

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



Efecto de la tiroxina como inductor a la metamorfosis del erizo de mar y el patrón de expresión del receptor nuclear COUP-TF en *Lytechinus pictus*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:
MÓNICA CECILIA CASTELLANOS KOTKOFF

ENSENADA, B.C.

NOVIEMBRE 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA TIROXINA COMO INDUCTOR A LA METAMORFOSIS DEL
ERIZO DE MAR Y EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR
COUP-TF EN *Lytechinus pictus*

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA:

MÓNICA CECILIA CASTELLANOS KOTKOFF

APROBADO POR:


DR. EUGENIO DE JESÚS CARPIZO ITUARTE
PRESIDENTE


DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
SECRETARIO


DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS
PRIMERA VOCAL

La genética transcribe como vas a ser,
tú eres el que traduce quien quieres ser.

Para mis padres Alejandro y Maña

AGRADECIMIENTOS

Gracias papá y gracias mamá por haberme apoyado a lo largo de mi carrera profesional, por heredarme su perseverancia, en ocasiones necesidad, por lograr mis sueños. Ustedes son mi ejemplo a seguir, los quiero y admiro muchísimo, espero que estén orgullosos por mis logros que en gran parte son de ustedes.

Agradezco de corazón al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, por su apoyo durante la realización de mi tesis, por las discusiones y desacuerdos que han forjado éste trabajo, gracias por todo.

Al Dr. Faustino Camarena le doy gracias por haberme introducido en el fascinante mundo de la Biología Molecular.

Gracias a la Dra. Meredith Gould por sus aportes a éste trabajo y lo invaluable de sus enseñanzas.

Agradezco al Dr. Jorge de la Rosa Velez por su apoyo incondicional en éste trabajo, por sus aportes y su amistad.

Gracias al Dr. Luis Enriquez, una persona a la que admiro muchísimo y considero clave para éste trabajo, gracias por tu paciencia en las innumerables consultas hechas.

Agradezco a la Dra. Yolanda Schramm por su ayuda en la realización de las alineaciones.

Muchas gracias a M.C. Griselda Parés por su ayuda oportuna, al M.C. Gerardo Amador (gracias por tus fotos) y a la M.C. Raquel Pedrín que hicieron mi paso por el laboratorio divertido.

A Eduardo por compartir este momento conmigo y haber estado a mi lado a lo largo de este trabajo. Gracias por tu apoyo, por tu amistad y por tu amor. Te admiro y te quiero.

A mis amigas, Cris, Dania y Dirce, gracias por ser mis amigas, las quiero mucho, ustedes me han ayudado y apoyado muchísimo.

A mis amigos y compañeros de la carrera (no los menciono individualmente pero ustedes saben lo importante que son para mí) por los momentos que siempre quedarán en mis recuerdos, por las carcajadas, desveladas y enojos que han hecho mi carrera inolvidable, los quiero.

Gracias a todos aquellos maestros que aportaron parte de sus conocimientos para mi enriquecimiento profesional.

Y por último y no por eso menos importante, agradezco a Dios, él me ha colmado de bendiciones y me permitió concluir ésta etapa. Veremos que tiene deparado el futuro para mí.

RESUMEN

Resumen de la tesis de **Mónica Cecilia Castellanos Kotkoff** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en **Biología**. Ensenada, Baja California, México. Noviembre del 2004.

Título: Efecto de la tiroxina como inductora a la metamorfosis del erizo de mar y el patrón de expresión del receptor nuclear COUP-TF en *Lytechinus pictus*.

Resumen aprobado por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

La tiroxina es una hormona esteroide/tiroidea propia de vertebrados que actúa en el desarrollo y activa procesos como la metamorfosis de anfibios. En invertebrados, especialmente marinos, se ha reportado que la tiroxina posee un efecto inductor en la metamorfosis de ascidias, cnidarios y gasterópodos. El presente trabajo aporta evidencias del efecto de la tiroxina como inductor a la metamorfosis del erizo de mar, complementando los reportes del efecto de ésta hormona sobre el desarrollo larval de equinodermos. En Experimentos de exposición continua a la hormona se encontró un mayor efecto en las concentraciones 10^{-4} M y 10^{-6} M en tres especies de erizo de mar, *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* y *Lytechinus pictus*. La segunda aproximación al posible papel de hormonas esteroides/tiroideas en el erizo de mar se documentó a nivel molecular. Lo anterior con base en un reporte previo de un receptor nuclear huérfano de la familia de los esteroides/tiroideos, en el genoma del erizo de mar *S. purpuratus*, denominado spCOUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor in *S. purpuratus*). En este trabajo presentamos un fragmento aislado y secuenciado del homólogo COUP-TF en *L. pictus*, que presentó una similitud del 98% con respecto al encontrado en *S. purpuratus*. En la secuencia aislada para *L. pictus* se localizaron mutaciones puntuales y dos posibles sitios polimórficos de un solo nucleótido. El patrón de expresión del COUP-TF en estadios larvales tardíos de *L. pictus* se muestra localizado en la región del estómago y esófago. Los resultados obtenidos permiten hipotetizar sobre una posible función de este receptor en el desarrollo del sistema nervioso en estadios larvales avanzados del erizo de mar. La evidencia conjunta del presente trabajo sugiere la posibilidad de que moléculas similares a hormonas del grupo de las esteroide/tiroideas, pudieran participar en la regulación interna del desarrollo larvario tardío del erizo de mar.

ABSTRACT

Thyroxine is a vertebrate steroid/thyroid hormone that has an important role in vertebrate development and is known to regulate processes like amphibian metamorphosis. In invertebrates, especially marine invertebrates, thyroxine has been reported to have an inductive effect in metamorphosis of ascidians, cnidarians and mollusks. This study shows evidence of the effect that thyroxine has in larval development of the sea urchin, adding information to previous reports on the role this hormone has in larval development of echinoderms. In experiments where competent larvae were continually exposed to thyroxine, a mayor effect was found in two concentrations of thyroxine, 10^{-4} M and 10^{-6} M, for the three species of sea urchins tested, *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* and *Lytechinus pictus*. The second approach of this study on the prescence of steroid/thyroid hormones in the sea urchin was at the molecular level based on a previous report of an homolog of a nuclear orphan receptor of the steroid/thyroid superfamily named COUP-TF. The COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) was found in the sea urchin genome of *Strongylocentrotus purpuratus*. This study presents an isolated fragment of the COUP-TF homolg in *L. pictus*, that presents a 98% similarity with the one found in *S. purpuratus*. The COUP-TF sequence for *L. pictus* has punctual mutations and two possible single nucleotide polymorphic sites. The expression pattern of the COUP-TF in later larval stages was located in the stomach and esophagus region. These results allow to hypothesize that this orphan receptor may have a role in the juvenile nervous system development. Together these evidence suggests the possibility that steroid/thyroid hormone-like elements could participate in the internal regulation of the later larval development of the sea urchin.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TRABAJO.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I “Tiroxina como hormona inductora a la metamorfosis en el erizo de mar”	
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Embriología y metamorfosis del erizo de mar.....	8
2.2 Hormonas tiroideas y su acción en la metamorfosis.....	11
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1 Obtención de la larva y criterios de utilización.....	16
3.2 Experimentos de inducción a la metamorfosis.....	17
3.3 Evaluación de los experimentos.....	19
3.4 Procesamiento estadístico.....	20
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES.....	34
7. RECOMENDACIONES.....	35
CAPÍTULO II “Patrón de expresión del receptor nuclear spCOUP-TF en los últimos estadios larvales del erizo de mar <i>Lytechinus pictus</i>”	
1. INTRODUCCIÓN.....	36
2. ANTECEDENTES.....	39
2.1 Receptores nucleares de la familia de hormonas esteroides/tiroideas...	39
2.2 Receptores huérfanos.....	40
2.3 Fisiología del COUP-TF y sus homólogos.....	41
2.4 Localización del spCOUP-TF y su patrón de expresión durante el desarrollo del erizo de mar.....	43
3. METODOLOGÍA.....	45
3.1 Extracción de DNA.....	45
3.2 Elaboración de los cebadores.....	45
3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	47
3.4 Secuenciación del producto amplificado.....	48

3.5 Preparación de la sonda de DNA.....	49
3.6 Pretratamiento y fijación de la larva de erizo de mar.....	50
3.7 Hibridaciones <i>in-situ</i> "whole-mount".....	51
4. RESULTADOS.....	55
4.1 Extracción de DNA.....	55
4.2 Cebadores.....	56
4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	56
4.4 Secuenciación.....	57
4.5 Producción de sonda marcada	62
4.6 Hibridaciones <i>in-situ</i> "whole-mount".....	63
5. DISCUSIÓN.....	70
5.1 Extracción de DNA y amplificación del fragmento de COUP-TF en <i>Lytechinus pictus</i>	70
5.2 Secuenciación.....	70
5.3 Expresión del receptor COUP-TF.....	72
6. CONCLUSIONES.....	76
7. RECOMENDACIONES.....	77
CONCLUSIÓN FINAL	78
REFERENCIAS.....	79
ANEXOS.....	85
Anexo I. Experimentos de inducción a la metamorfosis con L-tiroxina....	85
Anexo II. Resumen de ANOVAS.....	88
Anexo III. Soluciones	94

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Morfología típica del desarrollo larval del erizo de mar.....	8
Figura 1.2. Síntesis de la tiroxina a partir del aminoácido tirosina.....	11
Figura 1.3. Representación esquemática de la metodología utilizada en los experimentos de inducción a la metamorfosis con L-tiroxina.....	18
Figura 1.4. Experimento de inducción a la metamorfosis con tiroxina en la larva competente de <i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	22
Figura 1.5. Primer experimento de inducción a la metamorfosis con tiroxina en la larva competente de <i>Lytechinus pictus</i> , evaluado a las 24 horas.....	23
Figura 1.6. Experimento realizado en larva competente de <i>S. purpuratus</i> , evaluado a las 24 horas de exposición a las distintas concentraciones de tiroxina.....	24
Figura 1.7. Porcentaje de metamorfosis y mortalidad en larva competente de <i>L. pictus</i> , evaluado a las 24 horas (A) y a las 48 horas (B).....	26
Figura 1.8. Experimento de inducción a la metamorfosis con tiroxina en larva competente de <i>L. pictus</i> , evaluado a las 48 horas.....	28

CAPÍTULO II

Figura 2.1. Organización estructural del receptor de hormonas esteroideas/tiroideas.....	40
Figura 2.2. Representación esquemática de la metodología utilizada en la preparación de la sonda marcada con digoxigenina.....	50
Figura 2.3. Representación esquemática de la metodología utilizada en las hibridaciones <i>in-situ</i> "whole-mount".....	54
Figura 2.4. Electroforesis de la extracción de DNA para <i>S. purpuratus</i> y <i>L. pictus</i>	55
Figura 2.5. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR.....	57
Figura 2.6. Alineación realizada en el BLAST del genbank.....	58
Figura 2.7. Alineación de la secuencia obtenida con el exón 2 del spCOUP-TF en <i>S. purpuratus</i>	60
Figura 2.8. Cromatogramas de las posiciones 278 (A) y 417 (B) de la secuencia obtenida en <i>L. pictus</i>	61
Figura 2.9. Electroforesis de la sonda marcada producida para <i>L. pictus</i>	62
Figura 2.10. Comparación entre la morfología de una larva de <i>L. pictus</i> y una larva de <i>S. purpuratus</i>	63
Figura 2.11. Comparación entre la morfología de una larva de <i>L. pictus</i> deshidratada y rehidratada.....	64

Figura 2.12. Localización del COUP-TF en larva de seis brazos de <i>L. pictus</i> incubada en proteinasa K.....	65
Figura 2.13. Patrón de expresión del COUP-TF en larva de seis brazos de <i>L. pictus</i> que no fueron incubadas en proteinasa K.....	67
Figura 2.14. Control negativo de larvas de seis brazos de <i>L. pictus</i> que no fueron incubadas en proteinasa K.....	68
Figura 2.15. Patrón de expresión del COUP-TF en larva de ocho brazos de <i>L. pictus</i>	68
Figura 2.16. Localización del spCOUP-TF en larva de seis brazos de <i>S. purpuratus</i>	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Concentraciones utilizadas en la reacción en cadena de la polimerasa.....	47
Tabla II. Características de los experimentos de inducción con tiroxina para las especies <i>L. pictus</i> y <i>S. purpuratus</i>	85
Tabla III. Características del experimento de inducción con tiroxina para la especie <i>S. franciscanus</i>	86
Tabla IV. Características de los controles utilizados en los experimentos de inducción a la metamorfosis para las tres especies de erizo de mar.....	87
Tabla V. Análisis de Varianza de una sola vía para el experimento evaluado a las 24 horas con larva competente de <i>S. franciscanus</i>	88
Tabla VI. Prueba Duncan para el experimento evaluado a las 24 horas con larva competente de <i>S. franciscanus</i>	88
Tabla VII. Análisis de Varianza para el primer experimento realizado con larva competente de <i>L. pictus</i> y evaluado a las 24 horas.....	89
Tabla VIII. Prueba Duncan para el primer experimento realizado con larva competente de <i>L. pictus</i> , evaluado a las 24 horas.....	89
Tabla IX. Análisis de Varianza para el experimento realizado con larva competente de <i>S. purpuratus</i> , evaluado a las 24 horas.....	90
Tabla X. Prueba Duncan para el experimento realizado con larva competente de <i>S. purpuratus</i> , evaluado a las 24 horas.....	90
Tabla XI. Análisis de Varianza para el segundo experimento de <i>L. pictus</i> evaluado a las 24 horas.....	91
Tabla XII. Prueba Duncan para el segundo experimento de <i>L. pictus</i> evaluado a las 24 horas.....	91
Tabla XIII. Análisis de Varianza para el segundo experimento de <i>L. pictus</i> evaluado a las 48 horas.....	92
Tabla XIV. Prueba Duncan para el segundo experimento de <i>L. pictus</i> evaluado a las 48 horas.....	92
Tabla XV. Análisis de Varianza para el tercer experimento con <i>L. pictus</i> cuya evaluación se realizó a las 48 horas.....	93
Tabla XVI. Prueba Duncan para el tercer experimento con <i>L. pictus</i> cuya evaluación se realizó a las 48 horas.....	93

INTRODUCCIÓN

El desarrollo embrionario es un proceso de cambios progresivos durante los cuales un organismo toma formas sucesivas que caracterizan su ciclo de vida (Purves et al., 1998). Desde la fecundación hasta la organogénesis los procesos son regulados por cambios en la expresión de ciertos genes y por señales provenientes de células adyacentes, dando como resultado un embrión que crece y da lugar al organismo adulto (Gilbert, 1994).

Existen algunos organismos en donde el desarrollo embrionario da lugar a una forma larval cuya morfología y fisiología difieren de manera significativa del organismo adulto. Esta larva mediante un proceso denominado “metamorfosis”, se transforma en juvenil para lo cual requiere una extensa reprogramación morfogenética. La metamorfosis forma parte del ciclo de vida de organismos vertebrados, como los anfibios, y en la gran mayoría de los invertebrados terrestres, como los insectos, así como en una gran diversidad de invertebrados marinos (Gilbert, 1994).

