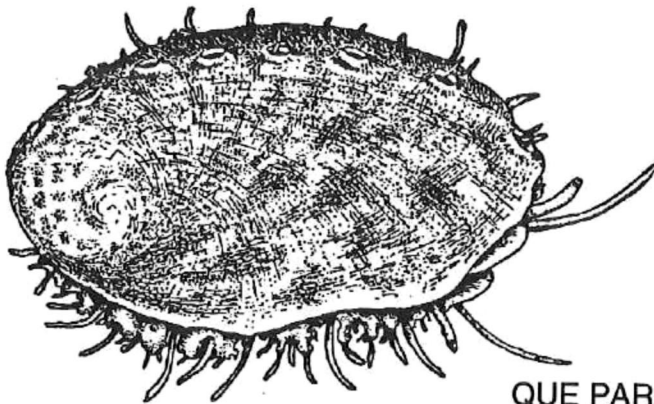




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**Efecto de la hormona L-tiroxina y compuestos
neuroactivos en la inducción a la metamorfosis
de dos especies de moluscos gasterópodos**



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

EUGENIO CARPIZO ITUARTE

ENSENADA, B.C. FEBRERO DE 1994

**EFFECTO DE LA L-TIROXINA Y COMPUESTOS
NEUROACTIVOS EN LA INDUCCION A LA
METAMORFOSIS DE DOS ESPECIES DE
GASTEROPODOS**

**TESIS
QUE PRESENTA:**

Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte



**Dr. Jorge de la Rosa Velez
Presidente del Jurado**



**M.C. Zaul García Esquivel
Sinodal**



**M.C. Rafael Solana Sansores
Sinodal**

**Lo hermoso no ha sido escribir estas líneas,
sino compartir con ustedes el haberlas escrito.**

Con todo mi amor

a Marce

Karin

y Andrea.

**Su ejemplo ha sido siempre la fuerza que
me deja ver más adelante.**

**Con todo mi cariño y respeto
a Fidencio y Maris, mis Padres.**

AGRADECIMIENTOS

El entusiasmo para seguir adelante es el ingrediente principal del vigor científico, y éste es alimentado por el ejemplo de los colegas que te rodean.

Arthur Kornberg

Agradezco al Dr. Jorge de la Rosa Velez; al "George", porque su apoyo como Director, compañero y amigo es invaluable y espero que continúe.

Al M.C. Rafael Solana Sansores., que desde que salió de Sepesca lo tenemos más cerca, y eso, académica y estadísticamente nos favorece.

Al M.C. Zaúl García Esquivel, porque su seriedad y dedicación favorecen el que continuemos adelante y eso es bueno.

Al "M.C." Alfredo Salas Garza, por su amistad y soporte durante los años que hemos colaborado juntos, y durante los cuales la comunicación ha sido sincera y productiva.

Al Oc. Lewis McAnally Salas; siempre estuvo dispuesto a discutir conmigo y pasar las tardes frente a la máquina para hacer de éste un mejor trabajo.

A mis compañeros de la maestría, en forma particular a Lorenzo, Roberto, Dolores, Nacho, Carolina, Gustavo, Mora May y Victor Hugo, con quienes compartí estos años de aprendizaje.

**La tarea no es tanto ver lo que uno no ha visto todavía,
sino pensar lo que nadie ha pensado de lo que todo el
mundo ve.**

Szent-Gyorgy

I N D I C E

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. MARCO TEORICO	5
2.1. El proceso de metamorfosis en invertebrados marinos.	5
2.2. El papel de las hormonas tiroideas, GABA, L-DOPA, norepinefrina y el ion potasio en el proceso de metamorfosis en moluscos.	7
2.3. Modelo Conceptual de la metamorfosis en gasterópodos.	15
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y METODOS	18
4.1. Selección de especies y compuestos neuroactivos.	18
4.2. Obtención y cultivo de larvas.	19
4.3. Diseño Experimental	22
4.3.1. Diseño general utilizado para los diferentes experimentos.	22
4.3.2. Experimentos realizados	24
4.3.3. Evaluación de los experimentos.	27
4.3.4. Procesamiento estadístico.	27
5. RESULTADOS	31
5.1. Experimentos con abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>).	31
5.2. Experimento con el caracol <i>Astraea undosa</i> .	42
6. DISCUSION	45
6.1. Efecto de L-Tiroxina, GABA, L-DOPA, Norepinefrina y KCl en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>).	45
6.2. Cuantificación del efecto del NaOH utilizado para disolver la hormona L-tiroxina (Experimentos 2 y 3).	48
6.3. Efecto de la Hormona L--tiroxina y concentración de NaOH en la inducción a la metamorfosis de abulón rojo (experimentos 4a, 4b y 5).	49
6.4. Efecto de la hormona L-tiroxina, GABA, NaOH y KCl en la inducción a la metamorfosis del caracol <i>Astraea undosa</i> .	51

6.5. Patrones de comportamiento observados durante los experimentos y posibles mecanismos de acción de los inductores.	52
7. CONCLUSIONES	62
8. RECOMENDACIONES	63
9. REFERENCIAS	64
ANEXOS	73
Anexo I. Resumen de las características de los experimentos.	74
Anexo II. Resumen de las tablas de ANOVA para los seis experimentos realizados.	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura química de la L-Tiroxina con su precursor el aminoácido Tirosina.	8
Figura 2.- Síntesis de ácido -aminobutírico (GABA) a partir de ácido glutámico.	11
Figura 3.- Síntesis de algunas de las principales catecolaminas entre las que se incluyen dopamina y norepinefrina.	13
Figura 4.- Modelo conceptual del proceso de asentamiento y metamorfosis en larvas de invertebrados marinos.	17
Figura 5.- A) Larva competente de abulón que muestra los tentáculos cefálicos ramificados. B) Larva competente de abulón que muestra el comportamiento típico de búsqueda de sustrato	21
Figura 6.- Representación esquemática del modelo experimental utilizado ejemplificado con solo dos compuestos.	23
Figura 7.- Diagrama de flujo que muestra de manera esquemática la metodología utilizada para cada especie en la realización de los experimentos.	25
Figura 8.- Vista dorsal y ventral de larva de abulón recién metamorfozada donde se muestra la pérdida total del velo.	28
Figura 9.- Porcentaje de metamorfosis con los diferentes tratamientos probados durante el primer experimento con abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>).	32
Figura 10.- Larva metamorfozada anormalmente en presencia de L-DOPA y Norepinefrina.	33
Figura 11.- Porcentaje de metamorfosis obtenida en los diferentes tratamientos durante el experimento 2 con el abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> .	34
Figura 12.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 3 con el abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> .	36
Figura 13.- Porcentaje de metamorfosis evaluada a las 20 horas, obtenida con los diferentes tratamientos durante la primera parte del experimento 4 (4A) con abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> .	38

Figura 14.- Porcentaje de metamorfosis evaluada a las 44 horas, obtenida con los diferentes tratamientos durante la evaluación final del experimento 4 (4B) con abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> .	39
Figura 15.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 5 con abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> .	41
Figura 16.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 6 con el caracol <i>Astraea undosa</i> .	43

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Trabajos realizados con las especies propuestas para este estudio con los diferentes compuestos.	15
Tabla II. Compuestos y concentraciones utilizadas durante los experimentos.	26
Tabla III. Características del experimento 1 de inducción a la metamorfosis.	74
Tabla IV. Características del experimento 2 de inducción a la metamorfosis.	74
Tabla V. Características del experimento 3 de inducción a la metamorfosis.	75
Tabla VI. Características del experimento 4A de inducción a la metamorfosis.	75
Tabla VII. Características del experimento 4B de inducción a la metamorfosis.	76
Tabla VIII. Características del experimento 5 de inducción a la metamorfosis.	76
Tabla IX. Características del experimento 6 de inducción a la metamorfosis.	77
Tabla X. ANOVA y contrastes realizados para el primer experimento con abulón rojo.	78
Tabla XI. ANOVA y contrastes realizados para el segundo experimento con abulón rojo.	79
Tabla XII. ANOVA y contrastes realizados para el tercer experimento con abulón rojo.	79
Tabla XIII. ANOVA y contrastes realizados para el cuarto experimento (parte B) con abulón rojo.	80
Tabla XIV. ANOVA y contrastes realizados para el quinto experimento con abulón rojo.	81
Tabla XV. ANOVA y contrastes realizados para el sexto experimento realizado con el caracol <i>Astraea undosa</i>	82

RESUMEN

En la mayoría de los grupos de invertebrados marinos es común un periodo larvario al que le sigue un proceso de metamorfosis. En el caso de los moluscos gasterópodos como el abulón *Haliotis rufescens* y el caracol *Astraea undosa* este patrón se presenta durante su ciclo de vida. Entender los mecanismos, así como las sustancias que inducen la metamorfosis resulta de particular interés ya que en estas especies, así como en otras de importancia en acuicultura, este proceso es determinante para su cultivo. Asimismo, la metamorfosis es un elemento determinante en el establecimiento de las poblaciones bentónicas. Con lo anterior en mente, se realizaron seis experimentos mediante un diseño experimental anidado. Se probaron cinco compuestos neuroactivos (L-tiroxina, GABA, L-Dopa, norepinefrina y KCl), con un interés particular en la L-tiroxina debido a la diversidad de procesos que regulan estas hormonas en vertebrados y que incluyen la diferenciación celular y la maduración neuronal. Los experimentos se realizaron en forma independiente para cada especie en agua de mar filtrada hasta 0.45 μm . El porcentaje de metamorfosis se evaluó entre 17 y 44 horas después de la inducción en función de cada experimento. Los mayores porcentajes de metamorfosis se obtuvieron con L-tiroxina (98.83%, exp. 2; 100%, exp. 4 y 85.45%, exp. 5 para *H. rufescens* y 97.01%, exp. 6 para *A. undosa*). Estos valores resultaron significativamente diferentes ($p \leq 0.01$) a los obtenidos con GABA (71.88%) cuando se evaluó en forma simultánea a L-tiroxina durante el experimento dos con *H. rufescens*, y similares a los obtenidos en la concentración más alta de GABA utilizada con *A. undosa* (93.59% de metamorfosis). El mayor porcentaje de metamorfosis con KCl fue de 53.62%. Con el resto de los compuestos (norepinefrina y L-Dopa) se obtuvieron solamente metamorfosis anormales. Por otra parte, como resultado de la utilización de NaOH para disolver la L-tiroxina se obtuvieron porcentajes de metamorfosis con este compuesto. El porcentaje de metamorfosis con NaOH alcanzó valores hasta de 88.69% y resultó similar al obtenido con L-tiroxina en el mismo experimento. Para el caso de la L-tiroxina y el NaOH es la primera evidencia reportada sobre el efecto de estas sustancias en la metamorfosis de estas especies. Se desconoce aún cuales son los mecanismos mediante los cuales estas sustancias neuroactivas desencadenan el proceso de metamorfosis.

1. INTRODUCCION

En la mayoría de los grupos de invertebrados marinos, un periodo de transformación que involucra tanto cambios morfogénéticos como conductuales y de habitat, forma parte integral de su ciclo de vida. A este periodo se le reconoce en forma global como "metamorfosis", aunque en forma más estricta ésta solo incluye los cambios morfogénéticos a partir de los cuales el proceso resulta irreversible.

Debido al tamaño reducido de los estadios larvales ha resultado muy complejo comprender, en la mayoría de los grupos estudiados, cuales son los factores y mecanismos que regulan la metamorfosis, tanto a nivel ambiental como endócrino. Si se toma en consideración lo anterior, evaluar el efecto que tienen diferentes compuestos con probada actividad neuronal u hormonal en grupos de especies emparentadas de gasterópodos, puede aportar información acerca del papel de estas sustancias en el inicio de la metamorfosis en este grupo de organismos.

Por otra parte, muchas de las generalizaciones que se obtienen en cualquier subdisciplina de la Biología son producto de un reducido número de ejemplos, por lo que en un proceso complejo como lo es la metamorfosis en invertebrados marinos, más casos de estudio detallados y en la mayor variedad de condiciones posible favorecerán la comprensión de este fenómeno (Chia, 1989).

Durante la década pasada, la información que se generó acerca de la inducción a la metamorfosis por compuestos neuroactivos muestra pocas similitudes entre las diferentes clases de moluscos estudiados, y es menor aún, si se incluyen los diferentes fila (Pawlik, 1990).

Sin embargo, hasta el momento resulta reducido el número de especies con las que se han probado, en relación con la gran diversidad existente aún dentro de una misma clase de organismos.

En el caso particular de los moluscos gasterópodos, la metamorfosis se ha estudiado de manera sobresaliente en el abulón rojo, *Haliotis rufescens* (Morse *et al.*, 1979; Morse *et al.*, 1980; Morse, *et al.*, 1984; Morse y Morse, 1984a; Morse, 1985; Trapido-Rosenthal y Morse, 1985, 1986; Morse, 1990) y el nudibranquio, *Phestilla sibogae* (Bonar y Hadfield, 1974; Hadfield, 1984; Hadfield y Scheuer, 1895; Miller y Hadfield, 1986; Pennington y Hadfield, 1989; Hadfield y Pennington, 1990). Sin embargo, hasta el momento no se comprende en su totalidad el mecanismo o mecanismos endócrinos que regulan el proceso en ninguna de las dos especies.

Otras especies del mismo grupo de organismos en las que se ha inducido a la metamorfosis con diferentes compuestos comprenden el abulón azul, *Haliotis fulgens* (Searcy-Bernal *et al.*, 1988; García-Mendoza, 1991); el abulón japonés, *H. discus hannai* (Akashige *et al.*, 1981); el quitón, *Katharina tunicata* (Rumrill y Cameron, 1983); la lapa, *Crepidula fornicata* (Pechenik y Heyman, 1985, 1987; Pechenik y Gee, 1993) y el caracol *Ilyanassa obsoleta* (Levantine y Bonar, 1986). Por otra parte, aunque existe información sobre otros gasterópodos además de los mencionados, ésta se encuentra dispersa o bien los experimentos realizados solo incluyen la respuesta a un solo compuesto neuroactivo (Bonar *et al.*, 1990; Pawlik, 1990).

En diferentes investigaciones relacionadas con la metamorfosis en invertebrados, la participación del sistema nervioso, endócrino o neuroendócrino de las larvas se sugiere como el centro primario de control del inicio de la metamorfosis como

respuesta a estímulos ambientales (Burke, 1983a, 1983b; Chia, 1978, 1989; Coon *et al.*, 1985; Hadfield, 1978, 1986; Scheltema, 1974). El papel específico que desempeñan tanto sustancias neurotransmisoras como hormonas aún esta por demostrarse en un mayor número de especies para poder hacer interpretaciones que puedan generalizarse para grupos de organismos de un mismo taxon. En el caso del abulón y el caracol *Astraea*, son pocos los trabajos que existen en los que de manera simultánea se pruebe con diferentes compuestos y no existe ninguno en el cual se incluya alguna hormona tiroidea.

Además de la importancia biológica y el interés evolutivo que representa comprender el proceso de la metamorfosis para cualquier especie, entender los factores que inician este proceso resulta particularmente importante para contribuir a hacer más eficiente el cultivo de diversas especies comerciales de invertebrados, prevenir la fijación de organismos sobre estructuras colocadas por el hombre en el mar mediante sustancias inhibitoras del asentamiento y metamorfosis, y conocer el impacto que tienen las actividades humanas en las comunidades bentónicas, particularmente con el incremento en el uso de pinturas, metales pesados, detergentes y solventes que cada vez son arrojados con mayor frecuencia al océano (Pawlik y Hadfield, 1990) y pueden alterar el proceso de metamorfosis en diversos grupos. Asimismo, es ampliamente reconocido y aceptado el profundo efecto que tiene el reclutamiento larval en el establecimiento e interacción de las poblaciones y comunidades bentónicas (Sulkin, 1990)

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, con respaldo conjunto del proyecto de "Producción de Semilla de Abulón" y la sección de Genética de la Facultad de

Ciencias Marinas, y contó con el apoyo financiero parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

2. MARCO TEORICO

2.1. El proceso de metamorfosis en invertebrados marinos.

Una fase larvaria que permanece en el plancton por periodos variables es un elemento común de la mayoría de las filas de invertebrados bentónicos (Crisp, 1974), entre los que se incluyen desde el filum porifera hasta los artrópodos (Wald, 1981). En términos de actividad, esta etapa comprende tres elementos. Un primer periodo de movimiento activo y en el cual la larva no responde al estímulo a metamorfizarse; al cual le siguen el asentamiento y la metamorfosis (Chia, 1978), una vez que la larva se encuentra competente para responder ante estímulos ambientales (Scheltema, 1974). El asentamiento se refiere a la parte conductual de la larva, que incluye reducir su motilidad y dirigirse al fondo. La metamorfosis, por su parte, se entiende como un cambio ontogénico que implica transformaciones morfogenéticas irreversibles (Scheltema, 1974; Chia, 1978, 1989).

Tanto el asentamiento como la metamorfosis se presentan usualmente como respuesta ante un estímulo externo que se asocia con la presencia de congéneres, como sucede en los balanos (Crisp, 1985) y las galleta de mar, *Echinarachnius parma* (Pearce y Scheibling, 1990); a la existencia de una capa bacteriana o exopolímeros derivados de la misma (Maki y Mitchell, 1985; Leitz, 1993; Leitz y Lange, 1991); o bien, como respuesta a la presencia de un cierto número de especies de algas rojas como en el caso de del abulón, *Haliotis rufescens* (Morse, 1984a; Morse y Morse, 1984; Morse *et al.*, 1984); la liebre o vaquita de mar del

género *Aplysia* (Pawlik, 1989) o el erizo, *Strongilocentrotus droebachiensis* (Pearce y Schebling, 1990a).

En la actualidad se tienen identificadas diversas condiciones u organismos que promueven el proceso de metamorfosis en diversas especies. Sin embargo, los esfuerzos que se han realizado para tratar de aislar y purificar los compuestos que la inducen han fallado en forma repetida (Pawlik, 1990). Hasta finales de la década pasada, solo en un grupo reducido de especies se logró aislar el compuesto responsable de la inducción a la metamorfosis (Chia, 1989), y en la actualidad ese grupo no se ha incrementado de manera significativa. A pesar de esto, se tiene como consenso que los inductores más potentes emanan de alguna fuente biológica y que su naturaleza es química (Pawlik y Hadfield, 1990).

Estos inductores químicos se han separado en dos grupos: 1) los factores exógenos o medioambientales mencionados anteriormente, los cuales afectan directamente a las larvas mediante la interacción con el sistema nervioso de las mismas; y 2) los factores endógenos, que incluyen a los neurotransmisores, los cuales "disparan" o controlan los cambios de comportamiento y morfológicos que ocurren durante el proceso de asentamiento y metamorfosis (Bonar *et al.*, 1990).

En lo que respecta a la parte endógena del proceso de metamorfosis, todavía se tienen menos pruebas acerca de los mecanismos y la naturaleza química de los compuestos que regulan esta parte del proceso. A este respecto, diversas evidencias apuntan a la participación del sistema nervioso, endócrino o neuroendócrino de las distintas larvas como el centro de coordinación del proceso de metamorfosis (Burke, 1983a; 1983b; Coon *et al.*, 1985; Hadfield, 1978, 1986). Los resultados positivos obtenidos por Baloun y Morse (1984) y Yool *et al.* (1986) al inducir a la metamorfosis a varias especies de moluscos mediante el

incremento en la concentración externa del ión potasio, así como la inducción a la metamorfosis en *Dendraster excentricus* mediante estímulos eléctricos son parte de los elementos que fortalecen la idea de la participación del sistema nervioso.

2.2. El papel de las hormonas tiroideas, GABA, L-DOPA, norepinefrina y el ion potasio en el proceso de metamorfosis en moluscos.

Diversos compuestos bioactivos se han utilizado para inducir a la metamorfosis a una gran variedad moluscos. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cual es el papel que desempeñan en la regulación de la metamorfosis, aunque han sido utilizados positivamente como bioensayos para estudiar distintas fases del proceso de metamorfosis (Pechenik y Gee, 1993; Coon *et al.*, 1990) o bien para tratar de contribuir a comprender la parte endógena del proceso (Morse, 1990).

La participación de compuestos yodados o moléculas afines a las hormonas tiroideas en la metamorfosis de invertebrados es algo que ha sido poco considerado. Sin embargo, mientras que los eventos iniciales de la metamorfosis son desencadenados en forma rápida, hay aspectos del proceso, particularmente histogénéticos, que requieren horas o días para completarse. Aspectos de la metamorfosis como éstos tal vez incluyan la participación de hormonas o neurohormonas (Burke, 1983b), dentro de las que podrían incluirse derivados de hormonas tiroideas o moléculas afines a éstas.

