

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE LA METAMORFOSIS DE LA GALLETA DE

MAR *Dendraster excentricus* Y EL ERIZO *Arbacia incisa*

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA

OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DORA BEATRIZ CRISTINO JORGE

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. OCTUBRE 2012.

Rutas de señalización durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus* y el erizo *Arbacia incisa*

Resumen

La metamorfosis en invertebrados marinos es un evento dramático, las larvas dejan atrás un hábitat en la columna de agua y pasan al bentos con características morfológicas y fisiológicas distintas. Los procesos que tienen participación durante este evento de metamorfosis deben tener una coordinación para garantizar la funcionalidad de la postlarva. En el presente trabajo se obtuvo información sobre el posible involucramiento de los procesos de transcripción y traducción en la galleta de mar *Dendraster excentricus*. Así mismo se caracterizaron parcialmente las rutas de señalización de hormonas tiroideas y del óxido nítrico para la especie mencionada y su posible interacción. A su vez este trabajo presenta resultados iniciales sobre el rol del K^+ durante la metamorfosis del erizo negro *Arbacia incisa*. Los resultados se basan en experimentos realizados con larvas competentes de *D. excentricus* expuestas en un baño de soluciones con fármacos activadores e inhibidores de la metamorfosis de las rutas mencionadas, mientras que se utilizaron diferentes concentraciones de KCl para la inducción de *A. incisa*. Los resultados de este trabajo suma la respuesta en *D. excentricus* a otras especies de equinodermos, donde los eventos de transcripción y traducción son requeridos para la consolidación y crecimiento de las estructuras juveniles como las espinas. Nuestro resultado sugiere que la señalización de las hormonas tiroideas se encuentra río abajo de la ruta del óxido nítrico en la galleta de mar. Por su parte *A. incisa* responde solamente de manera parcial a la inducción a la metamorfosis en presencia de KCl, la cual se manifiesta con la presencia de estructuras larvales aún después de ser inducida con KCl. La respuesta en *A. incisa* al KCl como inductor de la metamorfosis, es poco usual en invertebrados en general y también en especies de equinodermos en los que se ha utilizado. Lo anterior sugiere que la regulación neuronal de la metamorfosis en esta especie difiere del resto de las especies en donde el KCl ha sido utilizado como inductor de la metamorfosis. Los resultados de este trabajo, aclaran la posible interacción entre diversas rutas de señalización y abre nuevas interrogantes respecto a la interacción de los mecanismos de señalización celular involucrados durante la metamorfosis en *D. excentricus* así como la coordinación de los mismos.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DURANTE LA METAMORFOSIS DE LA GALLETA DE
MAR *Dendraster excentricus* Y EL ERIZO *Arbacia incisa*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

DORA BEATRIZ CRISTINO JORGE

Aprobada por:


Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Director de tesis


Dra. Rosa Reyna Mourillo Pérez

Sinodal


Dr. Zaul García Ezquivel

Sinodal

Agradecimientos

A mi director de tesis Dr. Eugenio Carpizo por abrirme las puertas de su laboratorio. Por asesorarme y por su paciencia.

A mis sinodales Dra. Rosa Mouriño Pérez y el Dr. Zaul García Ezquivel por enriquecer este trabajo.

A la Dra. Ivone Giffard Mena por todo su apoyo para mi ingreso al programa.

Al M. C. Roberto Escobar Hernández por todo su apoyo.

Al M. C. Marco Aurelio González por tu valioso tiempo y disposición para ayudarme.

A quienes fueron mis compañeros del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo por todo su apoyo. A Luvia, Polo, Raquel, Paola, Carlos, Juan Antonio.

A mis compañeros del área de estudiantes en el IIO por la camaradería y su apoyo.

A mis compañeros de la maestría, por su solidaridad y apoyo.

Al Dr. Enrique Valenzuela por el alimento que su laboratorio proporcionó para mis cultivos.

A CONACyT por la beca número 329517 otorgada, para realizar mi maestría.

Al Proyecto interno IIO 533.

Quiero agradecer enormemente a mi familia. Mis hijos y esposo por todas las porras.

Agradezco a mis padres por darme la vida y por sus enseñanzas. A mis hermanos, particularmente a Oly. Gracias a toda mi familia.

Agradezco a todos los que se me escapan y no los he mencionado y que de alguna manera han contribuido a mi formación profesional.

Contenido

Resumen.....	ii
Agradecimientos.....	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Introducción.....	1
Objetivos general.....	5
Objetivos particulares.....	5
Capítulo I. Transcripción, traducción y las rutas de señalización hormonas tiroideas y óxido nítrico durante la metamorfosis de <i>Dendroaster excentricus</i>	6
I.1 Introducción.....	6
I.2 Metodología.....	14
I.2.2 Desarrollo de los experimentos	14
I.3 Farmacología.....	17
I.4 Análisis estadístico.....	21
I.5 Resultados	22
Inducción a la metamorfosis con DRB (inhibidor de la síntesis de mRNA) y emetina (inhibidor de la síntesis de proteínas).....	22
Fármacos que documentan la participación de la ruta del óxido nítrico durante la metamorfosis de galleta de mar <i>Dendroaster</i> <i>excentricus</i>	32
Combinación de activadores-inhibidores de THS así como del NO	36
I.4 Discusión.. ..	40

Capítulo II. El papel del KCl en la inducción a la metamorfosis del erizo negro <i>Arbacia incisa</i>	46
II.1 Introducción.....	46
II.2 Metodología.....	48
II.2.1 Diseño experimental	48
II.3 Análisis estadístico.....	51
II.4 Resultados	53
II.5 Discusión.....	60
Discusión Final.....	63
Conclusiones.....	66
Referencias.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las rutas de señalización del NO y THs. El posible efecto inductor o inhibidor de los fármacos utilizados en las rutas o en los procesos básicos de síntesis de mRNA y síntesis de proteínas, así como el efecto del potasio durante la metamorfosis de <i>Arbacia incisa</i>	4
Figura 2. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de larvas de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas a las 24 y 46 h después de incubar las larvas con DRB (10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} M), (N=3).	23
Figura 3. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>D. excentricus</i> evaluadas a las 24 h después de incubar las larvas en presencia de emetina (10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} M), (N=3).	26
Figura 4. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> 18 h después de exposición a diferentes concentraciones de tiourea como inhibidor (N=3).	29
Figura 5. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas 18 y 33 h después de exposición a diferentes concentraciones de tiroxina como inductor de la metamorfosis. (N=3)... ..	31
Figura 6. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas a las 20 y 40 h después de su exposición a diferentes concentraciones de L-NAME como inductor de la metamorfosis (N=3).	33
Figura 7. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas a las 20 y 44 h después de ser expuestas a diferentes concentraciones de SNAP como inhibidor (N=3)..	35
Figura 8. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas a las 22 h después de incubar las larvas con SNAP por dos h y posteriormente agregar tiroxina a una concentración constante de 10^{-7} M, en donde permanecieron con ambos fármacos hasta su evaluación	

(N=3).....	37
Figura 9. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> evaluadas a las 22 h de incubar las larvas con tiourea por dos horas a una concentración constante de 10^{-3} M, posteriormente se agregó L-NAME (10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} M), permaneciendo juntos inhibidor más L-NAME hasta su evaluación (N=3).	39
Figura 10. Metamorfosis completa en erizo negro <i>Arbacia incisa</i> ...	52
Figura 11. Efecto parcial del KCl en <i>A. incisa</i>	54
Figura 12. Porcentaje de metamorfosis de <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> y <i>Arbacia incisa</i> evaluadas 20 h después de exposición a diferentes concentraciones de KCl como inductor (N=3).	57
Figura 13. Porcentaje de metamorfosis de galleta de mar <i>Dendraster excentricus</i> y <i>Arbacia incisa</i> en evaluación 23 y 47 h después de exposición a diferentes concentraciones de KCl, (N=3).	59

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Rol biológico del NO en invertebrados marinos	12
Tabla II. Fármacos que participan en las rutas de señalización de NO y HTs utilizados durante el presente estudio en <i>Dendraster excentricus</i>	18
Tabla III. Efecto de los fármacos utilizados para probar la participación de las rutas del NO y THs durante la inducción a la metamorfosis de la galleta de mar <i>D. excentricus</i>	27

Introducción

La metamorfosis en invertebrados marinos ha sido tema de estudio durante décadas. Los procesos que participan durante este evento no se han logrado documentar por completo. La metamorfosis en invertebrados marinos es un evento usualmente rápido y cambia la morfología y en muchos casos el hábitat de los organismos, pasando de una forma larvaria a una juvenil con características morfológicas y fisiológicas distintas (Pechenik *et al.* 1998). Para que la metamorfosis se inicie, normalmente el organismo recibe una señal del medio ambiente. Estas señales pueden ser naturales o artificiales. Posteriormente la señal debe ser interpretada al interior celular del organismo mediante rutas de señalización, que desencadenan una serie de eventos morfogenéticos que culminan con la formación de la postlarva (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003).

La señalización celular es un sistema dinámico. Involucra la percepción de la señal en la membrana celular mediante receptores en la misma. Este acoplamiento con receptores membranales, desencadenan la activación de una serie de eventos de transducción que culminan con la activación de la expresión genética y su posterior síntesis de proteínas que modulan el desarrollo (Hadfield *et al.* 2001).

Dentro de los eventos básicos que a nivel celular pueden participar en el proceso de transición de larva a juvenil se encuentran la síntesis de mRNA y síntesis de proteínas. Estos procesos han sido previamente estudiados en invertebrados marinos, donde se ha encontrado que la síntesis de nuevos mRNA y proteínas es restringida durante las primeras fases de la metamorfosis y solo se requieren cuando la larva requiere la formación de nuevas estructuras. Dentro de los grupos de invertebrados marinos podemos mencionar el nudibranquio *Phestilla sibogae* (Del Carmen y Hadfield, 1999), el poliqueto *Hidroides elegans* (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003), el erizo de mar *Lytechinus pictus* (Amador-Cano, 2007). Los antecedentes mencionados llevan a preguntarnos si la galleta de mar *Dendraster excentricus* requiere de la transcripción y traducción como ha sido documentado en otros invertebrados marinos.

En la señalización celular participan diversas rutas de transducción durante la metamorfosis de invertebrados marinos (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Amador-Cano *et al.* 2006). Dentro de las rutas de señalización que han tenido participación durante la metamorfosis de invertebrados marinos podemos mencionar las siguientes: el sistema del

Phosphatidylinositol/Diacylglycerol/Proteína Quinasa C ha sido documentado en *Haliotis rufescens* (Hadfield, 1998, Hadfield, *et al.* 2000) *Hydroides elegans* (Holm *et al.* 1998; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003); receptores acoplados a proteínas G en *Pocillopora damicornis*,

Montipora capitata (Tran y Hadfield, 2012), *Strongylocentrotus purpuratus* (Amador-Cano *et al.* 2006), *Hydroides elegans* (Holm *et al.* 1998); la ruta del Óxido Nítrico/(cAMP) en *Lytechinus pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001, 2003); la ruta de las Hormonas Tiroideas en *Clypeaster rosaceus* (Heyland *et al.* 2006), *Peronella japonica*, *D. excentricus* (Heyland y Hodin, 2004). Las dos últimas rutas mencionadas se trabajaron en el presente estudio, la ruta de señalización del óxido nítrico y el de las hormonas tiroideas (NO y THs) por sus siglas en ingles respectivamente. Bishop y Brandhorst (2001) reportan que el sistema del NO/cGMP es un importante regulador de los eventos que conllevan la transición de la forma larvaria a juvenil en *L. pictus*. Estos mismos autores mencionan que el cGMP es producto de la producción del NO lo cual modula la metamorfosis en *L. pictus*.

A su vez dentro de los inductores artificiales que promueven la metamorfosis de invertebrados marinos se encuentra el cloruro de potasio (KCl), el cual ha sido documentado en inducir la metamorfosis en una gran variedad de organismos incluyendo equinodermos (Carpizo-Ituarte *et al.* 2002). Sin embargo, la respuesta obtenida en este trabajo de la especie de erizo negro *A. incisa* a la inducción a la metamorfosis con KCl parece ser diferente. La figura 1, muestra la posible relación de las rutas de señalización durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus* y el erizo *Arbacia incisa*

Este estudio incluye dos apartados. El capítulo I comprende la respuesta de larvas competentes de galleta de mar, *Dendraster excentricus* ante inhibidores de síntesis de mRNA y de síntesis de proteínas. Lo anterior para tratar de dilucidar si la transcripción y traducción se requieren durante la metamorfosis de la galleta de mar

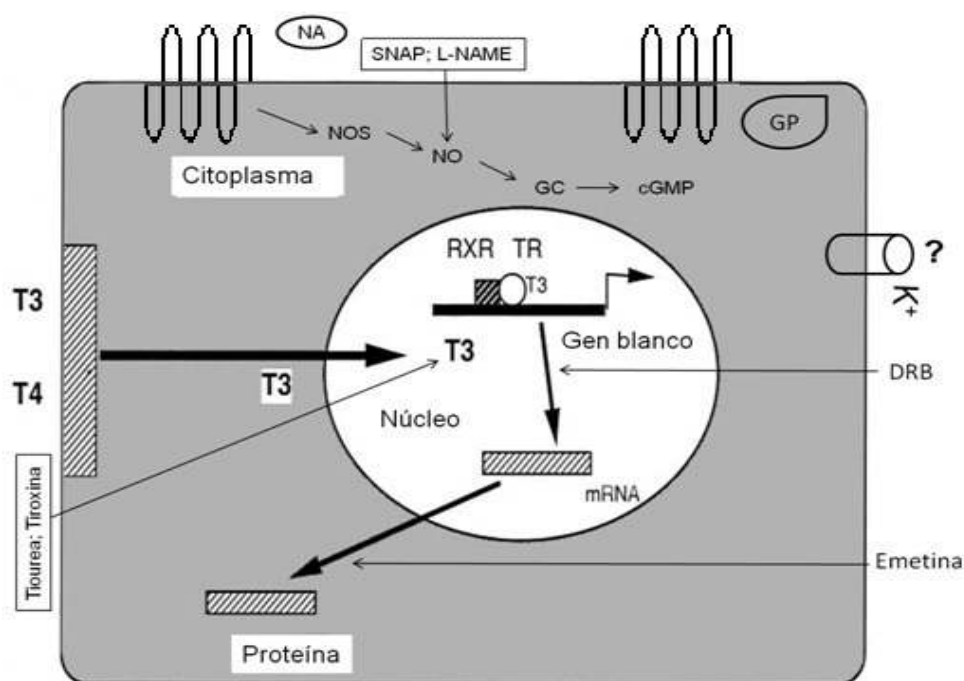


Figura 1. Esquema de las rutas de señalización del NO y THs. El posible efecto inductor o inhibidor de los fármacos utilizados en las rutas o en los procesos básicos de síntesis de mRNA y síntesis de proteínas, así como el efecto del potasio durante la metamorfosis de *A. incisa* (Modificado de Yen, 2001).

El capítulo II de este trabajo comprende la respuesta del erizo *A. incisa* a la inducción a la metamorfosis con KCl, dado que notamos en experimentos previos que responde parcialmente a la inducción con esta solución respecto a

otros equinoideos. Ésta fue la razón por la que describimos su respuesta a este compuesto y discutimos las posibles implicaciones.

