *y col.*, 2017).

Por muchos años, *O. vulgaris* fue considerada como una especie con una distribución cosmopolita (Roper *y col.*, 1984; Warnke *y col.*, 2004); no obstante, la identificación de inconsistencias taxonómicas (morfológicas, genéticas y moleculares) a través de su intervalo de distribución permitieron dilucidar que *O. vulgaris* es realmente un complejo de especies crípticas (Oosthuizen *y col.*, 2004; Leite *y col.*, 2008; Sales *y col.*, 2013; Amor *y col.*, 2017, 2019; Lima *y col.*, 2017). Como resultado, lo que antes era considerado como una sola especie bajo el nombre *O. vulgaris*, ahora está conformado por al menos seis especies: *O. vulgaris sensu stricto* (Atlántico nororiental y mar Mediterráneo); *O. aff. vulgaris*, también conocido como *O. vulgaris* Tipo III (costa de Sudáfrica y Madagascar); *O. sinensis* d’Orbigny, 1841 (Pacífico noroccidental, Japón y al este del mar de China); *O. tetricus* Gould, 1852 (Australia suroriental y norte de Nueva Zelanda); *O. djinda* Amor, 2021 (Australia suroccidental) y *O. americanus* Froriep, 1806 (desde el nororiente de los Estados Unidos hasta Argentina) (Borges *y col.*, 2022; Maloney *y col.*, 2023), esta última con presencia confirmada en Venezuela (Avendaño *y col.*, 2020).

Otra especie catalogada desde su descripción como miembro del complejo de especies *O. vulgaris*, fue *O. insularis* Leite y Haimovici, 2008, (Leite *y col.*, 2008), a pesar de ello, esta especie posee suficientes

diferencias genéticas y moleculares para separarse de las especies de este complejo, estando filogenéticamente más relacionada con especies como *O. maya* G. L. Voss y Solís, 1966 y *O. taganga* Guerrero-Kommritz y Camelo-Guarín, 2016 (Amor *y col.*, 2017; Puentes-Sayo *y col.*, 2022). Anteriormente, *O. insularis* fue considerada como una especie geográficamente restringida a las costas de Brasil (Lima *y col.*, 2014), sin embargo, estudios recientes demostraron que posee un intervalo de distribución anfiatlántico bastante amplio, pudiendo ser hallada en el Atlántico occidental desde el sur de Florida (Estados Unidos), Las Bahamas y el golfo de México, el Caribe colombiano hasta el sur de Brasil (Flores-Valle *y col.*, 2018; Maloney *y col.*, 2023) y en el Atlántico oriental en Santo Tomé y Príncipe (Lima *y col.*, 2023).

Aunque el intervalo de distribución de *O. insularis* abarca el mar Caribe y potencialmente puede incluir la costa venezolana (Lima *y col.*, 2023), su presencia en aguas del país aún no había sido confirmada. En la presente investigación se señala por primera vez la presencia de la especie *O. insularis* en Venezuela y se discuten algunos aspectos taxonómicos y ecológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares fueron observados in situ durante muestreos diurnos en los meses de agosto y septiembre de 2023 en los islotes Puerto Real (11°11'42,47" Latitud Norte y -63°44'19,91" Longitud Oeste) y La Pecha (11°12'20,16" Latitud Norte y -63°45'16,10" Longitud Oeste) del archipiélago de Los Frailes, Dependencias Federales, con ayuda de equipo de buceo tipo SCUBA a una profundidad de entre 4 a 6 metros. Y durante el mes de diciembre en las localidades de Manare (10°23'30,8" Latitud Norte y -64°21'52,2" Longitud Oeste) y Las Maritas (10°23'13,1" Latitud Norte y -64°20'18,3" Longitud Oeste) del Parque Nacional Mochima, estado Sucre, República Bolivariana de Venezuela (Figura 1), con ayuda de equipo de buceo tipo snorkel a una profundidad de 2 metros. Los ejemplares fueron fotografiados con ayuda de una cámara submarina GoPro HERO 3 (archipiélago de Los Frailes) y GoPro HERO 10 (Parque Nacional Mochima) y la identificación taxonómica fue realizada siguiendo la guía de identificación de pulpos propuesta por O'Brien *y col.* (2021) la cual se basa en características presentes en el patrón de coloración de cada especie.

RESULTADOS

Fueron fotografiados cinco ejemplares de la especie *O. insularis*, tres de ellos en su guarida (Figuras 2 y 4) y el resto junto a rocas (Figura 3A – B) y corales blandos (Figura 3C).