Un invertebrado marino que se ha tomado como modelo de estudio en la embriología y cuyo ciclo de vida presenta un estadio larval que culmina con la metamorfosis para alcanzar su estadio juvenil, es el erizo de mar. Se tomó como modelo de estudio porque posee un huevo y una larva transparentes, lo cual, en conjunto con su disponibilidad y facilidad de cultivo en el laboratorio, han posibilitado las observaciones de los procesos por los cuales lleva a cabo su desarrollo. Sin embargo, el erizo de mar aún presenta muchas incógnitas en los mecanismos de regulación de su embriogénesis, así como en los procesos que regulan el desarrollo larval y la metamorfosis.

La presente tesis, considera dos aspectos de la embriología del erizo de mar, uno a nivel morfo-fisiológico y el segundo en el plano molecular. La mayoría de los trabajos que se han realizado sobre este organismo se enfocan en los procesos que ocurren en los estadios tempranos de desarrollo y en las primeras fases larvarias. Esto seguramente debido a la facilidad de obtener embriones, sin embargo, estudios como el presente abordan periodos de desarrollo posteriores a la larva pluteus, con lo cual se genera información relevante para estadios finales del desarrollo larvario. En estos estadios tardíos ocurren procesos como la formación del rudimento, la competencia y la metamorfosis, que son importantes en el desarrollo del erizo de mar.

Para la facilidad del lector, este trabajo se encuentra dividido en dos capítulos, cada uno aborda uno de los niveles de estudio del desarrollo del erizo de mar y su importancia.

En la primera parte se analiza la capacidad de la hormona tiroxina para inducir larvas de tres especies de erizos, *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus* y *Lytechinus pictus* a la metamorfosis, con base en la capacidad reguladora y morfogenética de dicha hormona en vertebrados, así como en estudios de su acción durante el desarrollo del rudimento juvenil en el erizo de mar.

En la segunda parte se documenta a nivel molecular la presencia y el patrón de expresión de un receptor nuclear huérfano perteneciente a la superfamilia esteroide/tiroidea denominado COUP-TF (factor de transcripción del promotor del gen de la ovalbúmina de gallina), en los estadios larvales tardíos del erizo *Lytechinus pictus*.

HIPÓTESIS GENERAL.- Las hormonas esteroides/tiroideas en vertebrados poseen una acción reguladora y morfogenética durante el desarrollo, sin embargo, se han observado dentro de algunos grupos de invertebrados que dichas hormonas pudieran ejercer efectos similares. Se desconoce la presencia o producción de las mismas en invertebrados, pero sí se han descubierto a nivel molecular receptores de hormonas esteroides/tiroideas que posiblemente no respondan a los mismos estímulos más sí posean funciones conservadas durante la evolución.

HIPÓTESIS UNO

Si se aplica tiroxina de manera exógena a larvas competentes de erizo, los porcentajes de metamorfosis se encontrarán relacionados de manera dosis dependiente.

HIPÓTESIS DOS

El patrón de expresión del COUP-TF en las etapas iniciales del desarrollo larval se concentra en la zona neurógena de la banda ciliada de manera que al avanzar los estadios y acercarse a la competencia es posible que presente una variación de éste patrón para localizarse en la zona de formación del rudimento juvenil por las implicaciones que pueda poseer en el origen del sistema nervioso adulto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de la L-tiroxina como inductora de la metamorfosis de larvas competentes de las especies de erizos *Stronglocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus* y *Lytechinus pictus*.
- Diseñar cebadores que delimiten la región más conservada del receptor nuclear COUP-TF para poder amplificar dicha región por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Detectar el patrón de expresión del COUP-TF por medio de la técnica de hibridación *in-situ* “whole mount” en larvas de los estadios de 6 y 8 brazos de *L. pictus*.

CAPÍTULO I

TIROXINA COMO HORMONA INDUCTORA DE LA METAMORFOSIS EN EL ERIZO DE MAR.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un organismo inicia desde la fecundación del huevo por el esperma y culmina con la organogénesis, pasando por la segmentación, gastrulación y en vertebrados, por la neurulación. Algunos organismos invertebrados poseen un desarrollo embrionario que presenta una fase larval que culmina en un proceso denominado metamorfosis, el cual es la transformación de la larva en juvenil.

Dentro del desarrollo embrionario tanto de vertebrados como de invertebrados, las hormonas poseen un papel primordial. Regulan procesos como el metabolismo, la formación del sistema nervioso y la diferenciación sexual, sin embargo, uno de los procesos más interesantes que es regulado por hormonas es la metamorfosis.

La metamorfosis se define como el proceso por el cual un organismo larval es transformado en un juvenil. Ocurre en aquellos animales cuyos ciclos de vida son indirectos, es decir, la larva posee características tanto morfológicas como fisiológicas, distintas al adulto (Gilbert, 1994).

Dentro de los vertebrados, los anfibios son el grupo cuyo proceso metamórfico se encuentra ampliamente documentado. Todos los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren para pasar de una forma de vida acuática y herbívora a una terrestre y carnívora se llevan a cabo por la tiroides, mediante la secreción de las hormonas tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3) (Gilbert, 1994).

Dentro de los cordados, se ha descrito la presencia de hormonas tiroideas y sus precursores en tunicados adultos, así como sitios de unión nuclear para T_3 . Se sugiere también la participación de hormonas tiroideas en la metamorfosis de las larvas de ascidias (Patricolo et al., 2001).

Aún cuando la metamorfosis se presenta en algunos vertebrados, éste proceso define los ciclos de vida de un gran número de invertebrados. En algunos invertebrados se ha observado que el proceso de metamorfosis se encuentra regulado por hormonas de la familia esteroides/tiroideas; un ejemplo se presenta en los insectos ya que la 20-hydroxyecdysone regula su metamorfosis (Gilbert, 1994). Sin embargo, en los invertebrados marinos los mecanismos de regulación de la metamorfosis se desconocen. Esto incluye la amplia gama de invertebrados marinos que poseen un ciclo de vida larval que culmina en un estadio de competencia que reconoce claves ambientales que inducen a su asentamiento y metamorfosis (Morse, 1990).

Las claves ambientales han sido el objeto de estudio de varios autores, algunos de los cuales han llegado a sugerir una regulación hormonal, por miembros de la familia de hormonas esteroides/tiroideas, en la metamorfosis. Lo anterior basado en las observaciones en cordados primitivos e insectos. Sin embargo, es muy improbable que el inductor natural sea en efecto alguna hormona esteroide/tiroidea.

Algunas especies que han presentado un efecto de inducción a la metamorfosis por la aplicación exógena de tiroxina a larvas competentes son el cnidario *Aurelia* (Spangenberg, 1971; 1984), el abulón del género *Haliotis* (Carpizo et al., 1993; Fukazawa et al., 2001), el gasterópodo *Astraea undosa* (Carpizo et al., 1993) y la galleta de mar *Peronella japonica* (Saito et al., 1998), éste último perteneciente al filum de los equinodermos.

Dentro del grupo de los equinodermos, se han realizado diversos estudios con aplicaciones exógenas de tiroxina durante el desarrollo larval. Se ha descrito una aceleración en el desarrollo de la larva de la estrella de mar *Acanthaster planci* que es influenciada por las concentraciones de tiroxina (Johnson et al., 1996).

La formación del rudimento adulto en los erizos de mar es acelerado cuando se cultiva la larva en un medio que contiene tiroxina (Chino et al., 1994); así también la tiroxina posee el efecto de retardar el desarrollo embrionario del erizo cuando éstos son expuestos a concentraciones de tiroxina en sus primeros estadios, sin embargo, la misma tiroxina acelera el desarrollo en los últimos estadios previos a la metamorfosis del erizo de mar (Johnson, 1998).

No se ha evaluado si la tiroxina interviene como inductor a la metamorfosis de las larvas competentes del erizo de mar, de ser así, su efecto podría agregar elementos para entender la regulación interna en equinodermos.

2. ANTECEDENTES

2.1 EMBRIOLOGÍA Y METAMORFOSIS DEL ERIZO DE MAR

Los erizos son organismos dioicos que se reproducen por fecundación externa al liberar sus gametos al medio. Un óvulo que ha sido fertilizado inicia su desarrollo hasta una larva planctónica llamada equinopluteus. Esta larva desarrolla cambios graduales en su morfología hasta llegar a un estadio de competencia, en el cual los estímulos adecuados desencadenan la metamorfosis (Chino et al., 1994).

Chino et al. (1994) denominan por medio de una serie de letras a cada estadio representativo del desarrollo larval del erizo, ésta clasificación será utilizada a lo largo del presente trabajo (fig. 1.1).

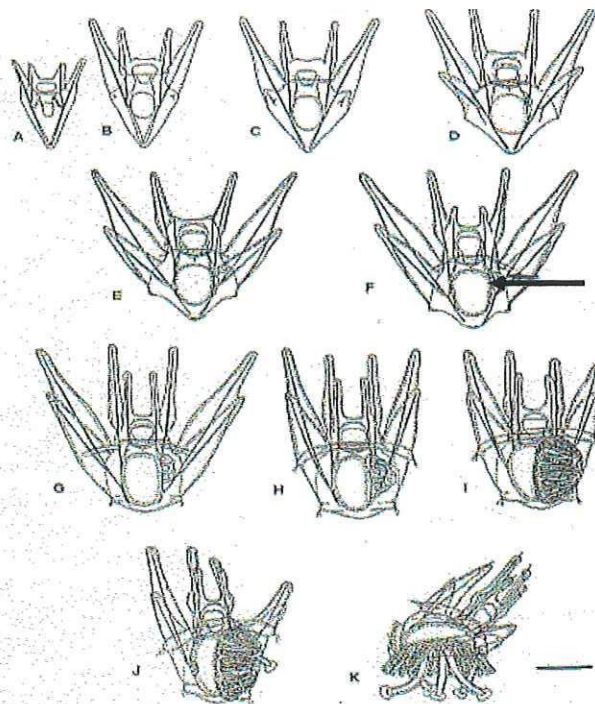


Figura 1.1. Morfología que presenta el erizo de mar durante su desarrollo desde el estadio pluteus de cuatro brazos hasta la metamorfosis, así como el desarrollo del rudimento juvenil. La formación del rudimento juvenil inicia al fin del estadio de seis brazos o al inicio del estadio de ocho brazos (F, flecha). Cuando la larva presenta un rudimento completamente desarrollado se le designa como competente (J) y se encuentran listas para la metamorfosis (K). La barra mide 200 µm. Tomado de Chino et al., 1994.

Los estadios larvales van desde una forma de cuatro brazos (A) hasta una larva de ocho brazos que presenta el rudimento juvenil (G). El vestíbulo que se une al hidrocéloma y forma lo que será la testa del organismo adulto, esto es a lo que se denomina el rudimento juvenil (Chino et al., 1994).

En este momento se dice que la larva se encuentra en estadio competente (J), y generalmente ya presenta algunas de las estructuras adultas dentro del epitelio larval. Sin embargo, una larva competente al encontrarse en ausencia de la señal inductora requerida, puede demorar el proceso de metamorfosis y permanecer como larva por un tiempo prolongado (Bishop et al., 2001).

El proceso de metamorfosis se lleva a cabo una vez que encuentra y reconoce señales ambientales que se asocian a un hábitat propicio para que se establezca como juvenil. El tipo de sustrato, ya sean algas específicas, películas bacterianas, o algún metabolito de organismos adultos de la especie son los que determinan la distribución final del recluta (Yazaki, 2000). La inducción a la metamorfosis requiere de una respuesta neurosensorial inicial por parte de la larva (Bishop et al., 2001).

Estudios sobre este proceso en los erizos han pretendido determinar cual es el compuesto inductor que actúa de manera natural. Rowley (1989) propone que aún cuando se desconoce cual es el elemento que activa la metamorfosis, cuando la larva competente de *Strongylocentrotus* spp. se coloca en un medio con un extracto de algas coralinas, en este medio los porcentajes de metamorfosis fueron ligeramente mayores a los controles, sin embargo, el autor señala la posibilidad de que películas bacterianas puedan estar involucradas en la inducción al asentamiento.

Por su parte Carpizo-Ituarte et al. (2002) demostraron que al igual que muchas especies de larvas de invertebrados marinos, los erizos de mar pueden ser inducidos a la metamorfosis de manera artificial con cloruro de potasio (KCl).

Por otro lado como se mencionó anteriormente, la tiroxina ha probado acelerar el desarrollo larval e inducir el asentamiento de la larva del erizo de mar (Chino et al., 1994; Johnson, 1998), sin embargo, su acción como inductor a la metamorfosis no se ha probado.

En el erizo de mar, la metamorfosis se inicia por el colapso del epitelio larval, cuando ésta ha sido expuesta a un compuesto inductor. El colapso del epitelio larval se caracteriza por un doblamiento de los brazos larvales en posición aboral al rudimento juvenil y simultáneamente, los pies ambulacrales y las espinas se extienden (Cameron et al., 1978).

El epitelio larval se vuelve irregular y en la zona más alejada de la superficie apical aparecen vesículas de gran tamaño que probablemente sean lisosomas. En esta etapa aparece una superficie de microvellosidades que cubren el rudimento y se extienden aboralmente. Estos son los eventos más sobresalientes de la metamorfosis y ocurren durante las primeras horas posteriores a la inducción, sin embargo, el proceso continúa por más de cinco días, durante los cuales se completa la formación de la testa y los órganos internos del juvenil, hasta la apertura de la mandíbula (Cameron et al., 1978).

2.2 HORMONAS TIROIDEAS Y SU ACCIÓN EN LA METAMORFOSIS

La hormona tiroxina se produce por la adición de yodo al aminoácido tirosina (fig. 1.2). En vertebrados, ésta unión ocurre dentro de la tiroglobulina, una glicoproteína sintetizada y secretada por el aparato de Golgi en los folículos de la glándula tiroides. La iodinasa se encarga de unir los yodos a la tirosina encontrada en la tiroglobulina y dar lugar tanto a la triiodotironina (T_3) como a la tiroxina (T_4), las cuales son formas activas de las hormonas tiroideas. La tiroxina se encuentra en un porcentaje mayor al ser liberada a la sangre, sin embargo ésta pierde un yodo para volverse T_3 , la cual actúa directamente en los tejidos y se une a los receptores nucleares para incrementar la transcripción de ciertos genes (Guyton et al., 2000).