Objetivos

I.1 General

- Documentar la posible participación de la transcripción y traducción durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus*, caracterizar de manera parcial las rutas de señalización que la modulan, así como determinar la participación del KCl durante la metamorfosis de erizo negro *Arbacia incisa*.

Objetivos Particulares

1. Establecer la interacción de las rutas de señalización del NO y THs durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.
2. Determinar la participación de procesos de transcripción y síntesis de proteínas durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus*.
3. Establecer el rol del KCl durante la inducción de la metamorfosis de *Arbacia incisa*.

CAPITULO I

Transcripción, traducción y las rutas de señalización hormonas tiroideas y óxido nítrico durante la metamorfosis de *Dendraster excentricus*

I.1 Introducción

La galleta de mar *Dendraster excentricus* es uno de los invertebrados más abundantes de la costa arenosa del Noroeste del Pacífico (Merrill y Hobson, 1970; Mooi, 1997). Se distribuye desde Alaska, hasta Bahía Almejas en Baja California Sur. Su hábitat es en sustrato arenoso de playas semi expuestas al oleaje. Particularmente la encontramos al sur de la ciudad de Ensenada en Baja California, en el Estero de Punta Banda (32° 21' N y a 116° 53' O) donde es posible obtener organismos adultos durante casi todo el año en periodos de marea baja.

El periodo larvario de la galleta de mar dura aproximadamente de catorce a dieciocho días en condiciones de laboratorio y a una temperatura promedio de 18 °C y recientemente ha sido descrito para las poblaciones locales por Olivares-Bañuelos *et al.* (2012). Alcanza el estadio competente con un rudimento bien desarrollado, el cual abarca el lado izquierdo de la larva, así como el acortamiento de los brazos larvarios. Características anteriores que le confieren la capacidad de responder a estímulos para metamorfosearse. Las señales ambientales en *D. excentricus* que inducen a la metamorfosis se ha

documentado están relacionadas con el medio ambiente donde habitan los adultos (Burke, 1980).

El desarrollo de la galleta de mar al igual que otros equinodermos u otros grupos de invertebrados como insectos, y vertebrados como los anfibios incluyen una transición dramática durante la metamorfosis. Involucran cambios en la morfología, fisiología y hábitat (Heyland *et al.* 2005; Bishop *et al.* 2006; Heyland y Moroz, 2006). Usualmente, el período larvario incluye una etapa precompetente seguida de otro de competencia, en donde las larvas son capaces de responder a estímulos para metamorfosearse (Hadfield *et al.* 2001). La característica principal en la etapa competente de las larvas de equinoideos es la presencia del rudimento que la larva ha terminado de formar del lado izquierdo y que constituye el primordio de la postlarva. La capacidad de las larvas competentes para responder a señales medioambientales específicas les confiere la posibilidad de seleccionar el sustrato adecuado para el asentamiento y metamorfosis. El proceso de conversión de señales desde el exterior celular y que se traduce en respuestas al interior de las células se le conoce como rutas de transducción. Las rutas de transducción interactúan para integrar y regular el flujo de información que desencadena respuestas celulares complejas culminando con la formación de la postlarva (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003).

La metamorfosis como culminación del desarrollo larvario, requiere una gran coordinación entre diversos procesos ontogénicos. Uno de estos eventos involucra procesos básicos a nivel celular que incluyen la transcripción y

traducción, los cuales han sido documentados durante la metamorfosis de diversos invertebrados y pensamos que la galleta de mar puede responder en forma semejante.

Sin embargo, hasta el momento es todavía poca la información que hay sobre el papel que juegan la transcripción y síntesis de proteínas durante la metamorfosis de muchos invertebrados marinos. Se ha demostrado que una reducción sustancial en la síntesis de mRNA y proteínas, no fueron capaces de inhibir el inicio de las transformaciones morfogénicas durante la inducción a la metamorfosis en el poliqueto serpúlido *Hydroides elegans* (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003). Estos autores reportan, que en presencia de un inductor natural (biopelícula) o artificial (KCl) y en presencia de inhibidores de mRNA y proteínas, las larvas competentes de *H. elegans* fueron capaces de asentarse en el fondo del recipiente, secretar el tubo primario que requieren para fijarse al sustrato e iniciar los cambios morfológicos que incluyen la reabsorción de la corona ciliar larval, la elongación de la región caudal y la diferenciación del collar que divide la región cefálica de los segmentos de la postlarva metamorfoseada; sin embargo, fueron insuficientes para inhibir la diferenciación de la corona branquial, que es la estructura fundamental para filtrar alimento durante su desarrollo postlarvario, juvenil y adulto y la cual requiere nueva síntesis de mRNA y proteínas para su diferenciación (Carpizo-Ituarte y Hadfield 2003). En larvas competentes del erizo de mar *Lythechinus pictus* los inhibidores de la síntesis de mRNA y proteínas (DRB y emetina) activaron la

metamorfosis de esta especie en forma dosis dependiente (Amador-Cano, 2007).

A su vez THs juegan un papel fundamental en diferenciación y metabolismo de organismos vertebrados en general. Son requeridas para las funciones normales de todos los tejidos, y tienen un efecto en el consumo de oxígeno y tasa metabólica (Oppenheimer *et al.* 1987). Las THs regulan una variedad de funciones como crecimiento desarrollo y metabolismo (Heyland *et al.* 2005) y se ha documentado orquestan la metamorfosis de lampreas y anfibios (Manzon *et al.*, 2001; Youson, 2003). En insectos los principales reguladores del comportamiento, fisiología y los procesos de desarrollo son hormonas señalizadoras denominadas ecdisteroides y hormonas juveniles (De Loof, 2008).

Las THs son moléculas pequeñas hidrofóbicas que difunden a través de la membrana. Actúan a nivel del núcleo de la célula, mediante el acoplamiento a receptores nucleares, interaccionan directamente con el DNA y son las responsables entonces de activar genes blanco. Regulan directamente la activación de mensajeros específicos para la síntesis de proteínas.

Las THs, se han investigado durante los cambios metamórficos en diversos equinoideos (Heyland *et al.* 2005). La tiroxina es una de las hormonas tiroideas que puede acelerar el desarrollo de la metamorfosis en equinoideos (Heyland y Hodin, 2004; Heyland y Moroz, 2005; Heyland *et al.* 2006b). La

respuesta a la tiroxina se ha documentado anteriormente en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO, en larvas competentes de dos gasterópodos *Lythopoma undosa* y *Haliotis* spp (Carpizo-Ituarte y De la Rosa-Vélez, 2003) y en erizo de mar *Strongylocentrotus* spp. y *Lytechinus pictus* (Castellanos-Kotkoff, 2004). A su vez otros autores sugieren que algunas especies de equinoideos pueden sintetizar internamente las hormonas (Saito *et al.*, 1998; Heylan *et al.* 2006a).

Por su parte el NO en mamíferos, es una molécula señalizadora intercelular, la cual tiene una variedad de funciones, en el sistema nervioso, cardiovascular e inmune (Moncada *et al.* 1991). Asimismo el sistema del NO ha documentado que participa en una variedad de funciones biológicas en diversos invertebrados marinos (Tabla I).

Bishop y Brandhorst (2001), reportan que el sistema del óxido nítrico/monofosfato de guanosín cíclico (NO/cGMP) es un importante regulador de los eventos alrededor de la transformación de la larva a juvenil en el erizo *Lytechinus pictus*. Este sistema puede ser iniciado por una señal natural asociada a biopelículas y su regulación parece ser dependiente de la interacción entre la proteína “heat shock” 90 (HSP 90), la oxido nítrico sintetasa (NOS) y el sistema de la guanilato ciclasa. El sistema de señalización del (NO/cGMP) actúa como un represor del asentamiento. Lo anterior parece ser una característica común en gasterópodos como *Ilyanassa obsoleta* (Froggett y Leise, 1999); ascidios, cordados: tunicados como *Boltenia villosa* y

Cnemidocarpa finmarkiensis (Bishop *et al.* 2001) así como en equinodermos *Lytechinus pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001).

Tabla I. Rol biológico del NO en invertebrados marinos (Modificado de Palumbo, 2005).

Fila	Especie	Rol biológico	Referencia
Porifera	<i>Axinella polypoides</i>	Estrés medioambiental	Giovine <i>et al.</i> , 2001
	<i>Petrosia ficiformis</i>		
Cnidarios	<i>Aglantha digitale</i>	Nado	Moroz <i>et al.</i> , 2004
	<i>Aiptasia diaphana</i>	Descarga de nematocistos	Salleo <i>et al.</i> , 1996
Artrópoda	<i>Limulus polyphemus</i>	Agregación de hematocitos	Radomski <i>et al.</i> , 1991
Moluscos	<i>Aplysia californica</i>	Respuesta a la alimentación	Moroz, 2000
	<i>Pleurobranchaea californica</i>		
	<i>Aplysia californica</i>	Memoria	Katzoff <i>et al.</i> , 2002
	<i>Clione limacina</i>	Respuesta al alimento	Moroz <i>et al.</i> , 2000
		Movimiento	
	<i>Ilyanassa obsoleta</i>	Metamorfosis	Leise <i>et al.</i> , 2004
	<i>Ruditapes decussatus</i>	Defensa	Tafalla <i>et al.</i> , 2003
	<i>Mytilus edulis</i>	Defensa	Stefano y Ottaviani, 2002
			Franchini <i>et al.</i> , 1995;
	<i>Euprymna scolopes</i>	Simbiosis	Ottaviani <i>et al.</i> , 1993
	<i>Octopus vulgaris</i>		Davidson <i>et al.</i> , 2004
	<i>Sepia officinalis</i>	Aprendizaje visual y táctil	Robertson <i>et al.</i> , 1994, 1996
Equinodermos	<i>Lytechinus pictus</i>	Fertilización	Fiore <i>et al.</i> , 2004;
	<i>Psammechinus miliaris</i>		
	<i>Lytechinus pictus</i>	Metamorfosis	
			Palumbo <i>et al.</i> , 2000, 1999
			Di Cosmo <i>et al.</i> , 2000
Cordados	<i>Ciona intestinalis</i>	Canales de fertilización	Halm <i>et al.</i> , 2003
	<i>Boltenia villosa</i>	Metamorfosis	Schipp y Gebauer, 1999
	<i>Cnemidocarpa finmarkiensis</i>		Tu and Budelmann, 2000

La importancia biológica en invertebrados marinos del NO ha sido reportada en equinodermos donde participa en la fertilización de *Lytechinus pictus* y *Psammechinus miliaris* (Leckie *et al.* 2003); regulación de la metamorfosis en ascidios (Bishop *et al.* 2001) y erizos (Bishop y Brandshorst, 2001).

El NO es una molécula pequeña hidrofóbica que se difunde a través de la membrana en mamíferos y una vez dentro actúa sobre enzimas específicas. La señalización del NO es funcional y evolutivamente conservada entre diversos fila de invertebrados marinos (Palumbo, 2005).

Hasta el momento, no se ha documentado si existe una relación entre el efecto inductor de las hormonas tiroideas y la ruta del NO durante la metamorfosis en la galleta de mar *Dendraster excentricus*. Por lo que dado que las THs actúan a nivel núcleo en la célula, es muy posible que la ruta de señalización de la metamorfosis asociada con las THs se encuentre cascada abajo de la ruta de señalización del NO. Lo anterior sería suficiente entonces para activar la metamorfosis en *D. excentricus*.

I.2 Metodología

I.2.1 *Diseño experimental*

Como una primera aproximación para entender la regulación de la metamorfosis posiblemente mediada por la ruta de la tiroxina o por la del NO, se probaron los fármacos en forma individual para verificar su efecto en la inducción de la metamorfosis de la galleta de mar *D. excentricus*. Las concentraciones que se utilizaron en los experimentos, fueron de acuerdo a los antecedentes sobre el efecto de estos fármacos para otras especies de equinoideos y experiencias previas en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo. Posteriormente se hicieron combinaciones entre inhibidores y activadores de las dos rutas mencionadas anteriormente, para probar su posible interacción. Para la llevar a cabo el presente trabajo se realizaron seis experimentos en promedio para probar cada uno de los fármacos por separado. En cada uno de los experimentos se incluyeron los tratamientos con sus respectivas concentraciones descritas en la Tabla II. El diseño experimental incluyó cajas multipozos (Falcon), con 3 réplicas por tratamiento. En cada uno de los tratamientos se agregaron aproximadamente 30 larvas competentes en cada una de las réplicas y la duración de los experimentos varió entre 24 y 48 h que es cuando se realizó la evaluación de los mismos.

I.2.2 Desarrollo de los experimentos

Se obtuvieron aproximadamente 80 organismos adultos de galleta de mar *D. excentricus* y 100 de erizo negro *A. incisa*, en la zona costera de la Bahía de Todos Santos, en Ensenada B.C. (32° 21' N y a 116° 53' O). Las tallas fueron aproximadamente de seis y cuatro centímetros de testa respectivamente. Una vez recolectados los organismos se transportaron al laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC, donde se mantuvieron en estanques con un sistema abierto de agua de mar y a una temperatura de 16°C en promedio. A partir de estos organismos se obtuvieron los gametos para la obtención de larvas competentes utilizadas en los experimentos con ambas especies.

La inducción al desove de los reproductores de ambas especies, se realizó mediante el método descrito por Hinegardner (1969). Los erizos se inyectaron a través de la membrana peristomal con una solución de KCl a una concentración de 0.53 M. El volumen inyectado fue de 1 a 2 ml dependiendo del tamaño del organismo de acuerdo con lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). Los organismos se colocaron individualmente con el hemisferio oral hacia arriba, sobre recipientes de vidrio de 50 ml, previamente llenados con agua de mar filtrada hasta 1 µm e irradiada con luz UV (AMF), de manera que los gametos expulsados fueran recolectados en dichos recipientes.

Una vez que los organismos expulsaron sus gametos, se llevó a cabo la fertilización mediante el método descrito por Strathmann (1987). En forma separada los gametos masculinos y femeninos de cada uno de los frascos se concentraron en vasos de precipitado de 500 ml pasándolos previamente por un tamiz de 430 μm de luz de malla para eliminar material orgánico contaminante. Posteriormente se llevo a cabo la fertilización. Los óvulos en presencia de espermatozoides, se dejaron en contacto durante 10 minutos para garantizar la fertilización, la cual se corroboró por la formación de la membrana de fertilización. Una vez fertilizados los huevos, se eliminó el exceso de espermatozoides pasando los cigotos por un tamiz de 50 μm de luz de malla. Los óvulos fertilizados (cigotos) se colocaron en cubetas de plástico de 18 l con AMF donde se mantuvieron durante 48 h, tiempo en el que la mayoría de las larvas alcanzaron el estadio de prisma.

Las larvas prisma se colocaron en estanques cónicos de 45 l, donde se mantuvieron en AMF. La concentración inicial en los estanques fue de 4 larvas/ml. El periodo precompetente tuvo una duración de entre 14 a 18 días para las larvas de galleta de mar (*D. excentricus*) y de más de 60 días para las larvas de erizo negro (*A. incisa*). El intervalo de temperatura a las cuales las larvas se mantuvieron fue de 14-20.5°C para ambas especies. Las larvas se alimentaron con la microalga *Rhodomonas* sp. con una ración diaria de 10,000 cel/ml durante la primera semana, y de 15,000 cel/ml durante el resto del

periodo de desarrollo. En los cultivos se realizaron recambios de agua al 50% del volumen total cada segundo día y del 100% cada tercer día.