La presencia de hormonas que intervienen en los procesos de regulación en invertebrados es algo ampliamente reconocido. Es el caso de la liebre de mar, *Aplysia californica*, en donde se encuentra bien caracterizada la hormona de la ovoposición, ELH (Joosse, J. y W. P. M. Geraerts, 1983).

De las hormonas presentes en vertebrados superiores la tiroxina (Figura 1), resulta particularmente interesante como inductor, ya que el grupo de hormonas

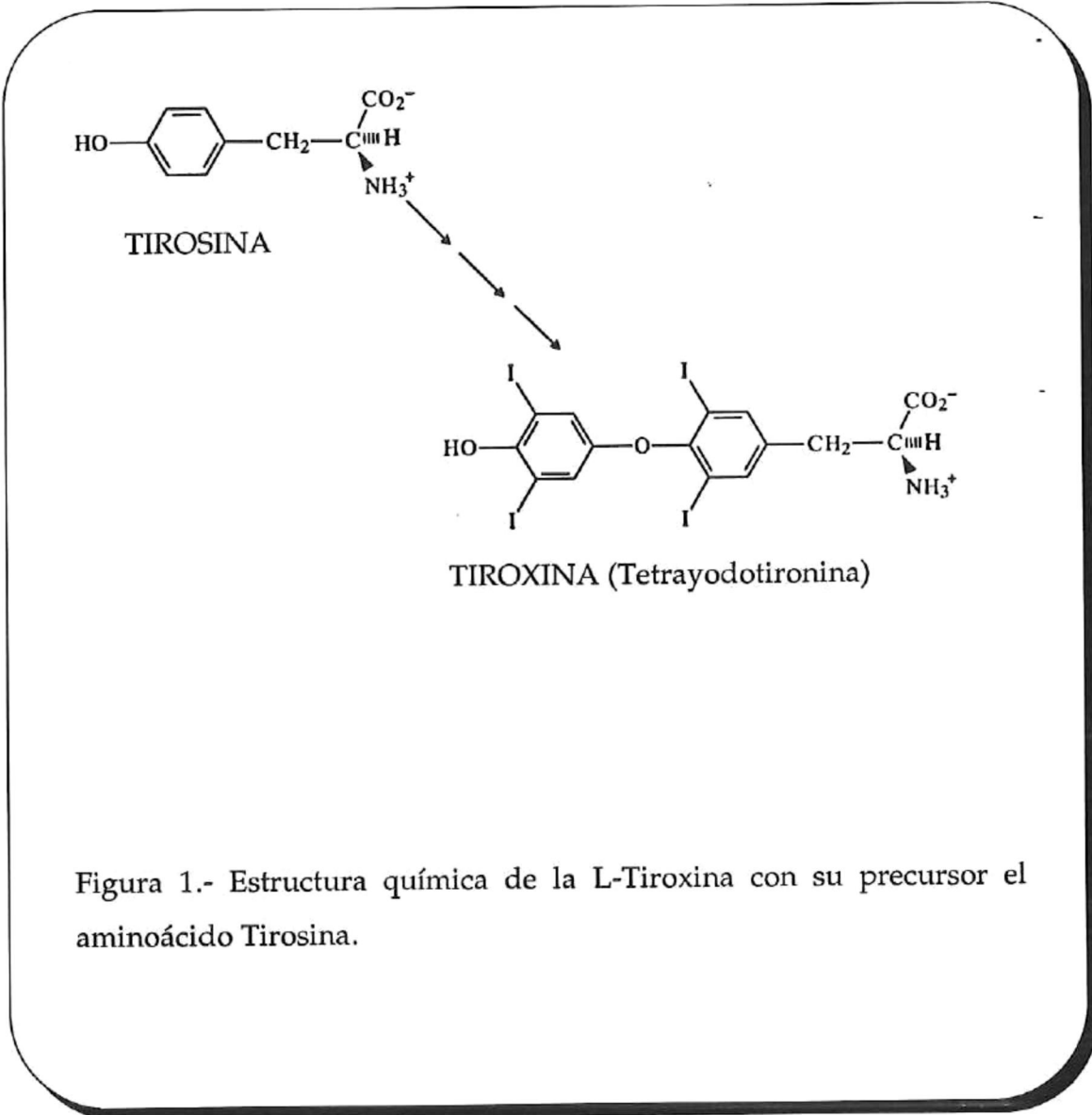


Figura 1.- Estructura química de la L-Tiroxina con su precursor el aminoácido Tiroxina.

al que pertenece contribuye a coordinar procesos esenciales de desarrollo, diferenciación, homeostasis (Evans, 1988; Forman y Samuels, 1990), crecimiento muscular (Flaim, *et al.*, 1978) y desarrollo neurológico (Porterfield y Hendrich, 1993) en vertebrados. Por otra parte, la participación de la tiroxina en el proceso de metamorfosis en anfibios ha sido ampliamente documentada (Galton, 1988).

Las hormonas tiroideas ejercen su acción a través de receptores nucleares, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores que se conoce como esteroide/tiroideos (Jones *et al.*, 1993). Esta familia incluye receptores nucleares para varios ligandos hidrofóbicos como glucocorticoides, estrógenos, progesterona, ácido retinóico y también para dioxina y ecdisona (Laudet, *et al.*, 1991). De manera clásica, estos receptores se han dividido en dos subfamilias de acuerdo a sus homologías estructurales. Una subfamilia incluye los genes que codifican para receptores de hormonas esteroides y la otra comprende los receptores para hormonas tiroideas y ácido retinóico (Laudet, *et al.*, 1991).

Desde la década de los años 60, se mencionaba la posibilidad de la síntesis de compuestos yodados en invertebrados, anteriores a la aparición de vertebrados que contaban con glándula tiroides (Gorbman, 1963). Recientemente, Frieden (1981) menciona que no es necesario disponer de una glándula tiroides para sintetizar hormonas tiroideas ya que existen varias enzimas capaces de yodar proteínas y formar estos compuestos. Todo lo que se necesita es yodo, el cual es abundante en plantas e invertebrados, peróxido de hidrógeno, una peroxidasa y proteínas que contengan el aminoácido tirosina.

Sin embargo, el papel que desempeñan las hormonas tiroideas en la metamorfosis de invertebrados está poco documentado. Veitch y Hidu (1971), en experimentos con el ostión americano *Crassostrea virginica*, mencionan la presencia de un factor que estimula el asentamiento de esta especie, y probablemente se trataba de tiroxina. Recientemente, Bonar *et al.*, (1990), no obtuvieron ninguna respuesta al inducir al asentamiento y la metamorfosis a dos especies de ostión con tirosina y L-tiroxina. Los trabajos anteriores, presentan evidencias contradictorias acerca del efecto de estas hormonas en la metamorfosis de los bivalvos.

El sistema menos evolucionado en donde se demostró el papel funcional de los compuestos yodados, incluyendo la tiroxina, son los trabajos de Spangenberg (1967, 1971, 1984) con el celenterado *Aurelia aurita*. Estos compuestos fueron sintetizados por el celenterado durante los estadios de presegmentación y metamorfosis anteriores a la formación de la éfira ("ephyra") madura (Spangenberg, 1984). Experimentos más recientes mostraron que pólipos de *A. aurita* cultivados en presencia de tiroxina, presentaron una mayor frecuencia de organismos deformes al ser expuestos a rayos X, en relación con organismos sometidos a la radiación, pero que no estuvieron en contacto con tiroxina (Prokopchak *et al.*, 1990).

Por otra parte, Pillai *et al.*, (1987) en experimentos con *Penaeus monodon*, mostraron que para postlarvas y juveniles de esta especie de camarón, cantidades muy pequeñas de tiroxina aceleran el crecimiento y la frecuencia de muda en forma significativa. Hasta el momento, no existe evidencia publicada acerca del papel de la tiroxina en la metamorfosis de moluscos gasterópodos.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 2) se ha probado como inductor al asentamiento y la metamorfosis fundamentalmente en el abulón rojo *Haliotis rufescens* (Morse *et al.* 1979; 1980). Un extenso trabajo, que lo ha asociado como un compuesto que mimetiza la acción del inductor en el medio natural, ha sido desarrollado en esta especie con el objeto de tratar de establecer los mecanismos mediante los cuales se produce la metamorfosis bajo el efecto de este inductor (Baxter y Morse, 1987, 1992; Fenteany y Morse, 1993; Morse, 1985, 1990; Trapido-Rosenthal y Morse, 1985, 1986).

El GABA es un potente neurotransmisor que actúa en terminales presinápticas como inhibidor en el sistema nervioso de vertebrados (Levitan y Kaczmarek,

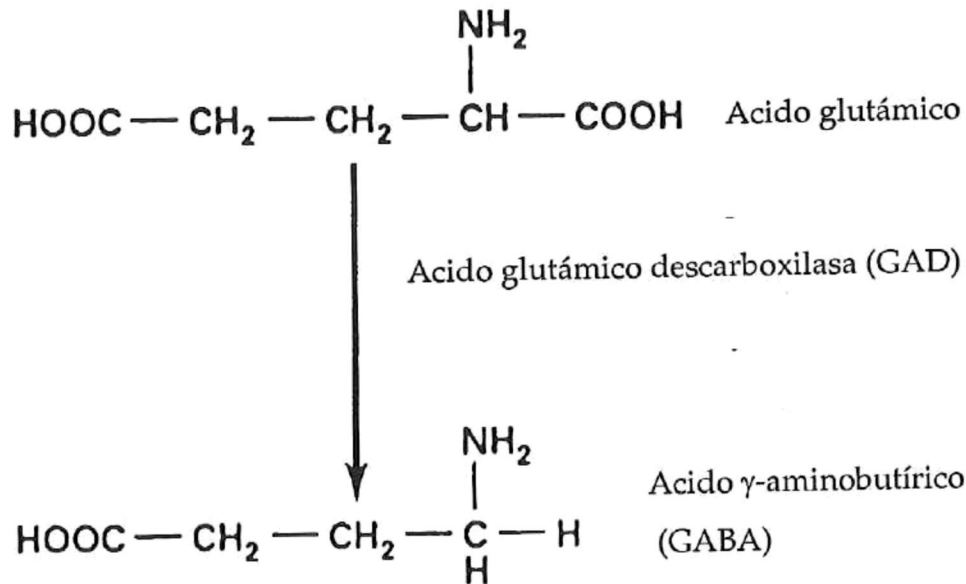


Figura 2.- Síntesis de ácido γ -aminobutírico (GABA) a partir de ácido glutámico.

1991; Tofano, 1983). Junto con la glicina, forma parte de los neurotransmisores de tipo aminoácido formados por ácidos monocarboxílicos (McGeer y McGeer, 1993). Su participación es a través de dos tipos de receptores de membrana reconocidos como GABA_A y GABA_B (Chapman, *et al.*, 1993; McGeer y McGeer, 1993). El primero actúa mediante la apertura de canales iónicos de Cl⁻ con los que se despolariza la membrana nerviosa y bloquea los potenciales de acción nerviosa (Zhang y Jackson, 1993) y se inhibe la excitabilidad nerviosa (Chapman, *et al.*, 1993). El segundo, modula los canales de Ca²⁺ y K⁺ mediante la interacción con segundos mensajeros celulares como las G proteínas o la adenilato ciclasa (Chapman *et al.*, 1993).

El uso del GABA como inductor al asentamiento y metamorfosis se ha probado en otras especies de gasterópodos con resultados diversos. Slattery (1992), utilizó al GABA como uno de los inductores para el asentamiento y metamorfosis del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Sus resultados mostraron que no existió una diferencia significativa en el porcentaje de larvas metamorfizadas ante el mucus de adultos en presencia y ausencia del GABA. En forma contrastante, Searcy-Bernal *et al.* (1992), trabajando con la misma especie de abulón, obtuvieron los mayores porcentajes de metamorfosis con el GABA como inductor, aún en presencia de bacterias y sin el uso de antibióticos.

Una respuesta negativa en presencia del GABA como inductor al asentamiento y metamorfosis fue observada por Akashige *et al.* (1981) con el abulón japonés *Haliotis discus hannai*. El GABA se ha probado además en el abulón azul *Haliotis fulgens* (García-Mendoza, 1991) en presencia de bacterias con resultados positivos, y en el caracol *Astraea undosa* con resultados variables. Mientras Yool *et al.* (1986) encontraron resultados positivos en *Astraea*, Salas-Garza y Searcy-Bernal (1989) obtuvieron una respuesta muy pequeña en esta especie.

Al igual que la tiroxina, la dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y las catecolaminas epinefrina y norepinefrina (Figura 3), son derivados del aminoácido tirosina. En vertebrados superiores, la norepinefrina puede ligarse a diferentes receptores adrenérgicos y funciona como neurotransmisor en estos sitios; la epinefrina es sintetizada y almacenada en la médula adrenal y liberada al torrente circulatorio para actuar como hormona. La dihidroxifenilalanina (DOPA) es precursor de las dos catecolaminas anteriores (Levitan y Kaczmarek, 1991) y se sabe que aunque en la naturaleza usualmente se presenta de manera transitoria, se encuentra probablemente distribuido universalmente en los tejidos y fluidos de

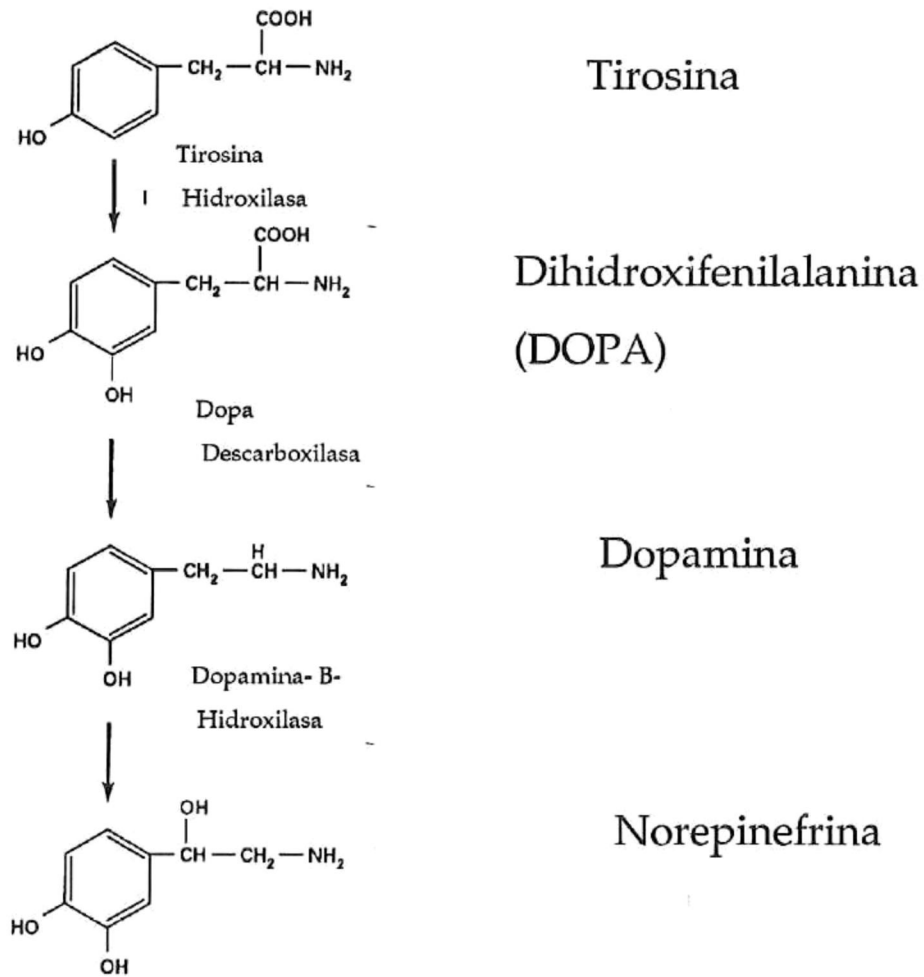


Figura 3.- Síntesis de algunas de las principales catecolaminas entre las que se incluyen dopamina y norepinefrina.

invertebrados. En este grupo de organismos participa en funciones neuroendócrinas, inmunes, reproductivas y forma además sustancias adhesivas, pigmentos y fibras (Waite, 1992).

La dopamina y las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) han sido utilizadas como inductores a la metamorfosis en el nudibranquio *Phestilla sibogae*. Una

respuesta máxima del 31% se obtuvo con dopamina después de 4 días de contacto con el compuesto, los resultados con epinefrina y norepinefrina fueron negativos (Hadfield, 1984). Con el abulón rojo *Haliotis rufescens*, Morse *et al.* (1979) reportaron que tanto epinefrina como norepinefrina no indujeron a la metamorfosis en esta especie, aunque no menciona las condiciones particulares en las que fueron probadas.

En forma contrastante, el uso de L-DOPA y catecolaminas como inductores del asentamiento y metamorfosis en moluscos bivalvos es más consistente. L-DOPA induce al asentamiento y metamorfosis en el ostión japonés *Crassostrea gigas*, mientras que epinefrina y norepinefrina inducen metamorfosis sin mostrar la conducta característica del asentamiento (Coon *et al.* 1985; Bonar *et al.* 1990).

Al probar los mismos compuestos neuroactivos con *C. gigas* en Baja California, McAnally *et al.* (1989), obtuvieron resultados similares, donde la L-DOPA resultó ser el mejor inductor para obtener postlarva cementada al sustrato, mientras que la epinefrina y la norepinefrina resultaron excelentes inductores para obtener postlarva de ostión suelta, esto es sin adherirse al sustrato. El efecto de la L-DOPA y las catecolaminas no se ha probado en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) ni en el caracol (*Astraea undosa*).

Por último, se sabe que el ion K^+ es capaz de influir el potencial de la membrana celular (Levitan y Kaczmarek, 1991; Baulon y Morse, 1984)). Con este antecedente, y considerando la participación del sistema nervioso de las larvas en el proceso de metamorfosis, varias especies de moluscos han sido estimuladas a metamorfizarse en presencia de diferentes concentraciones de K^+ con resultados usualmente positivos (Davis *et al.* 1990; Pechenik y Heyman, 1987; Baulon y Morse, 1984; Nell y Holliday, 1986; Yool *et al.* 1986). De la información

presentada por estos autores los resultados que muestra Yool *et al.* (1986) para el caracol *Astraea undosa*, no se refieren específicamente a porcentaje de metamorfosis (Tabla I).

Tabla I. Trabajos realizados con las especies propuestas para este estudio con los diferentes compuestos.

COMPUESTOS PROBADOS					
Especie	L-tiroxina	GABA	KCl	L-DOPA	NOREPINEFRINA
<i>Haliotis rufescens</i> (abulón rojo)	NP	1	2	NP	3
<i>Astraea undosa</i> (caracol)	NP	4	2	NP	NP

1. Principalmente los trabajos de Morse, (1980, 1981, 1984, 1990), Morse et al. (1979). existen trabajos en que se reporta respuesta negativa o sin influencia (Akashige, 1981; Slattery, 1992). 2. Para el abulón rojo Yool *et al.*, (1986) y para el caracol Markell y Morse observaciones sin publicar. 3. Morse, (1979a) sin efecto. sin mencionar las condiciones experimentales para este neurotransmisor. 4. Markell y Morse, observaciones sin publicar. Salas-Garza (comunicación personal¹) pobre respuesta. NP = No se ha probado este compuesto.

2.3. Modelo Conceptual de la metamorfosis en gasterópodos.

Con base en la información que se cuenta en la actualidad se puede plantear un modelo conceptual que permita visualizar de manera global lo que implica el asentamiento y metamorfosis en moluscos gasterópodos de larva lecitotrófica y el conocimiento que se tiene, en forma particular, sobre este proceso en las especies utilizadas en el presente estudio. El modelo que aquí se presenta fue

¹ Oc. Alfredo Salas Garza. Investigador. Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

tomado de Chia, (1989) y en principio puede aplicarse a diversos organismos que presenten una fase larvaria en su ciclo de vida (Figura 4).

Si se ubica el desarrollo larvario del abulón y del caracol dentro del modelo presentado por Chia (1989), quedan por aclarar varios aspectos en ambas especies. En el caso del abulón rojo, se sabe que el estímulo ambiental que desencadena el proceso de metamorfosis se encuentra presente en algas rojas incrustantes (Morse y Morse, 1984a; Morse *et al.*, 1984). Se conoce además, que el GABA mimetiza la acción del inductor natural (Morse *et al.*, 1979, 1980). Con estos elementos se supone que el GABA forma parte del mismo. Sin embargo, esto último no ha sido demostrado (Pawlik, 1990).