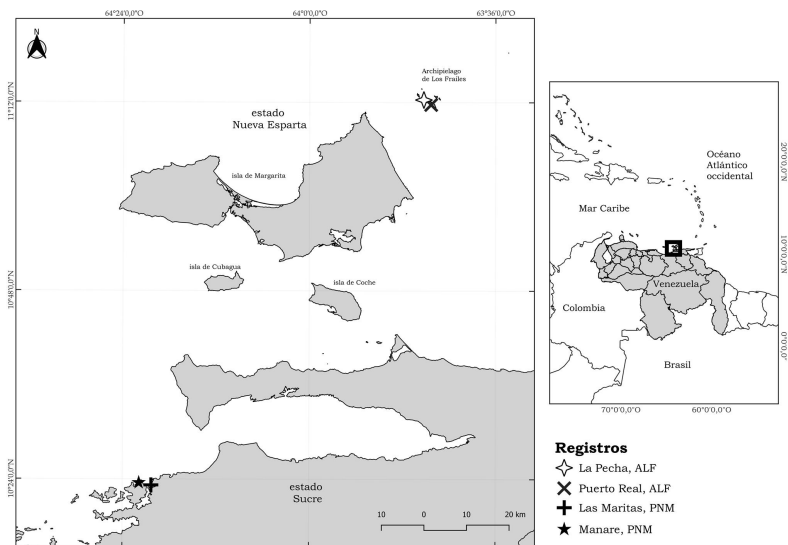


Figura 1. Ubicación geográfica de los registros de *Octopus insularis* en el nororiente de Venezuela. ALF. Archipiélago de Los Frailes; PNM: Parque Nacional Mochima.

Los ejemplares presentaron una morfología externa robusta, y de apariencia rugosa, con papilas dispersas en la superficie dorsal del cuerpo, más conspicuas en la superficie dorsal del manto y una papila de gran tamaño por encima del ojo. El patrón de coloración fue consistente en todos los ejemplares observados, siendo resaltante en la región ventral de los brazos, presentando un patrón reticulado conspicuo formado por manchas oscuras marrón, naranja o violeta sobre un fondo claro. Dicho patrón fue más evidente cuando los ejemplares se encontraban en su guarida (Figura 2) o eran perturbados (Figura 3C). La coloración dorsal de los brazos y del manto fue más variable, con predominio de tonos crema claro. El despliegue de coloración durante su comportamiento dimántico fue también característico. Durante éste, los ejemplares presentaron un área de color crema pálido a blanco alrededor del ojo sobre un fondo oscuro y una banda oscura que cruza transversalmente el ojo (Figura 4).

DISCUSIÓN

El uso de caracteres morfológicos y merísticos para la distinción taxonómica de los miembros del complejo de especies *O. vulgaris* es, en ocasiones engoroso, debido al solapamiento de caracteres entre especies, así como por la pérdida de caracteres de interés diagnóstico posterior a la captura y preservación de los ejemplares (Lima *y col.*, 2017).