Se determinó el estadio de la competencia de las larvas por la presencia del rudimento juvenil, que en esta etapa ocupa una parte importante a la izquierda del cuerpo de la larva, en donde se apreciaban los cinco pies ambulacrales desarrollados y la tendencia a estar cerca del fondo como lo describen Burke (1980) y Carpizo-Iltuarte *et al.* (2002).

I.3 Farmacología

Una vez que las larvas alcanzaron el estadio de competencia, se indujeron a la metamorfosis en presencia de fármacos que pudieran estimular o inhibir la metamorfosis. De esta manera podríamos saber si el fármaco que se decidió utilizar afectaba la metamorfosis positiva o negativamente. Las concentraciones que se probaron en las combinaciones de inhibidores o activadores de THs así como del NO fueron las que tuvieron un efecto significativo en la experimentación por separado.

Las concentraciones utilizadas para los inhibidores de la síntesis de mRNA y proteínas fueron de acuerdo a resultados previos obtenidos en laboratorio de acuerdo a (Tabla II).

Tabla II. Fármacos que participan en las rutas de señalización de NO y HTs utilizados durante el presente estudio en *Dendroaster excentricus*.

Ruta asociada	Fármaco	Acción	Concentración utilizada	Efecto esperado
THs	Tiourea	Inhibidor de la síntesis de Tiroxina.	$10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ M	inhibición
	Tiroxina	Estimulación de la tasa metabólica y regulación del crecimiento	$10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$ M	inducción
NO	<i>N_ω</i> -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME)	Inhibidor de la NOS	$10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 10^{-3}$ M	inducción
	S- nitroso-N-Acetylpenicillamine (SNAP)	Promotor de la síntesis del NO	$10^{-4}, 7,5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}$ M	inhibición
Combinación de fármacos	SNAP+ Tiroxina	Promotor de NO +inductor de TH	$10^{-4}, 7,5 \times 10^{-5}, 5 \times 10^{-5}$ M + 10^{-7} M	inhibición
	Tiourea + L-NAME	inhibidor de TH + Inhibidor de la NOS	10^{-3} M + $10^{-2}, 5 \times 10^{-3}, 10^{-3}$ M	inhibición
Transcripción y Traducción	5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside (DRB)	Inhibidor de RNA polimerasa II	$10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 10^{-5}$ M	inhibición
	Emetine Dihydrochloride (Emetina)	Inhibidor de la síntesis de proteínas-acoplamiento a la subunidad ribosomal 40S	$10^{-4}, 5 \times 10^{-5}, 10^{-5}$ M	inhibición

SNAP= S- nitroso-N-Acetylpenicillamine; DRB= 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside; NOS= Oxido Nítrico Sintatasa; L-NAME= *N_ω*-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride; Emetine Dihydrochloride= emetina; THs= hormona tiroideas; NO= oxido nítrico; TPO= tiroperoxidasa de la tiroxina.

Para llevar a cabo lo anterior, se seleccionaron de 20 a 30 larvas competentes. Para su selección se tomó en cuenta la presencia del rudimento juvenil y que se pudieran apreciar los cinco pies ambulacrales desarrollados así como la tendencia a estar cerca del fondo como lo describen Burke (1980) y Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). Las larvas se colocaron en cajas multipozos (Falcon 1006), las cuales se prepararon previamente con un volumen conocido de AMF. Posteriormente se adicionó una solución stock del fármaco a probar de manera que se obtuvo un volumen final de 5 ml y una concentración final del fármaco de acuerdo a lo referido en la Tabla II. Lo anterior se realizó para cada concentración de fármaco empleada y utilizando tres réplicas por tratamiento. Para cada fármaco a probar, se incluyeron un control positivo consistente en la adición de KCl a una concentración de 0.1 M durante 10-15 minutos y un control negativo en el cual se colocaron larvas en AMF durante el periodo experimental de acuerdo a lo descrito por Carpizo-Ituarte *et al.* (2002). En el caso de los tratamientos con KCl, este fue sustituido por AMF, donde las larvas permanecieron hasta el final del experimento. Las soluciones stock fueron preparadas en agua destilada, mientras que para tiroxina se utilizó como solvente hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 N; la solución stock de DRB se preparó con etanol al 100 %. En los tratamientos donde se utilizó algún solvente (Etanol, NaOH) para disolver el fármaco a probar, se adicionó un tercer control de solvente en el diseño experimental con un volumen del solvente igual a la mayor cantidad utilizada para disolver el fármaco correspondiente y que fue agregada al tratamiento con la mayor concentración del fármaco a probar.

En los tratamientos donde se consideró un efecto inhibidor del fármaco, se mantuvo por dos horas a las larvas en presencia de las diferentes concentraciones del inhibidor. Posteriormente se agregó KCl de forma equivalente a la empleada en el control positivo. Una vez retirado el medio conteniendo el KCl, se agregó nuevamente el fármaco inhibidor utilizado, de manera que la larva permaneció en su presencia durante el resto del periodo experimental. Todos los fármacos empleados fueron obtenidos de la compañía Sigma-Aldrich®.

A partir de la adición del fármaco, se dejaron transcurrir 24 horas y se procedió a la evaluación para determinar si hubo un efecto de los fármacos en la inducción a la metamorfosis, cuando se consideró conveniente se procedió a retirar la solución del tratamiento dejándolos solo con AMF para realizar una segunda evaluación transcurridas 48 horas. En algunos casos, se le dio seguimiento hasta por 7 días a los experimentos después de que las larvas fueron expuestas inicialmente a los fármacos para ver si las larvas progresaban en su desarrollo o se incrementaba la mortalidad. El porcentaje de metamorfosis para los diferentes tratamientos se estimó con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 2000-C. Zeiss).

I.4 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el número de organismos metamorfoseados entre el total de organismos en las réplicas de los tratamientos. A este porcentaje se les realizó la transformación arcoseno antes del análisis estadístico. A los datos, se les realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no presentaron una distribución normal y resultaban no homogéneos, se utilizó estadística no paramétrica. El análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía se utilizó para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de los fármacos empleados. Cuando se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, se utilizaron pruebas a posteriori Dunn's y Fisher LSD para establecer entre cuales tratamientos se presentaron dichas diferencias. Estas diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$ con un nivel de confianza del 95%.

I.5 Resultados

Inducción a la metamorfosis con DRB (inhibidor de la síntesis de mRNA) y Emetina (inhibidor de la síntesis de proteínas).

El inhibidor de la síntesis de RNA (DRB) en las concentraciones de 10^{-4} y 5×10^{-5} indujo la metamorfosis de la galleta de mar (Figura 2). Este resultado fue significativamente diferente ($F = 24.464$; $gl = 11$ (grados de libertad); $P < 0.001$) respecto al control negativo y equivalente al porcentaje de metamorfosis obtenido con el KCl en el control positivo.

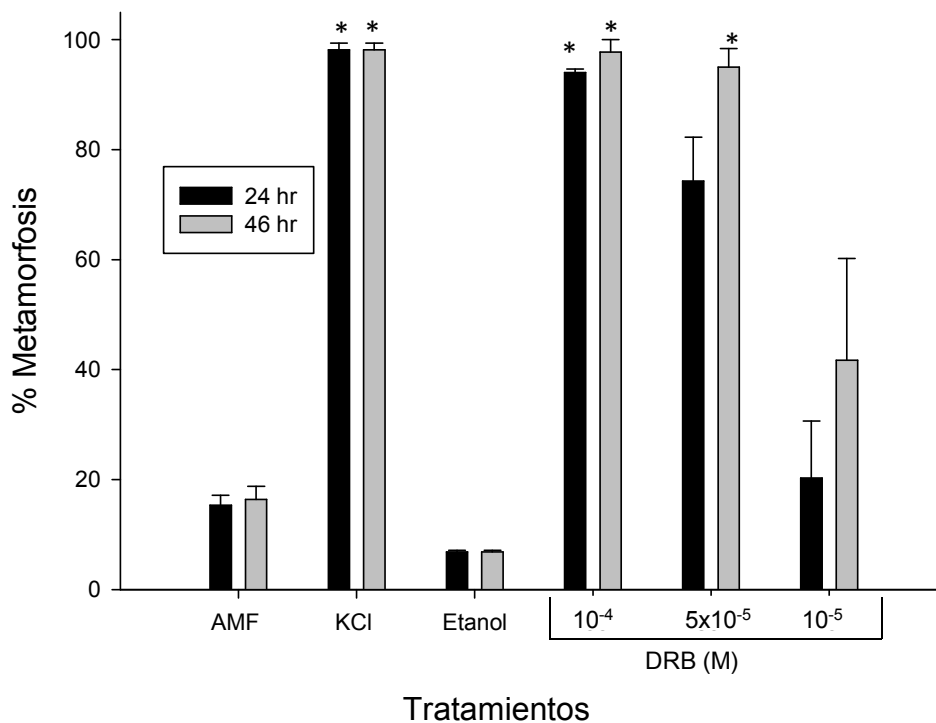


Figura 2. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de larvas de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas a las 24 y 46 h después de incubar las larvas con DRB (10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} M), (N=3). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (AMF) ($P < 0.05$). Las líneas verticales indican el error estándar. Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inhibidor que se indican en el eje de las x; Control Positivo= KCl, 0.1 M (10 a 15 minutos); Control Negativo= AMF, agua de mar filtrada ($1 \mu\text{m}$) e irradiada con UV; Etanol= concentración mayor de etanol utilizado en la preparación de las soluciones de DRB

En el tratamiento con la mayor concentración utilizada de DRB 10^{-4} M, se observó un porcentaje de metamorfosis significativo respecto al control negativo en la evaluación a las 24 h de iniciado el experimento ($F= 24.464$; $gl= 11$ (grados de libertad); $P < 0.001$). La solución con el fármaco fue retirada y los tratamientos se dejaron en medio con AMF. Los porcentajes de metamorfosis alcanzados fueron de 94, 74.2 y 20.2, % en las concentraciones 10^{-4} , 5×10^{-5} , y 10^{-5} M respectivamente para la evaluación a las 24 h de iniciado el experimento. En la primera evaluación se observó metamorfosis parcial en ciertos organismos, es decir, no alcanzaron a desarrollar las características de una postlarva funcional. Dichos organismos parecían alcanzar la metamorfosis total en la segunda evaluación del tratamiento con la concentración de 5×10^{-5} M de DRB, este resultado fue significativo respecto al control negativo ($F= 24.464$; $gl= 11$ (grados de libertad); $P < 0.001$). El etanol, utilizado como solvente de DRB no tuvo efecto en las larvas de galleta de mar expuestas en los tratamientos con este control (Figura 2). En la segunda evaluación se observó la formación de una capa verde sobre la parte aboral de las postlarvas.

Por su parte, en presencia de emetina, un inhibidor de la síntesis de proteínas se probó el efecto inductor de la metamorfosis en la galleta de mar (Figura 3). El porcentaje observado fue significativamente diferente en las tres concentraciones probadas 10^{-4} , 5×10^{-5} y 10^{-5} M respecto al control negativo ($F= 30.905$; $gl= 4$ (grados de libertad); $P < 0.001$). Los porcentajes de metamorfosis alcanzados fueron cercanos al 100 % y resultaron con valores equivalentes al control positivo ($P > 0.05$). En la evaluación 24 h los organismos

metamorfoseados se observaron con poca movilidad así con una apariencia blanquecina y verde particularmente sobre el área aboral, parecían estar en proceso de descomposición. Experimentos previos con este fármaco demostraron un efecto tóxico en la evaluación a las 24 h de la inducción, por lo que se decidió disminuir el tiempo de exposición a 2 h con emetina y dejar los tratamientos solo con agua de mar filtrada hasta la evaluación. Los organismos no tuvieron la capacidad de recuperarse ya que después de 24 h el total de ellos estaban muertos. El resultado con emetina es de utilidad limitada ya que este compuesto fue tóxico, provocando la mortalidad de la totalidad de los organismos metamorfoseados.

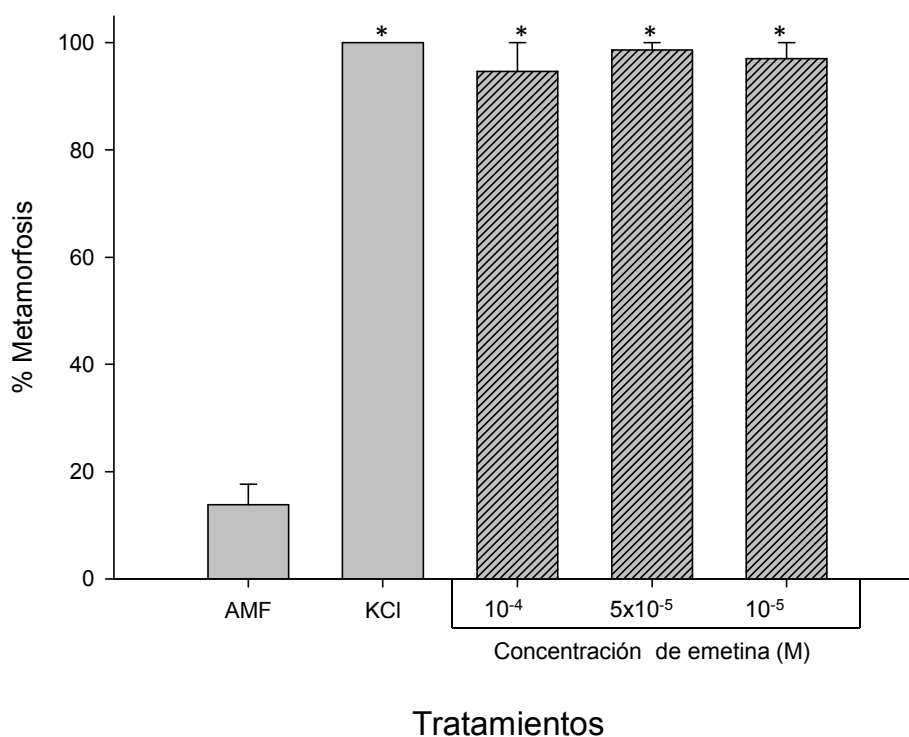


Figura 3. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *D. excentricus* evaluadas a las 24 h después de incubar las larvas en presencia de emetina (10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} M), (N=3). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo ($P < 0.05$). Las líneas verticales indican el error estándar. Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inhibidor que se indican en el eje de las x; Control Positivo= KCl, 0.1 M (10 a 15 minutos); Negativo= AMF, agua de mar filtrada e irradiada con UV. Nota: los porcentajes de metamorfosis que se presentan en presencia de emetina corresponden a postlarvas que murieron al finalizar el experimento y no pudieron recuperarse al efecto tóxico de la emetina.

El resultado del efecto de los fármacos que documentan la participación de THs y NO durante la metamorfosis de la galleta de mar *Dendraster excentricus* así como en las combinaciones realizadas se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Efecto de los fármacos utilizados para probar la participación de las rutas del NO y THs durante la inducción a la metamorfosis de la galleta de mar *D. excentricus*.