En el caso del caracol *Astraea*, no se conoce cual es el estímulo ambiental que en forma natural promueve la metamorfosis. A este respecto, experiencias en laboratorio mostraron que en presencia de organismos adultos de la misma especie, el 100% de la larva se metamorfiza (Salas-Garza, comunicación personal). Para ninguna de las dos especies se ha demostrado si existen estímulos y receptores celulares que en forma diferenciada se puedan distinguir para el asentamiento y la metamorfosis. Asimismo, en los dos casos se desconoce de que manera es traducido el estímulo ambiental por medio del sistema nervioso o neuroendócrino, tanto para el asentamiento como para la metamorfosis. Se han realizado esfuerzos recientes con el abulón rojo para tratar de aclarar esta parte del proceso (Ver Morse 1990; Morse *et al.*, 1980; Baxter y Morse 1987, 1992; Fenteany y Morse 1993) con resultados importantes. Es en este último aspecto, donde la utilización de compuestos neuroactivos o con actividad hormonal puede contribuir a aportar elementos que nos permitan conocer con mayor claridad el proceso de metamorfosis, y mediante el estudio de especies pertenecientes a grupos taxonómicos cercanos, poder hacer generalizaciones de

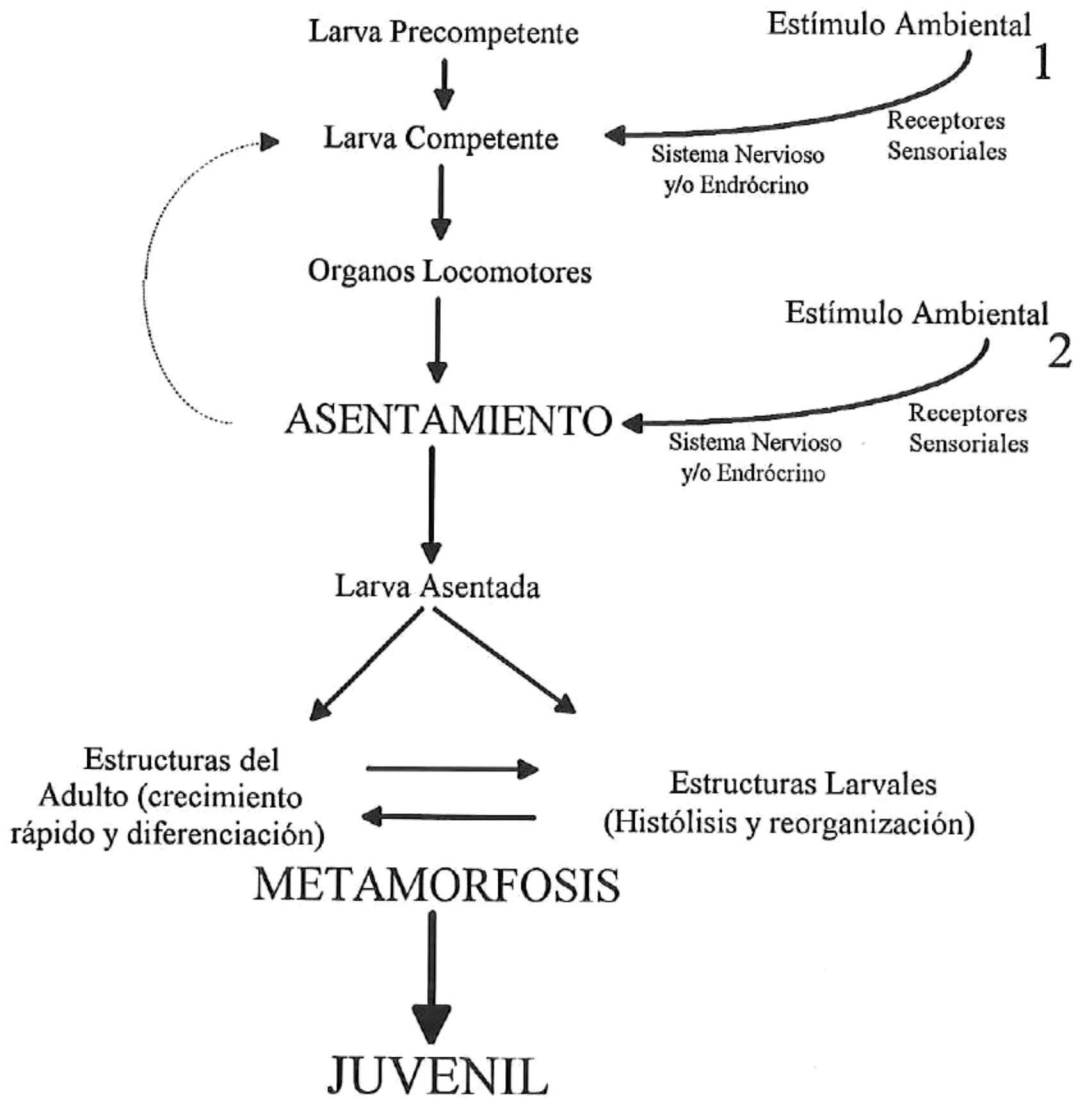


Figura 4.- Modelo conceptual del proceso de asentamiento y metamorfosis en larvas de invertebrados marinos. (Tomado de Chia, 1989).

mayor alcance.

3. OBJETIVOS

Evaluar el efecto que tienen la hormona L-tiroxina; los neurotransmisores, ácido gama-aminobutírico (GABA) y norepinefrina, y los compuestos dihidroxifenilalanina (DOPA) y cloruro de potasio (KCl), en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo *Haliotis rufescens*, y el caracol *Astraea undosa*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Selección de especies y compuestos neuroactivos.

Para la selección de las especies utilizadas en el presente trabajo se tomó en consideración la factibilidad del cultivo de la larva en condiciones de laboratorio (ver Hahn, 1989). El desarrollo larval en ambas especies es similar. Las especies con las que se trabajó fueron el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) y el caracol (*Astraea undosa*). El grupo de sustancias neuroactivas probadas se eligió con base en experiencias realizadas en grupos similares de moluscos en los que alguno de estos compuestos mostró tener efecto sobre el proceso de metamorfosis.

Para la inclusión de la hormona L-tiroxina se tomó en consideración la amplia gama de acciones que tiene dentro de los procesos de diferenciación, maduración, reproducción, homeostasis (Forman y Samuels, 1990) y desarrollo neurológico en vertebrados (Porterfield y Hendrich, 1993), además de su definida participación en el proceso de metamorfosis en anfibios (Galton, 1988). La L-tiroxina se incluyó para las dos especies debido al interés particular sobre el efecto de esta hormona en la metamorfosis de estos organismos.

4.2. Obtención y cultivo de larvas.

Los reproductores de abulón rojo fueron adquiridos en los Estados Unidos y transportados al laboratorio de acuicultura del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California. En el laboratorio fueron colocados en tanques con agua corriente a una temperatura de 18 °C, donde permanecieron con fotoperiodo natural y alimentados con *Macrocystis pyrifera* hasta el momento de la inducción al desove.

Para el caso de *Astraea*, se colectaron organismos adultos de la zona del intermareal frente a las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, de donde fueron transportados al laboratorio de acuicultura y colocados en un tanque con agua corriente donde se mantuvieron con fotoperiodo natural y alimentados con *M. pyrifera* hasta la inducción al desove.

La inducción al desove del abulón rojo se realizó mediante el método del peróxido de hidrógeno descrito por Morse *et al.*, 1977. Se colocaron seis abulones rojos maduros (4 hembras y 2 machos) en dos acuarios en presencia de peróxido de hidrógeno, por un periodo de tres horas, después del cual se renovó el agua de mar. De esta manera se promovió la expulsión de los gametos.

Ovulo y esperma se colectaron en recipientes separados. Para la colecta de los óvulos se utilizó un tamiz de 108 µm de luz de malla. La fertilización se realizó *in vitro*.

La inducción al desove del caracol *Astraea undosa* se efectuó con el método de luz ultravioleta (UV) descrito por Kikuchi y Uki, (1974) para las especies de abulón japonés y que ha resultado el más eficiente con *Astraea* (Carpizo-Ituarte, observaciones sin publicar). Doce reproductores de caracol se colocaron en un acuario con agua de mar irradiada con luz ultravioleta (4 lámparas de 30 watts)

y un flujo continuo de 300 ml. Para aumentar el estímulo se incrementó la temperatura del agua de 18.5 °C a 22 °C en un periodo de una hora, por medio de un calentador marca Visi-Therm (115V). La colecta de gametos y la fertilización se efectuaron de la misma forma que en el abulón rojo. Para la totalidad de los experimentos se realizaron dos desoves de abulón rojo y uno de caracol.

Debido a la similitud en el desarrollo larvario de estas dos especies (*Astraea* y *Haliotis*), la metodología del cultivo de larvas fue la misma., por lo que la explicación siguiente puede aplicarse a ambas.

El huevo fertilizado se limpió con agua de mar filtrada hasta 1 µm y se colocó en cubetas de plástico de 20 l. Transcurridas entre 18 y 24 horas se colectó la larva trocófora mediante sifoneo de las 3/4 partes del agua de la cubeta, ya que esta larva presenta fototactismo positivo.

Alrededor de las 36 horas después de la fertilización se presentó la larva veliger temprana. A partir de este momento se realizó un cambio diario de agua hasta que la larva alcanzó la competencia para la metamorfosis. En el caso de *Astraea* esto ocurrió 4 días después de la fertilización, a una temperatura de 19°C, y en el caso del abulón a los 7 días después de la misma, a una temperatura promedio de 15°C y 17°C para los dos desoves realizados. Durante el periodo de cultivo de las larvas se utilizó agua de mar filtrada hasta 1 µm por medio de filtros de cartucho.

Como criterio de larva competente se consideró la ramificación de los tentáculos cefálicos como elemento principal (Figura 5A). Además se consideró, de manera cualitativa, el aumento en la proporción de larvas que reptaban en busca de sustrato (Figura 5B). Estos elementos, uno morfológico y el otro conductual, han

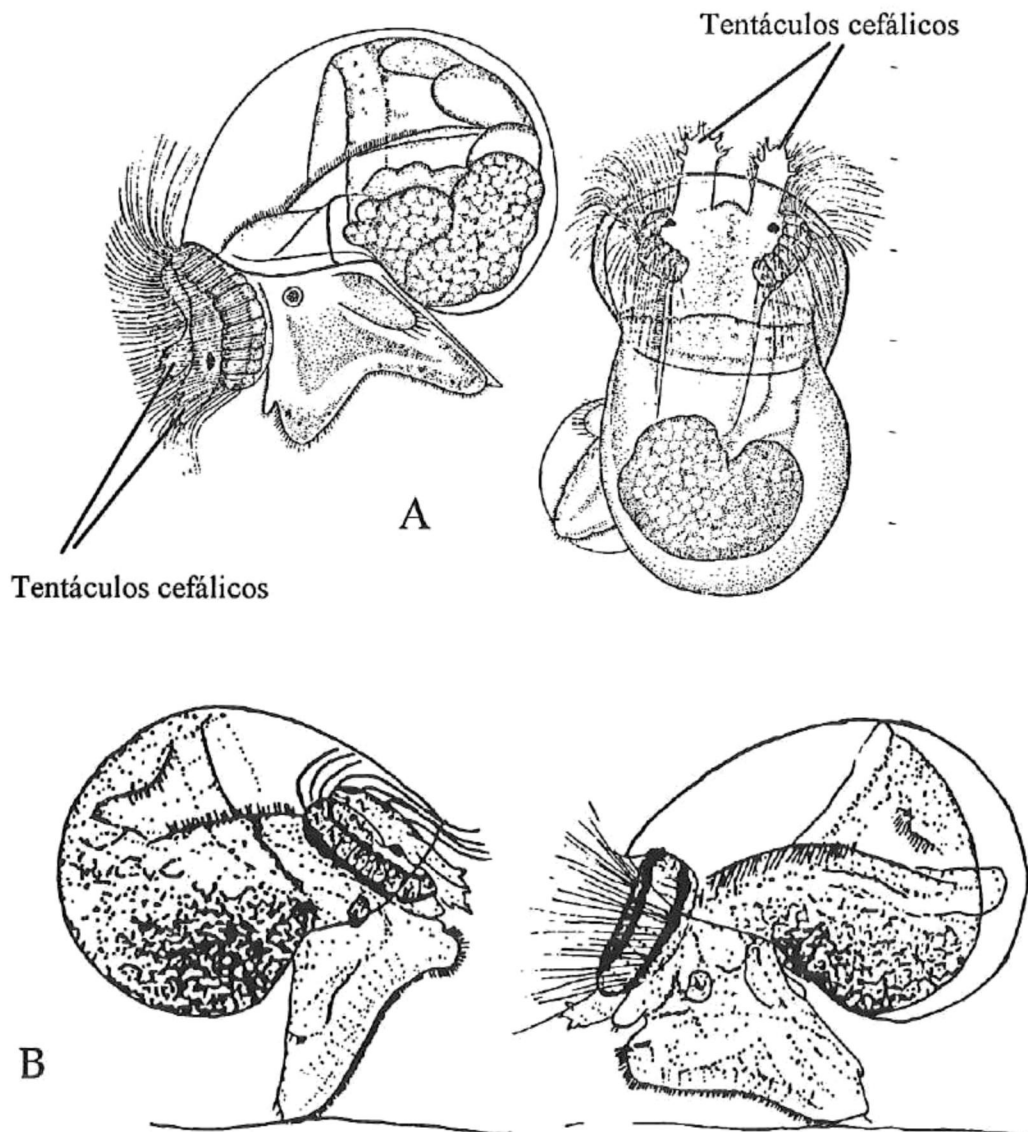


Figura 5.- A) Larva competente de abulón que muestra los tentáculos cefálicos ramificados (Modificado de Ino, 1952). B) Larva competente de abulón que muestra el comportamiento típico de búsqueda de sustrato (Tomado de Seki y Kan-No, 1981).

sido considerados como los más sobresalientes para determinar la competencia larval en estas especies (Ebert y Houk, 1984; Seki y Kan-no, 1981).

4.3. Diseño Experimental

4.3.1. Diseño general utilizado para los diferentes experimentos.

Como modelo experimental en todos los casos se utilizó un diseño experimental anidado completamente aleatorizado, con igual número de réplicas (en algunos casos con número de replicas desiguales) y de efectos fijos. El modelo se representa de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

A = Sustancia neuroactiva utilizada.

B = Concentracion probada de la sustancia neuroactiva A

Y_{ijk} = Porcentaje de metamorfosis en la k-esima réplica del j-esimo nivel del factor B, en el i-esimo factor A.

μ =Media general de todas las observaciones.

τ_i =Efecto del i-esimo factor A.

$\beta_{j(i)}$ =Efecto del nivel j-esimo de B, en el i-esimo factor A.

ε_{ijk} =Error asociado con la k-esima observación en el j-esimo nivel de B, del i-esimo factor A.

La figura 6 muestra en forma esquemática el modelo experimental utilizado durante el trabajo.

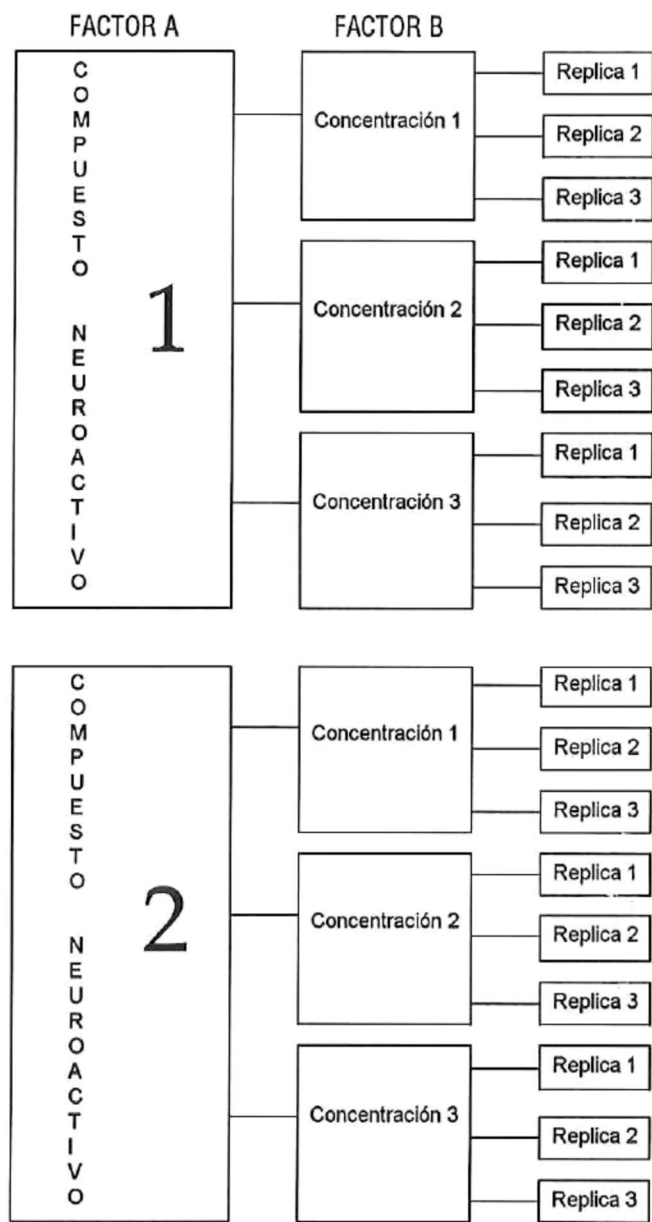


Figura 6.- Representación esquemática del modelo experimental utilizado, ejemplificado con solo dos compuestos. Durante algunos experimentos se utilizaron hasta cinco compuestos diferentes.

4.3.2. Experimentos realizados

A partir de este modelo experimental se realizaron un total de seis experimentos de los cuales cinco fueron con el abulón rojo (*Haliotis rufescens*), y uno con el caracol (*Astraea undosa*). La metodología utilizada se muestra de manera esquemática en la figura 7.

Todos los experimentos se realizaron en frascos de vidrio desechables (marca Kimble) con capacidad de 20 mililitros. En todos los casos se utilizó agua de mar filtrada a 0.45 μm con filtros de membrana marca Schleicher & Schuell.

En forma similar, en todos los experimentos se agregaron las concentraciones de inductores preestablecidas a los frascos con agua de mar filtrada a 0.45 μm . Al final se agregó una alícuota (3.5 o 4 ml en función de cada experimento) de larva competente de la especie a utilizar. Las larvas fueron previamente lavadas y colocadas en agua de mar filtrada a 0.45 μm , además de cuantificada la densidad. La Tabla II muestra los compuestos y las concentraciones que se utilizaron de acuerdo a lo señalado en cada experimento.

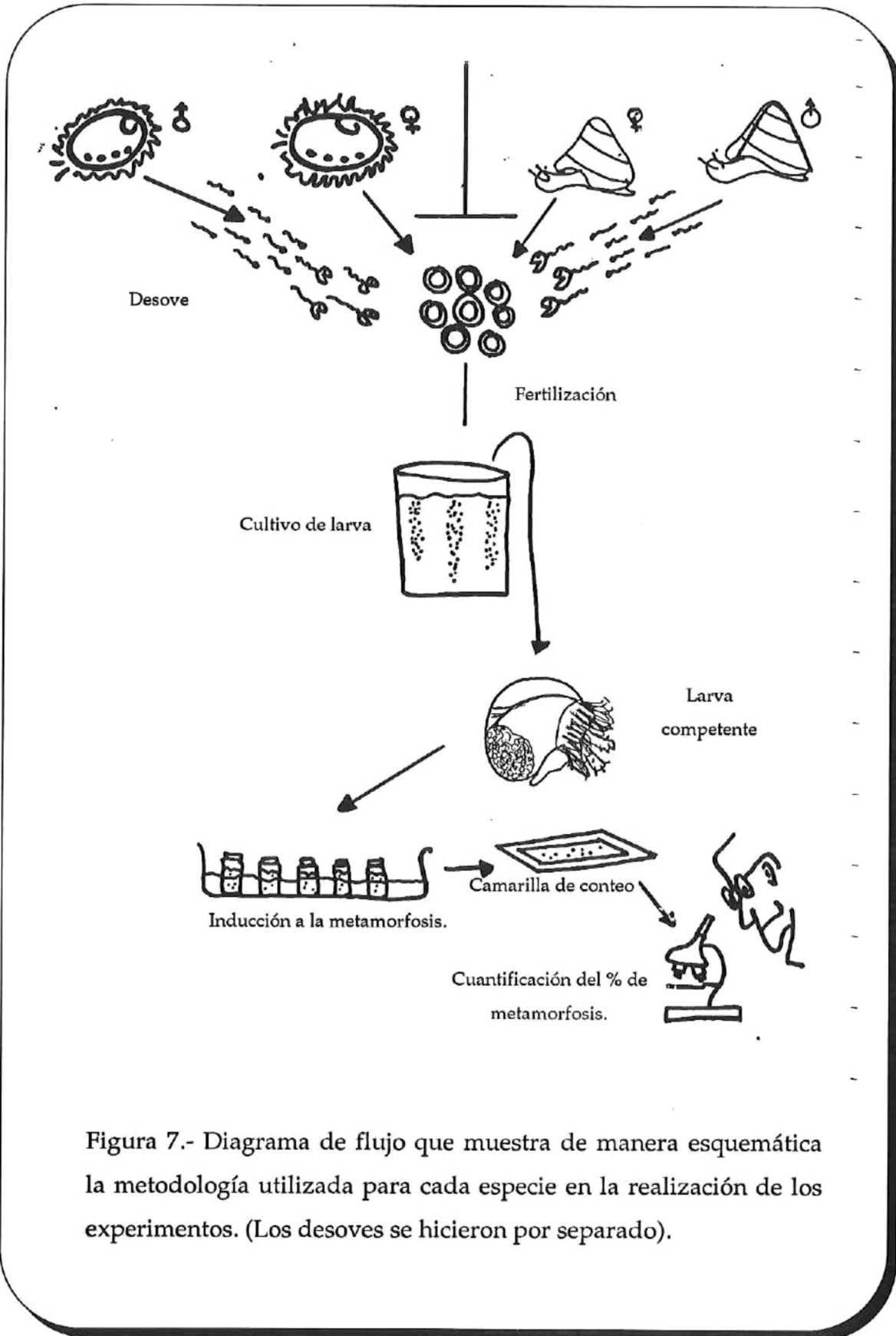


Figura 7.- Diagrama de flujo que muestra de manera esquemática la metodología utilizada para cada especie en la realización de los experimentos. (Los desoves se hicieron por separado).