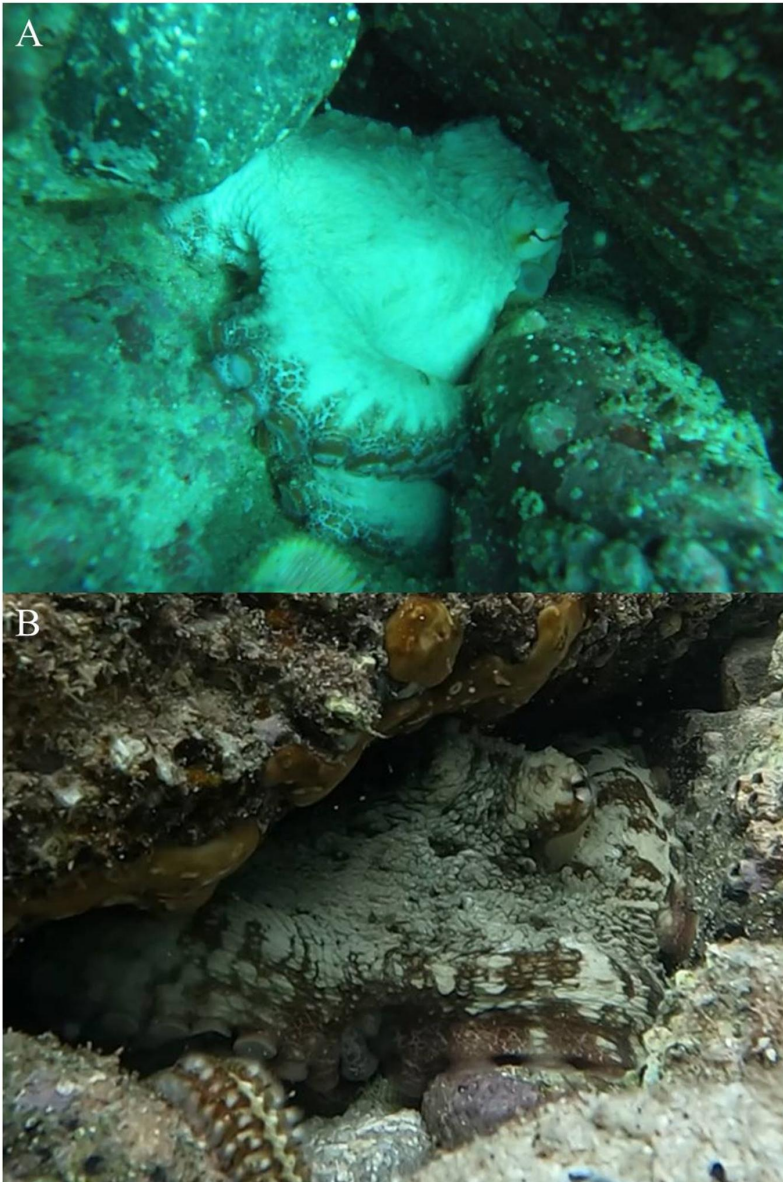


Figura 2. *Octopus insularis* (A) ejemplar fotografiado *in situ* en el Archipiélago de Los Frailes, Dependencias Federales, Venezuela y (B) ejemplar fotografiado *in situ* en el Parque Nacional Mochima, estado Sucre, Venezuela.

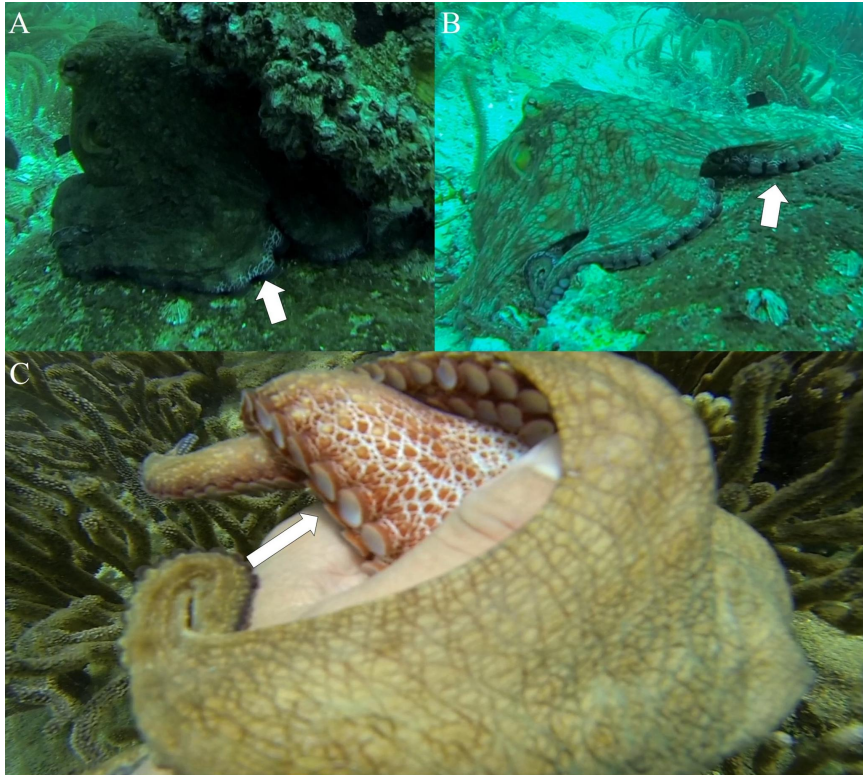


Figura 3. Patrón de coloración diagnóstico en los ejemplares de *O. insularis* observados en el archipiélago de Los Frailes (A – C). Las flechas señalan el patrón reticulado en la parte ventral de los brazos.

A pesar de que los pulpos tienen la extraordinaria capacidad de cambiar su forma y coloración para mimetizarse con el entorno, algunas especies presentan patrones de coloración característicos que permiten su identificación en el campo (O'Brien *et al.* 2021). Los ejemplares observados y fotografiados en el archipiélago de Los Frailes y Parque Nacional Mochima, concuerdan exactamente con los caracteres de coloración diagnósticos descritos para *O. insularis* por O'Brien *et al.* (2021). Al respecto, dichos autores señalan que tales características de coloración de la especie, son constantes y por tanto confiables para la identificación taxonómica sin necesidad de análisis morfológicos exhaustivos o genéticos. Estas características visuales han permitido recientemente la detección y posterior identificación de esta especie en aguas del sur de Florida (Estados Unidos), expandiendo su intervalo de distribución conocido

(Maloney y col., 2023). *Octopus insularis* puede distinguirse fácilmente de *O. americanus*, por la coloración en la región ventral de los brazos, ya que, en *O. americanus*, es de color naranja a marrón uniforme, sin ningún patrón reticulado. Además de ello, *O. americanus* carece de un área clara alrededor del ojo durante el comportamiento dimántico, siendo el área ocular completamente oscura (O'Brien y col., 2021; Leite com pers., 2023).