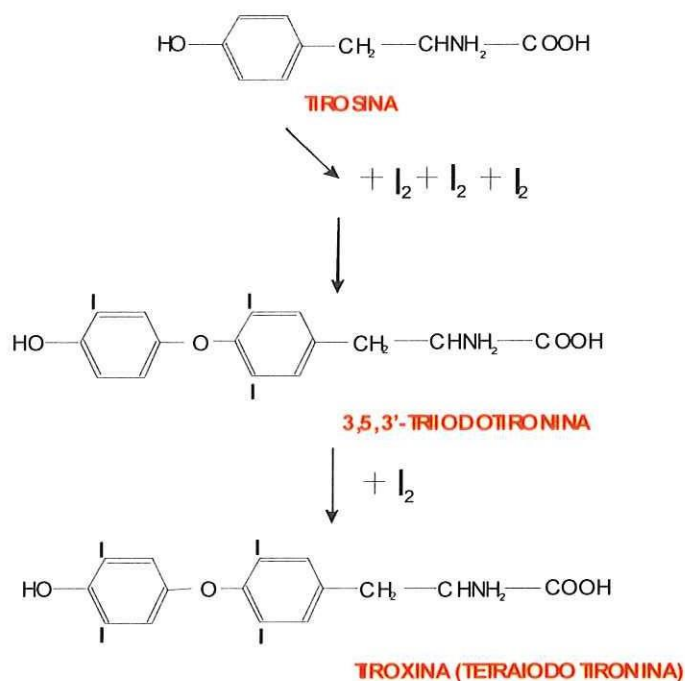


Figura 1.2- Síntesis de la tiroxina a partir del aminoácido tirosina por medio de la adición de yodo. (Tomado de Guyton et al., 2000)

Durante la metamorfosis de los anfibios, la tiroxina provoca cambios tejido-específicos, es decir, cada tejido responde de manera diferencial al efecto de la tiroxina. Asimismo, en el nivel molecular, los receptores nucleares de hormonas tiroideas requieren de la unión de la triiodotironina para poder iniciar su actividad transcripcional. El receptor que carece de ligando hormonal actuará como represor y por tanto evitará la expresión de los genes a los que se encuentran asociados y que intervienen en los cambios propios de la metamorfosis (Tata, 1999).

La tiroxina es una hormona propia de los vertebrados, pues éstos poseen la capacidad de producción en la glándula tiroides. Sin embargo, se han realizados estudios que muestran la acción de dichas hormonas en diferentes fila.

En las ascidias, cordados primitivos, se ha encontrado que células del endostilo biosintetizan hormonas tiroideas, puesto que son capaces de unir yodo y secretar glicoproteínas (Patricolo et al., 2001). El mismo estudio reveló que existe un mayor porcentaje de metamorfosis cuando las larvas son expuestas a L-tiroxina, lo cual indica que ésta hormona posiblemente posea un papel determinante en la metamorfosis de la larva, al igual que en los vertebrados (Patricolo et al., 2001).

El estudio del efecto inductor a la metamorfosis de la tiroxina se extiende a lo largo de la escala filogenética. En *Aurelia*, una especie de cnidario, se observó que en organismos preacondicionados a bajas temperaturas, era posible inducir la metamorfosis con elementos iodados o tiroxina en concentraciones de 10^{-5} M. Asimismo, se demostró una biosíntesis de compuestos iodados, uno de los cuales se comportó de manera similar a la tiroxina en el cromatograma (Spangenberg, 1971).

La metamorfosis en los pólipos de *Aurelia* sugiere un papel primordial de la tiroxina, y representa la reacción morfológica similar de un organismo primitivo a una hormona presente en vertebrados (Spangenberg, 1971). Posteriormente, el mismo autor sugiere que al igual que intervenir en la metamorfosis del cnidario, es probable que la tiroxina, al igual que en vertebrados, posee un papel en la regulación del metabolismo de homeostasis de iones minerales (Spangenberg, 1984).

Otras evidencias de la acción inductora de la tiroxina en la metamorfosis de invertebrados marinos están dadas en los gasterópodos y en los equinodermos. En larva competente de abulón, concentraciones bajas de tiroxina fueron capaces de inducir a la metamorfosis, con resultados comparables a la inducción provocada por el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Carpizo et al., 1993; Fukazawa et al., 2001).

En equinodermos la tiroxina ha mostrado poseer un efecto en el desarrollo y la metamorfosis. En la especie *Acanthaster planci*, una estrella de mar, se ha reportado una aceleración en el desarrollo de las larvas que fueron expuestas a tiroxina. La respuesta estuvo directamente relacionada con las concentraciones de los tratamientos, mas no les fue posible determinar si la tiroxina promovía por sí misma la metamorfosis (Johnson et al., 1996).

Por su parte Chino et al. (1994) ya anteriormente habían determinado el efecto de la tiroxina en el desarrollo larval de tres especies de erizo de mar. Describieron que la tiroxina por sí sola no produce efecto alguno en el desarrollo del rudimento juvenil, sin embargo, cuando se cultivaron las larvas en un medio con hormonas tiroideas su respuesta era dosis-dependiente, sin embargo, cuando se combinaba en el medio hormonas tiroideas y microalga como alimento, el efecto era mayor que el resto de los controles. En los primeros estadios larvales no se presentó respuesta diferencial, presentándose incluso mortalidad, sin embargo, en el estadio de ocho brazos el crecimiento y la reabsorción del epitelio larval se aceleró en presencia de hormonas tiroideas y microalgas. Estos resultados pretenden sugerir que la larva se provee de las hormonas tiroideas que requiere por medio de su alimento, pero no se descarta la posibilidad de biosíntesis (Chino et al., 1994).

Estudios similares se han realizado en larvas de distintas especies de erizo de mar. Johnson (1998) por una parte determinó que la tiroxina retarda el desarrollo embrionario durante los primeros estadios. Esta hormona aceleró la diferenciación del rudimento juvenil y las larvas completaron en un periodo más reducido la metamorfosis (Chino et al., 1994; Johnson, 1998).

Tiroxina proporcionada en lugar de microalgas a las larvas cuyo rudimento se encontraba en diferenciación, mostraron una formación más avanzada de estructuras del adulto como la placa genital de la testa, en comparación con larvas alimentadas solamente con microalgas (Suyemitsu, 2000).

Para descartar la posibilidad de biosíntesis de hormonas tiroideas, en el estudio se evaluaron los efectos de inhibidores de síntesis, así como de incorporación de yodo; los primeros no afectaron el desarrollo larval, sin embargo los segundos retardaron el desarrollo del rudimento juvenil (Suyemitsu, 2000).

3. METODOLOGÍA

3.1 OBTENCIÓN DE LARVA Y CRITERIOS DE UTILIZACIÓN

Erizos adultos de las especies *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus* y *Lytechinus pictus* fueron recolectados y mantenidos en el Laboratorio de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Para la obtención de los gametos se inyectó una solución de 0.55 M de cloruro de potasio (KCl) en la cavidad celómica; 1 ml para *S. purpuratus* y *S. franciscanus*, y 0.2 ml para *L. pictus* de acuerdo con el método descrito por Strathmann (1987). Los gametos se colectaron en frascos de vidrio con agua de mar filtrada, de los cual se tomó una muestra para observar en el microscopio la calidad de los mismos. Un óvulo en condiciones óptimas deberá presentar una forma esférica y el esperma una motilidad del 90% o mayor. Las impurezas se eliminaron al pasar los gametos por un tamiz de 250 μm .

Los óvulos de tres hembras se fertilizaron con el esperma diluido de dos machos, siendo desconocida con exactitud la proporción óvulo-esperma utilizada, puesto que para fines de cultivo no era requerido, ya que se utilizó la membrana de fertilización como criterio de viabilidad. El porcentaje de fertilización se evaluó después de 15 minutos de haber agregado el esperma. Para ello se tomó una muestra y se observó al microscopio. Si el 90% de los óvulos presentaban la membrana de fertilización, éstos fueron utilizados para el cultivo de la larva. Los huevos fertilizados fueron lavados en un tamiz de 45 μm para remover el exceso de esperma y se colocaron en cubetas de 18 L por 72 horas.

Al término de los tres días, se estimó el número de larvas para transferirlas a tanques cónicos con capacidad de 50 L y en los cuales se colocó una densidad de 2 larvas por mililitro. Durante este periodo las larvas se mantuvieron con aireación y se les alimentó con la microalga *Rhodomonas* sp.

La ración del alimento se aumentó cada semana: 10,000 células/ml en la primera, 15,000 cel/ml en la segunda y 20,000 cel/ml en la tercera. Asimismo para asegurar la calidad de agua de los tanques se realizaron recambios de agua del 50% y del 100% de manera alterna.

El desarrollo larval duró aproximadamente entre 20 y 25 días para *L. pictus* y 23 y 27 días para *S. franciscanus* y *S. purpuratus*, al cabo de los cuales la larva se encontró en estadio de competencia para la metamorfosis. El estadio de competencia se caracterizó por la presencia del rudimento completamente desarrollado en el cual eran visibles los primordios de las espinas y los pies ambulacrales correspondientes al estadio J según Chino et al. (1994). Una vez que la larva presentaba dichas estructuras, se realizaron los experimentos farmacológicos.

3.2 EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN A LA METAMORFOSIS

Los experimentos de inducción a la metamorfosis fueron realizados de acuerdo a la metodología que se presenta de manera esquemática en la figura 1.3.

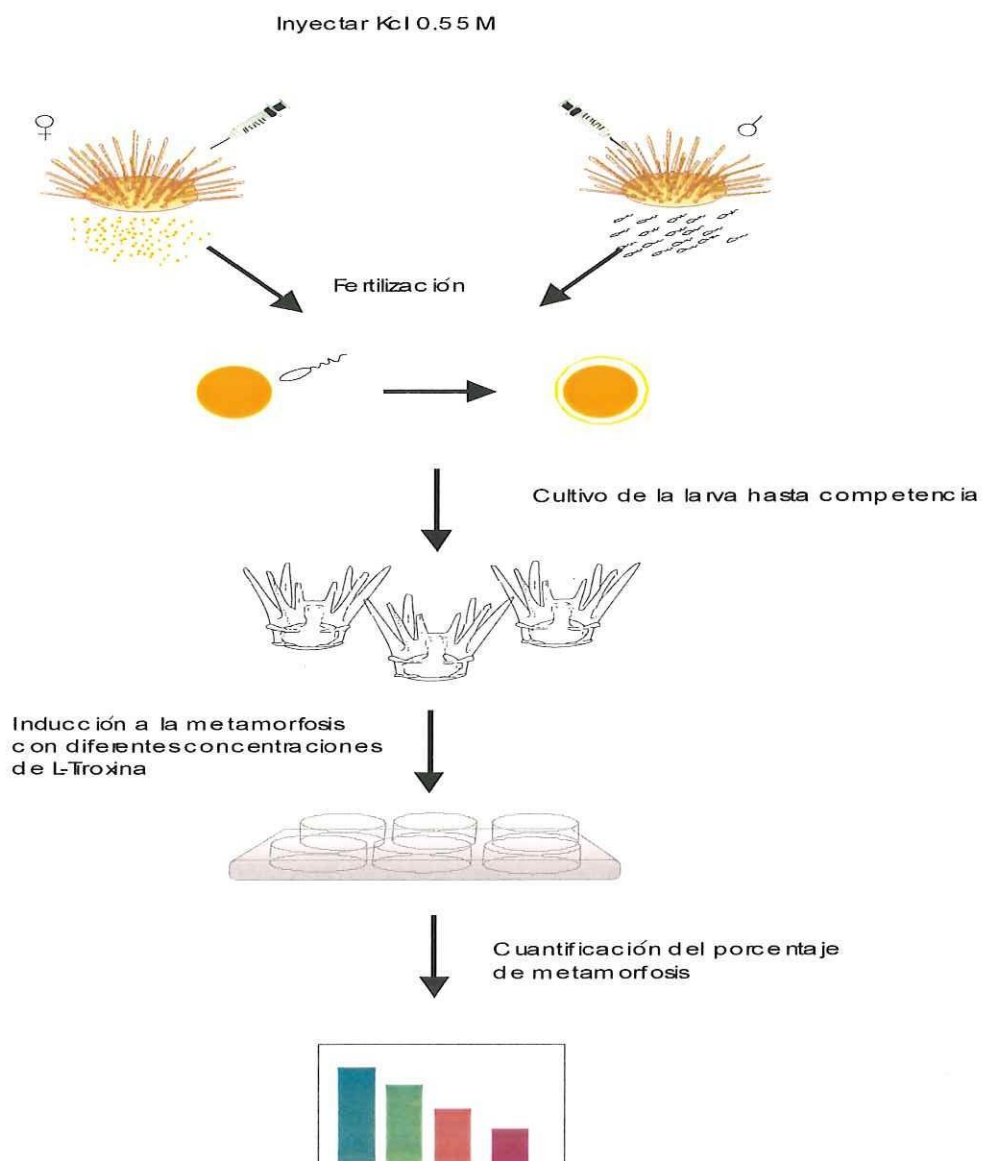


Figura. 1.3. Representación esquemática de la metodología que se siguió en los experimentos de inducción a la metamorfosis con L-tiroxina. Se obtuvieron los gametos al inyectar KCl 0.55 M a erizos maduros de las distintas especies, el cultivo se mantuvo durante aproximadamente un mes hasta que la larva alcanzó la competencia para poder inducir la metamorfosis con distintas concentraciones de L-tiroxina.

Para ello se utilizaron cajas de pozos múltiples (BD Falcon, no. catálogo U-13008-00), donde se colocaron larvas competentes de erizo *S. purpuratus*, *S. franciscanus* o *L. pictus*, según el experimento, y fueron expuestas a distintas concentraciones de L-tiroxina (Sigma, no. catálogo T 2501). En el anexo 1 se muestran las concentraciones utilizadas y los volúmenes de reactivos requeridos.

Se realizaron un total de siete experimentos de inducción a la metamorfosis, uno para *S. franciscanus*, cuatro para *L. pictus* y dos para *S. purpuratus*. Cada experimento contó con tres réplicas y sus respectivos controles. KCL 10^{-1} M por 15 minutos, se utilizó como control positivo por su conocida acción inductora en larvas competentes de erizo (Carpizo-Ituarte et al., 2002). El control negativo consistió en larvas que permanecieron en agua de mar filtrada hasta $0.45\ \mu\text{m}$ e irradiada con luz ultravioleta (UV). Asimismo se incluyó un control de reactivo de NaOH 10^{-4} M, ya que ésta fue la solución en la cual se disolvió la tiroxina, por su insolubilidad en agua. Para todos los experimentos se utilizó agua de mar filtrada hasta $0.45\ \mu\text{m}$ e irradiada con UV (AME).

3.3 EVALUACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS

Los resultados fueron evaluados a las 24 horas. Sólo un experimento de *L. pictus* fue evaluado en dos tiempos, a las 24 y 48 horas. Asimismo, en el tercer experimento realizado con *L. pictus* se evaluó sólo a las 48 horas. En *S. purpuratus* se evaluó uno de los experimentos al término de 48 horas y otro sólo a las 24 horas. Durante este tiempo las larvas permanecieron expuestas a las distintas soluciones de tiroxina.

En el control positivo de KCl, se retiró la solución a los 15 minutos y el agua de mar fue renovada, sin embargo, la evaluación de éste se realizó a las 24 horas al igual que el resto de los tratamientos.

En todos los experimentos la evaluación se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca Zeiss (KL 200).

Como criterio de metamorfosis, se consideró la presencia de las espinas y pies ambulacrales extendidos y el colapso del epitelio larval, los cuales son característicos del erizo juvenil.