Tabla II. Compuestos y Concentraciones utilizadas durante los experimentos.	
COMPUESTO	CONCENTRACIONES UTILIZADAS
L-tiroxina	TIROXC1 132 nmol/ml TIROXC2 66 nmol/ml TIROXC3 33 nmol/ml
GABA	GABA1 100 nmol/ml GABA2 1 nmol/ml
L-DOPA	L-DOPA1 963 nmol/ml L-DOPA2 96.3 nmol/ml L-DOPA3 0.96 nmol/ml
NOREPINEFRINA	NOREP1 996 nmol/ml NOREP2 99.6 nmol/ml NOREP3 0.99 nmol/ml
KCl	KCl1 29.7 nmol/ml KCl2 19.8 nmol/ml KCl3 9.8 nmol/ml
NaOH (incremento de pH)	NaOH 150 nmol/ml (experimentos 2-3) NaOH1 150 nmol/ml (experimentos 4-6) NaOH2 100 nmol/ml (experimentos 4-6)

Los experimentos realizados fueron los siguientes:

- 1. Efecto de la hormona L-tiroxina, GABA y diversos neurotransmisores en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo (*H. rufescens*).
- 2. Cuantificación del efecto del hidróxido de sodio utilizado para disolver L-tiroxina y L-dopa, en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo.
- 3. Cuantificación del efecto del hidroxido de sodio (variante del experimento 2) en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo.

- 4. Efecto de la hormona L-tiroxina y concentración de NaOH en la inducción a la metamorfosis del abulón rojo (*H. rufescens*).
- 5. Efecto de la hormona L-tiroxina y concentración de NaOH en la inducción a la metamorfosis de abulón rojo (repetición exp. anterior)
- 6. Efecto de la hormona L-tiroxina, GABA, concentración NaOH y KCl en la inducción a la metamorfosis del caracol *Astraea undosa*.

Las Tablas III a IX en el anexo I muestran las condiciones particulares de cada experimento, así como los inductores y las concentraciones a las que fueron utilizados.

4.3.3. Evaluación de los experimentos.

Transcurrido el periodo de inducción para cada experimento, la totalidad de las larvas de cada unidad experimental se tamizó a través de un tamiz de 96 µm de luz de malla. En cada uno de los casos, toda la muestra se pipeteó a una cámara de conteo con capacidad de 1 ml, después de lo cual se contó la totalidad de las larvas en cada muestra y se cuantificó tanto el número de larvas como de metamorfizadas. La evaluación de las muestras se realizó con ayuda de un microscopio compuesto marca AusJena, Laboval 4.

Tanto para el abulón rojo como para el caracol, se consideró la pérdida total del velo como criterio de metamorfosis (Seki y Kan-no, 1981)(Figura 8).

4.3.4. Procesamiento estadístico.

Para la comparación entre los tratamientos se utilizó un análisis de varianza anidado con un nivel de confianza del 99%. La hipótesis nula planteada para cada experimento fue que no había diferencia significativa entre el porcentaje de metamorfosis obtenido con los diferentes compuestos neuroactivos, así como

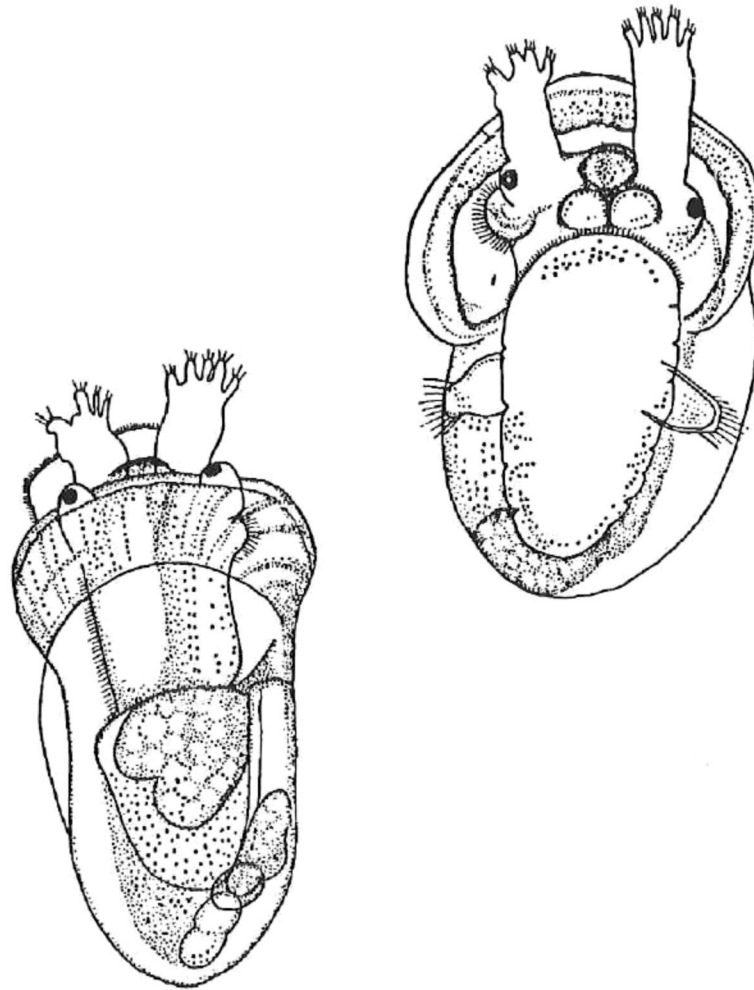


Figura 8.- Vista dorsal y ventral de larva de abulón recién metamorfizada donde se muestra la pérdida total del velo. (Modificado de Ino, 1952).

entre éstos y un testigo sin inductor. En forma complementaria, la hipótesis alterna planteó la existencia de diferencias en el porcentaje de metamorfosis obtenido con cada uno de los diferentes compuestos, y de estos en relación con un testigo sin inductor.

Hipótesis semejantes a las descritas en el párrafo anterior se plantearon en cada uno de los experimentos para las diferentes concentraciones de los distintos compuestos neuroactivos. En este caso, la hipótesis nula planteada fue que no existía diferencia significativa entre los porcentajes de metamorfosis obtenidos con diferentes concentraciones de un mismo compuesto, mientras la hipótesis alterna planteó la existencia de diferencias en el porcentaje obtenido.

Los dos factores probados (compuesto neuroactivo y concentración del mismo) se consideraron como fijos, ya que fueron seleccionados previamente, esto es, sin pretender su elección al azar. Considerándolos como tales, la esperanza de cuadrados medios para cada uno de los factores y el error, se expresa de la siguiente manera:

Esperanza de cuadrados medios (E (CM))

FACTOR A	$\sigma^2 + \frac{bn \sum_i \tau_i}{a-1}$
(substancia neuroactiva)	

FACTOR B	$\sigma^2 + \frac{n \sum_j \beta_j}{a(b-1)}$
(concentración del Factor A)	

ERROR	σ^2
-------	------------

Debido a que los factores son fijos, la F calculada para el análisis de varianza se estimó mediante la división de la esperanza de cuadrados medios de cada factor entre la esperanza de cuadrados medios del error.

El anova se realizó con la ayuda del paquete estadístico CSS y las gráficas se generaron por medio del paquete Sigma Plot. Las diferencias entre diferentes inductores de manera específica se probaron por medio de contrastes, los cuales se realizaron de acuerdo con Steel y Torrie (1985).

5. RESULTADOS

5.1. Experimentos con abulón rojo (*Haliotis rufescens*).

Durante el primer experimento con abulón rojo se obtuvieron porcentajes de metamorfosis importantes para los tratamientos con L-tiroxina y el GABA (1 nmol/ml). Los porcentajes promedio por tratamiento fueron de 58.29 y 33.14 respectivamente (Figura 9), sin existir diferencias significativas entre estos tratamientos ($p > 0.05$; ver anexo II: resumen ANOVA).

Los porcentajes obtenidos con las distintas concentraciones de L-tiroxina dentro del tratamiento global con este compuesto fueron de 58.29% y 7.99% para las concentraciones de 66 nmol/ml y 33 nmol/ml. Se encontró diferencia significativa ($p \leq 0.01$) para los porcentajes obtenidos con las dos concentraciones de L-tiroxina. El tratamiento con la concentración más alta de L-tiroxina (C1= 132 nmol/ml) no pudo ser evaluado debido a que la larva se encontraba retraída en la concha y no se pudo establecer si se encontraba metamorfizada.

Los porcentajes de metamorfosis obtenidos en los tratamientos de GABA y L-tiroxina resultaron significativamente diferentes ($p \leq 0.01$) al resto de los obtenidos en los demás tratamientos y respecto al testigo (ver anexo II: Tabla ANOVA).

Para el mismo experimento, los tratamientos de L-DOPA concentración 2 (L-DOPA2) y norepinefrina concentración 2 (NOREP2), aunque muestran altos porcentajes de metamorfosis, estos se refieren a metamorfosis anormal (Figura 9); caracterizada por la pérdida total del velo pero con la larva retraída en el interior de la concha y con el pie constreñido sin poder reptar en forma normal (Figura 10). Por esta razón estos tratamientos no se incluyeron en los contrastes de interés.

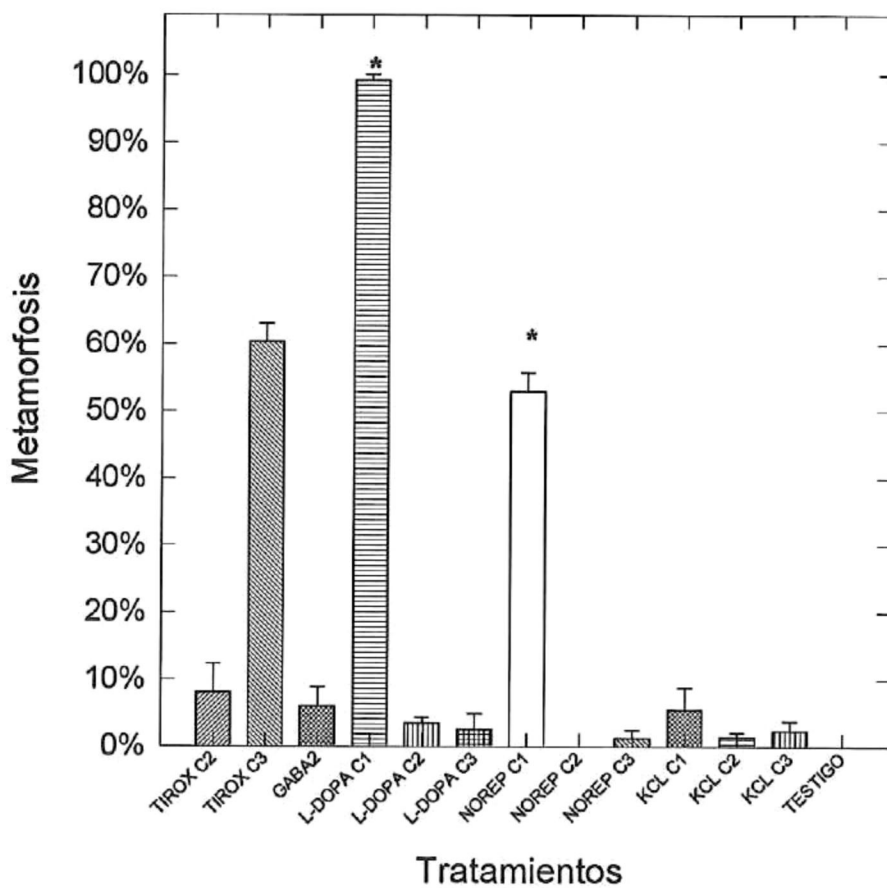
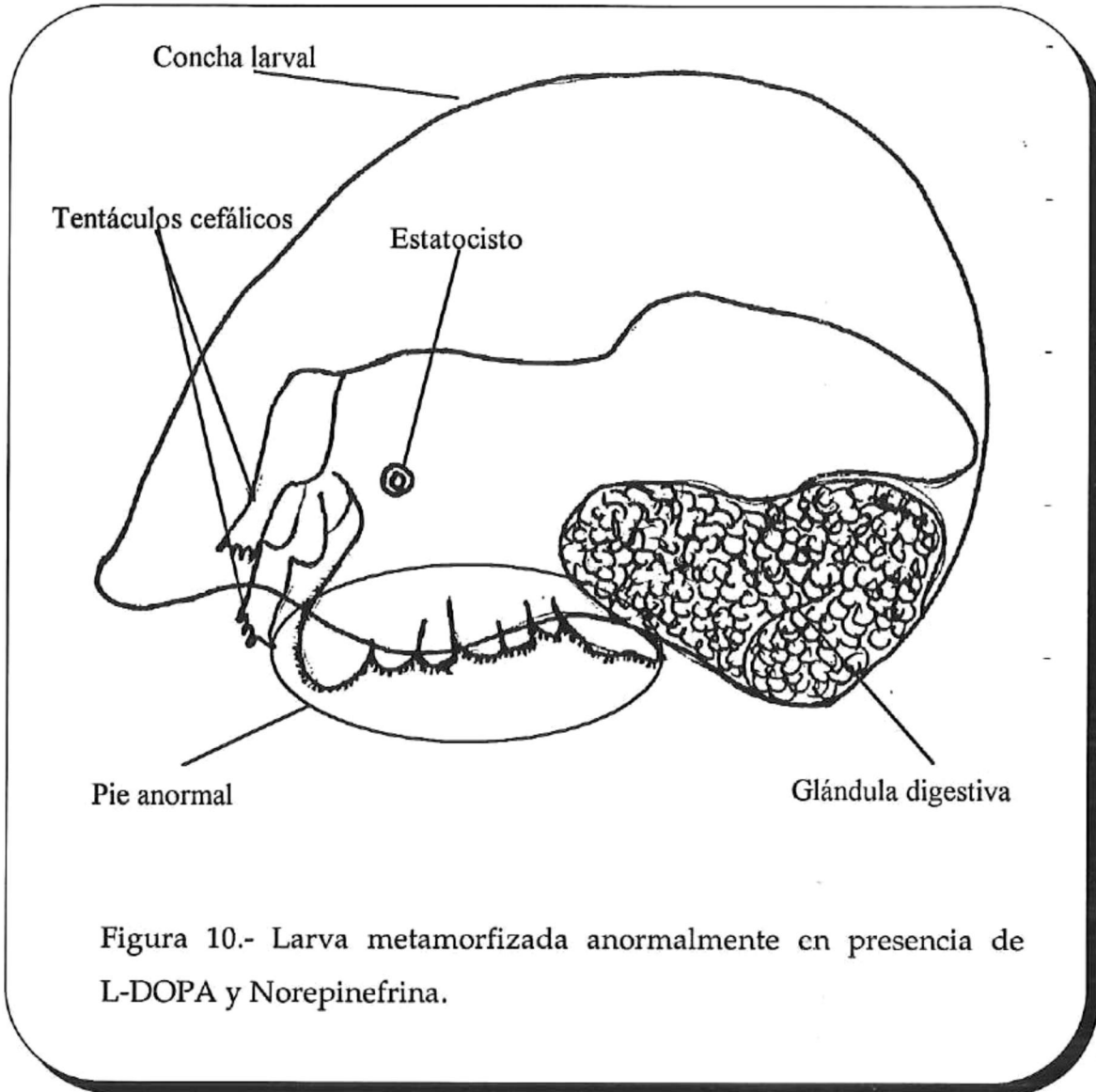


Figura 9.- Porcentaje de metamorfosis con los diferentes tratamientos probados durante el primer experimento con abulón rojo (*Haliotis rufescens*). Las barras verticales corresponden al error estandar. (*)representan metamorfosis anormales.



El promedio de metamorfosis para el resto de los tratamientos fue: KCl C1, 1.19%; KCl C2, 5.49%; KCl C3, 1.37% y testigo, 2.57%. No se encontraron diferencias en el porcentaje de metamorfosis obtenido con las diferentes concentraciones de cloruro de potasio (KCl)

Los resultados obtenidos durante el segundo experimento con el abulón rojo, con el objeto de demostrar el efecto del hidróxido de sodio utilizado para disolver la L-tiroxina se muestran en la figura 11.

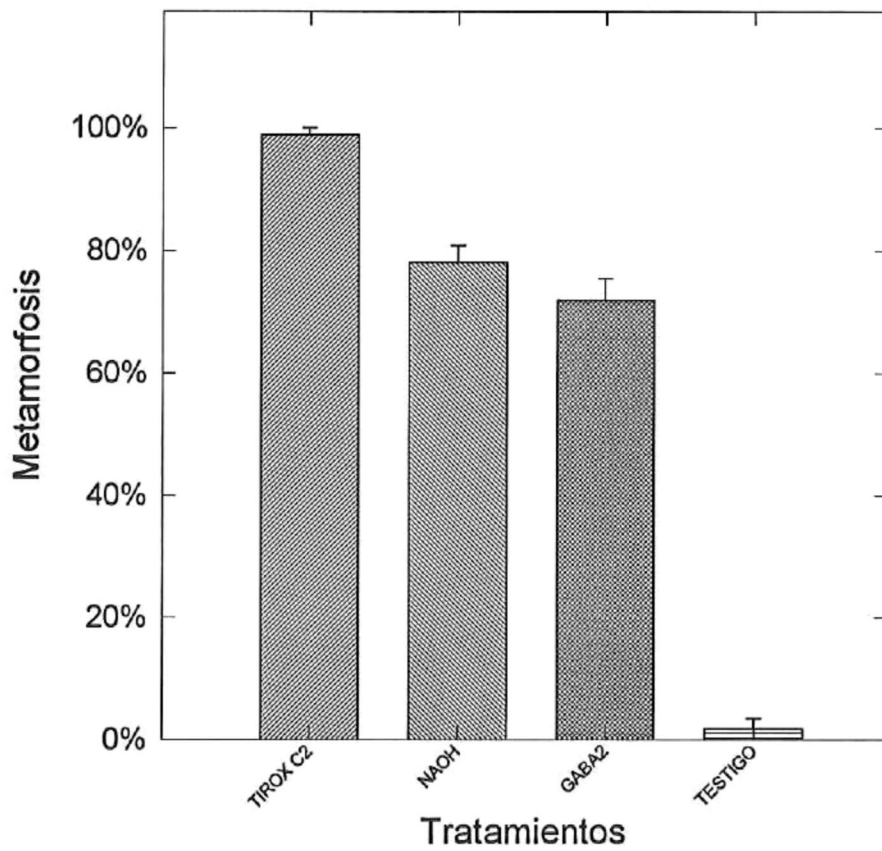


Figura 11.- Porcentaje de metamorfosis obtenida en los diferentes tratamientos durante el experimento 2 con el abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las barras verticales corresponden al error estándar.