Ruta asociada a	Fármaco	Efecto esperado	Efecto encontrado
THs	Tiourea	inhibición	sin efecto
	Tiroxina	inducción	inducción
NO	L-NAME	inducción	inducción
	SNAP	inhibición	inhibición
Combinación de fármacos	SNAP+ Tiroxina	inhibición	inducción
	Tiourea + L-NAME	inhibición	inducción
Transcripción y Traducción	DRB	inhibición	inducción
	Emetina	inhibición	inducción

Tiourea como inhibidor de la síntesis de tiroxina, probado en presencia de KCl como activador no fue suficiente para inhibir el efecto de éste último compuesto (Figura 4). Los porcentajes de metamorfosis en las concentraciones probadas fueron desde 88.4 hasta 98.1% y alcanzaron el 100% en dos de ellas. No hubo diferencias significativas entre las concentraciones, ni respecto al control positivo ($P>0.05$). Las dos horas de exposición de las larvas al inhibidor

no fueron suficientes para detener el efecto inductor del KCl. El resultado en el control positivo fue significativamente diferente del control negativo ($F=56.275$; $gl= 6$ (grados de libertad); $P < 0.001$). A su vez los porcentajes de metamorfosis que se obtuvieron en los tratamientos en presencia de tiourea fueron significativamente diferentes del control negativo ($F=56.275$; $gl= 6$ (grados de libertad); $P < 0.001$).

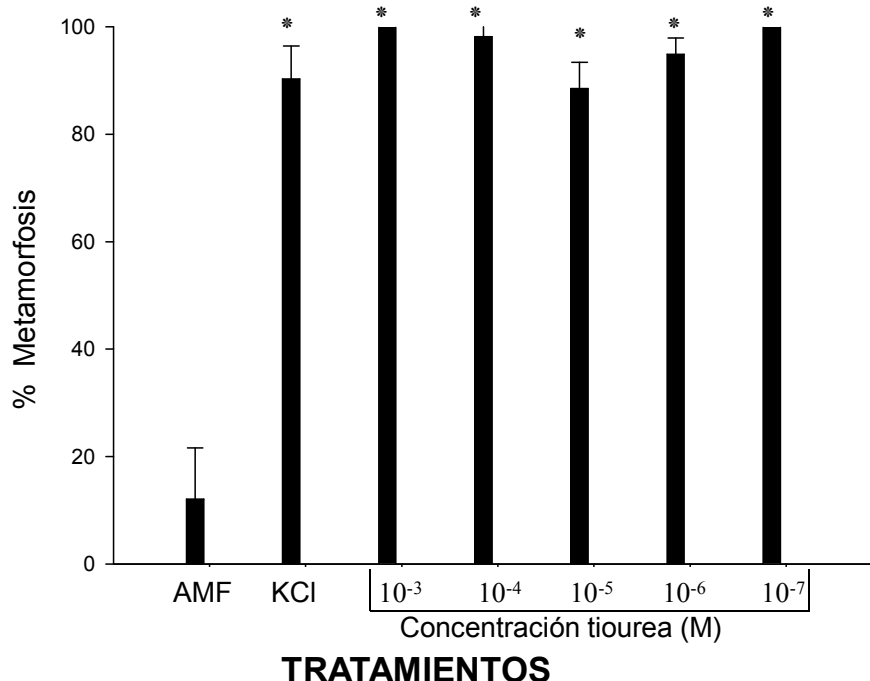


Figura 4. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* 18 h después de exposición a diferentes concentraciones de tiourea como inhibidor (N=3). Las líneas verticales indican el error estándar. Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de tiourea por 2 h antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en presencia del inhibidor. Después de 15 minutos se cambió esta solución por solución fresca de tiourea (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) y AMF de acuerdo a las concentraciones que se muestran en el eje de las x. Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0.05$). Las líneas verticales error estándar. KCl= solución 0.1 M, (10 a 15 minutos); AMF =agua de mar filtrada hasta 1 μ m e irradiada con UV.

El porcentaje de metamorfosis en presencia de tiroxina como inductor fue significativo en la evaluación a las 33 h de agregado el compuesto, no así en las primeras horas de evaluación donde el efecto solo fue significativo respecto al control negativo en la concentración de 10^{-9} M ($F= 65.744$; $gl= 15$ (grados de libertad); $P < 0.001$), con un porcentaje de 24 % (Figura 5). En la evaluación a las 33 h el resultado fue significativamente diferente respecto al control negativo en las concentraciones 10^{-6} y 10^{-7} M ($F= 65.744$; $gl= 15$ (grados de libertad); $P < 0.001$) y los porcentajes de metamorfosis obtenidos fueron de 86.9 y 75.6 % respectivamente. El mayor porcentaje de metamorfosis obtenido a las 33 h de evaluación en el tratamiento con la concentración 10^{-9} M fue de 26.5 %. Esta concentración así como la concentración 10^{-7} M resultaron estadísticamente iguales al control negativo ($P>0.05$). El NaOH utilizado como solvente de la tiroxina no tuvo efecto en las larvas.

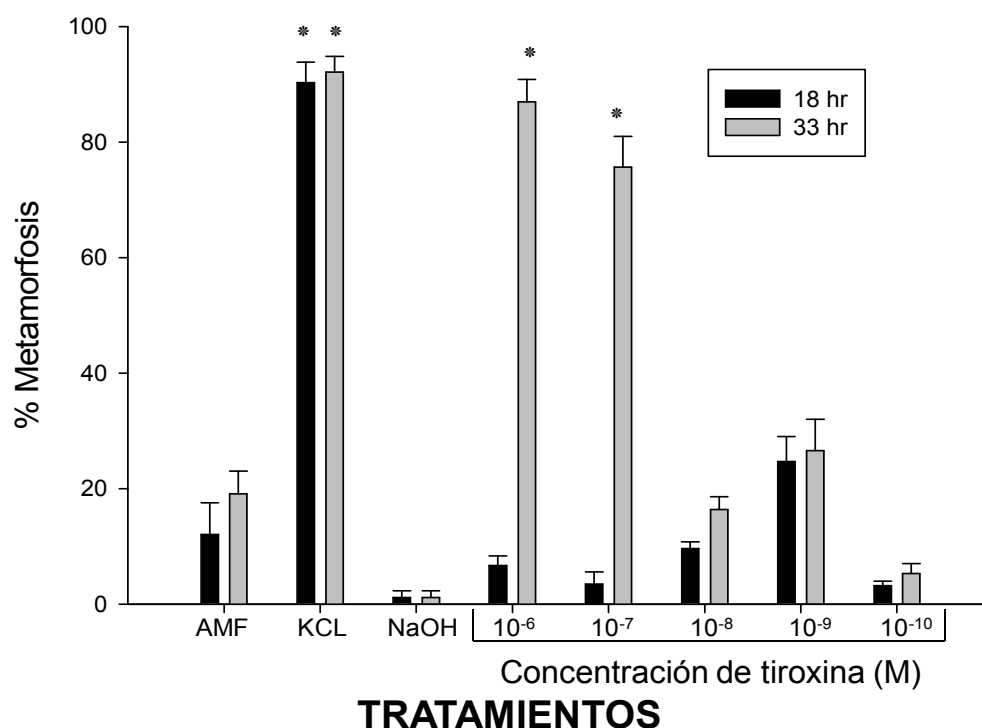


Figura 5. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas 18 y 33 h después de exposición a diferentes concentraciones de tiroxina como inductor de la metamorfosis. (N=3). Las líneas verticales el error estándar. Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control negativo ($P < 0.05$). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inductor (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M) que se indican en el eje de las X; NaOH= concentración mayor de NAOH (10^{-6} M) utilizado en la preparación de las soluciones; KCL= solución 0.1 M (10 a 15 minutos); AMF= agua de mar filtrada.

Fármacos que documentan la participación de la ruta del NO durante la metamorfosis de galleta de mar *D. excentricus*:

El efecto de L-NAME como inductor de la metamorfosis en larvas de galleta de mar se muestra en la (Figura 6). Las concentraciones en donde se obtuvo un efecto significativo respecto al control negativo fueron 10^{-2} y 5×10^{-3} M ($F= 96.008$; $gl= 9$ (grados de libertad); $P<0.001$).

En estas concentraciones se alcanzaron porcentajes de metamorfosis del 64 y 79 % respectivamente y el efecto se observó desde la evaluación a las 20 h de iniciado el experimento. El porcentaje de metamorfosis en la concentración 10^{-3} M no fue significativamente diferente al control negativo ($F= 96.008$; $gl= 9$ (grados de libertad); $P<0.001$) y el efecto observado no fue diferente cuando las muestras se evaluaron a las 40 h de iniciado el experimento. Los porcentajes de metamorfosis en los tratamientos de 10^{-2} y 5×10^{-3} M llegaron al 100 % en la evaluación a las 40 h de iniciado el experimento. Este resultado fue igual al obtenido en el control positivo ($P>0.05$). En la presencia de este fármaco, se observó un efecto tóxico durante la evaluación a las 40 h, donde las postlarvas se observaron con poco movimiento.

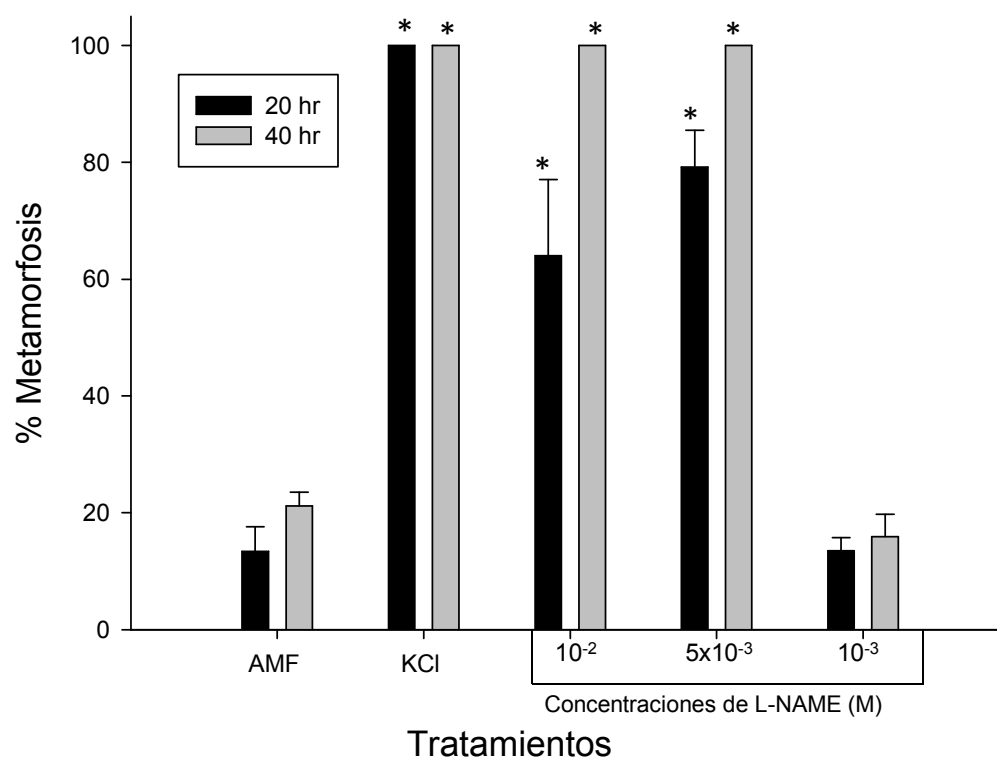


Figura 6. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas a las 20 y 40 h después de su exposición a diferentes concentraciones de L-NAME como inductor de la metamorfosis (N=3). Las líneas verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo ($P < 0.05$). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inductor (10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} M) que se indican en el eje de las X; KCl= solución 0.1 M (10 a 15 minutos); AMF= agua de mar filtrada hasta $1 \mu\text{m}$ e irradiada con UV.

En presencia de SNAP se inhibió la metamorfosis de larvas de la galleta de mar al ser inducidas con KCl (Figura 7). Los porcentajes de metamorfosis

que se obtuvieron en las concentraciones de 10^{-4} y 5×10^{-5} M fueron de 43.6 y 69.6 % respectivamente. El porcentaje de metamorfosis encontrado en la concentración 10^{-4} M fue estadísticamente diferente del control positivo tanto en la evaluación a las 20 h como a las 44 h ($F = 78.324$; $gl = 7$ (grados de libertad); $P < 0.001$); mientras que el resultado en la concentración de 5×10^{-5} M no resultó ser diferente del control positivo para ambas evaluaciones ($F = 78.324$; $gl = 7$ (grados de libertad); $P < 0.001$).

Para este fármaco no se detectó ningún efecto tóxico en las larvas en la evaluación a las 44 h, que fue la última que se realizó para el experimento.

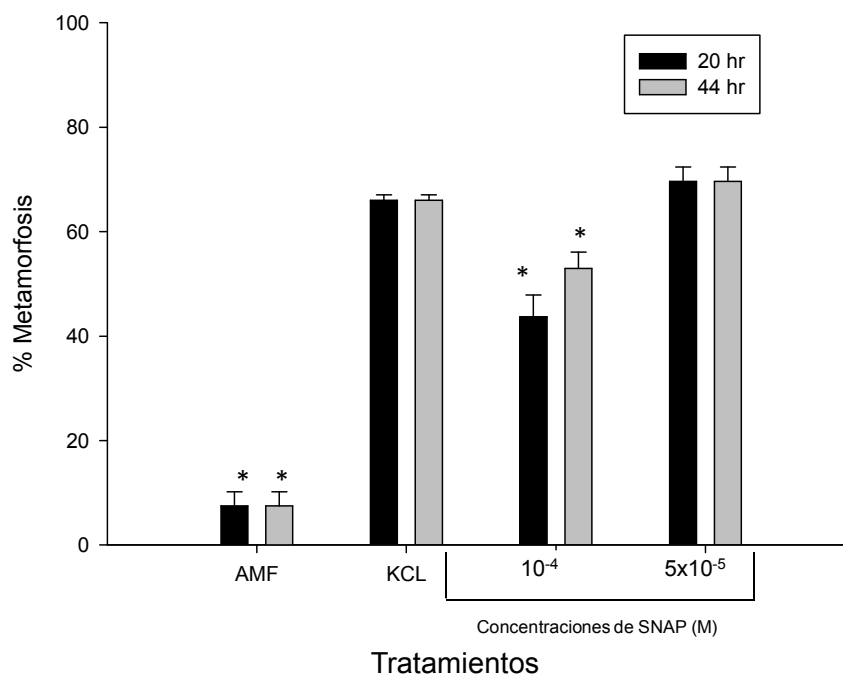


Figura 7. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas a las 20 y 44 h después de ser expuestas a diferentes concentraciones de SNAP como inhibidor (N=3). Las líneas verticales indican el error estándar. Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de SNAP por 2 h antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en presencia del inhibidor. Después de 15 minutos se removió esta solución por solución fresca de SNAP y AMF de acuerdo a las concentraciones que se muestran en el eje de las X. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control positivo de KCl ($P < 0.05$). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inductor que se indican en el eje de las X; KCl= 0.1 M (10 a 15 minutos); AMF,= agua de mar filtrada hasta 1 μ m e irradiada con UV.

Combinación de activadores-inhibidores de HTs así como del NO.