3.4 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Se cuantificaron los porcentajes de metamorfosis y mortalidad en cada una de las réplicas de cada tratamiento para realizar un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 %. La hipótesis nula para cada experimento consistió en la no existencia de diferencias significativas entre los tratamientos. La hipótesis alterna planteaba la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

Los datos fueron transformados por la función arcoseno y procesados en el paquete estadístico Statistica®. Asimismo, en el mismo software, se realizó la prueba Duncan para comparar las medias de cada uno de los tratamientos y determinar el porcentaje de similitud entre ellos. Las gráficas se generaron con la ayuda del programa Sigma Plot®.

Existieron algunas réplicas en las cuales los porcentajes de mortalidad fueron elevados con respecto a lo que se observó en esos tratamientos para la mayoría de las réplicas. Sin embargo, se consideraron las larvas metamorfozadas de éstas réplicas en el análisis estadístico.

4. RESULTADOS

En el experimento evaluado a las 24 horas para *Strongylocentrotus franciscanus*, el porcentaje de metamorfosis más alto que se obtuvo en los tratamientos de tiroxina fue del 15 % en la concentración de 10^{-4} M (fig. 1.4). Este porcentaje no fue significativamente diferente del control de reactivo (NaOH), ni de las larvas que permanecieron en AME. (Prueba Duncan, $P > 0.05$). El control con KCl fue diferente de manera significativa de los tratamientos de tiroxina con un porcentaje del 80 % (ANOVA, $P < 0.05$).

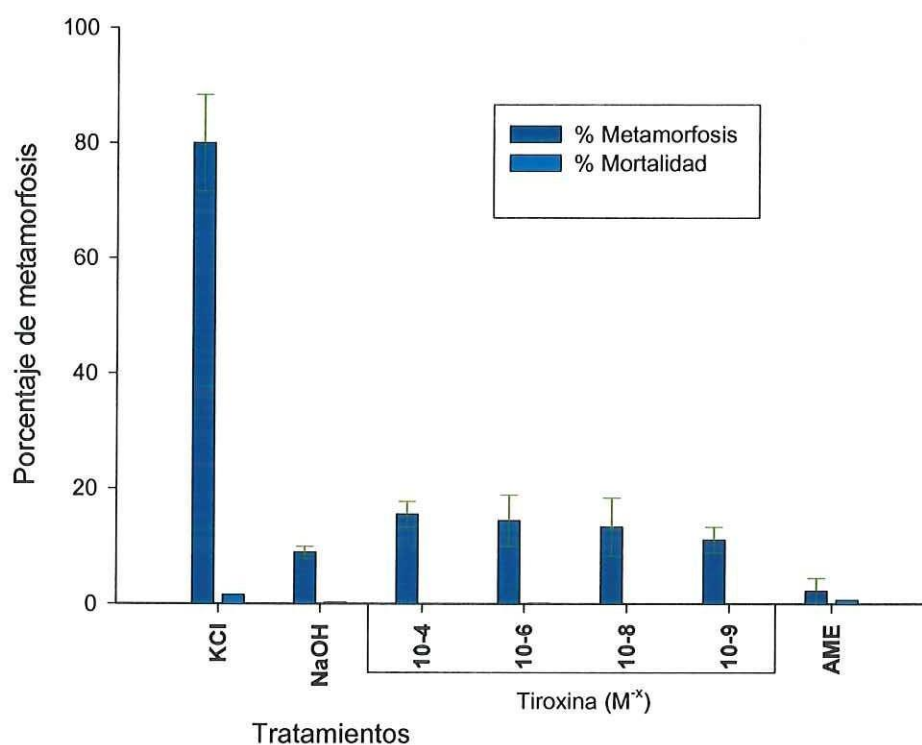


Figura 1.4. Porcentaje de metamorfosis y mortalidad de la larva competente de 23 días de *Strongylocentrotus franciscanus*, evaluado a las 24 h de exposición a las diferentes concentraciones de tiroxina. La larva fue expuesta a un pulso de KCl 10^{-1} M por 15 min, al cabo de los cuales se retiró y se reemplazó por AME. NaOH= NaOH 10^{-4} M por 24 h. AME= agua de mar filtrada hasta $0.45 \mu\text{m}$ e irradiada por UV. (n=3 réplicas). Las barras verticales corresponden al error estándar.

En el primer experimento de *Lytechinus pictus* evaluado a las 24 horas, se presentó un mayor porcentaje de metamorfosis en la concentración 10^{-6} M con 22.2 % (fig. 1.5), siendo diferente significativamente de los demás tratamientos (Prueba Duncan, $P > 0.05$), sin embargo, su efecto no fue comparable al KCl, que presentó un 85 % de metamorfosis (ANOVA, $P < 0.05$).

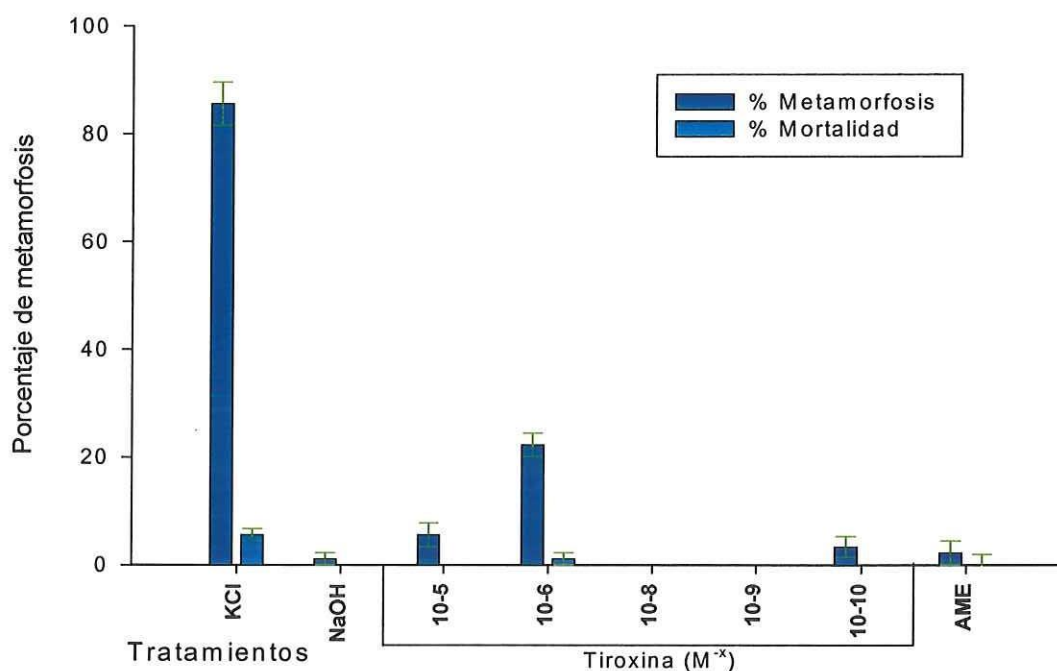


Figura 1.5. Muestra el porcentaje de metamorfosis y mortalidad en la larva competente de 25 días de *Lytechinus pictus*, evaluado a las 24 h de exposición a las diferentes concentraciones de tiroxina. La larva fue expuesta a un pulso de KCl 10^{-1} M por 15 min, al cabo de los cuales se retira y se reemplaza por AME. NaOH= NaOH 10^{-4} M por 24 h. AME= agua de mar filtrada hasta $0.45\mu\text{m}$ e irradiada por UV. (n=3 réplicas). Las barras verticales corresponden al error estándar.

En el experimento de inducción realizado para *Strongylocentrotus purpuratus* cuya evaluación fue realizada a las 24 horas, el mayor porcentaje de metamorfosis encontrado en los tratamientos con tiroxina fue del 22 % en la concentración 10^{-4} M (fig. 1.6).

Este experimento presentó diferencias significativas entre el control positivo de KCl y el resto de los tratamientos (ANOVA, $P < 0.05$), sin embargo, aún cuando 10^{-4} M no se asemeja a éste control, fue diferente del resto de tratamientos y del control de reactivo (NaOH) así como de las larvas que permanecieron en AME (Prueba Duncan, $P < 0.05$).

En este mismo experimento, una de las réplicas en la concentración 10^{-10} M presentó un 100 % de mortalidad, cuando el promedio observado fue del 3.3 %. Por su parte, en AME una réplica inusual presentó un 30 % de mortalidad, cuando el promedio de las réplicas restantes fue del 5 %. Asimismo, en una réplica de la concentración 10^{-10} M se observó un 76.6 % de metamorfosis, muy por encima del promedio de las dos réplicas restantes.

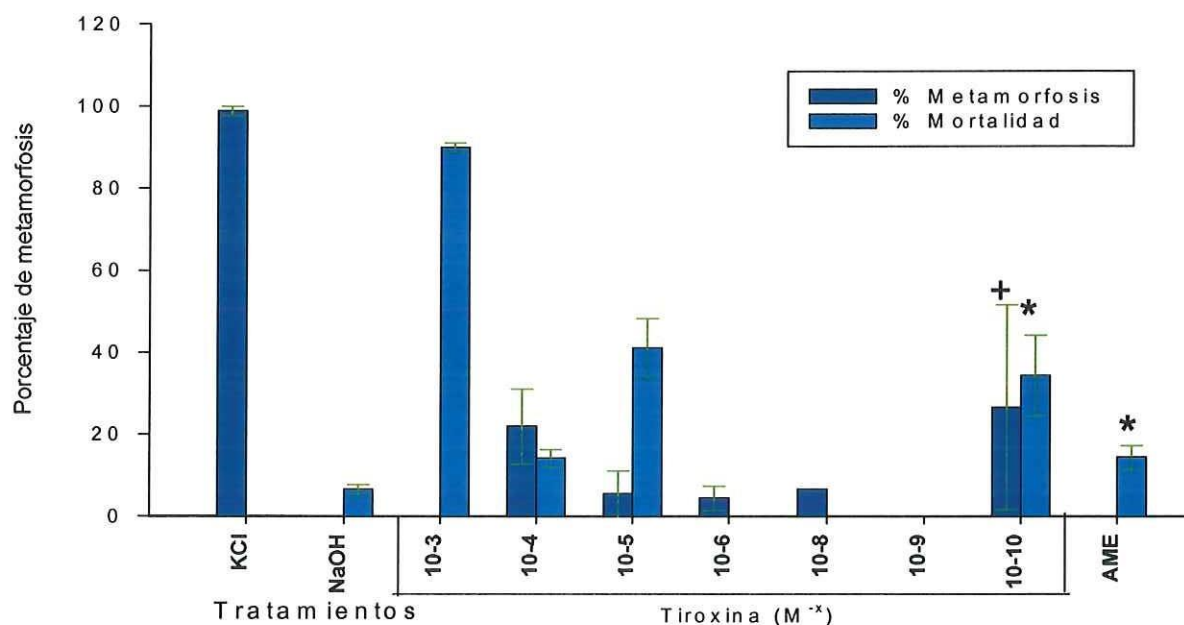


Figura 1.6. Porcentaje de metamorfosis y mortalidad en la larva competente de 26 días de *Strongylocentrotus purpuratus*, evaluado a las 24 h de exposición a las distintas concentraciones de tiroxina. La larva fue expuesta a un pulso de KCl 10^{-1} M por 15 min, al cabo de los cuales se retira y se reemplaza por AME. NaOH= NaOH 10^{-4} M por 24 h. AME =agua de mar filtrada hasta $0.45 \mu\text{m}$ e irradiada por UV. (n=3 réplicas). Las barras verticales corresponden al error estándar. (*) Mortalidad inusual. (+) Metamorfosis inusual.

Para el experimento de *L. pictus*, evaluado a dos tiempos (24 y 48 horas), se observó un aumento en el porcentaje de metamorfosis en las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-6} M. En estas concentraciones se presentó el mayor porcentaje de metamorfosis de los experimentos realizados.

A las 24 horas el mayor porcentaje de metamorfosis fue del 13.33 % en la concentración de 10^{-4} M (fig. 1.7 A). Las larvas del control de KCl presentaron un porcentaje del 83 % siendo diferente significativamente del resto de los tratamientos (ANOVA, $P < 0.05$). Sin embargo, el porcentaje encontrado en la concentración de tiroxina 10^{-4} M difiere de manera significativa del control de AME y del control de NaOH (Duncan, $P < 0.05$).

En este experimento una réplica de la concentración 10^{-4} M presentó una mortalidad mayor correspondiente al 6.6 % cuando el porcentaje observado en las dos réplicas restantes fue de 0 (fig. 1.7 A).

Se presentaron porcentajes de metamorfosis superiores al 50 % en las concentraciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} M, cuando el mismo experimento fue evaluado a las 48 horas (fig. 1.7 B). Estos valores fueron significativamente diferentes de los controles de reactivo (NaOH) y de la larva que permaneció en AME (Duncan, $P < 0.05$). El tratamiento de KCl fue significativamente diferente de todos los tratamientos (ANOVA, $P < 0.05$).

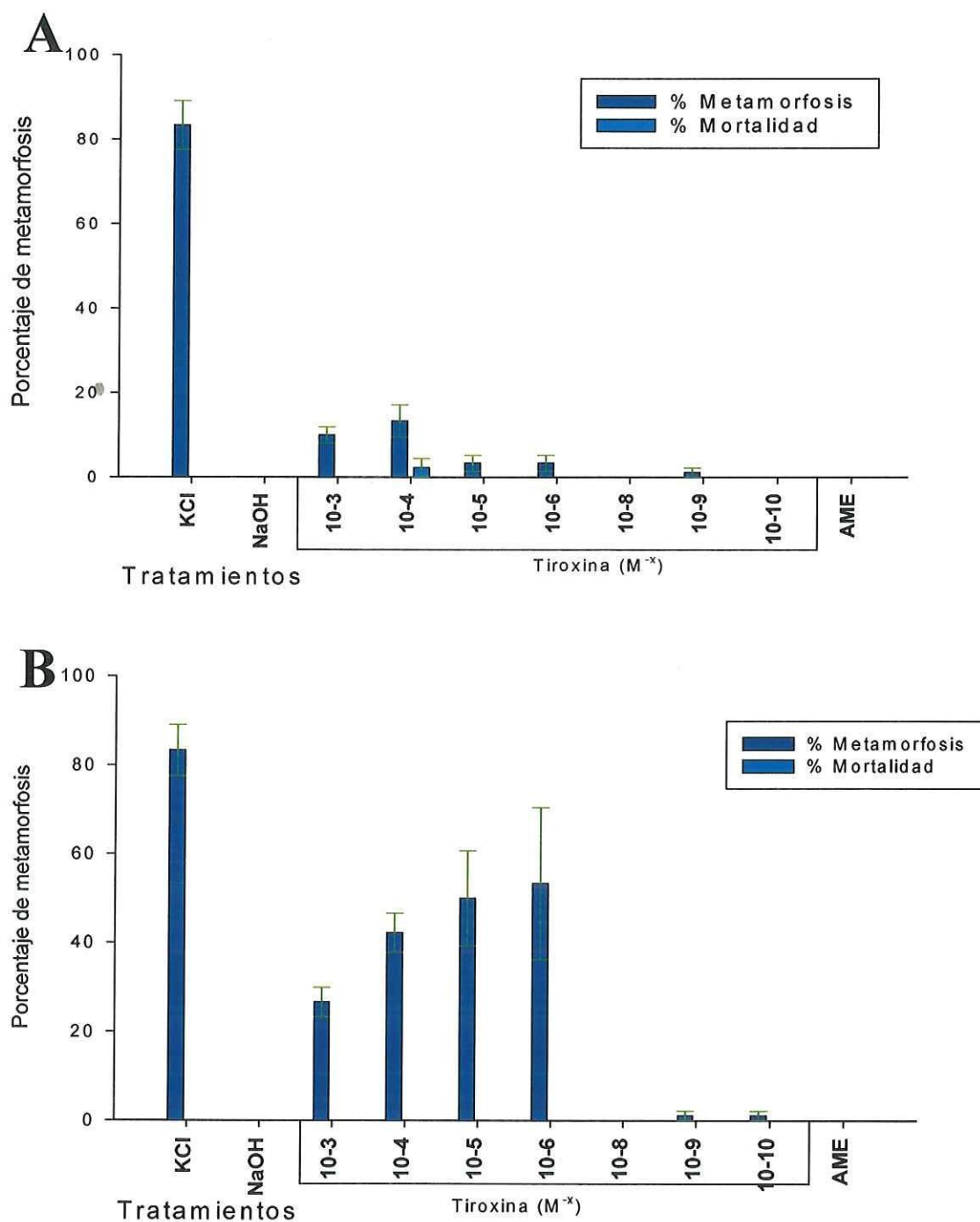


Figura 1.7. Porcentaje de metamorfosis y mortalidad en la larva competente de 20 días de *Lytechinus pictus* evaluado a las 24 h (A) y 48 h (B) de exposición a las diferentes concentraciones de tiroxina. La larva fue expuesta a un pulso de KCl 10^{-1} M por 15 min, al cabo de los cuales se retira y se reemplaza por AME. NaOH= NaOH 10^{-4} M por 24 h. AME =agua de mar filtrada hasta $0.45 \mu\text{m}$ e irradiada por UV. (n=3 réplicas). Las barras verticales corresponden al error estándar. A las 48 h no se consideró la mortalidad encontrada a 25h.