Se observaron valores altos de metamorfosis tanto para la L-tiroxina C2, NaOH y GABA. Los valores promedio de metamorfosis para estos tratamientos fueron de 98.83%, 78.03% y 71.88% respectivamente (Figura 10). Estos porcentajes resultaron significativamente diferentes al porcentaje de metamorfosis que se obtuvo en el testigo ($p \leq 0.01$), el cual fue de 1.7% en promedio como se aprecia en la misma Figura 10. Asimismo se probó por medio de contrastes, que el porcentaje obtenido con L-tiroxina C2 resultó significativamente diferente ($p \leq 0.01$) a los de NaOH y GABA. Estos dos últimos resultaron diferentes entre si al mismo nivel de significancia (ver anexo II: Tabla ANOVA).

Durante el tercer experimento con abulón rojo, se mostró el efecto del NaOH utilizado para disolver la L-tiroxina. El porcentaje promedio de metamorfosis para este tratamiento fue de 82.73%, el cual resultó significativamente diferente ($p \leq 0.01$), comparado con los porcentajes obtenidos para agua desionizada y el testigo, los cuales fueron en promedio 2.08% y 3.56% respectivamente (Figura 12). No se encontró diferencia significativa entre los porcentajes de metamorfosis promedio obtenidos para estos dos últimos tratamientos. Un resumen de la Tabla ANOVA se presenta en el anexo II.

En los experimentos anteriores, el efecto del NaOH utilizado para disolver la L-tiroxina tuvo como consecuencia un incremento de pH en el agua de mar de los tratamientos en los que se agregó este compuesto. La variación de pH para el tratamiento de NaOH en el experimento anterior tuvo el siguiente comportamiento. A partir de un pH de 8.14 (-287 mV) del agua de mar filtrada a $0.45 \mu\text{m}$, éste se incrementó a 9.47 (-362 mV) al agregar 1.2 ml de una solución de 1:20 de NaOH 0.1N. Con agua desionizada el pH fue de 8.19 (-289 mV).

Con la evidencia anterior se disolvió la L-tiroxina en 50 μl de NaOH 0.1N para los experimentos posteriores. Las variaciones de pH con esta nueva solución de L-tiroxina fueron las siguientes. A partir de un pH de 8.32 del agua de mar

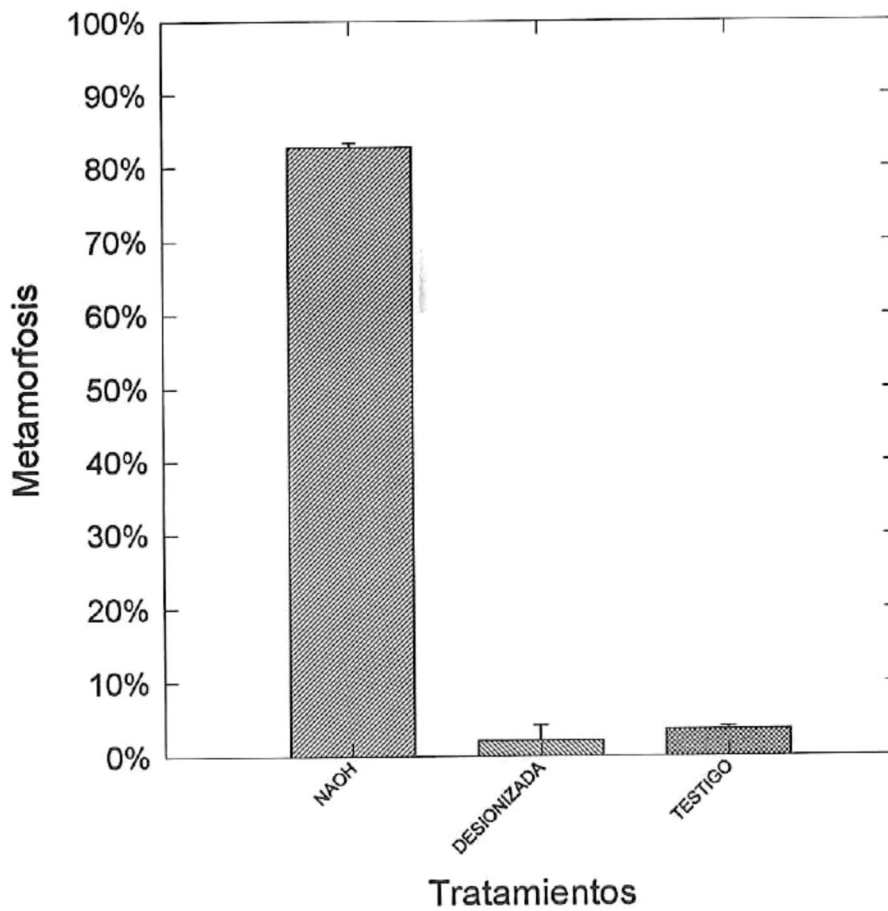


Figura 12.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 3 con abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las barras verticales corresponden al error estandar.

filtrada a $0.45\mu\text{m}$, este se incrementó hasta 8.44 (-214 mV) y 8.59 (-220mV) al agregar 0.6 y 1.2 ml de la solución de NaOH. Lo anterior equivale a incrementos de pH de 0.12 y 0.27, respectivamente. Estas cantidades (0.6 y 1.2 ml) fueron las utilizadas en los blancos de reactivo para L-tiroxina

Con estas consideraciones se realizó el cuarto experimento con abulón rojo con los siguientes resultados. Durante la evaluación de ocho de las réplicas a las 20 horas de realizada la inducción a la metamorfosis se observaron porcentajes importantes de metamorfosis para los tratamientos de GABA, L-tiroxina C1, y NaOH 1. Los porcentajes de metamorfosis fueron de 72.43%, 11.64% y 46.66% respectivamente. Este último valor corresponde a una sola muestra (Figura 13), al igual que los porcentajes de metamorfosis para los tratamientos de NaOH 2 y el testigo que fueron de 2.77% y 10% respectivamente.

La evaluación final del cuarto experimento se realizó a las 44 horas de la inducción a la metamorfosis. Los valores para cada tratamiento fueron los siguientes. Tirox C1, 100%; Tirox C2, 100%; Blco de react 1, 18.11%; Blco de react 2, 23.66%; NaOH 1, 90.3%; NaOH 2, 50% y el testigo con 31.6%.

Los blancos de reactivo se refieren a los tratamientos en los cuales se utilizó la cantidad de NaOH usada para disolver la L-tiroxina en los tratamientos con la hormona.

Los porcentajes de metamorfosis obtenidos se muestran en la Figura 14. Asimismo, los tratamientos significativamente diferentes se muestran en el resumen de la tabla ANOVA en el anexo II.

Destacan entre estos resultados la diferencia entre el tratamiento de L-tiroxina y NaOH en contraste con los blancos de reactivo y el testigo ($p \leq 0.01$). Asimismo, existió diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre el porcentaje de metamorfosis obtenido con L-tiroxina y con el NaOH (incremento de pH).

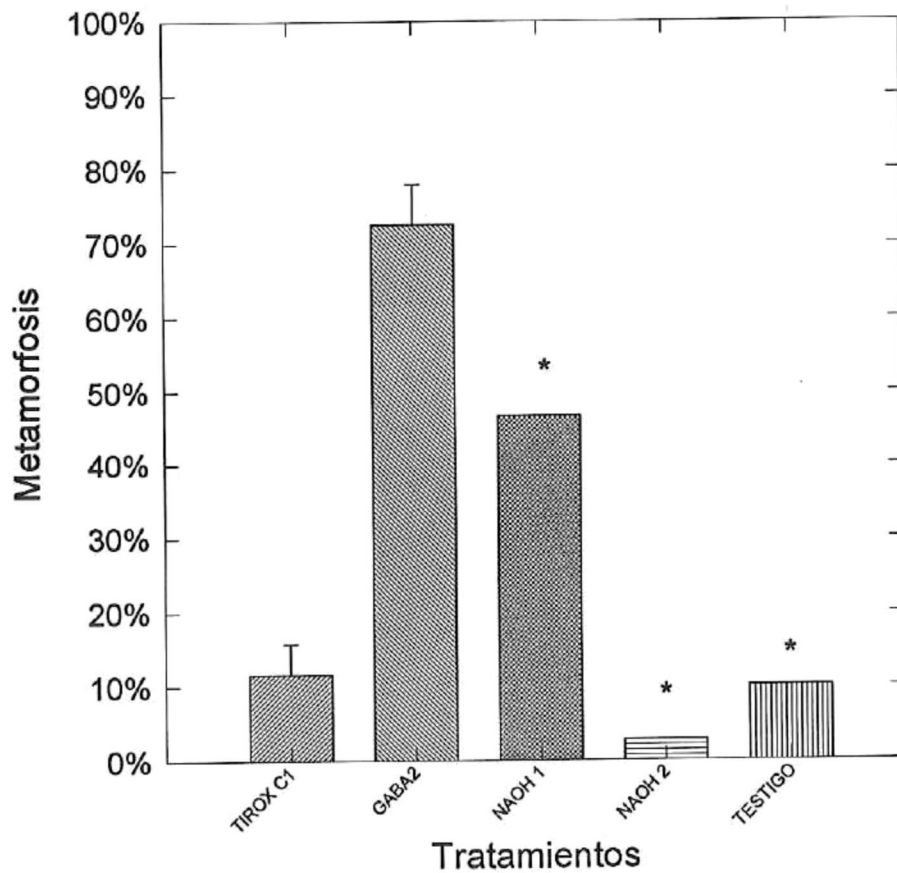


Figura 13.- Porcentaje de metamorfosis evaluada a las 20 horas, obtenida con los diferentes tratamientos durante la primera parte del experimento 4 (4A) con abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las barras verticales corresponden al error estandar y el asterisco (*) a valores de una sola muestra.

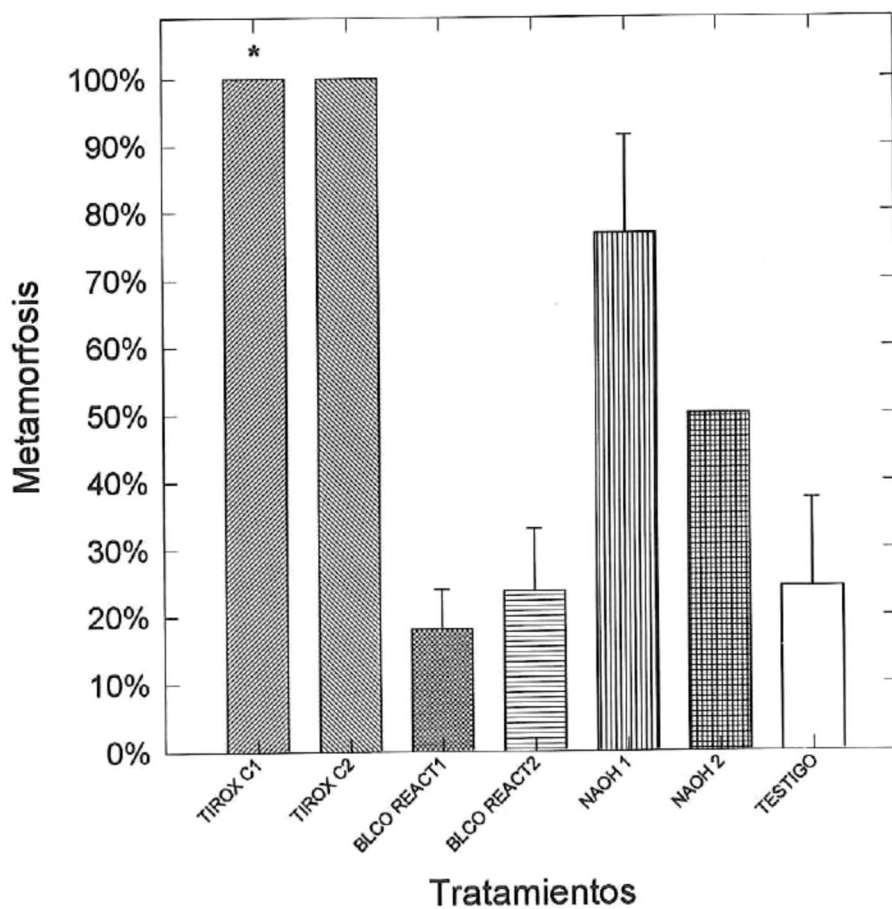


Figura 14.- Porcentaje de metamorfosis evaluada a las 44 horas, obtenida con los diferentes tratamientos durante la evaluación final del experimento 4 (4B) con abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las barras verticales corresponden al error estandar y el asterisco (*) a valores de una sola muestra.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre las dos concentraciones de NaOH utilizadas para este tratamiento, esto es, los porcentajes de metamorfosis obtenidas fueron directamente proporcionales a la concentración de NaOH y por lo tanto al incremento de pH. De la misma forma, se encontraron valores significativamente diferentes entre los porcentajes obtenidos en los blancos de reactivo y el testigo. Cabe mencionar que durante este experimento se observó la presencia de protozoarios en los diferentes tratamientos.

Para este experimento no se incluyó en el análisis estadístico el porcentaje de metamorfosis obtenido con la concentración mayor de L-tiroxina, ya que al momento de la evaluación final se contaba solamente con una réplica. El porcentaje promedio de metamorfosis obtenido para esta concentración fue de 100% y se muestra junto con el resto de los tratamientos en la Figura 14.

Durante el quinto experimento con abulón rojo se obtuvieron porcentajes sobresalientes de metamorfosis para los tratamientos con L-tiroxina y NaOH. Los porcentajes promedio de metamorfosis considerando los tratamientos en forma global fueron de 85.45% y 52.47%, los cuales fueron significativamente diferentes entre sí ($p \leq 0.01$, ver anexo II: resumen tabla ANOVA). Asimismo, estos valores de metamorfosis resultaron significativamente diferentes ($p \leq 0.01$; ver anexo II: Tabla ANOVA) a los que se obtuvieron con los blancos de reactivo (Blco React 1 y 2) y el Testigo. Los valores promedio de metamorfosis para estos dos últimos tratamientos fueron de 8.84% y 6.46% respectivamente (Figura 15 y anexo II: Resumen de tabla ANOVA).

Los valores promedio de metamorfosis para cada una de las concentraciones dentro de los diferentes tratamientos se comportaron de la siguiente manera. Para la L-tiroxina se obtuvieron porcentajes promedio de 85.03 y 85.88 en las dos concentraciones probadas durante este experimento, y que corresponden a

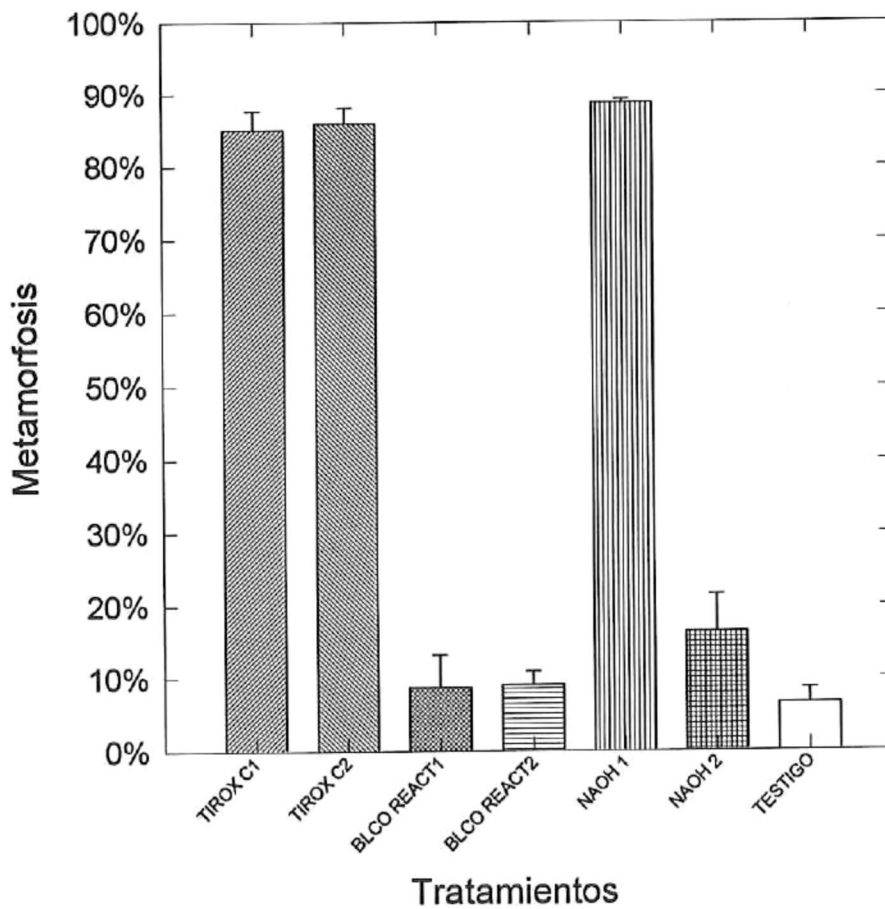


Figura 15.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 5 con abulón rojo *Haliotis rufescens*. Las barras verticales corresponden al error estandar.

132nmol/ml (TIROX C1) y 66 nmol/ml (TIROX C2). No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre estos dos niveles. Para los blancos de reactivo 1 y 2 (BLCO REACT 1 Y 2 en la Figura 15), los valores promedio fueron de 8.69 y 8.99. Al igual que en el caso de L-tiroxina, los valores no fueron significativamente diferentes entre si ($p>0.05$). Los valores obtenidos para las dos concentraciones de NaOH fueron de 88.69 y 16.2, que corresponden a incrementos de pH de 0.37 (-22.7mV) y 0.28 (-17.36mV). En este caso se encontró diferencia significativa ($p\leq 0.01$) entre los dos niveles de este tratamiento. El valor promedio de metamorfosis para el testigo fue de y 6.45% (Figura 15).

5.2. Experimento con el caracol *Astraea undosa*.

Durante el sexto experimento, en el cual se indujeron a la metamorfosis larvas competentes del caracol *Astraea undosa* se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 16). El promedio de metamorfosis para cada uno de los tratamientos en forma global fue: GABA, 73.06%; L-tiroxina, 97.01%; Blancos de Reactivo, 28.42%; KCl, 36,25%; NaOH, 46.42% y testigo, 6.75% (Figura 16). Se encontró diferencia significativa ($p\leq 0.01$) entre el testigo y el resto de los tratamientos; entre el KCl y los porcentajes obtenidos con L-tiroxina, GABA y NaOH; entre el NaOH y los porcentajes de L-tiroxina y GABA; entre los porcentajes de GABA y L-tiroxina; y finalmente entre los valores de L-tiroxina y los obtenidos en los blancos de reactivo (Figura 16 y anexo II; resumen tabla ANOVA).

Diferencias significativas ($P\leq 0.01$) se encontraron entre las dos concentraciones de GABA utilizadas (GABA 1 y GABA 2), donde los porcentajes promedio de metamorfosis fueron 93.59 y 52.53 respectivamente. Una situación similar se observó dentro de los tratamientos con KCl, donde existió diferencia significativa entre las tres concentraciones probadas. La metamorfosis promedio fue de 23.01%, 32.14% y 53.62%, para las concentraciones de KCl 1 (29.7 nmol/ml), KCl 2 (19.8 nmol/ml) y KCl 3 (9.8 nmol/ml) respectivamente. En el

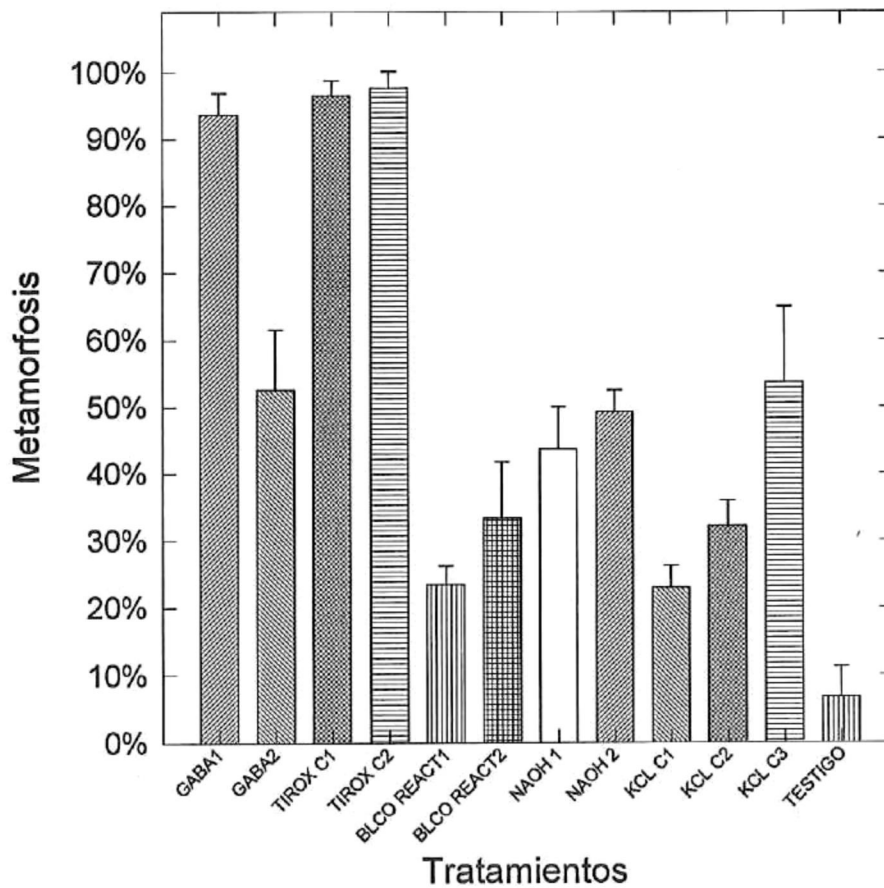


Figura 16.- Porcentaje de metamorfosis obtenida con los diferentes tratamientos durante el experimento 6 con el caracol *Astraea undosa*. Las barras verticales corresponden al error estandar.

resto de los grupos no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los niveles de tratamiento probados.