El efecto sobre la metamorfosis, de la combinación del promotor de la síntesis del NO (SNAP) y promotor de la síntesis de tiroxina se presenta en la (Figura 8). En todos los tratamientos se encontraron porcentajes de metamorfosis significativamente diferentes respecto al control negativo ($F = 34.810$; $gl = 5$ (grados de libertad); $P < 0.001$). Los porcentajes de metamorfosis fueron de 89.0, 87.6, 70.6, % en las concentraciones 10^{-4} , 7.5×10^{-5} y 5×10^{-5} M respectivamente. La concentración de tiroxina que se agregó a los tratamientos fue 10^{-7} M. El porcentaje de metamorfosis en la concentración 5×10^{-5} M resultó diferente respecto al resto de las concentraciones así como al control positivo ($F = 34.810$; $gl = 5$ (grados de libertad); $P < 0.001$). El NaOH utilizado como solvente de la tiroxina no tuvo ningún efecto sobre las larvas (Figura 8).

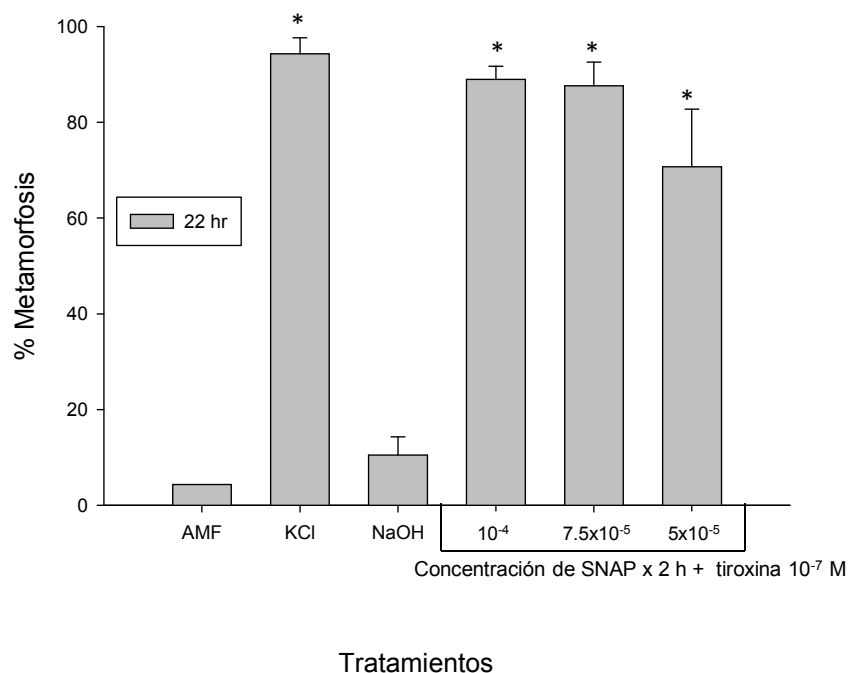


Figura 8. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas a las 22 h después de incubar las larvas con SNAP por dos h y posteriormente agregar tiroxina a una concentración constante de 10^{-7} M, en donde permanecieron con ambos fármacos hasta su evaluación (N=3). Las líneas verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (AMF, NaOH) ($P < 0.05$). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inhibidor que se indican en el eje de las X; NaOH= concentración mayor de NaOH utilizada en la preparación de las soluciones de tiroxina (10^{-7} M); KCl= solución 0.1 M (10 a 15 minutos); AMF= agua de mar filtrada hasta $1 \mu\text{m}$ e irradiada con UV.

Por su parte la combinación de tiourea (inhibidor de la síntesis de tiroxina) y L- NAME (inhibidor de la NOS) resultaron en una acción inductora de la metamorfosis (Figura 9). Las tres concentraciones utilizadas 10^{-2} y 5×10^{-3} , 10^{-3} M fueron significativamente diferentes respecto al control negativo ($F = 86.702$; $gl = 4$ (grados de libertad); $P < 0.001$). Los mayores porcentajes de metamorfosis alcanzados fueron de 83 y 78 % en las concentraciones 10^{-2} y 5×10^{-3} M respectivamente. Este resultado fue estadísticamente diferente respecto al control negativo ($F = 86.702$; $gl = 4$ (grados de libertad); $P < 0.001$). El porcentaje de metamorfosis en el control positivo fue de 82 % y resultó ser equivalente al de los tratamientos con concentraciones de 10^{-2} y 5×10^{-3} M de L- NAME (Figura 9).

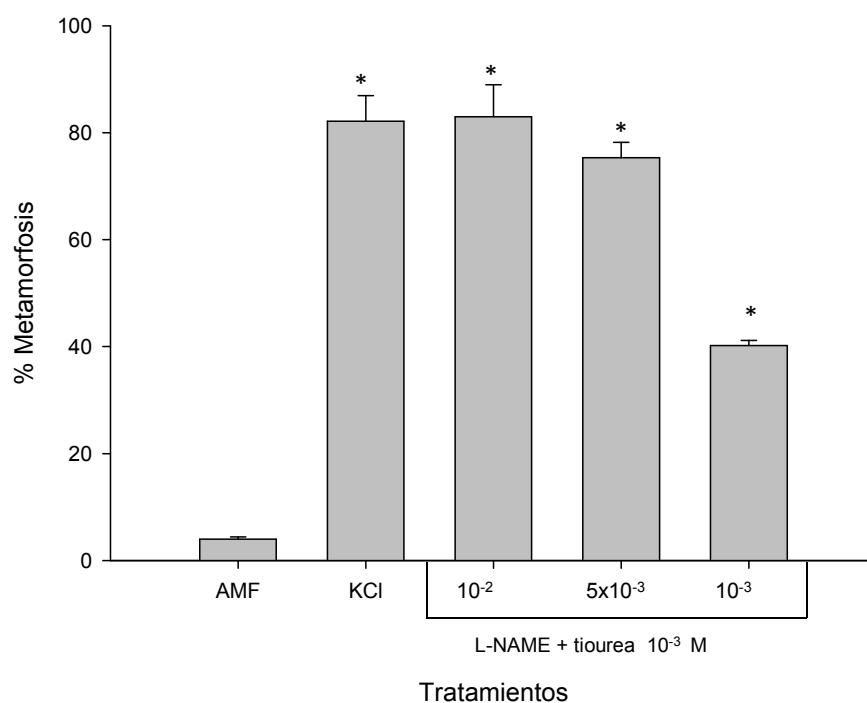


Figura 9. Porcentaje de metamorfosis ($\pm$ error estándar) de galleta de mar *Dendraster excentricus* evaluadas a las 22 h de incubar las larvas con tiourea por dos horas a una concentración constante de 10^{-3} M, posteriormente se agregó L-NAME (10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} M), permaneciendo juntos inhibidor más L-NAME hasta su evaluación (N=3). Las líneas verticales indican el error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo de AMF ($P < 0.05$). Los tratamientos incluyen: las concentraciones L-NAME que se indican en el eje de las X; KCl= solución 0.1 M (10 a 15 minutos); AMF= agua de mar filtrada hasta $1 \mu\text{m}$ e irradiada con UV.

I.4 Discusión

Los resultados del presente trabajo muestra que los inhibidores de la síntesis de mRNA (DRB) y de proteína (emetina) activaron la metamorfosis en la galleta de mar, sin embargo, los resultados con emetina, si bien muestran que tuvo la capacidad inductora, la toxicidad del compuesto aunada a lo esencial que resulta la síntesis de proteínas en el metabolismo de los organismos, hacen limitada su interpretación. Resultados similares se han obtenido en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo, donde en presencia de DRB y emetina se obtuvieron porcentajes importantes de metamorfosis del erizo blanco *L. pictus* (Amador-Cano, 2007), para el cual la emetina no resultó tan toxica. En el poliqueto *H. elegans* también se ha reportado efecto potenciador de la inducción de la metamorfosis utilizando los compuestos mencionados, aun cuando hay una reducción de más del 80 % en la síntesis de proteínas y RNA por periodos cortos y hasta antes de desarrollar los tentáculos branquiales (Carpizo-Ituarte Com. Pers.).

Durante las evaluaciones de los dos fármacos se pudo observar poca metamorfosis parcial y para el caso de DRB esta metamorfosis llevo a ser metamorfosis total en la segunda evaluación. La tendencia a morir de los organismos aún en los tratamientos con DRB indican que los procesos de transcripción y traducción, resultan fundamentales para el funcionamiento general de los organismos, por lo que solo es posible inhibirlos por periodos muy cortos de tiempo sin ocasionar efectos tóxicos irreversibles. Y que tanto la

síntesis de nuevos mRNA y proteínas se requieren posteriores al periodo inicial de inducción a la metamorfosis.

La respuesta de las larvas de galleta de mar ante los fármacos fue diferente ya que emetina fue tóxica y causó porcentajes de mortalidad cercanos al 100 % en los tratamientos a la primera evaluación. Mientras que la respuesta que se obtuvo al inducir a la metamorfosis con DRB la movilidad se pudo observar hasta antes de las 48 h. A los siete días de evaluación en estos tratamientos los organismos ya se encontraban muertos. Aún permaneciendo en medio fresco (AMF). La evaluación posterior a este tiempo confirma que la síntesis de mRNA si es necesaria cuando las estructuras juveniles de la postlarva requieren continuar su crecimiento y fortalecerse. Dado que la movilidad de los organismos fue decayendo con el tiempo, por lo que

Con el presente trabajo, se muestra una participación de las rutas de señalización de hormonas tiroideas y del óxido nítrico en la inducción a la metamorfosis de *D. excentricus*. Los fármacos probados individualmente fueron efectivos ya sea como inhibidores o activadores de la metamorfosis (ver la tabla II).

La excepción al efecto esperado de los diversos fármacos utilizados fue tiourea. Al parecer las dos h en que las larvas estuvieron expuestas al inhibidor no fueron suficientes para detener el efecto inductor del KCl, por lo que la señal inductora asociada a la ruta activada por el KCl, actuó para promover la metamorfosis de las larvas de galleta de mar a pesar de la presencia de tiourea.

La galleta de mar *D. excentricus* se metamorfoseó en presencia de tiroxina, sin que sea necesaria ninguna otra señal externa. La respuesta a la tiroxina en otras especies de equinoideos ha sido previamente reportada en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO, en larvas competentes de erizo de mar *Strongylocentrotus* spp. y *L. pictus* (Castellanos-Kotkoff, 2004). Trabajos posteriores mencionan que las larvas competentes de erizo blanco *Lytechinus pictus* responden a la inducción con biopelículas y L-NAME solo si han sido incubadas previamente con tiroxina (Bishop *et al.* 2006). Al igual que tiroxina el inhibidor de la NOS (L-NAME) promueve la metamorfosis de galleta de mar. La aplicación, vía externa de tiroxina, así como la reducción del óxido nítrico promueven la inducción de la metamorfosis de galleta de mar por lo que podemos mencionar que la señalización vía la ruta del NO y THs puede ser que interaccionen durante los eventos que desencadenan la metamorfosis en esta especie.

Se ha documentado La interacción de HTs y NO en el erizo blanco *L. pictus* (Bishop *et al.* 2006). Estos autores documentan que la interacción fue antagónica, asumiendo que la tiroxina se bioacumula vía exógena por la alimentación (Heyland *et al.* 2006). Al llegar al estadio competente las larvas alcanzan el máximo nivel de tiroxina provocando antagonismo en la señalización inhibitoria del NO y lo explican con la respuesta de las larvas de erizo al ser expuestas a tiroxina como activador y L-NAME como inhibidor del

NO en presencia de biopelículas. Cuando se incrementa la tiroxina o cuando se disminuye el NO se genera la misma respuesta obteniéndose metamorfosis.

Las THs y el NO son particularmente adecuados para coordinar los complejos cambios morfogenéticos que ocurren durante la transición metamórfica (Heyland y Moroz, 2006). En otras investigaciones se ha documentado que si la larva de *D. excentricus* se mantiene por tres días sin alimento, la presencia de tiourea puede retrasar el asentamiento (Heylan y Hodin, 2004). De ser así la síntesis de tiroxina puede ser necesaria para poder completar adecuadamente la metamorfosis en *D. excentricus*. El efecto inductor de la tiroxina en la galleta de mar, respalda trabajos previos en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo con larvas competentes de *S. y S. purpuratus* (Castellanos –Kotkoff, 2004), así como para gasterópodos (Carpizo-Ituarte y De la Rosa-Vélez 1993).

El efecto inhibitorio de la metamorfosis en presencia de SNAP (promotor de la síntesis del NO) sugiere la participación de esta ruta de señalización, río abajo de la percepción sensorial del KCl en *D. excentricus*. Lo anterior ha sido previamente reportado para otras especies como el nudibranquio *P. sibogae* (Hadfield, *et al.* 2000) y el erizo blanco *L. pictus* (Bishop *et al.* 2006).

Se ha documentado en varias especies de equinoideos la síntesis interna de hormonas tiroideas entre ellas erizos de mar y galleta de mar (Chino *et al.* 1994; Saito *et al.* 1998; Heyland y Hodin, 2004; Heyland y Moroz, 2005; Heyland *et al.* 2006). Lo anterior puede darle a la larva competente una

capacidad mayor para responder al estímulo inductor, cualquiera que este sea incluyendo la tiroxina misma, e iniciar el proceso de metamorfosis.

Acorde a lo anterior se explica el resultado de inducción a la metamorfosis con la combinación los fármacos activadores-inhibidores de las rutas del NO y HTs, tiroxina con SNAP, donde resultó en una activación de la metamorfosis. El promotor del NO, no detuvo la acción inductora de la tiroxina en larvas competentes de la galleta de mar. Lo anterior puede deberse a que el incremento de tiroxina bloqueo de alguna manera la producción de la óxido nítrico sintetasa (NOS) enzima responsable de la producción del NO (Bishop *et al.* 2006) y por lo tanto haberse promovido la metamorfosis en la galleta de mar.

Con nuestro resultado podemos sugerir que la inducción con fármacos activadores-inhibidores del óxido nítrico demuestra la participación de esta molécula señalizadora durante la metamorfosis de *D. excentricus*. Lo anterior ha sido reportado Bishop y Brandhorst, (2001) para el erizo blanco *L. pictus*. Estos autores mencionan, que el NO actúa reprimiendo la metamorfosis de la especie mencionada. La galleta de mar responde de manera similar a la inducción a la metamorfosis con el inhibidor de la NOS (L-NAME), así como con el promotor de la síntesis del NO (SNAP). El efecto es de activación de la metamorfosis para el primero así como de inhibición para el segundo. Ambas especies mencionadas fueron expuestas a tiroxina vía exógena obteniéndose inducción a la metamorfosis, el mecanismo de acción puede ser similar para otras especies de equinoideos.

En el resultado de la combinación de SNAP más tiroxina parece ser mayor al efecto de tiroxina respecto al primero. Se ha demostrado que la función de tiroxina y NO puede ser antagónica (Bishop *et al.* 2006). Lo cual puede estar pasando con el resultado encontrado en el experimento donde combinamos SNAP + tiroxina. Bishop y colaboradores (2006) documentan que el incremento de tiroxina puede antagonizar el efecto inhibitorio del NO como represor de la metamorfosis o de algún otro mecanismo que tenga el mismo efecto inhibitorio durante la metamorfosis.