El último experimento que se realizó con *Lytechinus pictus* evaluado sólo al término de las 48 horas de exposición, presentó valores de metamorfosis similares a los del experimento anterior en el mismo periodo de tiempo (fig. 1.8).

Los porcentajes de metamorfosis más altos se obtuvieron con las concentraciones entre 10^{-3} M y 10^{-6} M, sin ser comparable al efecto del KCl, en el que se obtuvieron porcentajes del 96 % de metamorfosis (ANOVA, $P < 0.05$). Los porcentajes de metamorfosis observados fueron del 20 % en 10^{-3} M y hasta 54 % en 10^{-6} M. En la concentración 10^{-8} M se presentó un porcentaje de metamorfosis del 55.5 % (fig. 1.8). Las concentraciones 10^{-6} M y 10^{-8} M difirieron de manera significativa de los controles de AME y NaOH (Duncan, $P < 0.05$). El resto de los tratamientos fueron similares al control negativo y de reactivo (Duncan, $P < 0.05$).

En una de las réplicas de la concentración 10^{-9} M de este experimento se presentaron porcentajes en la metamorfosis del 20 % cuando se venía observando para ésta concentración un porcentaje promedio del 3 %. Asimismo en las concentraciones 10^{-6} M y 10^{-10} M se presentaron réplicas con porcentajes de mortalidad del 41.11 % y 51.11 % respectivamente, los cuales fueron mayores al 3 % o menor de mortalidad observada en las demás réplicas (fig. 1.8).

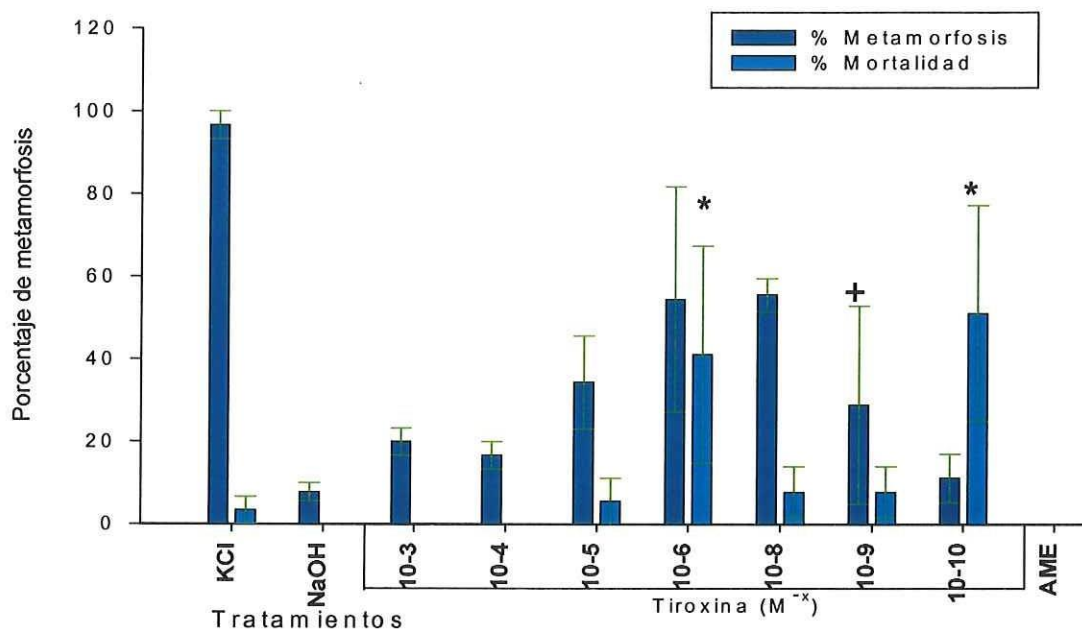


Figura 1.8. Porcentaje de metamorfosis y mortalidad en la larva competente de 22 días de *Lytechinus pictus*, evaluado después de 48 h de exposición a las diferentes concentraciones de tiroxina. La larva fue expuesta a un pulso de KCl 10^{-1} M por 15 min, al cabo de los cuales se retira y se reemplaza por AME. NaOH= NaOH 10^{-4} M por 24 h. AME =agua de mar filtrada hasta $0.45 \mu\text{m}$ e irradiada por UV. (n=3 réplicas). Las barras verticales corresponden al error estándar. (*) Representa el porcentaje de mortalidad inusual. (+) Representa el porcentaje de metamorfosis inusual en una de las réplicas.

En el experimento de *Strongylocentrotus purpuratus* evaluado a las 48 horas la mayoría de la larva se encontró muerta en todos los tratamientos. Al no realizarse la evaluación de éste experimento a las 24 horas, no se pudo determinar si un periodo de exposición menor a 48 horas resulta tóxico en ésta especie.

En los experimentos con *Lytechinus pictus* se obtuvieron los mayores porcentajes de metamorfosis. En las concentraciones de tiroxina comprendidas entre 10^{-3} M y 10^{-6} M se obtuvo un promedio de 19 % y 43 % de metamorfosis respectivamente. El resto de los tratamientos en *Lytechinus pictus* fueron similares al control negativo de AME y al NaOH (Prueba Duncan, $P > 0.05$). En el control positivo de KCl se presentó un 88 % de metamorfosis, siendo diferente de manera significativa de todos los tratamientos (ANOVA, $P < 0.05$).

Las concentraciones de tiroxina cuyo efecto inductor fue mayor en las tres especies (*Strongylocentrotus franciscanus*, *Lytechinus pictus* y *S. purpuratus*) se encontraron en el rango de 10^{-3} M y 10^{-6} M, con porcentajes por debajo del 50 % de metamorfosis. Sin embargo, como ya se mencionó 10^{-3} M que resultó tóxica para *S. purpuratus*, produjo un efecto inductor del 20 % en *L. pictus*, y no fue probada en *S. franciscanus*.

5. DISCUSIÓN

La aplicación de hormona tiroxina en larva competente de tres especies de erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus* y *Lytechinus pictus*) produjo porcentajes de metamorfosis similares en las tres especies dentro del rango de concentraciones de 10^{-3} M y 10^{-6} M. Este trabajo es el primer reporte de la acción de la tiroxina como elemento inductor de la metamorfosis en el erizo de mar. Aún cuando existe un reporte previo de la aplicación de las hormonas T_3 y T_4 para éste organismo, no se presentan porcentajes de metamorfosis y se menciona solamente la formación de un esqueleto del tipo adulto como respuesta inducida por las hormonas (Suyemitsu, 2000).

El rango de concentraciones en el cual la tiroxina posee un efecto sobre la larva competente del erizo de mar es comparable con aquellas concentraciones de tiroxina que presentan un efecto inductor en especies de equinodermos como *Peronella japonica* que responde de manera significativa en la concentración 10^{-6} M de tiroxina (Saito et al., 1998). Otro deuterostomio marino en el cual se sugiere un posible papel de la tiroxina como elemento inductor en la metamorfosis es la ascidia, en la cual, concentraciones de tiroxina similares a este trabajo (10^{-5} M) fueron suficientes para promover una respuesta (Patricolo et al., 2001).

Invertebrados marinos gasterópodos como el abulón y el caracol han respondido a la aplicación exógena de tiroxina como inductor a la metamorfosis.

En el abulón *Haliotis rufescens* se reportó un mayor porcentaje de metamorfosis en la concentración 6.6×10^{-5} M de tiroxina (Carpizo-Ituarte, 1994); así como un efecto en la concentración 3.8×10^{-6} M de tiroxina para otras dos especies de abulón, *H. discus* y *H. gigantea* (Fukazawa et al., 2001). Por su parte en el caracol *Astraea undosa* la respuesta se dio, al igual que en *Haliotis rufescens*, al aplicar tiroxina a una concentración de 6.6×10^{-5} M (Carpizo-Ituarte, 1994).

Los porcentajes más altos de metamorfosis en las tres especies de erizo de mar que se presentan en este trabajo se encontraron en la concentración 10^{-6} M, al igual que en el equinodermo *Peronella japonica*, sin embargo, la metodología en éste trabajo difiere de la utilizada por Saito et al. (1998), en donde la larva fue cultivada a partir del huevo fertilizado en un medio que contenía tiroxina. El presente trabajo diseñó una metodología que pretende determinar si la tiroxina actúa como agente regulador de la metamorfosis por sí solo.

Los porcentajes de metamorfosis obtenidos en las distintas concentraciones de tiroxina que fueron aplicadas a larvas competentes de tres especies de erizo de mar no fueron comparables con respecto al control de KCl utilizado. Sin embargo, éste último sólo se utiliza como indicador de competencia, ya que en realidad se desconoce los mecanismos por los cuales actúa para promover la metamorfosis. Asimismo una larva metamorfozada con KCl puede llegar a su madurez sin presentar anomalías (Carpizo-Ituarte et al., 2002).

La respuesta a la tiroxina en dos de las tres especies (*S. franciscanus* y *S. purpuratus*) de erizo de mar estudiadas, nos permiten sugerir que existe un efecto de ésta hormona sobre la larva competente. Sin embargo, al haberse realizado un número limitado de experimentos, la apreciación del efecto que posee la tiroxina es incompleta.

En el caso de *S. franciscanus* los porcentajes de metamorfosis obtenidos en las cuatro concentraciones probadas fueron similares entre sí y similares con respecto al control de reactivo, con lo cual no es posible establecer si existe un efecto significativo de la tiroxina como inductor para ésta especie. Un mayor número de experimentos podrían proporcionar la información necesaria para corroborar nuestra hipótesis.

Para *S. purpuratus* los experimentos sugieren una sensibilidad mayor en ésta especie a la hormona. La concentración 10^{-3} M de tiroxina resultó ser tóxica en larva competente de *S. purpuratus*, asimismo, el primer experimento mostró un porcentaje alto de mortalidad por exposición prolongada a la hormona.

Es posible explicar las diferencias encontradas en la respuesta de cada una de las especies como una variación específica de especie. Otra fuente de variación en la respuesta puede deberse a las diferencias entre las larvas en la sensibilidad de la percepción sensorial. Por otra parte dentro de un mismo cultivo de erizo de mar, la larva se desarrolla de manera asincrónica, lo cual origina distintos grados de madurez dentro del mismo y por lo tanto una larva que no ha alcanzado el estadio de competencia no será capaz de responder al estímulo.

La competencia de una larva es un carácter fisiológico, que podemos relacionar con características morfológicas, sin embargo, es posible que presente las características morfológicas pero no necesariamente se encuentre competente, como lo han sugerido Bishop et al. (2001).

La respuesta de la larva competente de las tres especies utilizadas (*S. purpuratus*, *S. franciscanus* y *L. pictus*) proporcionan elementos para sugerir la posibilidad de moléculas similares a estas hormonas que pudieran participar en la regulación interna de la metamorfosis. Lo anterior se refuerza cuando se considera el efecto de la tiroxina en el desarrollo larval del erizo de mar, su aparente acumulación de T_3 y T_4 proporcionado por la microalga durante su desarrollo (Chino et al., 1994; Suyemitsu, 2000). Asimismo, al presentar en su genoma elementos nucleares que pertenecen a la familia de receptores de hormonas esteroides/tiroideas (Chan et al., 1992), no podemos descartar que el erizo posea la capacidad de responder a este tipo de estímulos hormonales con receptores nucleares similares.

Sin embargo, hasta no constatar que en efecto exista una acumulación de T_3 y T_4 durante el desarrollo larval como ha sido sugerido por Chino et al. (1994) y Suyemitsu (2000) o incluso si existe una biogénesis de ésta hormona o un elemento tipo-hormona por el erizo de mar, no es posible considerar que la tiroxina posea un papel importante en la metamorfosis del erizo de mar.

6. CONCLUSIONES

- Las concentraciones de tiroxina 10^{-4} M y 10^{-6} M fueron las que presentaron un mayor porcentaje de metamorfosis en las tres especies de erizo de mar (*S. purpuratus*, *S. franciscanus* y *L. pictus*).
- En la concentración 10^{-6} M se obtuvieron los valores más altos de porcentaje de metamorfosis en las tres especies siendo significativamente distintos al control de reactivo de NaOH y al control de agua de mar filtrada.
- Existieron diferencias entre las tres especies de erizo de mar en cuanto a su respuesta al compuesto.
- Los porcentajes de metamorfosis fueron siempre mayores en el control positivo con KCl en las tres especies.
- La tiroxina por sí sola no produce un porcentaje de metamorfosis significativo consistente.

7. RECOMENDACIONES

- Considerar un diseño experimental que permita alimentar a la larva competente mientras permanece en contacto con la solución de tiroxina, para descartar la posibilidad de un mecanismo de asimilación de la hormona por medio de la microalga.
- Inhibir la incorporación de yodo a lo largo del desarrollo larval y ver su efecto para completar el desarrollo y metamorfizarse.
- Probar inhibidores de la incorporación del yodo en larva competente y ver su efecto en los porcentajes de metamorfosis, para determinar si el mecanismo por el cual actúa la señal inductora está relacionado con este tipo de hormonas o elementos tipo-hormonas.