Figura 4. Patrón de coloración dimántico de *O. insularis* fotografiado en el archipiélago de Los Frailes. Las flechas señalan el patrón de coloración característico.

Desde su descripción, *O. insularis* ha sido objeto de investigación por ser la especie más importante de la pesquería artesanal de pulpos de Brasil (Leite *y col.*, 2008; Sales *y col.*, 2013; Lima *y col.*, 2014; Torrecilla-Batista y Leite 2016; Batista *y col.*, 2022; Andrade *y col.*, 2023). Además, se ha demostrado que esta también es la principal especie capturada artesanalmente en el Caribe colombiano (Puentes-Sayo *y col.*, 2022) y en el golfo de México (Flores-Valle *y col.*, 2018), y no *O. vulgaris*, como había sido planteado anteriormente. Esto ha resultado en un caso de incorrecta identificación taxonómica de la especie de pulpo más importante en la región (Lima *y col.*, 2017).

Este hallazgo plantea una importante interrogante: ¿ha sido *O. vulgaris* la especie más importante en la pesquería de pulpos de Venezuela, como ha sido señalado anteriormente (Arocha, 1989; Arocha *y col.*, 1991; González *y col.*, 2001, 2015; Eslava *y col.*, 2017)? Parece poco probable responder afirmativamente esta pregunta con base en la evidencia bibliográfica disponible para el Atlántico occidental y las observaciones hechas en esta investigación. Por ello, resulta prudente señalar que las capturas de pulpo en el país puedan tratarse de al menos dos especies distintas: *O. insularis* y *O. americanus*, y que ambas posiblemente hayan sido erróneamente identificadas como *O. vulgaris* por más de 40 años (*e.g.* Arocha y Urosa, 1982).

La presencia de especies crípticas identificadas bajo el nombre de *O. vulgaris* en aguas venezolanas había sido propuesta por Figueredo *y col.* (2014), con base en ejemplares proveniente del archipiélago de Los Frailes, los cuales estaban infestados con una posible nueva especie del género *Aggregata* Frenzel, 1885, un coccidio parásito de cefalópodos, caracterizado por una alta especificidad huésped-hospedero, cuyas características taxonómicas diferían de otras especies conocidas del género, y particularmente de *A. octopiana* (Schneider, 1875) Frenzel, 1885, único coccidio conocido como parásito de *O. vulgaris*. Por ello, es posible que los ejemplares analizados por Figueredo *y col.* (2014) correspondieran a *O. insularis*, *O. americanus* u otra especie del complejo. Un aspecto resaltante de *O. insularis* y *O. americanus*, es que, si bien ambas presentan una distribución similar en el Atlántico occidental, estas exhiben características ecológicas particulares, siendo *O. insularis* una especie de aguas cálidas y someras (entre 0,5 a 40 m de profundidad), mientras que *O. americanus* es hallada comúnmente en aguas frías y profundas (15 a 200 m de profundidad) (Avendaño *y col.*, 2020; O'Brien *y col.*, 2021).

Estas particularidades ecológicas permitirían suponer que la especie más abundante en las capturas provenientes de la pesca artesanal en los alrededores del archipiélago de Los Frailes es *O. insularis* y en menor medida, *O. americanus*, pues la pesca en esta zona se realiza en aguas someras, comúnmente por encima de los 50 m de profundidad (González *y col.*, 2015; Eslava *y col.*, 2017). La composición de las especies presentes

en la captura en esta zona sería clave para futuras investigaciones, considerando el nivel de desconocimiento que prevalece sobre este aspecto en las pesquerías de pulpos del continente (Bein *y col.*, 2023).