A su vez el resultado obtenido con la combinación de tiourea más L-NAME tuvo un efecto inductor de la metamorfosis en *D. excentricus*. Por si solo L-NAME es capaz de inducir a la metamorfosis en galleta de mar. Tiourea por su parte ha demostrado su efecto inhibitorio en larvas de la misma especie retrasando el asentamiento y el desarrollo del rudimento cuando las larvas se han mantenido sin alimento (Heyland y Hodin, 2004), sin embargo en el presente trabajo no se logro inhibitorio en presencia de KCl. Si los niveles de tiroxina en larva competente son elevados y a esto se suma el bloqueo de la producción del NO entonces L-NAME tuvo más posibilidades de activar la metamorfosis que tiourea de inhibirla.

CAPITULO II.

El papel del KCl en la inducción a la metamorfosis del erizo negro *Arbacia incisa*.

II.1 introducción

El erizo negro *A. incisa* se distribuye en el oeste a lo largo del Pacífico Mexicano, desde Baja California hasta Perú a profundidades menores de 10 (Mortensen 1935). *Arbacia incisa* es una especie que tiene menor densidad en ésta área geográfica respecto al género *Strongylocentrotus* spp

Entre las herramientas más usadas para el estudio de la metamorfosis en invertebrados marinos, se encuentran los inductores artificiales. El K⁺ es uno de los cationes que más ha sido utilizado y se ha reportado con capacidad de inducción en al menos 7 fila, mientras que el cesio en 4 fila (Baloun and Morse, 1984, Wendt y Woolacott, 1995; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Gallardo y Sánchez, 2001; Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Yang *et al.* 2008; Yu *et al.*, 2008; Young *et al.* 2011).

A su vez, trabajos anteriores en el laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo han demostrado la efectividad del KCl como inductor a la metamorfosis en diversas especies de erizos de mar *S. franciscanus*, *S. purpuratus*, *L. pictus* (Preciado-Pinedo, 2000; Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Amador-Cano *et al.* 2006; Díaz-Pérez y Carpizo-Ituarte, 2011).

Como actúa el K^+ en la ruta metamórfica y como su acción está relacionada a los inductores naturales aún permanece sin conocerse. Los trabajos de inducción a la metamorfosis con K^+ en invertebrados marinos le confieren la capacidad de depolarizar la membrana, aunque hay la posibilidad de que este actúe en otras células del organismo. El K^+ al igual que otros inductores artificiales ha sido utilizado para la inducción a la metamorfosis de invertebrados marinos así como para entender mejor las posibles rutas de transducción involucradas durante la misma. (Pawlik, 1990; Hadfield, 1998). El KCl ha demostrado su efectividad como inductor de la metamorfosis en larvas de invertebrados marinos como, moluscos; *H. rufescens*, *Astrea undosa*, *Phestilla sibogae* (Baloun y Morse, 1984; Yool *et al.* 1986); poliquetos *Phragmatopoma californica* (Yool *et al.* 1986); Bryozoarios *Bugula simplex*, *B. stolonifera*, *B. turrita* (Wendt y Woolacott, 1995); equinoideos (Preciado-Pinedo, 2000; Carpizo-Iltuarte *et al.* 2002; Amador-Cano *et al.*, 2006; Díaz-Pérez y Carpizo-Iltuarte, 2011); bivalvos, *Perna canaliculus* (Young *et al.* 2011) entre otros.

A pesar de la capacidad general de K^+ para inducir la metamorfosis, no es un inductor universal (Pechenik *et al.*, 2001). Las larvas de algunas especies de invertebrados marinos no son estimuladas a metamorfosearse en presencia de un exceso de K^+ en el agua de mar (Pearce y Scheibling, 1994), y ha sido reportado con capacidad de inhibir la metamorfosis en un percebe (Ritschoff *et*

al. 1986), opistobranquios gasterópodos (Todd *et al.* 1991), briozoarios (Wendt y Woolacott, 1995) y el mejillón *Mytilus edulis* (Dobretsov y Quian, 2003).

El K^+ puede no tener efecto en algunos organismos, puede inhibir la respuesta en otros o bien puede promover la metamorfosis parcial, como fue el caso del erizo negro *A. incisa* de acuerdo al resultado obtenido en el presente trabajo. En un inicio se consideró trabajar con erizo negro *A. incisa* para obtener información sobre la respuesta a inductores de la metamorfosis que participan en las rutas de señalización celular, particularmente hormonas tiroideas (HTs) y óxido nítrico (NO), sin embargo resultados experimentales iniciales a la respuesta de esta especie en presencia de KCl como inductor, nos indicaron que su sensibilidad al compuesto parece ser diferente al de otras especies de equinoideos y otros invertebrados marinos.

II.2 Metodología

II.2.1 *Diseño experimental*

Tomando como antecedente experimentos iniciales en la inducción a la metamorfosis con KCl, se probaron diferentes concentraciones de la solución para observar el efecto en larvas de erizo negro *Arbacia incisa*. El intervalo de concentraciones fue de 40-100 mM. Se realizaron dos experimentos para comparar la respuesta de metamorfosis total con el erizo morado *S. Purpuratus*, el cual se sabe responde favorablemente a la inducción con KCl. A este

experimento se denominó Experimento 1. Así también se realizaron dos experimentos con larvas competentes de *D. excentricus* para comparar igualmente la respuesta de larvas de erizo negro, con la respuesta de esta especie, que se sabe responde favorablemente a la inducción con KCl. A este experimento se le denominó Experimento 2. El diseño experimental fue mediante la utilización de cajas multipozos (Falcon), con 3 réplicas por tratamiento en cada uno de los experimentos, se agregaron aproximadamente 30 larvas en cada una de las réplicas, y la duración de los experimentos fue aproximadamente 24 h que es cuando se realizó la evaluación de los mismos.

II.2.2 Desarrollo experimental

La metodología que se utilizó en el cultivo de larvas e inducción a la metamorfosis fue la misma que la descrita en el capítulo I del presente trabajo. Se realizaron dos experimentos para probar la eficacia del KCl como inductor. En el experimento uno se indujeron a la metamorfosis larvas competentes de erizo negro (*A. incisa*) en forma paralela a larvas competentes del erizo morado (*Strongylocentrotus purpuratus*) que se conoce responden favorablemente a la inducción con KCl. En el primer experimento (Experimento 1), se utilizaron 30 larvas competentes de erizo negro (*A. incisa*) de 60 días de edad posteriores a la fertilización. La temperatura a la cual se cultivaron las larvas fue de 14.0°C en promedio. Las larvas competentes de erizo morado (*S. purpuratus*) utilizadas en

forma paralela a la inducción con erizo negro tenían una edad posterior a la fertilización de 34 días y fueron cultivadas a una temperatura de 15.1°C en promedio. En el segundo experimento (Experimento 2) las larvas competentes de erizo negro fueron de 49 días posterior a la fertilización y fue cultivada a una temperatura promedio de 17.8°C. La larva competente de galleta de mar que se utilizó en forma tenía 14 d después de la fertilización y fueron cultivadas a una temperatura promedio de 18.2°C. Dado que durante la fase de experimentación se observó una resistencia a concentraciones altas de KCl se decidió probar un intervalo más amplio del que usualmente se ha probado en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo, para otras especies de erizos. Así mismo el tiempo de exposición al KCl fue mayor, dejando los tratamientos hasta 24 con la solución de KCl. Las concentraciones experimentales de KCl que se probaron fueron en un intervalo de 40-100 mM. El volumen final en cada una de las réplicas en los tratamientos fue de 5 ml y los experimentos se realizaron con 3 réplicas por tratamiento en cajas multipozos (Falcon), de manera similar a como se describen en el capítulo I del presente trabajo. La respuesta a la inducción se evaluó a las 24 h mediante observación con ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi 2000, Zeiss). Los experimentos con ambas especies se llevaron hasta 6 y 16 d posterior a la inducción con la finalidad de observar un posible desarrollo de metamorfosis completa.

II.3 Análisis Estadístico

A su vez el análisis estadístico utilizado fue similar al que se mencionó en el Capítulo I de este trabajo. A los resultados obtenidos en porcentajes se les aplicó la transformación arcoseno antes de realizar el análisis estadístico. Se valoraron la normalidad y homogeneidad de varianzas. Si los datos no resultaban normales ni homogéneos se utilizó estadística no paramétrica. El ANOVA de una vía se realizó para determinar diferencias significativas entre las concentraciones de los fármacos utilizados. En caso de encontrarse diferencias entre las concentraciones se aplicó la prueba a posteriori Fisher LSD.

Los experimentos que se realizaron fueron para evaluar la respuesta de las larvas en presencia de KCl como inductor artificial de la metamorfosis. Los experimentos se realizaron en erizo negro *A. incisa* y se compararon con resultados obtenidos con este compuesto en larvas de erizo morado (*S. purpuratus*) y galleta de mar (*D. excentricus*), los cuales se sabe responden con una metamorfosis completa cuando son inducidos en presencia de KCl (Preciado-Pinedo, 2000; Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Amador-Cano *et al.* 2006; Díaz-Pérez y Carpizo-Ituarte, 2011). La metamorfosis total o completa, podemos describirla como un organismo que ha perdido sus característica larvarias y por lo tanto la postlarva tiene bien desarrolladas las estructuras juveniles como espinas y pies ambulacrales (Figura 10). La inducción con KCl ha sido probada con eficacia en ambas especies en el Laboratorio de Ecología

y Biología del desarrollo del IIO. Cabe mencionar que dentro de los intentos por encontrar el activador artificial que indujera la metamorfosis en erizo negro, se probaron a la vez cloruro de calcio (CaCl_2), el neurotransmisor λ -amino butírico (GABA) y tiroxina. Con tiroxina las larvas competentes de erizo negro se incubaron por 48 h para después dejar las larvas en la solución de KCl a diferentes concentraciones; mientras que con los dos primeros inductores mencionados se dejaron las larvas competentes de erizo en las respectivas soluciones de CaCl_2 y GABA.



Figura 10. Metamorfosis completa en erizo negro *Arbacia incisa*

II.4 Resultados

Las larvas de hasta 64 días de edad de erizo negro (*A. incisa*), respondieron de manera parcial a la inducción a la metamorfosis con KCl comparadas en forma simultánea en tratamientos paralelos con erizo morado y galleta de mar (Figura 12,13). La metamorfosis parcial puede apreciarse en la Figura 11). En la evaluación a las 23 h fue posible observar los organismos adheridos al sustrato pero con estructuras larvarias como la presencia de los brazos y era evidente que las varillas calcáreas que sostienen la estructura larval de los brazos, todavía estaban presentes como cuando las larvas están en su periodo planctónico. La respuesta parcial no fue homogénea respecto a las características morfológicas que se observaron, algunos organismos

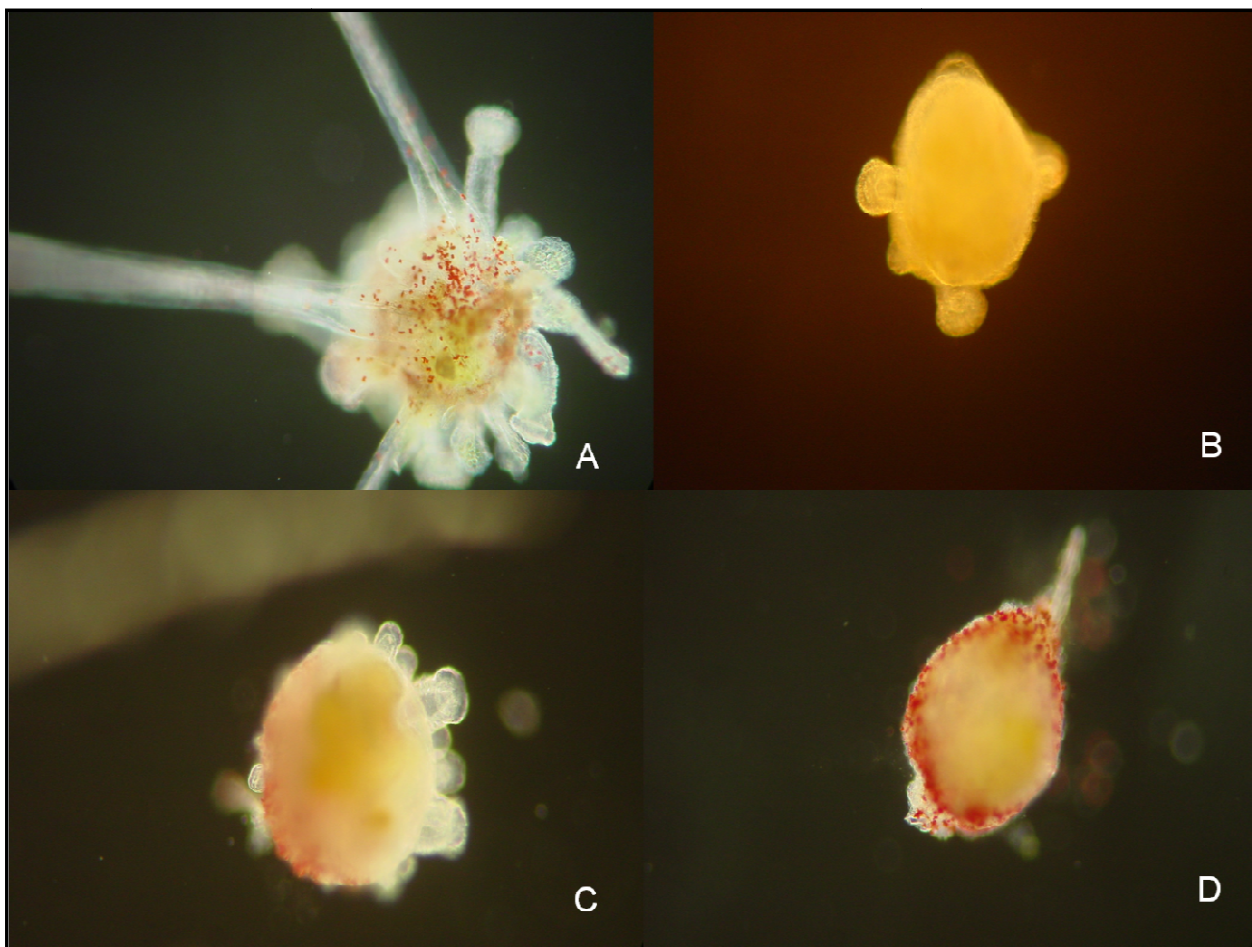


Figura 11. Efecto parcial del KCl en *A. incisa*. A) evaluación 7 d posterior a la inducción se aprecian los pies ambulacrales y porta aún las varillas calcáreas. B) larva parcialmente metamorfoseada en donde se aprecia los pies ambulacrales, no hay desarrollo de las espinas en evaluación 16 d posterior a la inducción. C) larva parcialmente metamorfoseada donde se observaron los pies ambulacrales en evaluación 24 h después de la inducción. D) larva evaluada a las 24 h posterior a la inducción donde se observa que esta adherida al sustrato, no desarrolló espinas y porta varilla calcárea.

tenían desprendido el epitelio y portaban las varillas calcáreas, otros solo se mantenían fijos al sustrato mediante pies ambulacrales, mientras que el resto se podían ver con pies ambulacrales y en movimiento manteniendo aún las varillas

calcáreas (Figura 11 A, B, C, D). La evaluación posterior a la inducción con KCl se llevó hasta los ocho días para observar si los organismos con metamorfosis parcial eran capaces de seguir desarrollando los pies ambulacrales y las espinas características de las postlarvas. Las dos especies tanto de galleta de mar (*D. excentricus*) como de erizo morado (*S. purpuratus*) con las cuales se comparó la respuesta parcial a la inducción desarrollaron metamorfosis completa y se pudo observar transcurridas 72 h después de la inducción. En el caso del erizo negro transcurrido un periodo de siete días después de que las larvas fueron inducidas a la metamorfosis con KCl, mantenían todavía su movilidad pero seguían conservando las varillas calcáreas y el epitelio larvario, sin haber alcanzado la morfología característica de la postlarva (Figura 11 A). Este resultado contrasta con la respuesta en las dos especies de equinoideos con las cuales se comparó, y donde el KCl ha demostrado su efectividad como inductor.