6. DISCUSION

6.1. Efecto de L-Tiroxina, GABA, L-DOPA, Norepinefrina y KCl en al inducción a la metamorfosis del abulón rojo (*Haliotis rufescens*).

De los compuestos utilizados, solamente los tratamientos con L-tiroxina concentración 2 (TIROX C2) y el GABA mostraron porcentajes normales de metamorfosis superiores al 50% (Figura 9). La metamorfosis normal en estas especies se caracteriza por la pérdida total de los cilios del velo, el continuo reptar de la larva, y posteriormente por la presencia de la concha peristomal.

Para el caso de la L-tiroxina, resultó la primera evidencia de inducción a la metamorfosis en esta especie. Sin embargo, la utilización de 1ml de NaOH para disolver la hormona en este primer experimento no permitió separar con claridad el efecto de estos dos compuestos (L-tiroxina y NaOH). Para el caso del tratamiento con la concentración superior de tiroxina no se pudo apreciar el porcentaje de metamorfosis durante este experimento ya que la larva se encontró retraída, a diferencia de los experimentos posteriores con esta especie y con el caracol, en los cuales se observaron porcentajes de metamorfosis normales entre un 90 y 100% (Figuras 14, 15 y 16) para esta misma concentración.

Para el caso de los resultados obtenidos con GABA, el porcentaje de metamorfosis promedio de 58.29 resultó un 15% menor aproximadamente al reportado por Searcy-Bernal *et al.* (1992) para la misma especie, en recipientes de plástico con agua filtrada a 5 μm y evaluados a las 24 horas de la inducción. Estas diferencias pudieran explicarse con base en la diferencia en la densidad de larvas utilizadas durante los experimentos, lo cual podría haber afectado la eficiencia en la asimilación del GABA. Mientras Searcy-Bernal y colaboradores utilizaron densidades de 0.1 larvas/ml, en el presente experimento se utilizó una densidad de 3.4 larvas/ml. Cabe mencionar, que García-Mendoza (1991),

encontró una disminución en el porcentaje de metamorfosis al aumentar la densidad de las larvas inducidas con GABA, aunque sus resultados no probaron ser significativamente diferentes. Lo anterior debido probablemente a la variabilidad que existió durante el experimento realizado, en el cual se utilizaron recipientes de mayor capacidad y el agua se filtró hasta 1 μm , en comparación con el presente estudio donde se utilizaron frascos de 20 ml de capacidad y el agua se filtró hasta 0.45 μm . En las condiciones utilizadas por García-Mendoza (1991), probablemente el número de réplicas en cada tratamiento resultó insuficiente para detectar las diferencias a un nivel estadísticamente significativo.

Otros factores que pudieron influenciar la diferencia de resultados son: el periodo para evaluar (24 horas después de la inducción en relación con 21 en este experimento) y la edad de la larva, que desafortunadamente no se menciona en el trabajo de Searcy-Bernal *et al.* (1992) y que pudo afectar la sensibilidad de la larva al estímulo.

El porcentaje de metamorfosis que se obtuvo con GABA, resultó muy similar al obtenido por García-Mendoza (1991) con el abulón azul (*Haliotis fulgens*) al utilizar larvas de 6 días de edad después de la fertilización a una densidad de 0.9 larvas/ml. Una diferencia importante entre los experimentos realizados por los autores anteriores y el presente trabajo, es que el agua utilizada durante los experimentos se filtró hasta 0.45 μm , lo cual elimina casi por completo la materia orgánica particulada y con ello partículas que pudieran influenciar el porcentaje final de metamorfosis, a diferencia del agua filtrada hasta 5 μm (Searcy-Bernal *et al.*, 1992) y 1 μm (García-Mendoza, 1991) utilizada por los autores mencionados.

Por otra parte los resultados obtenidos para el GABA, se contraponen a lo obtenido por Slattery (1992) con el abulón rojo, el cual no encontró diferencia

entre la media de larvas asentadas en presencia y ausencia de GABA; y los resultados de Akashige *et al.* (1981), en donde menciona que el efecto narcótico del GABA imposibilita a la larva a metamorfizarse. Tanto para la L-tiroxina como para el GABA, en donde los porcentajes de metamorfosis resultaron similares, estos fueron significativamente diferentes al testigo en el cual se registraron porcentajes promedio de metamorfosis tan solo del 2.33%.

En relación con lo obtenido por Morse y colaboradores al utilizar GABA como inductor, los resultados del presente trabajo fueron alrededor de un 30% menores a los reportados por estos autores en diferentes trabajos. Así por ejemplo, Morse *et al.* (1979) reportan hasta un 99% de larva asentada doce horas después de la inducción. Baloun y Morse (1984), porcentajes de asentamiento superiores al 90% y Trapido-Rosenthal y Morse hasta del 100% después de aproximadamente 20 horas de efectuada la inducción en ambos casos. Sin embargo, en los distintos trabajos, los porcentajes están referidos como asentamiento ("settlement" o "attachment"), lo cual no implica necesariamente la pérdida del velo, que se considera como una característica fundamental del proceso de metamorfosis. Lo anterior, hace más complejo el poder establecer comparaciones entre los resultados de este trabajo y los obtenidos por estos autores.

Los resultados obtenidos con la concentración intermedia de norepinefrina difieren de lo reportado por Morse *et al.* (1979), donde menciona que este compuesto no tiene ningún efecto en el asentamiento de la larva de abulón.

Como lo muestran los porcentajes de la Figura 9, tanto para las concentraciones intermedias de L-DOPA como para norepinefrina, la larva perdió el velo, lo cual pudiera considerarse como un elemento importante del proceso de metamorfosis en respuesta a la acción de estos compuestos.

A diferencia de los resultados de metamorfosis normal obtenidos por diversos autores con distintas especies de ostión (Bonar *et al.*, 1990; Bonar *et al.*, 1985; Coon y Bonar, 1985; Coon *et al.*, 1990; McAnally *et al.*, 1989), los porcentajes de metamorfosis en un intervalo de concentración de 0.96 a 963 nmol/ml para L-DOPA, y de 0.99 a 996 nmol/ml para norepinefrina, siempre fueron porcentajes de metamorfosis anormales. Los porcentajes de metamorfosis observados con KCl, resultaron mucho menores a los reportados por Yool *et al.* (1986), para el abulón rojo.

6.2. Cuantificación del efecto del NaOH utilizado para disolver la hormona L-tiroxina (Experimentos 2 y 3).

Los resultados de metamorfosis obtenidos cuando se indujo con la cantidad de NaOH utilizado para disolver la L-tiroxina mostraron tener un efecto significativo en el porcentaje de larva metamorfizada (Figuras 11 y 12). En estos dos experimentos se mostró que el porcentaje de metamorfosis obtenido con el tratamiento de L-tiroxina durante el primer experimento existió un efecto combinado entre la hormona y el NaOH al momento de la inducción. El efecto logró separarse en los experimentos 2 y 3, pero la interacción entre estos compuestos no fue probada debido a limitaciones del diseño experimental. Los porcentajes obtenidos con los compuestos por separado se aprecian claramente en la Figura 11, en la cual el porcentaje de metamorfosis con la cantidad de NaOH utilizado para disolver la hormona fue de 78.03%. Este valor, aunque significativamente diferente al obtenido con L-tiroxina con la concentración intermedia, representa un porcentaje importante, el cual resultó incluso superior al obtenido con GABA (Figura 11).

Otro aspecto importante a resaltar, es que el porcentaje de metamorfosis para los tratamientos de GABA y L-tiroxina, los cuales se repitieron durante los dos

primeros experimentos, se incrementaron en éste último. Lo anterior resulta importante, ya que la larva utilizada en estos tres primeros experimentos perteneció a un mismo lote inicial. Los experimentos se realizaron con larvas de 8, 10 y 11 días de edad después de la fertilización y en condiciones similares, por lo que este incremento en porcentaje de metamorfosis pudiera ser una evidencia, aunque incipiente, de una respuesta diferencial de la larva a estímulos ambientales conforme pasa el tiempo a partir de que se encuentra competente para metamorfizarse. Una respuesta de este tipo para el abulón rojo se obtuvo recientemente (Salas-Garza, Comunicación personal; Barlow, 1990)) y es sugerida por Searcy-Bernal *et al.* (1992).

Por último, en estos dos experimentos (experimento 2 y 3), resultó claro que el efecto de los inductores utilizados (L-tiroxina con NaOH, GABA y NaOH), fue muy superior al porcentaje obtenido en el testigo (agua de mar filtrada hasta 0.45µm) y en el tratamiento con agua desionizada.

Los resultados obtenidos al inducir con NaOH, parecen ser la primera evidencia de un efecto sobre la metamorfosis del abulón rojo. Otros estudios en diversas especies han probado el efecto de diferentes iones, como el Na⁺, Mg²⁺, usualmente con resultados negativos (Baloun y Morse, 1984). El exceso de Ca²⁺ por otra parte, indujo un porcentaje de metamorfosis mayor al 50% en el poliqueto *Phragmatopoma californica* (Yool *et al.*, 1986).

6.3. Efecto de la Hormona L-tiroxina y concentración de NaOH en la inducción a la metamorfosis de abulón rojo (experimentos 4a, 4b y 5).

La L-tiroxina en los tratamientos con las concentraciones mayor e intermedia utilizadas, junto con el tratamiento con mayor concentración de NaOH, fueron los que en forma consistente mostraron los mayores porcentajes de metamorfosis (Figuras 14 y 15). Tomando en cuenta la experiencia generada durante los tres

primeros experimentos, se logró separar en estos últimos el efecto producido por la L-tiroxina y el NaOH utilizado para disolverla (Figuras 14 y 15). Los porcentajes de metamorfosis en ambos experimentos resultaron muy superiores (100% exp. 4 y >85% exp. 5) y consistentes en relación a los valores obtenidos en los blancos de reactivo. Los valores de metamorfosis para estos últimos fueron inferiores al 25% en todos los casos (Figuras 14 y 15). Esto resulta importante, ya que para la larva utilizada perteneció a diferente cohorte y se obtuvo de desoves diferentes.

La metamorfosis obtenida en los tratamientos con NaOH durante estos dos experimentos, refuerza los resultados de los dos primeros, en los cuales ya se había detectado un efecto del NaOH.

Durante el experimento 4, se detectó una mayor velocidad en la acción del GABA y el NaOH (concentración 1) en la inducción a la metamorfosis en relación con el tratamiento con L-tiroxina (Figura 13). Mientras que en los dos primeros los porcentajes de metamorfosis fueron de 72.43 y 46.66, respectivamente, el porcentaje con L-tiroxina fue de 11.64%. Esto resulta dentro de las expectativas, ya que mientras la acción hormonal puede ser un proceso que requiera mayor tiempo (Burke, 1983b), la acción del GABA y el NaOH, presumiblemente ligada a interacciones directas con el sistema nervioso tendrían un efecto inmediato, o al menos de mayor rapidez en relación con la acción hormonal como propone Burke(1983b). Es importante hacer notar que los porcentajes de metamorfosis para los tratamientos con NaOH en la figura 13 representan el valor de una sola réplica, por lo que las comparaciones que se hacen deberán tomarse con esta consideración.

La presencia de protozoarios en la larva utilizada durante el experimento 4 pudo afectar la respuesta a los diferentes tratamientos. Sin embargo, el patrón de

respuesta que se observó durante el quinto experimento, resulta consistente y comparable con el experimento anterior. Para este último experimento la larva fue de buena calidad, sin detectarse la presencia de protozoarios durante el desarrollo larvario o durante el periodo de experimentación.

6.4. Efecto de la hormona L-tiroxina, GABA, NaOH y KCl en la inducción a la metamorfosis del caracol *Astraea undosa*.

Los tratamientos con mayores porcentajes de metamorfosis durante este experimento se obtuvieron con L-tiroxina y GABA1 (100 nmol/ml) (Figura 16). La respuesta con L-tiroxina es la primer evidencia del efecto de esta hormona en la inducción a la metamorfosis de *Astraea undosa*. Un segundo nivel de respuesta se obtuvo con los tratamientos de GABA2 (1 nm/ml), KCl C3 y las dos concentraciones de NaOH. Los porcentajes de metamorfosis en esos tratamientos estuvieron alrededor del 50% (Figura 16).

Para el caso del GABA los resultados difieren de los obtenidos por Salas-Garza y Searcy-Bernal (1989), en donde no obtuvieron una respuesta favorable con este compuesto. Las concentraciones utilizadas por ellos fueron equivalentes a la concentración 2 de GABA utilizada en el presente trabajo. La concentración mayor de GABA (100 nmol/ml) no fue probada por estos autores.

Por otra parte, los resultados obtenidos con KCl, coinciden con los observados por Yool. *et al.* (1986) para esta especie, en donde los mayores porcentajes de metamorfosis corresponden a una concentración de 9.8 nmol/ml de K⁺ suministrados en exceso al agua de mar. Los valores de metamorfosis para este trabajo se observan en la Figura 16.

Los resultados con KCl para *A. undosa* contrastan igualmente con los porcentajes de metamorfosis obtenidos con este inductor en el abulón rojo durante el primer

experimento. No se cuenta con una explicación acerca del bajo porcentaje de metamorfosis que se obtuvo con KCl en esta especie, ya que en repetidas ocasiones se ha demostrado el efecto del ion K^+ en la inducción a la metamorfosis de abulón rojo y otras especies de invertebrados como el nudibranquio *Phestilla sibogae*, el poliqueto *Phragmatopoma californica* (Yool *et al.*, 1986), la lapa *Crepidula fornicata* (Pechenik y Heyman, 1987; Pechenik y Gee, 1993) y el caracol *Strombus gigas* (Davis *et al.*, 1990), entre otros.

6.5. Patrones de comportamiento observados durante los experimentos y posibles mecanismos de acción de los inductores.

En el abulón rojo, los inductores L-tiroxina, GABA y NaOH probados durante los experimentos, mostraron en forma repetida inducir porcentajes altos (> 50%) de metamorfosis (Figuras 9 y 11 a 16). En el caso del experimento realizado con el caracol *Astraea undosa*, los porcentajes altos de metamorfosis correspondieron a los mismos inductores, a excepción de los obtenidos con KCl, los cuales en el caso de *Astraea*, resultaron superiores a los obtenidos en el abulón (Figura 16). Los posibles mecanismos de acción de estos inductores se discuten a continuación en forma individual.

El efecto de la hormona L-tiroxina sobre la metamorfosis de ambas especies puede tener al menos dos explicaciones distintas. La primera de ellas, parte del supuesto de que esta hormona tuvo un efecto similar al que ejerce en vertebrados superiores, en donde participa en procesos de diferenciación celular (Evans, 1988; Forman y Samuels, 1990) y desarrollo neurológico (Porterfield y Hendrich, 1993), a través de receptores nucleares (Jones *et al.*, 1993) como se señaló en los antecedentes. Su acción en este caso estaría mediada por factores de transcripción en el DNA de las larvas por medio de los cuales se activaron genes que participan en el desarrollo y diferenciación celular, de manera que el

proceso de metamorfosis se llevó a cabo. En este caso la acción más lenta de la L-tiroxina en relación con otros inductores como el GABA, observada en la evaluación inicial del experimento 4 con abulón rojo, podrían tomarse como un indicador de actividad hormonal.

Dos evidencias principales podrían apoyar un planteamiento como el anterior. Por una parte, la reciente caracterización del locus E75 en *Drosophila*, cuyo gene codifica una proteína estructuralmente muy similar al receptor de la hormona tiroidea en vertebrados (Evans, 1988), plantea la posibilidad de la existencia de una región estructural similar en el genoma del abulón y del caracol que se haya conservado a través de la evolución, aunque en este grupo con funciones distintas a las adquiridas en vertebrados superiores.

Por otra parte, la presencia de péptidos y hormonas como la corticotropina, insulina, gonadotropina coriónica y glucagón, descritos inicialmente en vertebrados, que al menos con criterios de inmunorreactividad cruzada, han mostrado estar presentes en invertebrados, incluyendo los moluscos (Valverde *et al.*, 1988), abre la posibilidad de la existencia de hormonas tiroideas o moléculas afines en este grupo de organismos, que hasta el momento no han podido ser detectadas. Lo anterior en parte, porque usualmente se encuentran en cantidades muy pequeñas (Evans, 1988) y por el tamaño tan pequeño (< 300 µm) de las larvas.

En forma más directa, los resultados obtenidos por Spangenberg (1971, 1974, 1984) en el celenterado *Aurelia aurita* y Pillai *et al.* (1987) en el camarón *Penaeus monodon*, en donde se mostró en el primero su participación en la estrobilación (equivalente a la metamorfosis en celenterados), y en el segundo su efecto en el crecimiento y frecuencia de muda, apoyan la posibilidad de que compuestos

yodados similares a las hormonas tiroideas, o estas mismas, desempeñen un papel funcional en el desarrollo de distintos grupos de invertebrados incluyendo los moluscos.

Una segunda explicación del efecto de la L-tiroxina en la metamorfosis de las especies utilizadas, es que la L-tiroxina o moléculas afines no tengan un papel funcional en el desarrollo de estas especies y que el efecto detectado sea producto de una interacción no específica de la hormona con alguna parte del mecanismo normal de metamorfosis.

La explicación anterior tiene su fundamento en dos argumentos que es necesario considerar. Por una parte, las concentraciones utilizadas de L-tiroxina durante los experimentos fueron superiores a los niveles que Frieden (1981) establece como tóxicos basado en datos obtenidos para vertebrados, en forma particular en ratas y renacuajos de rana toro. Sin embargo, existe la posibilidad de que las concentraciones que pudieran ser activas para invertebrados pudieran diferir de las de vertebrados debido a que los primeros no cuentan con una glándula o tejido definido para concentrar yodo. Por otra parte, si suponemos que existe una región en el genoma de moluscos que pudiera activarse a través de hormonas tiroideas o moléculas afines, seguramente esta región, aunque conservada a través de la evolución, probablemente no presente la misma afinidad que el receptor tiroideo a la acción de la hormona en vertebrados.

El segundo argumento a favor de una interacción no específica son los resultados obtenidos por Pennington y Hadfield (1989) con el nudibranquio *Phestilla sibogae*. Estos autores encontraron que al inducir a la metamorfosis a este organismo con diferentes solventes orgánicos, entre los cuales se incluyeron varios tipos de alcoholes, los animales iniciaban el proceso de metamorfosis. En presencia de algunos de los solventes un porcentaje alto de larvas (> 70%) perdió el velo, lo

que se considera el inicio de la metamorfosis. En presencia de los solventes, los nudibranchios no se desprendieron de su concha larval, lo que forma parte de su proceso normal de metamorfosis. Sin embargo, cuando se colocaron en presencia del inductor natural después de estar expuestos a los solventes orgánicos, los organismos reactivaron la metamorfosis y se desarrollaron hasta adultos.

Lo anterior resulta importante en el contexto del presente trabajo ya que un comportamiento similar se observó tanto en las larvas de abulón rojo como de caracol al ser inducidas con L-tiroxina. Debido a que el criterio durante este trabajo para definir la metamorfosis de las larvas fue la pérdida del velo, se prestó poca atención a la presencia de larvas con concha peristomal. Esta concha, con características diferentes a la concha larval resulta muy evidente en los organismos que la presentan. En el caso de las larvas inducidas con L-tiroxina un número pequeño, desafortunadamente no cuantificado presentó la concha peristomal. Lo anterior en contraste con una gran cantidad de larvas (tampoco cuantificadas) en los tratamientos con GABA.