El hallazgo presentado en este trabajo permite establecer un punto de partida para futuras líneas de investigación orientadas al estudio de estos cefalópodos, específicamente en materia de ordenación pesquera, debido a que ambas especies pueden diferir en sus aspectos biológicos y reproductivos, ya que *O. insularis* presenta un crecimiento rápido, madurez sexual temprana y baja fecundidad, en comparación con otras especies (Leite *y col.*, 2008; Lima *y col.*, 2014; Batista *y col.*, 2022), por lo que la correcta identificación taxonómica es crucial para la definición de nuevas propuestas de manejo y conservación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Tatiana Leite (autora del taxón) (Department of Ecology and Zoology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC Brazil) por su ayuda en la confirmación visual de la especie. Al Ing. Eric Martínez y la Lcda. Ruth Vásquez (CENIPA) por la lectura crítica del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Amor, M. D., S. R. Doyle, M. D. Norman, A. Roura, N. E. Hall, A. J. Robinson, T. S. Leite y J. M. Strugnell. 2019. Genome-wide sequencing uncovers cryptic diversity and mito-nuclear discordance in the *Octopus vulgaris* species complex. *BioRxiv*. 573493: <http://doi.org/10.1101/573493>.
- Amor, M. D., M. D. Norman, Á. Roura, T. S. Leite, I. G. Gleadall, A. Reid, C. Perales-Raya, L. Chung-Cheng, C. Silvey, S. Vidal, F. Hochberg, X. Zheng y J. Strugnell. 2017. Morphological assessment of the *Octopus vulgaris* species complex evaluated in light of molecular-based phylogenetic inferences. *Zool. Scr.* 46(3): 275–288 <http://doi.org/10.1111/zsc.12207>.
- Andrade, M. P., C. M. D. Santos, M. M. M. De Paiva, S. L. S. Medeiros, C. E. O'Brien, F. D. Lima, J. Machado y T. S. Leite. 2023. Assessing Negative Welfare Measures for Wild Invertebrates: The Case for Octopuses. *Animals*. 13(3021): 2–15 <http://doi.org/10.3390/ani13193021>.
- Arocha, F. 1989. Cephalopod Resources of Venezuela. *Mar. Fish Rev.* 51(2): 47–51.
- Arocha, F., L. Marcano y R. Cipriani. 1991. Cephalopods trawled Venezuelan waters by the R/V Dr. Fridtjof Nansen in 1988. *Bull. Mar. Sci.* 49(1-2): 231–234.
- Arocha, F., y L. J. Urosa. 1982. Cefalópodos del genero *Octopus* en el area nororiental de Venezuela. *Bol. Inst. Ocean. Venez* 21(1-2): 167–189.
- Avendaño, O., Á. Roura, C. Cedillo-Robles, Á. González, R. Rodríguez-Canul, I. Velázquez-Abunader y Á. Guerra. 2020. *Octopus americanus*: a cryptic species of the *O. vulgaris* species complex redescribed from the Caribbean. *Aquat. Ecol.* 54: 909–925 <http://doi.org/10.1007/s10452-020-09778-6>.
- Batista, B., H. Matthews-Cascon, R. Marinho, E. Kikuchi y M. Haimovici. 2022. The growth and population dynamics of *Octopus insularis* targeted by a pot longline fishery in north-eastern Brazil. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 1–12.