Los porcentajes de metamorfosis completa para erizo morado (*S. purpuratus*) y parcial para erizo negro (*A. incisa*) se muestran en la Figura 12. Los valores obtenidos con erizo morado fueron significativos respecto al control negativo ($F = 8.638$; $gl = 5$ (grados de libertad); $P < 0.001$). En este tratamiento se alcanzó un porcentaje cercano al 60 % de metamorfosis completa. La respuesta de erizo negro en la inducción de la metamorfosis parcial con KCl fue significativa respecto al control negativo ($F = 8.638$; $gl = 5$ (grados de libertad); $P < 0.001$), este control tuvo 0% de metamorfosis. Los porcentajes de

metamorfosis parcial con erizo negro que se alcanzaron en las concentraciones 5×10^{-2} y 6×10^{-2} M fueron de 79.6 y 85.7% respectivamente (Figura 12). Esta diferencia no fue significativa entre ellas ($P > 0.05$). Se observó una tendencia a disminuir el porcentaje de metamorfosis parcial en concentraciones mayores. En el tratamiento con la concentración de KCl 0.1 M, el porcentaje de metamorfosis fue de 30.5% y resultó dañino en la evaluación a las 24 h, los organismos se observaron con poca movilidad. Aún así se pudo observar que las larvas que no se metamorfoseaban eran capaces de recuperarse y permanecer por más tiempo respecto al resto de los tratamientos. Los mayores porcentajes de metamorfosis parcial fueron obtenidos en concentraciones 6×10^{-2} y 5×10^{-2} M, estas concentraciones son tóxicas para otras especies de equinoideos.

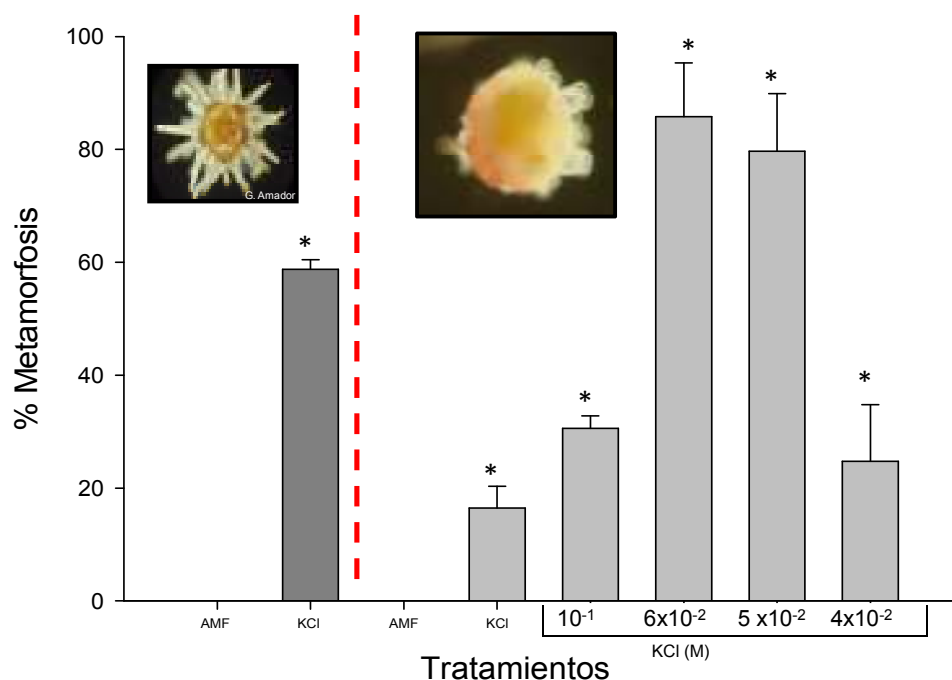


Figura 12. Porcentaje de metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Arbacia incisa* evaluadas 20 h después de exposición a diferentes concentraciones de KCl como inductor (N=3). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control negativo ($P<0.05$). Las líneas verticales indican el error estándar. Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inductor que se indican en el eje de las X (10^{-1} , 6×10^{-2} , 5×10^{-2} , 4×10^{-2}); KCl, 0.1 M (15 minutos); AMF=, agua de mar filtrada hasta $1 \mu\text{m}$ e irradiada con UV.

En el experimento 2 se obtuvieron resultados similares a lo observado en el experimento anterior con erizo morado. La respuesta de erizo negro al inductor artificial fue de metamorfosis parcial. En todos los tratamientos de inducción con KCl para erizo negro hubo una respuesta y fueron significativos

respecto tanto al control negativo como al control positivo ($F= 25.525$; $gl=11$ (grados de libertad); $P<0.001$) (Figura 13). Este resultado se incrementó en la evaluación a las 47 h de iniciado el experimento, alcanzando porcentajes de metamorfosis parcial de 41.9 y 55.7% respectivamente. Esta diferencia en el porcentaje resultó significativamente diferente entre los dos tratamientos para las dos evaluaciones ($F= 25.525$; $gl=11$ (grados de libertad); $P<0.001$). A su vez la galleta de mar respondió a la inducción con KCl, con una metamorfosis completa (Figura 13). Esta respuesta fue la esperada al igual que la que se encontró para erizo morado. El porcentaje de metamorfosis completa en el control positivo con galleta de mar fue de 73.4%. Los organismos metamorfoseados se observaron con las estructuras características de una postlarva, con sus pies ambulacrales y las espinas juveniles claramente presente como lo muestran Olivares-Bañuelos *et al.* (2012), lo cual contrasta con el experimento de inducción en erizo negro. Los organismos parcialmente metamorfoseados se observaron con las varillas calcáreas de los brazos larvarios sobre el área aboral y/o con una apariencia suave o frágil (Figura 11 D). Los mayores porcentajes de metamorfosis parcial se encontraron en las concentraciones 7×10^{-2} , 6×10^{-2} M.

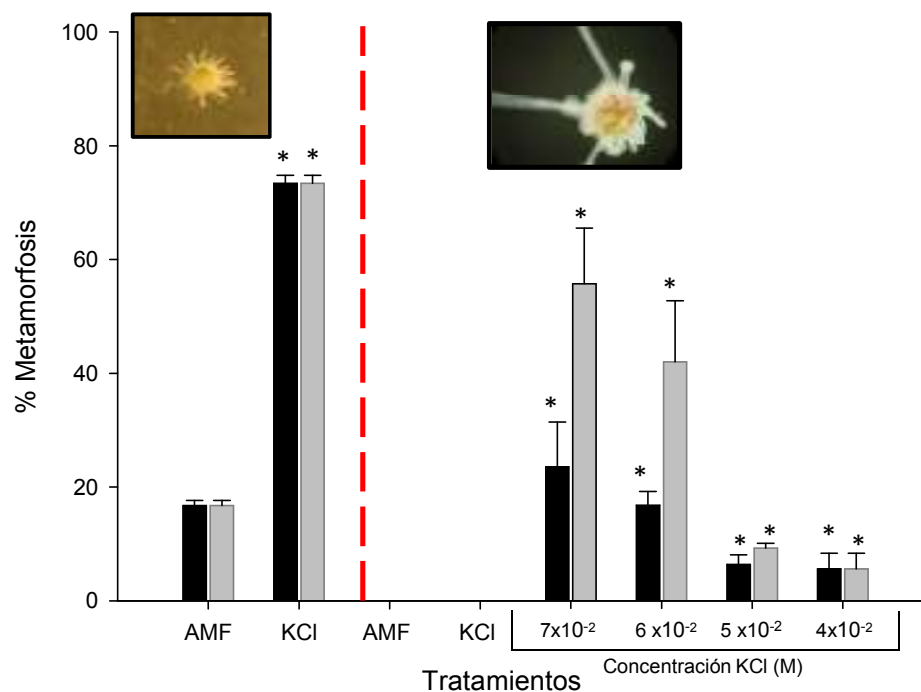


Figura 13. Porcentaje de metamorfosis de galleta de mar *Dendraster excentricus* y *Arbacia incisa* en evaluación 23 y 47 h después de exposición a diferentes concentraciones de KCl, (N=3). Los asteriscos indican diferencia significativa respecto al control negativo ($P < 0.05$). Las líneas verticales indican el error estándar. Los tratamientos incluyen: las concentraciones del inductor que se indican en el eje de las X (7×10^{-2} , 6×10^{-2} , 5×10^{-2} y 4×10^{-2} M); Positivo= KCl, 0.1 M (15 minutos); Negativo= AMF, agua de mar filtrada hasta $1 \mu\text{m}$ e irradiada con UV.

II.5 Discusión

La respuesta de las larvas competentes de *A. incisa* ante la inducción con KCl parece no ser la misma que otros invertebrados marinos, incluyendo otros equinoideos. Esta respuesta parece reforzarse con la nula respuesta a la inducción con calcio, GABA o tiroxina (resultados no presentados), ya que otras especies de equinoideos responden claramente a la presencia de estos inductores. La inducción a la metamorfosis con KCl en *A. incisa* puede indicar que las larvas competentes son capaces de percibir el estímulo inicial e iniciar los subsecuentes cambios fisiológicos y morfológicos que la metamorfosis requiere en su inicio. Esto implica que esta especie, posiblemente responda inicialmente a la presencia de KCl, en la misma forma que se supone lo hacen otros invertebrados incluyendo equinodermos. De manera general, se sugiere que el K^+ altera la homeostasis neuronal favoreciendo cambios en el potencial de la membrana del grupo de terminales nerviosas que intervienen en el asentamiento y metamorfosis (Müller y Leitz, 2002; Bishop *et al.* 2006).

La exposición de las larvas de hasta 64 días de erizo negro a la solución de KCl fue constante durante 24 h, lo que indica una resistencia mayor a responder a metamorfosearse en presencia de este inductor. Los antecedentes en la inducción con KCl de otras especies de equinodermos en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo, indican que los organismos pueden ser inducidos con pulsos de 15 minutos con nulas o muy bajas mortalidades y que un exceso mayor a las 24 h puede ser letal (Carpizo-Ituarte *et al.* 2000). Lo

anterior contrasta fuertemente con lo obtenido en el erizo negro. Se ha reportado que hay larvas de otros grupos de invertebrados marinos que no son estimulados para metamorfosearse con exceso de K^+ en el agua (Eyster y Pechenik, 1987; Pearce y Scheibling, 1994), y que puede inhibir la metamorfosis en otras (Rittschof *et al.* 1986; Todd *et al.* 1991; Wend y Woollacott, 2005) o ser un buen inductor del asentamiento y metamorfosis (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Carpizo-Ituarte *et al.* 2002; Amador-Cano *et al.* 2006; Gallardo y Sánchez, 2008; Young *et al.* 2011; Díaz-Pérez y Carpizo-Ituarte, 2011).

Dentro de los trabajos realizados con algunas especies de invertebrados marinos en las cuales se ha encontrado una respuesta controversial durante la activación de la metamorfosis podemos citar los siguientes; el potasio a concentraciones altas aparentemente tiene efecto inhibitor de *Balanus amphitrite* a concentraciones de 6 a 12 mM (Rittschof *et al.* 1986). Dentro de los bivalvos el mejillón *Mytilus edulis* es primer molusco en donde concentraciones de 5-20 mM de KCl no tiene efecto en la metamorfosis (Eyster y Pechenick, 1987); esto ocurre también en la almeja *Cytopleura costata* (Gustafson *et al.* 1991). Por otra parte en el nudibranquio *Adalaria proxima* el potasio inhibe la metamorfosis a concentraciones mayores de 29 mM (Todd *et al.* 1991). En briozoarios como *Bugula simplex*, *B. stolonifera*, *B. turrita* la metamorfosis puede ser inhibida si se expone a concentraciones mayores de 25 mM, mientras que si larvas de esta especie se exponen a pulsos de 5, 15, 30 min en

una concentración 10 mM de potasio no se inicia el asentamiento en las especies mencionadas (Wend y Woollacott, 2005).

Por los antecedentes podemos ver que la respuesta de los grupos de invertebrados marinos a la inducción con potasio es diferente. Para el caso de *A. incisa* el potasio pudo haber despolarizado la membrana, afectando las células excitables externas, y ser suficiente para iniciar el proceso de metamorfosis (Baulon y Morse, 1984). Sin embargo, en algún momento la señal resulta insuficiente para desencadenar la segunda fase de eventos en donde las larvas completan la metamorfosis.

Nuestro resultado contribuye a generar información de los equinoideos en general y sobre los procesos que parece difieren durante la metamorfosis en el erizo negro. *A. incisa* responde parcialmente a la metamorfosis en concentraciones mayores a la que para otros equinoideos serían tóxicas y mortales. A pesar de que desconocemos el significado o la frecuencia que la metamorfosis parcial pudiera presentarse en el océano, si llegara a ocurrir, el no completar la metamorfosis en esta especie, puede vulnerar su capacidad para sobrevivir en el medio, ya que no se transforma en una postlarva funcional capaz de reclutarse a las poblaciones de adultos.

Discusión Final

Los componentes que participan durante la metamorfosis son diversos en invertebrados marinos y deben actuar de manera sincronizada para el éxito de este evento. En este estudio se abarcaron ciertos componentes que participan durante la metamorfosis de la galleta de mar *D. excentricus* y el erizo negro *A. incisa*. Los resultados muestran la participación de la síntesis de mRNA, síntesis de proteínas, las rutas de las THs, el NO, para *D. excentricus*, así como una respuesta parcial a la inducción con KCl para *A. incisa*. Esta sorpresiva respuesta para *A. incisa*, abre la posibilidad que estudiar hasta qué punto las rutas de señalización probadas en otros equinoideos, son también necesarias para este organismo y entender su significado evolutivo; sin embargo el grado de conocimiento que tenemos de esta última especie en condiciones de laboratorio, no permite profundizar más en este momento.

Particularmente nuestros resultados en la galleta de mar se suman a otras especies donde el NO ha demostrado su participación durante la metamorfosis, como el erizo blanco *L. pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001), el gasterópodo *I. obsoleta* (Froggett y Leise, 1999; Leise *et al.* 2001). Así también la galleta de mar se suma a otros invertebrados donde se ha documentado la participación de los procesos de síntesis de mRNA y proteínas, particularmente durante la fase de conclusión de la metamorfosis, como el caso del poliqueto

Hydroides elegans (Carpizo-Iltuarte y Hadfield, 2003) y el erizo blanco *Lytechinus pictus* (Amador-Cano, 2007).