Por otra parte, Fenteany y Morse (1993) encontraron que la larva de abulón rojo pierde la corona ciliar cuando es inducida en presencia de compuestos que inhiben la síntesis proteínica ("emetine y anisomycin"), pero no desarrolla la concha peristomal después de 24 horas de ser inducida. Lo anterior resulta muy similar a los resultados obtenidos con L-tiroxina en el presente trabajo, aunque en este caso con porcentajes de metamorfosis superiores.

Los autores mencionados lo reportan como producto de un posible efecto tóxico del compuesto. La falta de evidencia adicional y los resultados obtenidos por Pennington y Hadfield (1989), hacen pensar más bien que se trata de una

interacción no determinada para estos compuestos y cuyo mecanismo de acción, si pudiera explicarse en esta forma, no se conoce.

En el caso del GABA, varios estudios han contribuido a tratar de elucidar el posible mecanismo mediante el cual induce la metamorfosis en el abulón rojo. Evidencias obtenidas al realizar estudios *in vivo* con las larvas de esta especie, mostraron que la acción del GABA para inducir a la metamorfosis, puede potenciarse mediante la presencia de aminoácidos como la L-lisina (Trapido-Rosenthal y Morse, 1985, 1986). En estudios posteriores, Baxter y Morse (1987), sugieren la participación de una proteína G (proteínas que se ligan a un guanil-nucleótido y que se les conoce en este nombre) involucrada en la activación del sistema de segundo mensajero en el interior de la célula, y proponen la existencia de dos patrones, uno morfogénico que involucra al GABA y otro regulador que involucra la presencia de receptores a diaminoácidos que desencadenan la respuesta de un segundo mensajero mediante la proteína G mencionada.

Un aspecto que resulta cuestionable en relación al mecanismo propuesto por estos autores, es que los resultados se obtuvieron experimentando con los organismos *in vivo*, donde la totalidad de los receptores están expuestos a los diferentes inductores (Pawlik, 1990), por lo que las interpretaciones deben hacerse con esa consideración en mente.

Para tratar de salvar este aspecto, recientemente Wodicka y Morse (1991), lograron aislar DNA complementario (cDNA), el cual reveló la presencia de RNA mensajero (RNAm) para dos G alfa proteínas en los cilios del abulón, y que resultó ser muy semejante al RNAm que codifica para este tipo de proteínas en células de mamífero. Sin embargo, este tipo de proteínas, probablemente se encuentren diseminadas en la mayoría de las células (Hille, 1992), al menos en

vertebrados. Por otra parte Barlow (1990), con base en estudios electrofisiológicos en los cilios de abulón indica que al menos en este tipo de cilio, es probable que no se encuentren los receptores mediante los cuales la larva reacciona al GABA. Por lo anterior, resulta difícil interpretar los resultados de Wodicka y Morse (1991) en relación al papel que pudieran desempeñar este tipo de mensajeros en el proceso de metamorfosis.

En el presente estudio, tanto *H. rufescens* como *A. undosa* se metamorfixaron en presencia de GABA, aunque en el último con concentraciones mayores. Esta respuesta podría ser debido a una madurez diferencial entre las larvas utilizadas y que se consideraron como competentes en ambas especies al momento de la experimentación. Aunque el criterio para definir la competencia a la metamorfosis es similar en ambas especies y pudiera considerarse equivalente, pueden existir diferencias interespecíficas que no es posible establecer con criterios morfológicos en ese periodo de desarrollo para estas especies. Esta respuesta diferencial a la inducción con GABA es equivalente a la observada en ocasiones anteriores por otros autores. Al utilizar 1 nmol/ml de GABA, los porcentajes de metamorfosis fueron mayores para el abulón rojo (Searcy-Bernal *et al.*, 1992) en comparación con los obtenidos para el caracol *Astraea* con la misma concentración (Salas-Garza y Searcy-Bernal, 1989).

Otra posibilidad, es que un mecanismo similar al propuesto por Baxter y Morse (1987) para el abulón rojo se encuentre en el caracol *Astraea*, solo que con diferente afinidad a los compuestos debido a diferencias interespecíficas en los receptores presentes de las larvas.

Los resultados obtenidos al inducir a la metamorfosis al abulón rojo y al caracol *Astraea* con NaOH parecen ser la primera evidencia de un efecto consistente en el porcentaje de metamorfosis en estas especies (Figuras 11 a 16). Un mecanismo

posible de acción de este compuesto pudiera estar relacionado con el incremento de pH provocado por el hidróxido de sodio, más que por la acción del sodio.

Si se considera que el sodio es el catión más abundante en el agua de mar, la cantidad agregada durante los experimentos resulta despreciable en relación con la existente en el agua de mar.

Por otra parte, experimentos realizados por Baloun y Morse (1984) en el abulón rojo, en donde sustituyeron diferentes cationes del agua de mar, mostraron que la inducción a la metamorfosis no era estimulada al aumentar la proporción de Na^+ en agua de mar artificial. La inducción a la metamorfosis mediante variaciones en la concentración de Na^+ sólo fue posible cuando este elemento se sustituyó en lugar de Mg^{2+} . El magnesio se sabe, bloquea los canales iónicos de Ca^{2+} y es un constituyente normal del agua de mar (Freeman, 1993), por lo que el efecto detectado probablemente se debió más a la ausencia de este catión.

El incremento de pH en el medio circundante al organismo (pH_o), puede traer como consecuencia un ajuste del pH en el citoplasma de las células del mismo (pH_i), lo que puede activar enzimas que pueden participar en el proceso de diferenciación y por lo tanto en la metamorfosis. En este sentido, se tienen diversas evidencias de la participación del pH como regulador del metabolismo por medio de variaciones intracelulares. Al menos en cuatro sistemas celulares, que incluyen la activación del huevo y su interacción con el esperma en erizos, la activación de los quistes en *Artemia*, y el músculo de la rana involucran variaciones moderadas o altas de pH_i (Busa y Nuccitelli, 1984; Lopo, A. y V.D. Vacquier, 1977). Aún más, variaciones de pH_i podrían influenciar el funcionamiento de enzimas como la adenilato ciclasa, la cual contribuye a generar el AMP cíclico (cAMP) (Busa y Nuccitelli, 1984); el cAMP se reconoce ampliamente como un segundo mensajero (Hille, 1992). Asimismo,

recientemente Coon *et al.* (1990) encontraron que un alto porcentaje de larvas del ostión japonés *Crassostrea gigas* es inducida al asentamiento en presencia de cloruro de amonio (NH_4Cl). Los autores sugieren que el NH_3 en forma de base débil penetra a la célula y es capaz de modificar el pH citoplasmático.

Por otra parte, el hecho de que el incremento de pH estimule la metamorfosis en el abulón y el caracol, pudiera tener implicaciones ecológicas importantes. Observaciones sobre los perfiles de oxígeno disuelto en la interfase agua-sustrato, utilizando microelectrodos mostraron incrementos importantes en su concentración para las primeras 100 μm de la columna de agua en relación con la saturación (Searcy-Bernal, ms.; Kaspar, 1992). Estos resultados se obtuvieron en presencia de una película de diatomeas en el recipiente ((Searcy-Bernal, ms.) y en rocas con algas coralinas rojas incrustantes (Kasspar, 1992). Estos niveles de oxígeno se encuentran asociados a un pH alcalino en superficies fotosintéticas. Si las variaciones de pH a microescala pudieran ser percibidas por las larvas en busca de sustrato, este podría ser un mecanismo mediante el cual se estimulara la metamorfosis. A lo anterior, se suma la evidencia reciente acerca de las diferencias en la estructura de las señales químicas que a nivel de microescala (menor al milímetro) pueden encontrarse en la interfase agua-sustrato (Moore, *et al.*, 1992).

El efecto del KCl, podría explicarse como producto de la acción del ion K^+ mediante la despolarización de la membrana de células externamente accesibles (Baloun y Morse, 1984). Lo anterior probablemente ligado a la presencia de canales iónicos de Ca^{2+} activados por potasio, como se ha sugerido para el mismo abulón, *H. rufescens* (Baloun y Morse, 1984) y el braquiópodo *Terebretalia transversa* (Freeman, 1993). Sin embargo, para ser más convincente sobre este mecanismo sería necesario demostrar por medio de mediciones

electrofisiológicas, que las células blanco no sólo despolarizan la membrana, sino generan además un potencial de acción el cual es típico de canales de voltaje dependientes de Ca^{2+} , y que el Ca^{2+} se desplaza a las células blanco durante la despolarización (Freeman, 1993).

El porcentaje de metamorfosis anormal obtenido con las concentraciones intermedias de L-DOPA y norepinefrina no aclara el papel que pueden desempeñar estos compuestos en la metamorfosis de *H. rufescens* y *A. undosa*. Queda la posibilidad de que las concentraciones utilizadas no hayan sido las adecuadas para inducir a estos organismos, además de que no se hicieron consideraciones sobre los productos de oxidación de estos compuestos en el agua de mar, y que recientemente han sido considerados por Pires y Hadfield (1991) como los causantes de la metamorfosis en el nudibranquio *Phestilla sibogae*.

De manera global, la inducción a la metamorfosis mediante los distintos inductores probados en diferentes ocasiones para el abulón rojo (*H. rufescens*) y en un experimento para el caracol *A. undosa* resultaron semejantes, a excepción de los obtenidos con KCl. En ambas especies se obtuvieron porcentajes similares con L-tiroxina, GABA y NaOH. Por lo que se considera que los mecanismos de acción pueden ser compartidos por ambas especies.

Si estas sustancias o estímulos (variación de pH) forman parte de los mecanismos en que de forma natural estas larvas se metamorfizan, todavía no ha sido probado. Teóricamente, debido a que cada una de ellas actúa a diferente nivel, podrían formar parte de un mecanismo común. Sin embargo, la evidencia resulta aún escasa para poder contestar este planteamiento.

Para poder aclarar el o los mecanismos de acción involucrados en la metamorfosis de estos organismos, será de gran utilidad abordar el problema

con las herramientas que ofrece actualmente la biología molecular (Morse, 1990), aislar y caracterizar los posibles receptores celulares a sustancias inductoras, y continuar con estudios acerca del sistema nervioso de las larvas de este grupo de organismos.

7. CONCLUSIONES

- Los porcentajes más altos de metamorfosis se obtuvieron con L-tiroxina, pH alcalino y GABA tanto en el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) como en el caracol (*Astraea undosa*).
- Los resultados con L-tiroxina y pH alcalino parecen ser la primera evidencia de la participación de estos compuestos en la metamorfosis de *H. rufescens* y *A. undosa*.
- Las concentraciones en las que se obtuvo un mayor porcentaje de metamorfosis fueron para L-tiroxina 132 y 66 nmol/ml; para NaOH, 150 nmol/ml para *H. rufescens*; y para el GABA, 100 nmol/ml en *A. undosa*.
- Tanto el abulón rojo (*H. rufescens*) como el caracol (*A. undosa*) respondieron en forma semejante a los diferentes inductores, a excepción del experimento con KCl, donde *A. undosa* tuvo una respuesta superior a la del abulón con el mismo compuesto.

8. RECOMENDACIONES

- Debido a la complejidad del proceso de la metamorfosis en invertebrados marinos, abordarlo en forma interdisciplinaria considerando aspectos bioquímicos y genéticos puede resultar de utilidad para aclarar los mecanismos involucrados en este proceso.
- Tratar de aislar receptores de membrana con métodos bioquímicos y, localizar regiones del genoma que se activen durante la metamorfosis por medio de métodos moleculares, puede aportar información valiosa en estos niveles.
- Continuar tratando de aislar inductores de fuentes naturales y abarcar una mayor diversidad de especies, puede contribuir a hacer generalizaciones más sólidas y que incluyan a un mayor número de especies.
- Continuar aclarando el papel del sistema nervioso durante esta fase del desarrollo en diversos grupos de organismos podrá ayudar a entender el papel que desempeñan las sustancias de origen neuroendócrino y que se encuentran presentes en una gran variedad de invertebrados.

9. REFERENCIAS

- Akashige, S., T. Seki, H. Kan-no y T. Nomura. 1981. Effects of γ -aminobutyric acid and certain neurotransmitters on the settlement of the larvae of *Haliotis discus hannai* Ino (Gastropoda). Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab. 43: 37-45.
- Baloun, L. y D.E. Morse. 1984. Ionic control of settlement and metamorphosis in larval *Haliotis rufescens* (gastropoda). Biol. Bull. 167: 124-138.
- Barlow, L.A. 1990. Electrophysiological and behavioral responses of larvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*) to settlement-inducing substances. Bull. Mar. Sci. 46(2): 537-554.
- Baxter, G. y D.E. Morse. 1987. G protein and diacylglycerol regulate metamorphosis of planktonic molluscan larvae. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1867-1870.
- Baxter, G.T. y D.E. Morse. 1992. Cilia from abalone larvae contain a receptor-dependent G protein transduction system similar to that in mammals. Biol. Bull. 183: 147-154.
- Bonar, D.B. y M.G. Hadfield. 1974. Metamorphosis of the marine gastropod *Phestilla sibogae* Berg (Nudibranchia: Aeolidacea). I. Light and electron microscopic analysis of larval and metamorphic stages. J. exp. mar. Biol. Ecol. 16: 227-255.
- Bonar, D.B., S.L. Coon, R.M. Weiner y R.R. Colwell. 1985. Induction of oyster metamorphosis by bacterial products and biogenic amines. Bull. Mar. Sci. 37(2): 763. (A).
- Bonar D.B., S.L. Coon, M. Walch, R.M. Weiner y W. Fitt. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. Bull. Mar. Sci. 46(2): 484-498.
- Burke, R.D. 1983a. Neural control of metamorphosis in *Dendraster excentricus*. Biol. Bull. 164: 176-188.
- Burke, R.D. 1983b. The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae: stimulus and response. Can. J. Zool. 61: 1701-1719.
- Busa, W.B. y R. Nuccitelli. 1984. Metabolic regulation via intracellular pH. Am. J. Physiol. 246 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 15): R409-R438.

- Coon, S.L., D.B. Bonar y R.M. Weiner. 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94: 211-221.
- Coon, S.L., W.K. Fitt y D.B. Bonar. 1990. Competence and delay of metamorphosis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 106: 379-387.
- Coon, S.L., M. Walch, W.K. Fitt, R.M. Weiner y D.B. Bonar. 1990. Ammonia induces settlement behavior in oyster larvae. *Biol. Bull.* 179: 297-303.
- Crisp, D.J. 1974. Factors influencing the settlement of marine invertebrate larvae. - En P.T. Grant & A.M. Mackie (eds): *Chemoreception in marine organisms*. pp. 177-256. Academic Press, New York, USA.
- Crisp, D.J. 1985. Recruitment of barnacle larvae from the plankton. *Bull. Mar. Sci.* 37(2): 478-486.
- Chapman, R.W., J.A. Hey, C.A. Rizzo y D.C. Bolser. 1993. GABA_B receptors in the lung. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 26-29.
- Chia, F.S. 1978. Perspectives: settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. - En F.S. Chia & M.E. Rice (eds): *Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae*. pp. 283-285. Elsevier, New York. USA.
- Chia, F.S. 1989. Differential larval settlement of ben thic marine invertebrates.- En J. S. Ryland & P.A. Tyler (eds): *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organisms*, pp.3-12. Olsen & Olsen publ. Dinamarca.
- Davis, M., W.D. Heyman, W. Harvey y C.A. Withstandley. 1990. A comparison of two inducers, KCl and *Laurencia* extracts and techniques for commercial scale induction of metamorphosis in the queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 larvae. *J. Shellf. Res.* 9(1): 67-73.
- Ebert, E.E. y J.L. Houk. 1984. Elements and innovations in the cultivation of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture.* 39 :375-392.
- Evans, R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.

- Fenteany, G. y D.E. Morse. 1993. Specific inhibitors of protein synthesis do not block RNA synthesis or settlement in larvae of a marine gastropod mollusk (*Haliotis rufescens*). Biol. Bull. 184: 6-14.
- Flaim, K.E., J.B. Li. y L.S. Jefferson. 1978. Effects of thyroxine on protein turnover in rat skeletal muscle. Amer. Physiol. Soc. 231-237.
- Forman, B.M. y H.H. Samuels. 1990. Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: The regulatory zipper model. Molecular Endocrinology. 1293-1301.
- Frieden, E. 1981. The dual role of thyroid hormones in vertebrate development and calorogenesis. -En L.I. Gibert & E. Frieden (eds): Metamorphosis, a problem in developmental biology. pp. 545-563. Plenum Press, New York, USA.
- Freeman, G. 1993. Metamorphosis in the brachiopod *Terebratalia*: Evidence for a role of calcium channel function and dissociation of shell formation from settlement. Biol. Bull. 184: 15-24.
- Galton, V.A. 1988. The role of thyroid hormone in amphibian development. Am. Zool. 28: 309-318.
- Garcia-Mendoza, E. 1991. Comparación a escala piloto de técnicas de producción de semilla de abulón azul *Haliotis fulgens*, Philippi 1845: Inducción al asentamiento y metamorfosis, densidad inicial de larvas y primera alimentación. Tesis profesional. Fac. de Ciencias Marinas (UABC). 103 pp.
- Gorbman, A. 1963. A reappraisal of theories of thyroid evolution. - En J.A. Moore (ed): Proceedings of the XVI International Congress of Zoology. Vol 3. pp. 35-37. Washington, D.C. USA.
- Hille, B. 1992. Ionic Channels of excitable membranes. Sinauer Ass. Inc. Publishers. Massachusetts, USA. (2nd. Edition). 607 pp.
- Hadfield, M.G. 1978. Metamorphosis in marine molluscan larvae: An analysis of stimulus and response. - En F.S. Chia & M.E. Rice (eds): Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. pp. 165-175.
- Hadfield, M.G. 1984. Settlement requirements of molluscan larvae: new data on chemical and genetic roles. Aquaculture. 39: 283-298.
- Hadfield, M.G. 1986. Settlement and recruitment of marine invertebrates: a perspective and some proposals. Bull. Mar. Sci. 39(2): 418-425.

- Hadfield, M.G. y D. Scheuer. 1985. Evidence for a soluble metamorphic inducer in *Phestilla*: ecological, chemical and biological data. *Bull. Mar. Sci.* 37(2): 556-566.
- Hadfield, M.G. y J.T. Pennington. 1990. Nature of the metamorphic signal and its internal transduction in larvae of the nudibranch *Phestilla sibogae*. *Bull. Mar. Sci.* 46(2): 455-464.
- Hahn, K.O. 1989. Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. CRC Press, Boca Raton, Flo. USA. 348 pp.
- Ino, T. 1952. Biological studies on the propagation of the japanese abalone (genus *Haliotis*). *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 5: 1-102.
- Jones, K.E., B.M. Yaffe y W. W. Chin. 1993. regulation of thyroid hormone receptor B-2 mRNA levels by retinoic acid. *Mol. Cel. Endoc.* 91: 113-118.
- Joose, J. y W.P.M. Geraerts. 1983. Chap. 8. Endocrinology. -En A.S.M. Saleuddin & K.M. Wilbur (eds): *The Mollusca. Vol. 4. Physiology, part 1.* pp. 317-405. Academic Press. New York, USA.
- Kaspar, H.F. 1992. Oxygen conditions on surfaces of coralline red algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 81: 97-100.
- Kikuchi, S. y N. Uki. 1974. Technical study on artificial spawning of abalone genus *Haliotis*. II. Effect of ultraviolet irradiated sea water to induce spawning. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* 33: 79-92.
- Laudet, V., A. Begue, C. Henry-Duthoit, A. Joubel, P. Martin, D. Stehelin y S. Saule. 1991. Genomic organization of the human thyroid hormone receptor (c-erbA-1) gene. *Nucl. Acids. Res.* 19(5):1105-1112.
- Levantine, P.L. y D.B. Bonar. 1986. Metamorphosis of *Ilyanassa obsoleta*: natural and artificial inducers. *Amer. Zool.* 26: 14A.
- Levitan, I.B. y L.K. Kaczmarek. 1991. *The neuron: cell and molecular biology.* 450 pp. Oxford Univ. Press. New York, USA.
- Leitz, T. 1993. Biochemical and cytological bases of metamorphosis in *Hydractinia echinata*. *Mar. Biol.* 116: 559-564.