- <https://doi.org/10.1017/S0025315421000898>
- Bein, B., F. D. Lima, H. Lazzarotto, L. A. Rocha, T. S. Leite, S. M. Q. Lima y R. Pereira. 2023. Population genomics of an *Octopus species* identify oceanographic barriers and inbreeding patterns. *Mar. Biol.* 170(161): 1–16 <http://doi.org/10.1007/s00227-023-04307-z>.
- Borges, F. O., M. Guerreiro, C. P. Santos, J. R. Paula y R. Rosa. 2022. Projecting future climate change impacts on the distribution of the '*Octopus vulgaris* species complex.' *Front. Mar. Sci.* 9:1018766: 1–26 <http://doi.org/10.3389/fmars.2022.1018766>.
- Capelo, J. C., y J. Buitrago. 1998. Distribución geográfica de los moluscos marinos en el oriente de Venezuela. *Memoria* 63: 109–160.
- Carvajal, F., y J. C. Capelo. 1993. Los moluscos de la plataforma Margarita-Coche-tierra firme (Venezuela). Su distribución y abundancia. *Memoria* 53: 1–17.
- Eslava, N., L. W. González, F. Guevara y J. M. Rodríguez. 2017. Caracterización y desempeño de la pesca artesanal del pulpo (*Octopus vulgaris*) usando potes en Venezuela. *TECNOCIENCIA Chihuahua* XI(1): 33–41.
- Figueredo, A., M. Rivero, E. Ron, J. L. Fuentes, M. Esteve y G. Mizrachi. 2014. Coccidiosis en pulpo común, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda), en aguas del nororiente de la isla de Margarita, Venezuela. *Bol. Inst. Ocean. Venez.* 53(1): 3–13.
- Flores-Valle, A., R. Pliego-Cárdenas, M. Jiménez-Badillo, J. Arredondo-Figueroa y I. Barriga-Sosa. 2018. First Record of *Octopus insularis* Leite and Haimovici, 2008 in the Octopus Fishery of a Marine Protected Area in the Gulf of Mexico. *J. Shellfish Res.* 37(1): 221–227 <http://doi.org/10.2983/035.037.0120>.
- González, L. W., N. Eslava y F. Guevara. 2001. La pesca artesanal del pulpo (*Octopus* spp.) en El Tirano, Isla de Margarita, Venezuela. *Ciencia* 9(1): 18–27.
- González, L. W., N. Eslava, F. Guevara y L. Troccoli. 2015. Biología y pesquería del pulpo *Octopus vulgaris* (Octopoda: Octopodidae) en las costas del estado Nueva Esparta, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 63(2): 427–442.
- Leite, T., M. Haimovici y J. E. L. Oliveira. 2008. Uma proposta de manejo para a pesca do polvo *Octopus insularis* Leite & Haimovici, 2008 (Mollusca: Cephalopoda) no Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. *Arq. Ciên. Mar* 41(1): 81–89.
- Leite, T. S., M. Haimovici, W. Molina y K. Warnke. 2008. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex (Cephalopoda: Octopodidae) from the tropical southwestern Atlantic. *J. Molluscan Stud.* 74: 63–74 <http://doi.org/10.1093/mollus/eym050>.
- Lima, F. D., L. E. Angeles-Gonzalez, H. Maia, T. S. Leite, I. Mari, M. L. Santana-Cisneros, M. Cahuich-I, P. Ardisson y S. M. Q. Lima. 2023. Molecular data, ecological niche, and dispersal models reveal a trans-Atlantic shallow-water octopus species. *Prog. Oceanogr.* 213. 10301: <http://doi.org/10.1016/j.pocean.2023.103019>.
- Lima, F. D., W. M. Berbel-Filho, T. S. Leite, C. Rosas y S. M. Q. Lima. 2017. Occurrence of *Octopus insularis* Leite and Haimovici, 2008 in the Tropical Northwestern Atlantic and implications of species misidentification to octopus fisheries management. *Mar. Biodiv.* 47: 723–734 <http://doi.org/10.1007/s12526-017-0638-y>.
- Lima, F. D., T. S. Leite, M. Haimovici y J. E. L. Oliveira. 2014. Gonadal development and reproductive strategies of the tropical octopus (*Octopus insularis*) in northeast Brazil. *Hydrobiologia* 725: 7–21 <http://doi.org/10.1007/s10750-013-1718-z>.
- Maloney, B., E. A. Ramos, C. O. Bennice, F. Young y M. O. Magnasco. 2023. Genetic

- confirmation of *Octopus insularis* (Leite and Haimovici, 2008) in South Florida, United States using physical features and de novo genome assembly. *Front. Physiol.* 14:1162807: 1–11 <http://doi.org/10.3389/fphys.2023.1162807>.
- O'Brien, C. E., C. O. Bennice & T. Leite. 2021. A field guide to distinguishing *Octopus insularis* and *Octopus americanus* (Octopoda: Octopodidae). *Zootaxa* 5060(4): 589–594 <http://doi.org/10.11646/zootaxa.5060.4.8>.
- Oosthuizen, A., M. Jiwaji y P. Shaw. 2004. Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. *S. Afr. J. Sci.* 100: 603–607.
- Puentes-Sayo, A., J. Torres-Rodríguez y O. Lecompte. 2022. Solving the identity of the common shallow-water octopus of the Colombian Caribbean based on the analysis of mitochondrial DNA sequence data. *J. Molluscan Stud.* 87: 1–9 <http://doi.org/10.1093/mollus/eyab039>.
- Robaina, G. 1986. *Guía práctica para el conocimiento de los pulpos de las costas de Venezuela*. Centro de Investigaciones Científicas, Universidad de Oriente, Boca del Río. Contribuciones Científicas 10. 40 pp.
- Roper, C. F. E., M. J. Sweeny y C. E. Nauen. 1984. *FAO species catalogue. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries*. Rome: FAO, 277 pp.
- Sales, J., P. Rego, A. Hildorf, A. Moreira, M. Haimovici, A. Tomás, B. Batista, R. Marinho, U. Markaida, H. Chneider y I. Sampaio. 2013. Phylogeographical Features of *Octopus vulgaris* and *Octopus insularis* in the Southeastern Atlantic Based on the Analysis of Mitochondrial Markers. *J. of Shellfish Res.* 32(2): 325–339 <http://doi.org/10.2983/035.032.0211>.
- Sauer, W. H., I. G. Gleadall, N. Downey-Breedt, Z. Doubleday, S. Leporati, M. Lipinski, U. Markaida, J. E. Ramos, R. Rosa, R. Villanueva, J. Arguelles, F. A. Briceño, S. A. Carrasco, J. Leo, C. Chen, R. Cisneros, E. Conners, A. C. Crespi-Abril, V. V. Kulik, E. N. Drobyazin, T. Emery, F. A. Fernández-Álvarez, H. Furuya, L. W. González, C. Gough, P. Krishnan, B. Kumar, T. Leite, Chung-Cheng Lu, K. S. Mohamed, J. Nabhitabhata, K. Noro, J. Petchkamnerd, D. Putra, S. Roccliffe, K.K. Sajikumar, H. Sakaguchi, D. Samuel, G. Sasikumar, T. Wada, X. Zheng, Y. Tian, Y. Pang y A. Yamrungrueng. 2019. World Octopus Fisheries. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 29:1–151 <http://doi.org/10.1080/23308249.2019.1680603>.
- Torrecilla-Batista, A., y T. S. Leite. 2016. *Octopus insularis* (Cephalopoda: Octopodidae) on the tropical coast of Brazil: where it lives and what it eats. *Brazilian J. Oceanogr.* 64(4): 353–364.
- Warnke, K., R. Siller, D. Blohm y U. Saint-Paul. 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda): indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 42: 306–312.
- WoRMS Editorial Board. 2023. *World Register of Marine Species*. Publicación electrónica: <http://www.marinespecies.org>.