CAPÍTULO II

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR COUP-TF EN LOS ÚLTIMOS ESTADIOS LARVALES DEL ERIZO DE MAR *Lytechinus pictus*.

1. INTRODUCCIÓN

El factor de transcripción-promotor de la ovalbúmina de pollo o COUP-TF por sus siglas en inglés (chicken ovalbumin upstream promoter- transcription factor), es un receptor huérfano que pertenece a la superfamilia de receptores para hormonas esteroides/tiroideas cuyos ligandos aún se desconocen, pero que una vez activados puede promover o reprimir la expresión de los genes a los cuales se encuentran relacionados y que posean la secuencia de reconocimiento que identifica a la superfamilia (Qiu et al., 1994a).

Dicho receptor se ha caracterizado desde invertebrados como el homólogo svp en *Drosophila* (Mlodzik, 1990), spCOUP-TF en el erizo de mar (Chan et al., 1992), hasta el mCOUP-TF en ratones (Qiu et al., 1994b) y cCOUP-TF de la gallina, éste último siendo el primero que fue descrito (Tsai et al., 1997). La presencia del COUP-TF en la gran variedad de especies mencionadas, sugiere un papel conservado de dicha proteína (Lu et al., 1994).

Las principales funciones descritas para el COUP-TF en cada una de las especies estudiadas, han sido durante la embriogénesis, presentando un patrón de expresión generalizado en regiones del sistema nervioso central, así como tejido mesenquimal en varios órganos (Tsai et al., 1997).

También posee la capacidad de reprimir la actividad transcripcional de genes activados por hormonas tiroideas, de ácido retinóico y vitamina D, los cuales son conocidos agentes morfogenéticos del desarrollo (Cooney et al., 1992).

En el erizo de mar, su homólogo spCOUP-TF fue localizado como un elemento regulador en el gen *CyIIIb* de las actinas, por lo que se sugirió una función transrepresora que generaba especificidad celular al delimitar la expresión de dicho gen sólo al ectodermo aboral (Chan et al., 1992). Asimismo, el patrón de expresión del spCOUP-TF fue descrito desde el huevo hasta la larva pluteus de cuatro brazos, encontrándose que se presenta como factor de transcripción maternal, y una vez formada la larva éste se presenta a lo largo de la banda ciliada de la misma, un elemento fuertemente innervado con células neurógenas. Por lo anterior se sugirió una función del COUP-TF en la determinación de células neurógenas así como en el origen del sistema nervioso completo de la larva. (Vlahou, 1996a).

El sistema nervioso de la larva pluteus de un erizo de mar consiste de un neuropilo apical, un ganglio inferior cerca de la boca y la banda ciliada (Bisgrove et al., 1987), sin embargo en los estadios finales del desarrollo larval, cuando el rudimento está en formación, existe nuevamente un requerimiento de genes que al expresarse darán lugar al sistema nervioso pentameral propio del adulto (Arenas-Mena et al., 2000).

Partiendo del ya descrito patrón de expresión del spCOUP-TF, desde el huevo hasta la larva pluteus de cuatro brazos en el erizo de mar, y considerando que al formarse el rudimento se origina un nuevo sistema nervioso, es importante determinar si existe una variación en dicho patrón de expresión de éste receptor conforme se acerca a la competencia y si una vez metamorfozado cesa de expresarse. Lo anterior permitirá hipotetizar sobre la posible intervención del COUP-TF en el desarrollo del sistema nervioso del juvenil y durante la metamorfosis.

2. ANTECEDENTES

2.1 RECEPTORES NUCLEARES DE LA FAMILIA DE HORMONAS ESTEROIDES/TIROIDEAS

Las hormonas derivadas de los esteroides y las hormonas tiroideas, coordinan eventos complejos del desarrollo embrionario tales como la determinación del sistema reproductivo y nervioso, metabolismo del calcio y osteogénesis en vertebrados. Asimismo, las hormonas tiroideas poseen un papel importante en la metamorfosis de los cordados y sus análogos poseen un rol similar en insectos (Evans, 1988).

Su mecanismo de acción, al ser hormonas lipofílicas, es a través de receptores nucleares encontrados en el citoplasma celular. Una vez unida la hormona al receptor, se induce un cambio alostérico que permite la translocación hacia el núcleo donde se une a secuencias de reconocimiento en la cromatina y entonces modula la transcripción (Mangelsdorf et al., 1995b).

Los receptores para las hormonas esteroides y tiroideas se agrupan en una superfamilia por sus similitudes en estructura y por la semejanza de las secuencias de reconocimiento encontradas en el DNA. Pertenecen a ésta superfamilia los receptores para ácido retinóico y los conocidos como receptores huérfanos, de los cuales se desconoce su ligando (Laudet et al., 1992).

Todo receptor nuclear posee cinco dominios funcionales en su estructura como lo muestra la figura 2.1.



Figura. 2.1. Organización estructural del receptor de hormonas esteroides/tiroideas. Dominio amino terminal (A/B) con función de activador transcripcional. Dominio de unión al DNA (C) región conservada que se une a los elementos de respuesta en el DNA. (D) mediador de la translocación al núcleo. Dominio de unión al ligando (E), forma el complejo hormona/receptor, permite la formación de dímeros y puede encontrarse unido a proteínas de estrés térmico. La (N) indica la posición amino-terminal, (C), indica la posición carboxi-terminal (Tomado de Reichel et al., 1993)

El dominio “C” es el que se encuentra conservado a lo largo de las especies y que permite agruparlos como miembros del grupo, es también conocido como dominio de unión al DNA (DBD, por sus siglas en inglés “DNA Binding Domain”) puesto que posee la secuencia que reconocerá el elemento de respuesta hormonal situado en el DNA.

Adyacente a éste dominio se encuentra el dominio “D”, el cual parece ser el responsable de la translocación del complejo hormona/receptor hacia el núcleo. La región “E”, también llamada dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés “Ligand Binding Domain”), posee, además de su función de unión al ligando, la capacidad de formar dímeros con coactivadores o si se requiere unirse a proteínas de estrés térmico (Reichel et al., 1993).

2.2 RECEPTORES HUÉRFANOS

Denominados receptores huérfanos por carecer de ligandos conocidos, pertenecen a la superfamilia de receptores de hormonas esteroides/tiroideas por sus semejanzas estructurales y por presentar elementos de respuesta hormonal conformados por secuencias palindrómicas (Mangelsdorf et al., 1995a).

Por poseer un elemento de respuesta hormonal similar al de los receptores de hormonas tiroideas, del ácido retinóico y de la vitamina D, se ha descubierto que se unen a sus secuencias, por lo que se les atribuye un papel regulador en la expresión de los genes asociados a éstos receptores. Asimismo poseen la capacidad de formar heterodímeros con el receptor X del ácido retinóico, siendo éste, otro mecanismo regulador (Mangelsdorf et al., 1995a).

De éste grupo, el factor de transcripción-promotor de la ovalbúmina del pollo (COUP-TF) es uno de los mejor caracterizados (Tsai et al., 1997).

2.3 FISIOLÓGÍA DEL COUP-TF Y SUS HOMÓLOGOS

Fue identificado por primera vez como un elemento regulador que se une a una secuencia palíndrome imperfecta en el promotor del gen de la ovalbúmina en la gallina. Se realizaron posteriormente cribados de homología en distintas especies y se encontró este receptor en cada una de ellas. En el ratón, mCOUP-TFI y mCOUP-TFII (Qiu et al., 1994b); svp, un homólogo en *Drosophila* (Mlodnick et al., 1990), spCOUP-TF en el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Chan et al., 1992), así como cCOUP-TF en gallina, xCOUP-TF de *Xenopus*, hCOUP-TF del humano, svp[44] y svp[46] del pez zebra entre otros (Tsai et al., 1997). Las secuencias de aminoácidos de la región de unión con el DNA y dominio de unión del ligando, se encuentran conservadas en las especies, incluso hasta en un 94 % con respecto al humano (Qiu et al., 1994a).

Los patrones de expresión, también presentan similitudes en las especies. Existe coincidencia de un papel importante del COUP-TF durante el desarrollo y de manera especial en la formación del sistema nervioso, aunque también es requerido en órganos formados a partir del tejido mesenquimal (Lu et al., 1994). Existen dos mecanismos de acción propuestos por los cuales interviene el COUP-TF en el desarrollo y son a través de la regulación de los genes asociados a hormonas tiroideas, ácido retinóico o vitamina D. Primero, es capaz de unirse a los elementos de respuesta de los receptores anteriores y evitar que éstos activen el gen. Asimismo, pueden competir por el heterodímero universal, el receptor X retinoide (RXR), que les confiere estabilidad en la unión al DNA (Cooney et al., 1992).

En invertebrados, se encontró que el COUP-TF interviene en la formación de órganos asociados al sistema nervioso. Por ejemplo en *Drosophila*, el homólogo *svp* es requerido para la formación de los fotorreceptores y su delección produce mutantes anormales e incluso puede ser letal (Mlodzick et al., 1990).

Con base en lo anterior y considerando la expresión del spCOUP-TF en el erizo *S. purpuratus*, se propone la hipótesis de un papel en la determinación de células neurógenas que darán lugar subsecuentemente al sistema nervioso de la larva (Vlahou et al., 1996).

2.4 LOCALIZACIÓN DEL COUP-TF Y SU PATRÓN DE EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL ERIZO DE MAR

El homólogo del COUP-TF en el erizo *S. purpuratus* fue identificado por Chan et al. (1992), quienes encontraron que dentro del gen CyIIIb de las actinas, existía un elemento regulador que poseía una secuencia de reconocimiento propia de la superfamilia de receptores esteroide/tiroideas y que era necesario para la transcripción de dicho gen. Después de realizar un cribado de homología utilizando una sonda del COUP-TF humano, se determinó que dicho sitio de unión pertenecía a su homólogo en ésta especie (Chan et al., 1992). El spCOUP-TF posee una similitud de hasta 96 % en su secuencia de aminoácidos en el sitio de unión al DNA con respecto al COUP-TF humano, así como un 92 % de semejanza en su sitio de unión al ligando, lo que demuestra nuevamente lo conservado que se encuentra dicha proteína (Chan et al., 1992).

El mismo Chan y su grupo de colaboradores (1992), realizaron "blot hybridizations" de RNA para determinar los estadios embrionarios en los cuales se expresaba dicho receptor. El spCOUP-TF se expresa en bajos niveles durante la oogénesis y la embriogénesis, incrementando posiblemente en el estadio larval pluteus de cuatro brazos.

Vlahou et al. (1996), realizaron un estudio espacio/temporal del patrón de expresión del spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*, dos especies de erizo de mar que poseen desarrollo indirecto. El patrón estuvo dado por la presencia de RNA mensajero y la señal que éste emitía.

El spCOUP-TF es un factor de transcripción maternal, que se presenta concentrado en una región de la corteza del huevo sin fertilizar y la presencia del RNA mensajero disminuye en dirección al polo opuesto de esta región de alta concentración. Esto explica que durante la segmentación existe una distribución desigual del mensajero en los blastómeros, como lo reportan Vlahou et al. (1996).

En el estadio de 16 células, el mensajero del spCOUP-TF se encuentra principalmente en aquellas que son precursoras del ectodermo y posiblemente en el endodermo. Durante la blástula, es exclusivo de células ectodermales del lado oral. Una vez alcanzado el estadio pluteus, el spCOUP-TF se detecta sólo en las células ectodermales de la banda ciliada, el ectodermo supra-anal y los brazos (Vlahou et al., 1996).

3. METODOLOGÍA

3.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Se cultivaron larvas del erizo *Lytechinus pictus* siguiendo la metodología establecida para ello en el capítulo uno. Cuando las larvas llegaron al estadio prisma, se recolectaron en un tubo de microcentrífuga hasta obtener aproximadamente 50 mg en peso húmedo y se procedió con las extracciones de DNA.

El protocolo que se siguió fue el sugerido por los fabricantes del reactivo DNAzol (Invitrogen, no. Cat.10503-027). La extracción con DNAzol, se basa en el uso de un detergente de guanidina que al hidrolizar el RNA permite una precipitación selectiva con etanol al 100 %, de DNA del lisado celular. Una vez extraído el DNA es lavado con etanol. Después de dos lavados con etanol al 75 % se resuspendió el DNA en agua nanopura.

3.2 ELABORACIÓN DE LOS CEBADORES

Se diseñaron cebadores para el homólogo COUP-TF en la especie *Lytechinus pictus*, a partir de la secuencia descrita en el genbank del spCOUP-TF para la especie *Strongylocentrotus purpuratus* (código de acceso: L01104). Dicha secuencia presenta dos exones, el primero codifica para el dominio de unión al DNA y su tamaño es de 1438 pares de bases, el segundo, codifica una porción del dominio de unión al ligando con 961 pares de bases. La parte restante de este receptor se encuentra en un tercer exón no secuenciado por Chan et al. (1992).

Se realizó una alineación por medio del programa “Basic Local Alignment Search” (BLAST) del mismo genebank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/megablast/) para obtener la región más conservada entre especies.

El exón 1 presentó similitudes por debajo de las 80 pares de bases por lo que se descartó para la fabricación de los cebadores. El segundo exón se tomó como la región más conservada ya que éste es el que presentó mayor similitud entre los 200 y 700 pares de bases con respecto al resto de las especies. Los cebadores fueron creados para delimitar la región entre la base 250 y la base 650 del exón 2.

Se utilizó el programa “Fast PCR” (Ruslan Kalender, “Fast PCR”. www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm, 2003) para la creación de los cebadores. Sólo fue necesario introducir la secuencia y delimitar la región que se deseaba amplificar, la longitud óptima de los cebadores (generalmente entre 20 y 30 bases) y el porcentaje mínimo de guaninas o citosinas en el extremo 3' para asegurar que no se despegara una vez unido al DNA (se procuró un mínimo del 50 %). Con el mismo programa se realizaron las pruebas de complementariedad entre cebadores y se descartaron aquellos que formaban estructuras secundarias entre ellos o entre sí mismos.

Los cebadores fueron sintetizados a través de Invitrogen (Accesolab) y resuspendidos en amortiguador TE (ver soluciones) para lograr una concentración de trabajo de 50 μ M y de 10 μ M final, la cual fue utilizada para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto esperado en la amplificación fue de 455 pares de bases.

3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para las reacciones de PCR, se utilizó el “Taq PCR Core Kit” de QIAGEN (250 u, no. de catálogo. 201223) y un termociclador “i-Cycler (BIO-RAD).

El programa utilizado consistió en las siguientes temperaturas y tiempos:

Desnaturalización inicial	94 ° C	4 minutos	
Desnaturalización en ciclo	94 ° C	1 minuto	} 30 ciclos
Alineación	52 ° C	45 segundos	
Extensión	72 ° C	45 segundos	
Extensión final	72 ° C	7 minutos	
	4° C	infinito (opcional)	

Como reacción estándar de PCR se utilizaron las concentraciones indicadas en la tabla I

TABLA I. Concentraciones finales de cada reactivo en la reacción de PCR utilizado. El volumen se ajustó según las necesidades.