- Leitz, T. y R.G. Lange. 1991. A substance released by metamorphosing larvae and young polyps of *Hydractinia echinata* induces metamorphosis in conspecific larvae. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199: 370-372.
- Lopo, A., y V.D. Vacquier. 1977. The rise and fall of intracellular pH of sea urchin eggs after fertilization. *Nature London* 269: 590-592.
- Maki, J.S. y R. Mitchell. 1985. Involvement of lectins in the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 37(2): 675-683.
- McAnally-Salas, L., H. Cavazos-Llitas y A. Salas-Garza. 1989. Efecto de la epinefrina, norepinefrina y L-Dopa en el asentamiento y metamorfosis de larvas de *Crassostrea gigas*. *Ciencias Marinas*, 15(4): 85-103.
- McGeer, P.L. y E.G. McGeer. 1993. 13. Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. En: H. Narabayashi, T. Nagatsu, N. Yanagisawa, and Y. Mizuno (eds). Raven press, Ltd., NY. 93-101.
- Miller, S.E. y M.G. Hadfield. 1986. Ontogeny of phototaxis and metamorphic competence in larvae of the nudibranch *Phestilla sibogae* Berg (Gastropoda: Ophistobranchia). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 97: 95-112.
- Moore, P.A., R.K. Zimmer-Faust, S.L. Bement, M. J. Weissburg, J. Michael Parrish y G.A. Gerhardt. 1992. Measurement of microscale patchiness in a turbulent aquatic odor plume using a semiconductor-based microprobe. *Biol. Bull.* 183: 138-142.
- Morse, D.E. 1981. Biochemical and genetic control of critical physiological processes in molluscan life cycles: Basic mechanisms, water-quality requirements and sensitivities to pollutants. University of California-Sea Grant Program Biennial Report 1979-1980; 83-87.
- Morse, D.E. 1985. Neurotransmitter-mimetic inducers of larval settlement and metamorphosis. *Bull. Mar. Sci.* 37(2): 697-706.
- Morse, D.E. 1990. Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bull. Mar. Sci.* 46(2): 465-483.
- Morse, D.E., H. Duncan, N. Hooker and A. Morse. 1977. Hydrogen peroxide induces spawning in molluscs, with activation of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Science.* 196: 298-300.

- Morse, D.E., N. Hooker, H. Duncan y Ll. Jensen. 1979. γ -aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. *Science* 204: 407-410.
- Morse, D.E., H. Duncan, N. Hooker, A. Baloun y G. Young. 1980. GABA induces behavioral and developmental metamorphosis in planktonic molluscan larvae. *Fed. Proc.* 39(14): 3237-3241.
- Morse, A.N.C., C.A. Froyd y D.E. Morse. 1984. Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 81(3): 293-298.
- Morse, A.N.C. y D.E. Morse. 1984a. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 75: 191-215.
- Nell, J.A. y J.E. Holliday. 1986. Effects of potassium and copper on the settling rate of Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) larvae. *Aquaculture*. 58: 263-267.
- Pawlik, J.R. 1989. Larvae of the sea hare *Aplysia californica* settle and metamorphose on an assortment of macroalgal species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 195-199.
- Pawlik, J.R. 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Sabellaridae), with a critical look at marine bioactive compounds on marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 46(2): 512-536.
- Pawlik, J.R. y M. G. Hadfield. 1990. A symposium on chemical factors that influence the settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: introduction and perspective. *Bull. Mar. Sci.* 46(2): 450-454.
- Pearce, C.M. y R.E. Scheibling. 1990. induction of settlement and metamorphosis in the sand dollar *Echinarachnius parma*: evidence for an adult-associated factor. *Mar. Biol.* 107: 363-369.
- Pearce, C.M. y R.E. Scheibling. 1990a. Induction of metamorphosis of larvae of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, by coralline red algae. *Biol. Bull.* 179: 304-311.
- Pechenik, J.A. y W. Heyman. 1985. The influence of elevated KCl on metamorphosis of larval *Crepidula fornicata*. *Amer. Zool.* 25: 70A.

- Pechenik, J.A. y W.D. Heyman. 1987. Using KCl to determine size at competence for larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata* (L.). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 112: 27-38.
- Pechenik, J.A. y C.C. Gee. 1993. Onset of metamorphic competence in larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.), judged by a natural and an artificial cue. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 167: 59-72.
- Pennington, J.T. y M.G. Hadfield. 1989. Larvae of a nudibranch mollusc (*Phestilla sibogae*) metamorphose when exposed to common organic solvents. Biol. Bull. 177: 350-355.
- Pillai, S.M., P.U. Verghese, P. Ravichandran y A.K. Roy. 1987. Effect of thyroxine on growth and moulting in *Penaeus monodon* Fabricus. Indian J. Anim. Sci. 57(3): 241-245.
- Pires, A. y M.G. Hadfield. 1991. Oxidative breakdown products of catecholamines and hydrogen peroxide induce partial metamorphosis in the nudibranch *Phestilla sibogae* Bergh (Gastropoda: Opisthobranchia). Biol. Bull. 180: 310-317.
- Porterfield, S.P. y C.E. Hendrich. 1993. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development--current perspectives. Endocrine Rev. 14(1): 94-106.
- Prokopchak, M.J., D.B. Spangenberg y J. Shaeffer. 1990. The effects of X irradiation on the metamorphosis and budding of *Aurelia aurita*. Radiat. Res. 124(1): 34-42 (A).
- Rumrill, S.S. y R.A. Cameron. 1983. Effects of gamma-aminobutyric acid on the settlement of larvae of the black chiton *Katharina tunicata*. Mar. Biol. 72: 243-247.
- Salas-Garza, A. y R. Searcy-Bernal. 1989. Larval and postlarval development of *Astraea undosa* (Mollusca: Gastropoda) under culture conditions. X Congreso Internacional de Malacología. Tubingen. Rep. Fed. de Alemania. Ags. 1989. (A).
- Scheltema, R.S. 1974. Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. Thalassia Jugosl. 10: 263-296.

- Searcy-Bernal, R. ms. Potential Importance of oxygen microprofiles in the ecology of cultured abalone (*Haliotis* spp.) postlarvae. 6 pp. (manuscrito sin publicar)
- Searcy-Bernal, R., A. Salas-Garza y R. Flores-Aguilar. 1988. Crecimiento de postlarvas y juveniles de abulón azul (*Haliotis fulgens*) en un laboratorio en México. *Ciencias Marinas*, 14(4): 57-72.
- Searcy-Bernal, R., A.E. Salas-Garza, R.A. Flores-Aguilar y P.R. Hinojosa-Rivera. 1992. Simultaneous comparison of methods for settlement and metamorphosis induction in the red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*. 105: 241-250.
- Seki, T. y H. Kan-no. 1981. Observations of the settlement and metamorphosis of the veliger of the Japanese abalone *Haliotis discus hannai* Ino, Haliotidae, Gastropoda. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* 42:31.
- Slattery, M. 1992. Larval settlement and juvenile survival in the red abalone (*Haliotis rufescens*): an examination of inductive cues and substrate selection. *aquaculture*. 102: 143-153.
- Spangenberg, D.B. 1967. Iodine induction of metamorphosis in *Aurelia*. *J. Exp. Zool.* 165: 441-450.
- Spangenberg, D.B. 1971. Thyroxine induced metamorphosis in *Aurelia*. *J. Exp. Zool.* 178: 183-194.
- Spangenberg, D.B. 1984. Effects of exogenous thyroxine on statolith synthesis and resorption in *Aurelia*. *Amer. Zool.* 24: 917-923.
- Steel, R. G.D. y J.H. Torrie. 1985 *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill de México SA de CV. Mex (2a. Ed.). 622 pp.
- Sulkin, S.D. 1990. Larval orientation mechanisms: the power of controlled experiments. *Ophelia* 32(1-2); 49-62.
- Toffano, G. 1983. GABA receptor function. En: R. Caputto y C. Ajmone Marsan (eds). Vol.10 :Neural transmission, learning, and memory. International Brain Research Organization Monograph Series. Raven press NY. 97-103.
- Trapido-Rosenthal H.G. y D.E. Morse. 1985. L- α , ω -Diamino acids facilitate GABA induction of larval metamorphosis in a gastropod mollusc (*Haliotis rufescens*). *J. Comp. Physiol. B.* 155: 403-414.

- Trapido-Rosenthal H.G. y D.E. Morse. 1986. Regulation of receptor-mediated settlement and metamorphosis in larvae of a gastropod mollusc (*Haliotis rufescens*). Bull. Mar. Sci. 39(2): 383-392.
- Valverde, C., C. Aramburo y A. Bayon. 1988. Neuroendocrinología y comunicación intercelular. En: J. Muñoz (comp). teorías y hechos sobre la vida. Vol II: Los sistemas vivos. Soc. Mex. C. Fisiol.-SEP (1988). 139-175.
- Veitch, F.P. y H. Hidu. 1971. Gregarious setting in the american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin: I. Properties of a partially purified "setting factor". Chesap. Sci. 12(3): 173-178.
- Wald, D. 1981. Chapter. I Metamorphosis: An overview. -En L.I. Gibert & E. Frieden (eds): Metamorphosis, a problem in developmental biology. pp. 1-39. Plenum Press, New York, USA.
- Waite, J. H. 1992. The DOPA ephemera: A recurrent motif in invertebrates. Biol. Bull. 183: 178-184.
- Wodicka, L.M. y D.E. Morse. 1991. cDNA sequences reveal mRNAs for two G signal transducing proteins from larval cilia. Biol. Bull. 180: 318-327.
- Yool, A.J., S.M. Grau, M.G. Hadfield, R.A. Jensen, D.A. Markell y D.E. Morse. 1986. Excess potassium induces larval metamorphosis in four marine invertebrate species. Biol. Bull. 170: 255-266.
- Zhang, S.J. y M.B. Jackson 1993. GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. Science. 259; 531-534.

ANEXOS

Anexo I. Resumen de las características de los experimentos.

Tabla III. Características del experimento 1 de inducción a la metamorfosis.

Fecha de realización: 2 al 3 de marzo de 1993
Especie utilizada: Abulón rojo (*Haliotis rufescens*).
Densidad de larva: entre 3 y 4 larvas/ ml (60-76 larvas/frasco)
Edad de la larva: 8 días después de la fertilización.
Tratamientos y concentraciones probadas:
- Acido gama-aminobutírico (GABA). (1 nmol / ml)
- L-Tiroxina. (33, 66 y 132 nmol / ml)
- L-Dopa (0.96, 96.3 y 963 nmol / ml)
- Norepinefrina (0.99, 99.6 y 996 nmol / ml)
- Cloruro de Potasio (KCl). (29.7, 19.8 y 9.8 nmol / ml)
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 µm)
Temperatura promedio: 16.7 °C. Máxima: 19.1 °C. Mínima: 14.3 °C
Evaluación: 21 horas después de la inducción a la metamorfosis
Número de réplicas: 3 por tratamiento.

Tabla IV. Características del experimento 2 de inducción a la metamorfosis.

Fecha de realización: 4 al 5 de marzo de 1993.
Especie utilizada: Abulón rojo (*H. rufescens*)
Densidad de larva: entre 3 y 3.6 larvas/ml (64 y 72 larvas /frasco)
Edad de la larva: 10 días a partir de la fertilización.
Tratamientos y compuestos probados:
- GABA. (1 nmol / ml)
- L-tiroxina (66 nmol / ml)
- NaOH (150 nmol/ml).
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 µm)
Temperatura promedio: 17.4 °C. Máxima: 20.9 °C. Mínima: 14.0 °C
Número de replicas: 3 para GABA y NaOH, 2 para L-tiroxina y 1 testigo.
Evaluación: 22 horas después de la inducción a la metamorfosis.

Tabla V. Características del experimento 3 de inducción a la metamorfosis.

Fecha de realización: 5 al 6 de marzo de 1993.

Especie utilizada: Abulón rojo (*H. rufescens*)

Densidad de larva: 1.1 larvas/ml (22 larvas / frasco)

Edad de la larva: 11 días a partir de la fertilización.

Tratamientos y compuestos probados:

- NaOH (150 nmol/ml).
- Agua desionizada (0.6 ml)
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 μ m)

Temperatura promedio: 17.4 °C. Máxima: 20.9 °C. Mínima: 14.0 °C

Número de replicas: 2 por tratamiento.

Evaluación: 23 horas después de la inducción a la metamorfosis.

Tabla VI. Características del experimento 4A de inducción a la metamorfosis. (este experimento se considera parte del 4B, sólo que algunos tratamientos se evaluaron antes).

Fecha de realización: 16 al 17 de marzo de 1993.

Especie utilizada: Abulón rojo (*H. rufescens*)

Densidad de larva: 2.6 larvas/ml (52 larvas /frasco)

Edad de la larva: 8 días a partir de la fertilización.

Tratamientos y compuestos probados:

- GABA (1 nmol / ml)
- L- tiroxina. (66 y 132 nmol / ml)
- Blancos de reactivo (se incluyó la cantidad de NaOH utilizada para disolver la L-tiroxina)
- NaOH (150 y 100 nmol/ml)
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 micras)

Temperatura promedio: 18.0 °C. Máxima:19.5 °C. Mínima: 16.5 °C

Número de replicas: 3 GABA, 2 tiroxina, 1 pH y 1 testigo.

Evaluación: 20 horas después de la inducción a la metamorfosis.

Tabla VII. Características del experimento 4B de inducción a la metamorfosis. (Este se considera la evaluación final del experimento 4A).

Fecha de realización: 16 al 18 de marzo de 1993.

Especie utilizada: Abulón rojo (*H. rufescens*)

Densidad de larva: 2.6 larvas/ml (52 larvas / frasco)

Edad de la larva: 8 días a partir de la fertilización.

Tratamientos y compuestos probados:

- GABA (1 nmol / ml)
- L- tiroxina. (66 y 132 nmol / ml)
- Blancos de reactivo (se incluyó la cantidad de NaOH utilizada para disolver la L-tiroxina)
- NaOH (150 y 100 nmol/ml)
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 micras)

Temperatura promedio: 17.3 °C. Máxima: 20.1 °C. Mínima: 14.6 °C

Número de réplicas: entre 2 y 3 por tratamiento.

Evaluación: 44 horas después de la inducción a la metamorfosis.

Tabla VIII. Características del experimento 5 de inducción a la metamorfosis.

Fecha de realización: 30 de marzo al 1 de abril de 1993.

Especie utilizada: Abulón rojo (*H. rufescens*)

Densidad de larva: 4.2 larvas/ml (84 larvas /frasco)

Edad de la larva: 7 días a partir de la fertilización.

Tratamientos y compuestos probados:

- L- Tiroxina. (66 y 132 nmol / ml)
- Blancos de reactivo (se incluyó la cantidad de NaOH utilizada para disolver la L-tiroxina)
- NaOH (150 y 100 nmol/ml)
- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 µm)

Temperatura promedio: 17.2°C. Máxima: 19.6 °C. Mínima: 14.9°C

Número de réplicas: 3 por tratamiento.

Evaluación: 42 horas después de la inducción a la metamorfosis.

Tabla IX. Características del experimento 6 de inducción a la metamorfosis.

Fecha de realización: 30 de marzo al 1 de abril de 1993.

Especie utilizada: Caracol (*Astraea undosa*)

Densidad de larva: 3.2 larvas/ml (64 larvas / frasco)

Edad de la larva: 4 días a partir de la fertilización.

Tratamientos y compuestos probados:

-GABA (1 y 100 nmol / ml)

- L- Tiroxina. (66 y 132 nmol / ml)

- Blancos de reactivo (se incluyó la cantidad de NaOH utilizada para disolver la L-tiroxina)

-Cloruro de Potasio (KCl). (29.7, 19.8 y 9.8 nmol / ml)

-NaOH (150 y 100 nmol/ml)

- Testigo (agua de mar filtrada a 0.45 μ m)

Temperatura promedio: 18.8°C. Máxima: 22.4 °C. Mínima: 15.3 °C

Número de replicas: 3 por tratamiento.

Anexo II. Resumen de las tablas de ANOVA para los seis experimentos realizados.

Tabla X. ANOVA y contrastes realizados para el primer experimento con abulón rojo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	12	38,580.5	3,215.04	220.96**
ENTRE GRUPOS	5	11,540.64	2,308.12	158.63**
CONTRASTES:				
Cont. 1 testigo = L-tiroxina + GABA	1	6,369.79	6,379.79	437.78**
Cont. 2 GABA = L-tiroxina	1	35.92	35.92	2.46(NS)
Cont. 3 L-tiroxina = KCl	1	2,033.97	2,033.97	139.79**
DENTRO DE GRUPOS				
Grupo 1: L-tiroxina	1	3,795.12	3,795.12	260.83**
Grupo 3: Norepinefrina	2	5,356.92	2,678.46	184.08**
Grupo 4: L-Dopa	2	17,852.34	8,926.17	613.48**
Grupo 5: KCl	2	35.48	17.74	1.21(NS)
ERROR	26	378.35	14.55	
TOTAL	38	38,958.85		

Tabla XI. ANOVA y contrastes realizados para el segundo experimento con abulón rojo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	3	10,954.81	3,651.6	165.75**
CONTRASTES:				
Cont. 1 testigo = L-tiroxina + GABA + NaOH	1	5,397.76	5,397.76	245.01**
Cont. 2 L-tiroxina = GABA + NaOH	1	1,412.81	1,412.81	64.13**
Cont. 3 GABA = NaOH	1	1,382.2	1,382.2	62.74**
ERROR	6	132.19	22.03	
TOTAL	9	11,087.38		

Tabla XII. ANOVA y contrastes realizados para el tercer experimento con abulón rojo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	2	8,517.39	4,258.69	1313.19**
CONTRASTES:				
Cont. 1 testigo = NaOH + desionizada	1	27,296.24	27,296.24	8416.97**
Cont. 2 NaOH = desionizada	1	27,363.02	27,363.02	8437.56**
ERROR	3	9.73	3.24	
TOTAL	5	8,527.12		

Tabla XIII. ANOVA y contrastes realizados para el cuarto experimento (parte B) con abulón rojo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	3	16,722.59	5,574.19	77.64**
ENTRE GRUPOS	5	15,052.31	3,010.46	41.93**
CONTRASTES:				
Cont. 1 L-tiroxina + NaOH= Blco. de react + testigo	1	9,935.46	9,935.46	138.39**
Cont. 2 tiroxina= NaOH	1	1,609.09	1,609.09	22.41**
Cont. 3 Blco. de react. = testigo	1	1,464.48	1,464.48	20.39**
DENTRO DE GRUPOS				
Grupo 2: Blancos de reactivo	1	46.19	46.19	0.63(NS)
Grupo 3: NaOH	1	1,624.09	1,624.09	22.62**
ERROR	11	789.71	71.79	
TOTAL	14	17,512.3		

Tabla XIV. ANOVA y contrastes realizados para el quinto experimento con abulón rojo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	6	30,231.32	5,038.55	177.03**
ENTRE GRUPOS	3	22,358.78	7,452.92	261.87**
CONTRASTES:				
Cont. 1 L-tiroxina + NaOH = Blco. de react. + testigo	1	17,087	17,087	600.38**
Cont. 2 L-tiroxina = NaOH	1	13,648.69	13,648.69	479.57**
Cont. 3 Blco. de react. = testigo	1	271.29	271.29	9.53**
DENTRO DE GRUPOS				
Grupo 1: L-tiroxina	1	1.08	1.08	0.038(NS)
Grupo 3: Blancos de reactivo	1	0.14	0.14	0.004(NS)
Grupo 4: NaOH	1	7,871.33	7,871.33	276.57**
ERROR	14	398.57	28.46	
TOTAL	20	30,629.89		

Tabla XV. ANOVA y contrastes realizados para el sexto experimento realizado con el caracol *Astraea undosa*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
TRATAMIENTOS	11	30,832.61	2,802.96	27.92**
ENTRE GRUPOS	5	26,627.44	5,325.48	53.25**
CONTRASTES:				
Cont. 1 GABA + L-tiroxina + NaOH + KCl = testigo	1	9,511.9	9,511.9	94.77**
Cont. 2 GABA + L-tiroxina + NaOH = KCl	1	2,920.49	2920,49	29.10**
Cont. 3 GABA + L-tiroxina = NaOH	1	10,438.69	10,438.69	104.01**
Cont. 4 GABA = L-tiroxina	1	12,219	12,219	121.75**
Cont. 5 L-tiroxina = Blco. de react.	1	25,809.52	25,809.52	257.16**
DENTRO DE GRUPOS				
Grupo 1: GABA	1	2,528.88	2,528.88	25.19**
Grupo 2: L-tiroxina	1	2.2	2.2	0.021(NS)
Grupo 3: Blanco de reactivo	1	147.01	147.01	1.46(NS)
Cont. 4 : KCl	2	1,481.71	740.85	7.38**
Grupo 5: NaOH	1	48.38	48.38	0.48(NS)
ERROR	24	2,408.64	100.36	
TOTAL	35	33,241.25		