INFORMACIÓN GENERAL. *Acta Biologica Venezuelica* es una revista científica, especializada, arbitrada e indizada, editada por el Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. *Tiene por objeto la publicación de trabajos originales de investigación en las diferentes áreas de la Biología.* Los manuscritos remitidos a la revista deberán ser inéditos y no estar siendo considerados para su publicación en otros medios. Se consideran (a) Artículos escritos en español, inglés y portugués, (b) Revisiones Invitadas, (c) Revisiones libres, (d) Trabajos Seriados, cuando el autor(es) remita la serie completa de manuscritos, (e) Notas Científicas, de menos de 10 páginas y (f) Trabajos y/o Revisiones producto de eventos científicos o Jornadas de investigación. La revista se edita en dos números que constituyen un volumen anual.

PREPARACIÓN DE MANUSCRITOS. Los manuscritos estarán escritos en español, inglés o portugués, tamaño carta y a doble espacio. Cada trabajo constará de: Título (español e inglés), Autor(es), Resúmenes (español e inglés), Palabras clave (español e inglés), Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Literatura Citada. Los trabajos que carezcan de alguna(s) de dichas secciones también seguirán ese orden. Se deberá enviar el manuscrito completo (texto, tablas y figuras) en versión electrónica al correo: acta.biol.ven@gmail.com.

Título. La primera página del manuscrito incluirá el título del trabajo en el mismo idioma que el texto, además deberá incluir el título en inglés o español dependiendo del idioma utilizado en el cuerpo del trabajo. El título debe ser breve (máximo 15 palabras), específico y dar una idea clara del propósito del trabajo; no contendrá nombres de autoridades ni fechas de los nombres científicos. Deberá incluir igualmente el nombre del autor(es), correo electrónico, título abreviado (running head) e indicar el autor de correspondencia.

Palabras clave. Se deberán suministrar un máximo de 5 palabras en español e inglés, diferentes de las que aparecen en el título.

Resumen. Se requiere un resumen en español y otro en inglés, cada uno de 250 palabras como máximo. Deberán aparecer en ese orden y en ellos deberá indicarse el objetivo, los principales resultados y las conclusiones del trabajo.

Texto. Se deberá utilizar letra Times New Roman de 12 puntos. Los márgenes deberán ser al menos 2.5 cm. Todas las páginas del trabajo deberán numerarse en forma consecutiva y toda medida deberá referirse al Sistema Métrico Decimal Internacional. Los nombres científicos en itálicas (cursivas). Ninguna porción del texto deberá subrayarse. Se recomienda no usar notas al pie de página. Trate de evitar el uso de caracteres especiales y/o de difícil reproducción. Las Tablas y Figuras deberán incluirse en el texto en el lugar de la cita.

Tablas. Las tablas deberán presentarse incluidas en el texto en el lugar de su cita, en arte final, numeradas en orden consecutivo, sin líneas verticales. La información contenida en las tablas no deberá repetirse en el texto o las figuras.

Figuras. Las figuras deberán presentarse incluidas en el texto en el lugar de su cita, se numerarán en el texto en orden consecutivo (ejemplo: Figura 1, Figura 2a), en formato de imagen (escalas de grises o color). Todo mapa, foto o dibujo debe incluir una escala gráfica. Evitar caracteres especiales o de difícil reproducción para indicar áreas en las figuras. Las leyendas de las figuras deberán ser explícitas, escritas a doble espacio dentro del Manuscrito.

Agradecimientos y apéndices. Los agradecimientos (si los hubiere) se colocarán al final del manuscrito y anterior a la literatura citada. Sólo se publicarán apéndices si es estrictamente indispensable y si su contenido se discute en el texto. Los mismos se ubicarán al final del trabajo.