Reactivo	Concentración final en el tubo
Amortiguador de PCR (10 X)	1 X
Cebador FWD	10 µM
Cebador REV	10 µM
dNTP's	2 mM (cada uno)
DNA	Aprox. 15- 50 ng

Para encontrar las mejores condiciones de PCR se realizó un gradiente para determinar la temperatura de alineamiento de los cebadores con base en su T_M . La primera fue de 55 °C y la segunda de 52 °C. Se colocó un control negativo sin template a 55 °C y una reacción por especie en cada una de las condiciones anteriores.

3.4 SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

El producto obtenido del PCR fue purificado con el paquete Concert (GIBCO BRL, no. catálogo. 11458-023). El paquete consiste en columnas con una base de sílica que retiene el DNA de doble hebra y deja pasar aquellos residuos que no son de interés como los cebadores y reactivos propios de la reacción de PCR. Esto permite evitar que exista contaminación que interfiera en los resultados de la secuenciación.

Fueron necesarios 1 µg del producto purificado de DNA y 6.4 µM de cada uno de los cebadores (por separado), llevados a 12 µl con agua nanopura para cada reacción de secuenciación. Esta preparación se mandó al Microchemical Core Facility en San Diego State University (www.sci.edu/dnacore/sdsu_dnacore.htm) para obtener los cromatogramas.

Una vez obtenidos los cromatogramas, fueron procesados en el programa ChromasPro (www.technelysium.com.au/ChromasPro.html) para determinar la secuencia.

Nuevamente se realizó un BLAST dentro del genbank para verificar que el producto fuera en realidad un fragmento del receptor nuclear COUP-TF.

La secuencia obtenida fue alineada con el programa Mega[®] para determinar los sitios variables que presenta con respecto al exón 2 del spCOUP-TF de *Strongylocentrotus purpuratus* del genbank, región de la cual se diseñaron los cebadores.

3.5 PREPARACIÓN DE LA SONDA DE DNA

La sonda utilizada se marcó con un hapteno de digoxigenina y para ello se utilizó el "PCR DIG Probe Síntesis Kit" (Roche, no. de catálogo. 1636 090). El protocolo, esquematizado en la figura 2.2, consistió en una reacción de PCR, pero a la cual se le agregó un nucleósido de uracilo trifosfato marcado con digoxigenina en la mezcla de los deoxinucleósidos trifosfatados. Las temperaturas que se utilizaron fueron las mismas que se presentan en la sección 3.3 (Reacción en Cadena de la Polimerasa). El producto fue verificado mediante una electroforesis en gel de Agarosa al 1 %, y corroborado al presentar un peso molecular ligeramente mayor al producto esperado del PCR para amplificar el gen deseado. La cuantificación de la concentración del fragmento marcado fue realizada mediante una escalera de concentraciones conocidas.

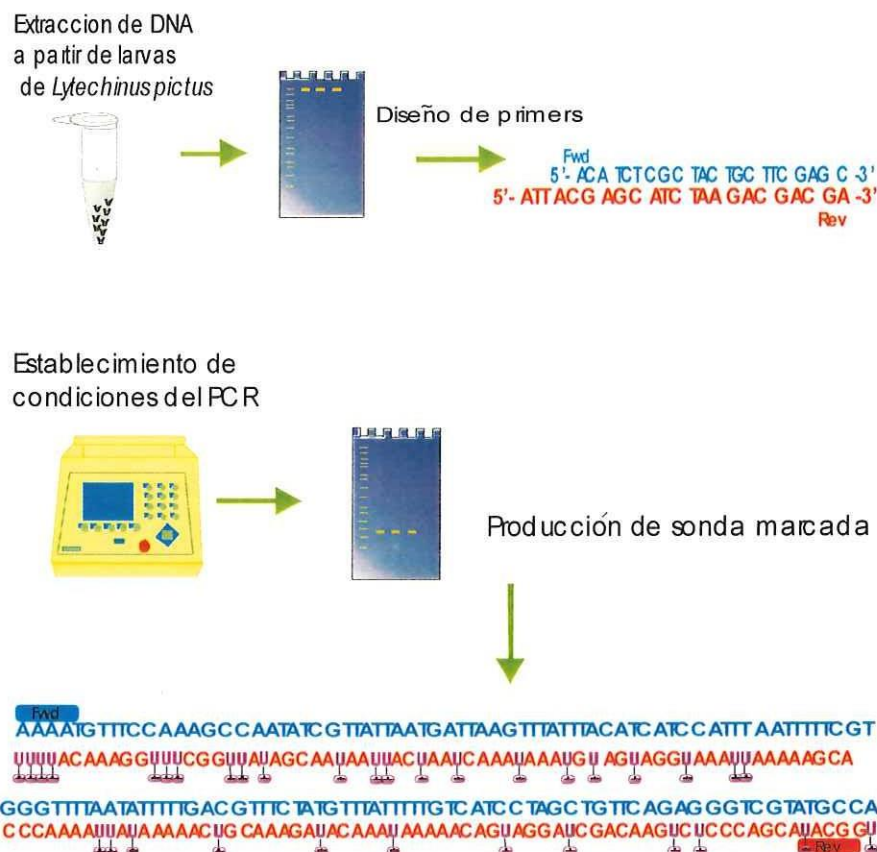


Figura 2.2. Esquema de los pasos a seguir para llevar a cabo la preparación de la sonda marcada con digoxigenina. Se inició con la extracción del DNA, se prosiguió con el diseño de cebadores o “primers”, y se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo la amplificación del gen por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hasta finalmente producir una sonda marcada con digoxigenina en sus uracilos trifosfatados (UTP).

3.6 PRETRATAMIENTO Y FIJACIÓN DE LA LARVA DE ERIZO DE MAR

El cultivo de larvas del erizo *Lytechinus pictus* fue monitoreado y una vez alcanzados los estadios larvales de seis y ocho brazos, se tomaron muestras, se les retiró el agua de mar y fueron fijadas en glutaraldehído al 2 % en agua de mar.

Posteriormente se deshidrataron en una serie de alcoholes hasta etanol al 70 % y almacenadas a -20 °C hasta su uso. La deshidratación consistió en colocar la larva por 10 minutos en cada una de las siguientes soluciones: 1) agua destilada, 2) 30 % etanol/70 % agua destilada, 3) 50 % etanol/50 % agua destilada, 4) 70 % etanol/30 % agua destilada.

Al momento de realizar las hibridaciones, fue necesaria una rehidratación de la larva con metanol en un amortiguador de fosfatos (PBS, ver anexo de soluciones). Las larvas se rehidrataron con una solución 70 % MeOH/30 % PBS y posteriormente una solución de 30 % MeOH/70 % PBS.

Se realizó un control con larva de erizo morado de seis brazos para corroborar la región de expresión del receptor spCOUP-TF reportado por Vlahou et al. (1996) y así confirmar que la sonda era específica para dicho receptor. A la larva de *S. purpuratus* se le dio un tratamiento distinto, fue recolectada y se le retiró el agua de mar, se enjuagó en cloruro de magnesio (ver anexo de soluciones) y fue fijada en paraformaldehído al 4 % en PBS, para seguir con el protocolo de hibridación.

3.7 HIBRIDACIONES *IN-SITU* "WHOLE MOUNT"

Se realizaron un total de cuatro hibridaciones *in-situ* "whole-mount" con base en los protocolos de Lepage et al. (1992) y Vlahou et al. (1996). Dos hibridaciones se llevaron a cabo en larva de seis brazos de *Lytechinus pictus*, en una de las cuales la larva fue incubada con proteinasa K. Para el estadio de ocho brazos de la especie *L. pictus* se realizó una hibridación sin la incubación con proteinasa K. El control con larva de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* fue de seis brazos sin la enzima.

Asimismo, sólo la hibridación de *L. pictus* de seis brazos incubada con proteinasa K y larva de ocho brazos fueron realizadas con sonda producida a partir del DNA de ésta misma especie. Las hibridaciones de larva de seis brazos de *L. pictus* sin proteinasa K y la de seis brazos en *S. purpuratus* se realizaron con sonda producida a partir del DNA de *S. purpuratus*.

En cada experimento que se condujo, existió un control negativo que consistió en larva del mismo estadio que fue manipulada de igual manera pero durante el proceso de hibridación no se le adicionó sonda.

Las modificaciones a los protocolos de Lepage et al. (1992) y Vlahou et al. (1996) fueron las siguientes: se omitió la incubación con proteinasa K después de observar que ésta provocaba que la larva no resistiera el proceso de hibridación y porque la permeabilización de la sonda era buena sin ella. La refijación con paraformaldehído al 4 % se llevó a cabo en hielo o a 4 °C, seguido de una serie de lavados con PBST (ver anexo).

Después de los lavados se removió el PBST y se colocó la solución de hibridación (ver anexo) para prehibridizar por una hora a 50 °C en un horno de hibridación rotacional. La sonda (cuya concentración aproximada fue de 150 ng, en 10 µl de solución de hibridación) se calentó a 100 °C por 5 min. Este paso se realizó durante los últimos 5 minutos de la hora de prehibridación para asegurar que el DNA permaneciera como cadena sencilla.

Inmediatamente al término de los 5 minutos, la sonda fue puesta en un baño de hielo y alcohol para posteriormente adicionarla al tubo que permanecería a 50 °C y girando en el horno de hibridación rotacional toda la noche (16 horas aproximadamente).

Los lavados para remover sonda inespecífica se realizaron una vez con PBS, seguida por tres lavados de PBS a 50 °C por 20 min cada uno. A continuación se realizaron tres lavados a 60 °C por 20 minutos cada uno con 0.1 X de una solución salina estándar (SSC, ver anexo) y 0.1 % Tween-20 (ver anexo), finalizando con uno a temperatura ambiente previo al bloqueo.

El bloqueo se realizó con suero de chivo (Sigma, no. catálogo. G9023) al 4 % en PBST por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se incubó con una proporción 1:750 de anti-DIG (Roche, no. catálogo. 1093274) en suero de chivo al 2 % en PBST por dos horas a 4°C. Terminadas las incubaciones las larvas se lavaron extensivamente en TBST (ver anexo), 8 veces por 15 minutos cada una.

Posteriormente se les adicionó la solución de tinción (ver anexo de soluciones) y los substratos cromogénicos NBT/BCIP (Boehringer Mannheim, no. catálogo. 1093657).

Para 1 ml de solución de tinción se agregaron 4.5 µl de NBT y 3.5 µl del BCIP. Se colocó en un lugar oscuro para evitar la oxidación de los cromógenos y se dejó entre 2 y 4 horas a temperatura ambiente hasta que se pudiera observar la tinción en las larvas.

Las larvas se fijaron en una solución de glicerol al 50 % en TBST y se montaron sobre un portaobjeto para ser observadas con la ayuda de un microscopio Axioscope (Zeiss). Para las fotografías se utilizó una cámara digital Cybershot de Sony con el objetivo de 10 X.

Las hibridaciones se llevaron a cabo en cajas con 12 pozos (BD Falcon, no. catálogo U-13008-D8) a excepción de la prehibridación e hibridación, las cuales se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga.

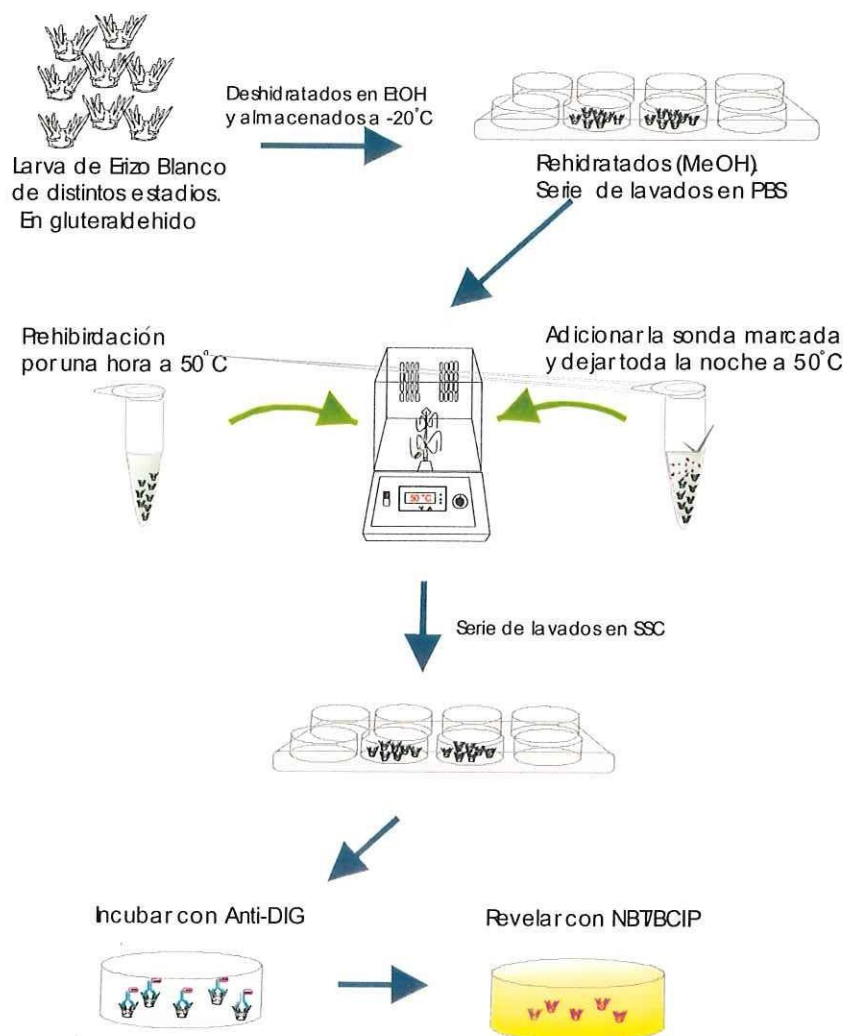


Figura 2.3. Esquema de hibridación *in-situ* "whole mount". Inicia desde la fijación de larva en glutaraldehído, deshidratación y rehidratación en una serie de alcoholes, lavados, prehibridación e hibridación, así como los lavados para eliminar la sonda no hibridizada. Se continuó con su incubación con el anticuerpo producido contra digoxigenina y su reveló con los substratos cromogénicos NBT/BCIP, los cuales mostraron un color morado/azul en las zonas donde se encontró expresándose el gen buscado.

4. RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN DE DNA

Se obtuvo DNA a partir de larvas en estadio prisma de las dos especies de erizo, *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. En ambos casos a partir de 50 mg de peso húmedo de larva, se obtuvieron concentraciones por encima de 200 ng/μl.

Fue necesario realizar diluciones en cada especie para obtener una concentración final de 15-30 ng/μl.