Por su parte las THs tienen antecedentes en disminuir el tiempo de formación de las estructuras larvarias así como de la competencia en galleta de mar. La tiroxina por si sola es capaz de promover la metamorfosis cuando es agregada externamente en larvas competentes de galleta de mar. Esta respuesta es diferente a la obtenida con erizo blanco, donde hubo una incubación previa de las larvas competentes con tiroxina sin tener efecto inductor, por lo que además de la tiroxina se presupone la presencia de una señal medioambiental para llevar a cabo la metamorfosis (Bishop *et al.* 2006).

Se obtuvo inducción con tiroxina en una combinación con SNAP, esto nos puede indicar que el efecto de tiroxina de alguna manera ya sea directa o indirectamente regula la producción de la NOS para que el NO sea producido. La tiroxina puede entonces inhibir la producción del NO y que la metamorfosis sea generada en la galleta de mar. Una respuesta similar se esperaría, para el caso de combinar un inhibidor de hormonas tiroideas con un inhibidor de la síntesis del NO, lo cual fue el resultado en la combinación de L-NAME con tiourea. Esta interacción entre ambas rutas fue reportada para el erizo blanco *L. pictus* (Bishop *et al.* 2006). Se puede mencionar que también existe relación de la ruta del NO con el KCl y que el primero puede ser capaz de inhibir el efecto del potasio.

Sin embargo, la participación completa de estas o más rutas, es un camino por recorrer en el estudio de la señalización celular durante la

metamorfosis en invertebrados marinos. La galleta de mar puede alcanzar la metamorfosis al inhibir los procesos mencionados, pero no puede consolidar las estructuras características de las postlarvas para que sigan creciendo como juveniles funcionales. Debido tal vez a que posterior al evento de la transición metamórfica, muy al inicio del periodo postlarval, se requieren la transcripción y la traducción para la formación de nuevos tejidos y estructuras. Una prueba de lo anterior es que ante la presencia de inhibidores de transcripción y traducción, las larvas, a pesar de ser capaces de deshacerse de las estructuras larvales y evertir el rudimento con sus características postlarvales (pies ambulacrales y espinas juveniles), son incapaces de continuar su desarrollo debido a la necesidad imperante de sintetizar nuevas macromoléculas que sustenten su crecimiento y desarrollo como organismos juveniles.

A su vez el resultado en la inducción parcial con KCl en el erizo negro demuestra que el potasio por sí solo no es suficiente en esta especie para terminar de desencadenar los cambios morfogenéticos durante la metamorfosis, debido tal vez a que se requieren de componentes que pueden ser adquiridos mediante la alimentación. La tiroxina es importante para el desarrollo del rudimento juvenil en especies de erizo, así como también, es necesaria para disminuir el tiempo de formación del rudimento y las estructuras juveniles. Las especies que se han cultivado en nuestro laboratorio han sido alimentadas con la microalga *Rhodomonas sp.* y han respondido a la inducción con el KCl. No así la especie de erizo negro, por lo que no sabemos si la ingesta de alimento sea suficiente para proporcionar la tiroxina necesaria para alcanzar la

metamorfosis. Continuar con el conocimiento de las características de esta especie al llegar a la competencia y complementarla con otros estudios sobre requerimientos nutricionales pueden ser un campo de interés futuro.

CONCLUSIONES

- Los procesos de transcripción y traducción son necesarios para que el proceso metamórfico sea completo en la inducción a la metamorfosis de *Dendraster excentricus*, sin embargo, parece que en presencia de inhibidores, las larvas son capaces de evertir el rudimento juvenil y adquirir la morfología de la postlarva.
- *Dendraster excentricus* se suma a otros invertebrados marinos donde los procesos de transcripción y traducción son requeridos durante la metamorfosis.
- La ruta de THs respondió corriente abajo de la ruta del NO en la metamorfosis de la galleta de mar *D. excentricus*.
- El erizo negro *A. incisa* responde parcialmente a la inducción a la metamorfosis con KCl. Esta especie parece tolerar por mayor tiempo concentraciones mayores a las usualmente utilizadas para otros equinoideos.

Referencias

- Amador-Cano G. 2007. Cambios morfogénéticos y procesos reguladores en la metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Tesis de Doctorado en Oceanografía Costera. UABC. 130 pp.
- Amador-Cano G, Carpizo-Ituarte E y Cristino-Jorge D. 2006. The role of the protein Kinase C, G-protein coupled receptors and calcium flux during metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Biol. Bull. 210: 121-131.
- Baloun AJ y Morse DE. 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Halotis rufescens* (Gastropoda). Biol. Bull. 167:124-138.
- Bishop CD, Bates WR y Brandhorst BP. 2001. Regulation of metamorphosis in ascidian involves NO/cGMP signaling and HSP90. J. Exp. Zool. 289: 374-384.
- Bishop CD y Brandhorst BP. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. Biol. Bull. 201: 394-404.
- Bishop CD y Brandhorst BP. 2003. On nitric oxide signaling, metamorphosis, and the evolution of biphasic life cycles. Evol. Dev. 5: 542–550.
- Bishop CD, Huggett MJ, Heyland A, Hodin A y Brandhorst BP. 2006. Interspecific variation in metamorphic competence in marine

invertebrates: the significance for comparative investigations into the timing of metamorphosis. *Int. Comp. Biol.* 46: 662–682.

Burke RD 1980. Podial sensory receptors and the induction of metamorphosis in echinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 47: 223-234.

Burke RD. 1984. Pheromonal control of metamorphosis in the pacific sand dollar,

Dendraster excentricus. *Science* 225:440–442

Carpizo-Ituarte E y De la Rosa-Vélez J.1993. L-Thyroxine induces metamorphosis in two species of marine gasteropods. *American Zoologist.* 33:41A.

Carpizo-Ituarte E y Hadfield MG. 1998. Stimulation of metamorphosis in the polychaete *Hydroides elegans* Haswell (Serpulidae). *Biol. Bull.* 194: 14-24.

Carpizo-Ituarte E y Hadfield MG. 2003. Transcription and translation inhibitors permit metamorphosis up to radiole formation in the serpulid polychaete

Hydroides elegans Haswell. *Biol. Bull.* 204: 114-125.

Carpizo-Ituarte E, Salas–Garza A y Parés-Sierra G. 2002. Inducción de la metamorfosis con KCl en tres especies de erizos de mar y sus implicaciones en la producción de juveniles. *Ciencias Marinas.* 28: 157-166.

- Castellanos-Kotkoff M. 2004. Efecto de la tiroxina como inductor a la metamorfosis del erizo de mar y el patrón de expresión del receptor nuclear COUP-TF en *Lytechinus pictus*. Tesis licenciatura. UABC. 95 pp.
- Chino Y, Saito M, Yamasu K, Suyemitsu T e Ishihara K.1994. Formation of the adult rudiment of sea-urchins is influenced by thyroid hormones. Dev. Biol. 161: 1-11.
- Del Carmen KA y Hadfield MG. 1999. Metamorphosis in a marine gastropod: the role of transcription and translation. Am. Zool. 39: 20A.
- De Loof A. 2008. Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: recent successes and remaining major challenges. General and Comparative Endocrinology, 155: 3–13.
- Díaz-Pérez L y Carpizo-Iltuarte E. 2011. Effect of thermal stress on survival and delay of metamorphosis in larvae of the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Ciencias Marinas. 37: 403-414.
- Dobretsov SV y Qian PY. 2003. Pharmacological induction of larval settlement and metamorphosis in the blue mussel *Mytilus edulis* L. Biofouling 19: 57–63.
- Eyster LS y Pechenik JA. 1987. Attachment of *Mytilus edulis* larvae on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. JExp Marine Biol Ecol. 114: 99-110.
- Froggett SJ y Leise EM. 1999. Metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa*

obsoleta, Yes or No?. Biol. Bull. 196: 57-62.

Gallardo CS y Sánchez KA. 2001. Induction of metamorphosis and its effect on the growth and survival of postmetamorphic juveniles of *Chorus giganteus* (Gastropoda: Muricidae). Aquaculture. 201, 241 – 250.

Gustafson R G, Creswell RL, Jacobsen TR, y Vaughan DE. 1991. Larval biology and mariculture of the angelwing clam, *Cytopleura costata*. Aquaculture. 95: 257-279.

Hadfield MG. 1998. The D P Wilson lecture. Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future. Biofouling. 12: 9-29.

Hadfield MG, Carpizo-Ituarte E, Del Carmen K y Nedved BT. 2001. Metamorphic competence, a major adaptive convergence in marine invertebrate larvae. Amer. Zool. 41: 1123-1131.

Hadfield MG, Meleshkevitch EA y Boudko DY. 2000. The Apical Sensory Organ of a Gastropod Veliger Is a Receptor for Settlement Cues. Biol. Bull. 198: 67-76.

Heyland A y Hodin J. 2004. Heterochronic developmental shift caused by thyroid hormone in larval sand dollars and its implications for phenotypic plasticity and the evolution of nonfeeding development. Evolution. 58:524–38.

Heyland A, Hodin J y Reitzel AM 2005. Hormone signaling in evolution and development: a non-model system approach. Bioessays 27:64–75.

- Heyland A y Moroz LL. 2006. Signalling mechanisms underlying metamorphic transitions in animals. *Integrative and Comparative Biology*. 46: 743–759.
- Heyland A y Moroz LL. 2006. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae. *The Journal Experimental Biology*. 208: 4355-4361
- Heyland A, Price DA, Bodnarova M y Moroz LL. 2006. Thyroid hormone metabolism and thyroid peroxidase function in two non-chordate animals. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 10.1002/ JEZ.B.2003.
- Heyland A, Reitzel AM y Hodin J. 2004. Thyroid hormones determine developmental mode in sand dollars (Echinodermata: Echinoidea). *Evol Dev* 6:382–92.
- Heyland A, Reitzel AM, Price D y Moroz LL. 2006. Endogenous thyroid hormone synthesis in facultative planktotrophic larvae of the sand dollar *Clypeaster rosaceus*: implications for the evolutionary loss of larval feeding. *Evol. Dev.*, 8: 568–579.
- Hinegardner RT. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* 137: 465-475.
- Holm ER, Nedved BT, Carpizo-Ituarte E y Hadfield MG. 1998. Metamorphic signal transduction in *Hydroides elegans* (Polychaeta:Serpulidae) is not mediated by a G protein. *Biol. Bull.* 195: 21-29.

- Leckie C, Empson R, Becchetti A, Thomas J, Galione A y Whitaker M. 2003. The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 278, 12247– 12254.
- Leise EM, Kempf SC, Durham NR y Gifondorwa DJ. 2004. Induction of metamorphosis in the marine *gastropod Ilyanassa obsoleta*: 5HT, NO and programmed cell death. *Acta Biol. Hung.* 55:293–300.
- Leise EM, Thavaradhara K, Durham NR y Turner BE. 2001. Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*. *Amer. Zool.* 41: 258-267.
- Manzon RG, Holmes JA y Youson JH. 2001. Variable effects of goitrogens in inducing precocious metamorphosis in sea lampreys (*Petromyzon marinus*). *J Exp Zool* 289:290–303.
- Merril RJ y Hobson ES. 1970. Field Observations of *Dendraster excentricus*, a Sand Dollar of Western North America. *Am Midl. Nat.* 83: 595-624.
- Mooi R 1977. Sand Dollars of the genus *Dendraster* (Echinoidea: Clypeasteroidea): Phylogenetics systematic, heterochrony and distribution of extant species. *Bull. Mar. Sci.* 61: 343-375.
- Moncada S, Palmer RM y Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Müller WA y Leitz T. 2002. Metamorphosis in the Cnidaria. *Can. J. Zool.* 80: 1755-1771.

- Oliveros-Bañuelos T, Figueroa-Flores S y Carpizo-Ituarte E. 2012. Índice gonadal y desarrollo larvario de la galleta de mar *Dendraster excentricus* (Eschscholtz, 1831; Echinodermata; Echinoidea) en Baja California, Mexico. Ciencias Marinas 38:411-425
- Oppenheimer JH, Schwartz HL, Mariash CN, Kinlaw WB, Wong NCW, y Freamo HC. 1987. Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. Endocr Rev 8: 288–308.
- Palumbo A. 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 142: 241–248.
- Pawlik JR. 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phracmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Sabellariidae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. Bull. Mar. Sci. 46: 512-536.
- Pechenik JA y Rice M E. 2001. Influence of delayed metamorphosis on postsettlement survival and growth in the sipunculan *Apionsoma misakianum*. Invertebrate Biology 120: 50-57.
- Pechenik JA, Wendt DE y Jarrett JN. 1998. Metamorphosis is not a new beginning. Larval experience influences juvenile performance. BioScience 48: 901–910. Invertebrate Biology 120: 50-57.

- Pearce CM y Scheibling RE. 1994. Induction of metamorphosis of larval echinoids (*Strongylocentrotus droebachiensis* and *Echinarachnius parma*) by potassium chloride (KCL). Invert. Rep. Devel. 26: 213-220.
- Preciado-Pinedo M. 2000. KCl, GABA y L-glutamina como inductores a la metamorfosis en larvas de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus*. Tesis de Maestría, FCM. UABC. 51 pp.
- Rittschof D, Maki J, Mitchell R y Costlow JD. 1986. Ion and neuropharmacological studies of barnacle Settlement. Neth. J. Sea Res. 20: 269-275.
- Saito M, Seki M, Amemiya S, Yamasu K y Suyemitsu T. 1998. Induction of metamorphosis in the sand dollar *peronella japonica* by thyroid hormones. Dev Growth Differ 40:307–312.
- Strathmann MF. 1987. Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific. Phylum Echinodermata, class Echinoidea. pp. 670 in Coast. University of Washington Press, Seattle, Washington.
- Todd CD, Bentley MG y Havenhand JN. 1991. Larval Metamorphosis of the Opisthobranch Mollusc *Adalaria proxima* (Gastropoda: Nudibranchia): The Effects of the Choline and Elevated Potassium Ion Concentration. J. mar. Biol. 71: 53-72.
- Are G-protein-coupled receptor involved in mediating larval settlement and metamorphosis of coral planulae?. 2012. Biol. Bull. 22: 128-136

- Wendt DE y Woollacott RM. 1995. Induction of larval settlement by KCl in three species of *Bugula* (Bryozoa), Invertebrate Biol. 114: 345-351.
- Yang JL, Satuito CG, Bao WY y Kitamura H. 2008. Induction of metamorphosis of pediveliger larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 using neuroactive compounds, KCl, NH₄Cl and organic solvents. Biofouling. 24: 461 – 470.
- Yool AJ, Grau SM, Hadfield MG, Jensen RA, Markell DA y Morse DE. 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol. Bull. 170: 255-266.
- Young T, Alfaro AC y Robertson J. 2011. Effect of neuroactive compounds on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae. Aquaculture. 319: 277-283
- Youson JH. 2003. The Impact of Environmental and Hormonal Cues on the Evolution of Fish Metamorphosis. In: Hall BK, Pearson RD, Müller GB, editors. Environment, Development, and Evolution: Toward a Synthesis. Cambridge, London: MIT Press. 239–277.
- Yu X, He W, Gu JD, He M, Yan Y, 2008. The effect of chemical cues on settlement of pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker) larvae. Aquaculture 277: 83–91.