Citas. Se utilizará el sistema internacional o método de citas en el texto, por ejemplo, (Scorza, 1968); Scorza (1968); (Menezes y Vanzoler, 1992); Menezes y Vanzoler (1992); (Scorza *y col.*, 1998); Scorza *y col.* (1998), citados en orden cronológico desde el más antiguo.

Literatura citada. Se incluirán en esta sección sólo los trabajos citados en el texto, según los siguientes formatos:

Revistas:

Scorza, J.V. 1968. Observaciones sobre las aves del Parque Canaima. *Acta Biol. Venez.* 15(2):1-14.

Scorza, J.V., R. Ramírez y F. Tejero. 1998. *Culex* un problema de salud en el Valle de Caracas. *Acta Biol. Venez.* 20(3):23-30.

Libros: Pearsall, N.H. 1950. Mountains and Moorlands. London, Collins Publ., 375 pp.

Capítulos de libros: Menezes, N. y P. Vanzoler, 1992. Reproductive Characteristics of Characiformes. En: *Reproductive Biology of South American Vertebrates* (W. Hamnlett, Ed.), Springer Verlag. Cap. 4:60-70.

Publicaciones electrónicas: Parliament of South Australia. 2000. Inquiry into Tuna Feedlots at Louth Bay. Environment, Resources, and Development Committee, 38th Report, 3rd Session of 49th Parliament. Adelaide, South Australia. www.parliament.sa.gov.au.

COSTO DE PÁGINA Y SEPARATAS. *Acta* no solicita ningún cobro por concepto de publicación.

CORRESPONDENCIA Y DIRECCIÓN: Toda la correspondencia deberá dirigirse a: Dra. Ana Bonilla - Directora-Editora *Acta Biologica Venezuelica*. Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas 1041-A, Venezuela. Teléfono: 58-212-6051208. Correo: acta.biol.ven@gmail.com.

ACTA BIOLOGICA VENEZUELICA, Vol. 43 (2) 2023

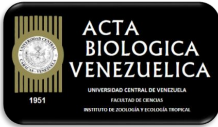
Diagramación: Ana Bonilla
Julio de 2024
Instituto de Zoología y Ecología Tropical - UCV

Publicación electrónica de libre acceso
mediante el portal SABER-UCV:

http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revista_abv

y la página web del Instituto de Zoología y Ecología Tropical:

izt.ciens.ucv.ve



Acta Biologica Venezolana

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA - FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA Y ECOLOGÍA TROPICAL

http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revista_abv/issue/archive

Vol. 43, No. 2, Jul-Dic2023

Vol. 43, No. 2, Jul-Dec2023

Dep. Legal 195102DF414 – VEISSN 0001-5326

CONTENIDO

EDITORIAL

Merentes. CÉLULAS MADRE EN LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS i

ARTÍCULOS

Díaz *y col.* PRIMER REGISTRO CONFIRMADO DEL PETREL CENICIENTO *Calonectris diomedea borealis* EN VENEZUELA 127

Peña-Colmenarez y Gordon-Colón. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Mauritia flexuosa* EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO TIGRE (ANZOÁTEGUI, VENEZUELA) 137

Rodríguez *y col.* DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS DEL TEJIDO ADIPOSEO HACIA EL LINAJE EPITELIAL 163

Navarro *y col.* MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO BIOSUSTRATO TRIDIMENSIONAL 179

Colmenares *y col.* CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS GERMINALES DE TESTÍCULO DE RATÓN 197

Rodríguez *y col.* PRIMER REGISTRO DE *Octopus insularis* (CEPHALOPODA, OCTOPODIDAE) EN LA REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA 213

CONTENTS

EDITORIAL

Merentes. Stem cells in tissue bioengineering i

ARTICLES

Díaz *et al.* First confirmed record of Cory's Shearwater *Calonectris diomedea borealis* in Venezuela 127

Peña-Colmenarez and Gordon-Colón. Population structure of *Mauritia flexuosa* in the upper basin of the Tigre River (Anzoategui, Venezuela) 137

Rodríguez *et al.* Differentiation of human mesenchymal stem cells adipose tissue into the epithelial lineage *in vitro* 163

Navarro *et al.* Human Amniotic Membrane like Three-dimensional Biosubstrate 179

Colmenares *et al.* Characterization of the primary culture of mouse testicle germ cells 197

Rodríguez *et al.* First record of *Octopus insularis* (Cephalopoda, Octopodidae) from Bolivarian Republic of Venezuela 213

INSTITUTO DE ZOOLOGÍA Y ECOLOGÍA TROPICAL - FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA - CARACAS, VENEZUELA