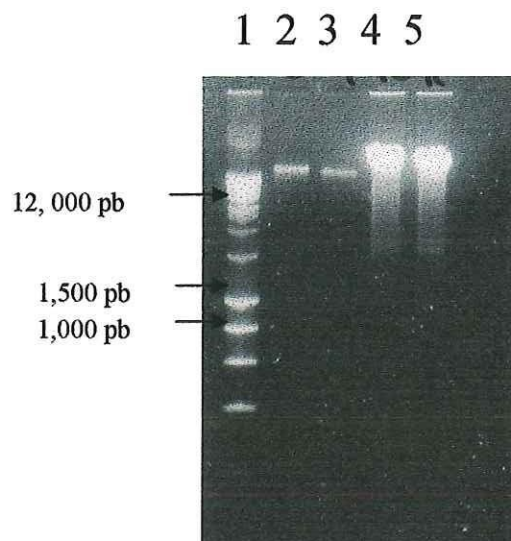


Figura 2.4. Electroforesis que muestra el DNA obtenido de larva prisma de *Strongylocentrotus purpuratus* como de *Lytechinus pictus*, así como las diluciones utilizadas en el PCR. En el carril 1 se muestra la escalera de 100 pares de bases. Carril 2 y 3 son las diluciones 1:50 y 1:30 de *S. purpuratus* y *L. pictus* respectivamente. 4 y 5 muestran los originales de *S. purpuratus* y *L. pictus*. Características del gel: agarosa al 1.2 %, 80 volts por 1.5 h, revelado con Bromuro de Etidio.

4.2 CEBADORES

Las secuencias y características de los cebadores diseñados se presentan a continuación:

Cebador “Forward” (sentido)

5' ACA TCT CGC TAC TGC TTC GAG C 3'

Temperatura de fusión (TM) 55.8 °C

Cebador “Reverse” (antisentido)

5' ATT ACG AGC ATC TAA GAC GAC GA 3'

Temperatura de fusión (TM) 54.5 °C

4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El producto esperado fue de aproximadamente 455 pares de bases y en el caso de *Strongylocentrotus purpuratus* se presentó una banda tenue a 55 °C lo que indicó especificidad. Por su parte *Lytechinus pictus* mostró una banda tenue a 52 °C, por lo que se tomó ésta temperatura para realizar las amplificaciones para asegurar una mayor astringencia (fig. 2.5)

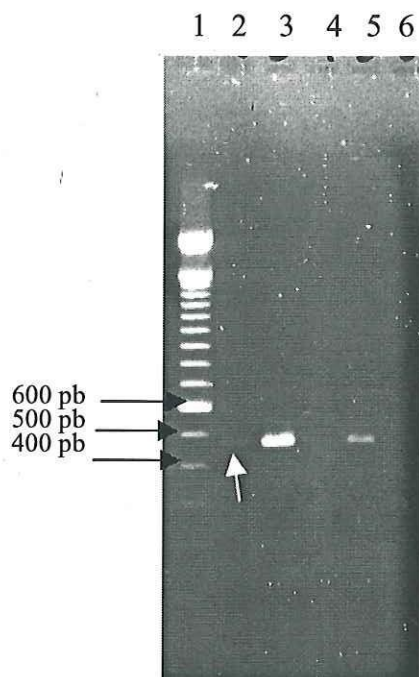


Figura 2.5. Electroforesis que muestra los productos obtenidos en la amplificación por medio de PCR. El carril 1 muestra la escalera de 100 pares de bases. Los carriles 2 y 3 muestran los productos de PCR para *Strongylocentrotus purpuratus* a 55 °C y 52 °C respectivamente, nótese la banda tenue en el carril 2 (flecha). Los carriles 4 y 5 pertenecen a los productos en *Lytechinus pictus* en 55 °C y 52 °C respectivamente (el carril 4 carece de banda). El carril 6 muestra el control negativo. Características del gel: agarosa al 1.2 %, 80 volts por 1.5 h, revelado con Bromuro de Etidio.

4.4 SECUENCIACIÓN

La secuencia obtenida constó de 433 bases nucleotídicas una vez eliminados los cebadores. El alineamiento en el programa BLAST del genbank mostró al spCOUP-TF de la especie *Strongylocentrotus purpuratus* como la secuencia que posee una mayor semejanza con la secuencia encontrada. Presentaron semejanzas menores a la secuencia amplificada, receptores huérfanos incluyendo COUP-TF en otras especies, generalmente de vertebrados, sin embargo sólo presentan una semejanza de entre 80 y 200 bases (fig. 2.6).

Distribution of 92 Blast Hits on the COUPTF Sequence

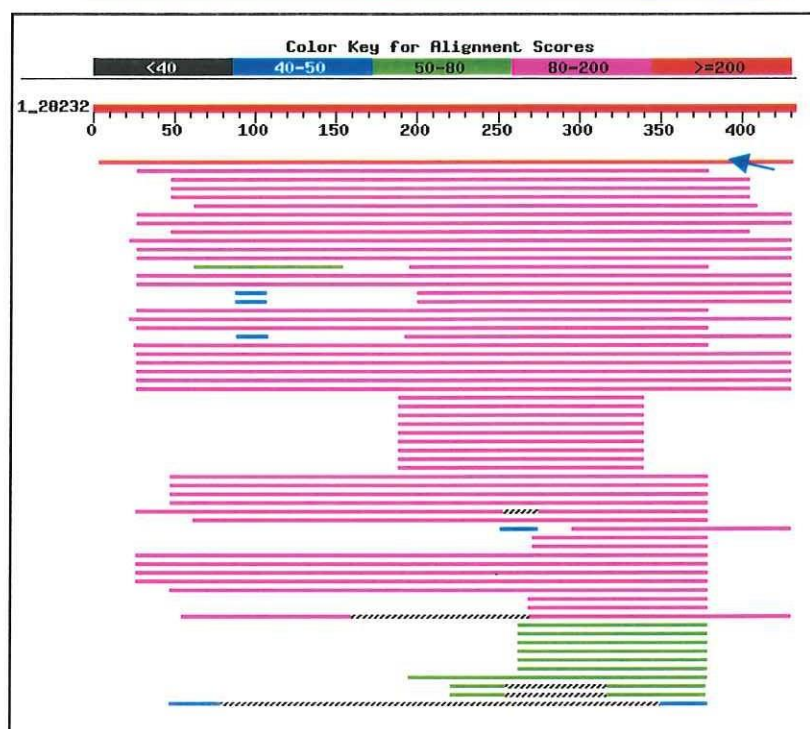


Figura 2.6. Alineación realizada en el BLAST del genbank. La línea roja (flecha) consiste en la secuencia del spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus* que se asemeja en más de 200 bases a la secuencia reportada en este trabajo. El resto de las líneas representan secuencias que poseen una semejanza de entre 80 y 200 bases.

La figura 2.7 muestra la secuencia del exón 2 a partir de la base 239, se considera ésta posición como la inicial en el análisis de la secuencia. En *L. pictus* se presentaron sólo siete cambios a lo largo de la secuencia, el resto permanece igual a la secuencia en *S. purpuratus*.

El fragmento secuenciado del COUP-TF en el género *Lytechinus pictus* se encuentra muy conservado con respecto al exón 2 de spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus*, como lo muestra el alineamiento en el programa Mega® (fig. 2.7).

La primera observación es en la posición 8 donde existe un cambio puntual de un nucleótido, una timina en lugar de una adenina. El mismo caso ocurre en la posición 9, siendo el cambio una adenina por una timina. Las posiciones de éstas bases se encuentran invertidas con respecto a la secuencia de *S. purpuratus*. Dos mutaciones puntuales, una inserción y una delección, ocurren en las posiciones 29 y 40 respectivamente.

La posición 278 presenta una base purínica (adenina o guanina), la cual sólo se señala como tal, puesto que los picos del cromatograma de la secuencia presentaban igual magnitud en ambas bases. Lo anterior hace difícil determinar la base nucleotídica de ésta posición (fig. 2.8 A).

De igual manera, en la posición 417 se señala la presencia de una base nucleotídica que pudiera ser una adenina o una timina. Al igual que en el caso anterior, los picos del cromatograma presentaban igual magnitud y no fue posible determinar con exactitud la base nucleotídica correspondiente (fig. 2.8 B).

5'

```

1      8 9      2 9      4 0
E2 TGAGCCCA TC CCGACGTCGC GTTACGCCA GTGCATGCA GACCAACTCA GTAATGGGCA TCGACAACAT CTGCGAGCTC
S  TGAGCCCTAC CCGACGTCGC GTTACGCCA GTGCATGCA GACCAACTCA GTAATGGGCA TCGACAACAT CTGCGAGCTC

E2 GCAGCCCGGC TCCTCTTCAG CGCCGTCGAG TGGGCTA GGA ACATCCCTTT CTTCCCCGAC CTCCAAGTCA CTGACCAAGGT
S  GCAGCCCGGC TCCTCTTCAG CGCCGTCGAG TGGGCTA GGA ACATCCCTTT CTTCCCCGAC CTCCAAGTCA CTGACCAAGGT

E2 GGCCTTGCTC AGGATGTGCT GGAGCGAGCT CTTCTGCCTC AACGCGTCGC AGTGTTTCGAT GCCCCTCCAC GTCGCCCCGC
S  GGCCTTGCTC AGGATGTGCT GGAGCGAGCT CTTCTGCCTC AACGCGTCGC AGTGTTTCGAT GCCCCTCCAC GTCGCCCCGC

E2 TCCTCGCTGC GTCGGGACTC CACGCCAGCC CGATGTCGGC CGACCGCGTG GTCGCTTTCA TGGACCATAT CCGTATTTTC
S  TCCTCGCTGC GTCGGGACTC CACGCCAGCC CGATGTCRGC CGACCGCGTG GTCGCTTTCA TGGACCATAT CCGTATTTTC

E2 CAGGAACAAG TTGAAAAACT GAAAGCGTTA CACGTGGACT CGGCAGAGTA TAGCTGTATC AAGGCAATTG TACTCTTCAC
S  CAGGAACAAG TTGAAAAACT GAAAGCGTTA CACGTGGACT CGGCAGAGTA TAGCTGTATC AAGGCAATTG TACTCTTCAC

E2 GTCAGGTGAG TTTTAA CACA GAGTGGCTCA TCA
S  GTCAGGTGAG TTTTAA WACA GAGTGGCTCT ACA

```

3'

E2: Exón 2 del spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus*

S: Secuencia obtenida en *Lytechinus pictus*

A: Adenina

G: Guanina

T: Timina

R: Adenina o Guanina

C: Citosina

W: Adenina o Timina

Figura 2.7. Alineamiento realizado en el programa Mega® y regiones que presentaron modificaciones con respecto a la secuencia consenso. E2, consiste en la secuencia consenso del spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus* a partir de la base 239. S, representa la secuencia del presente trabajo, obtenida a partir de DNA de *Lytechinus pictus*.

Por último ocurren cambios puntuales en las posiciones 430 y 431 donde una adenina es sustituida por una timina y viceversa, presentando la misma posición invertida que en las posiciones 8 y 9.

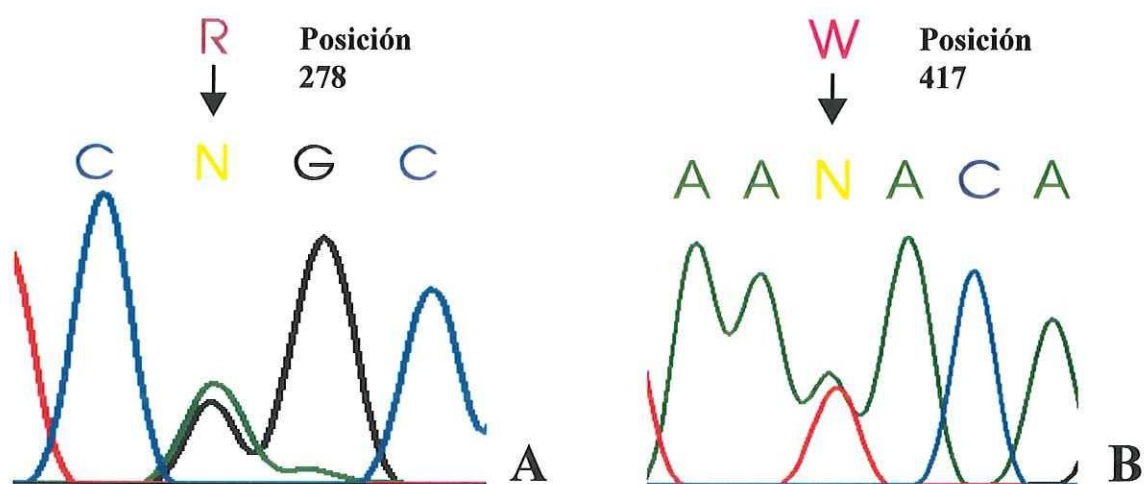


Figura 2.8. Cromatogramas de las posiciones 278 (A) y 417 (B) donde surgieron problemas para identificar la base nucleotídica por la semejanza en los picos del cromatograma. Debido a lo anterior se señala de acuerdo a la nomenclatura de secuencias como R (Adenina o Guanina) y W (Adenina o Timina).

4.5 PRODUCCIÓN DE SONDA MARCADA

Se obtuvieron dos tipos de sonda, una con DNA de *Lytechinus pictus* y la segunda con DNA de *Strongylocentrotus purpuratus*. Esta última fue necesario producirla por carecer en un momento de larva de *L. pictus* para realizar las extracciones. Sin embargo, el rendimiento fue mejor en *S. purpuratus*. En promedio se produjeron aproximadamente 500 ng de sonda por microlitro de reacción.

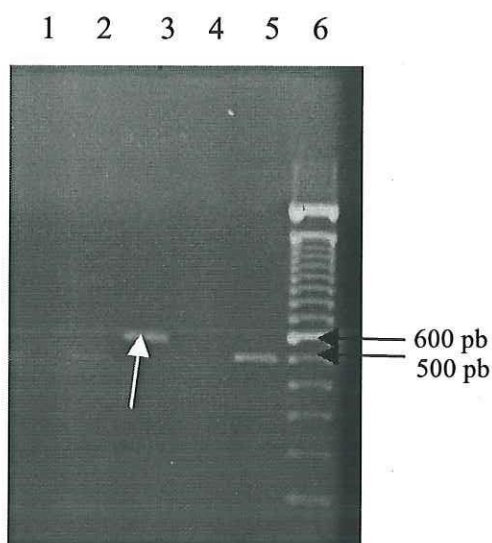


Figura 2.9. Electroforesis que muestra la sonda marcada a partir de DNA de *Lytechinus pictus* (*S.purputatus* no se muestra). En el carril 6 se presenta la escalera de 100 pares de bases. En el carril 5 se muestra un control de producto amplificado en las mismas condiciones sin el dig-UTP para verificar el tamaño de 455 pares de bases aproximadamente. El carril 3 muestra el producto amplificado con el dig-UTP incorporado (flecha), nótese el mayor tamaño con respecto al producto presente en el segundo carril. Los carriles 1 y 2 son controles propuestos por el mismo kit con el cual se realizó el marcaje de sonda, un control sin marcar (1) y una reacción preestablecida donde se incluye el template y cebadores (2). El carril 4 carece de muestra. Características del gel: agarosa al 1.2 %, 80 volts por 1.5 h, revelado con Bromuro de Etidio.

4.6 HIBRIDACIONES *IN-SITU* “WHOLE-MOUNT”

La larva de *Lytechinus pictus* presentó como característica en su desarrollo, brazos no definidos y que tomaban una forma ondulada, haciendo difícil la asignación de los estadios por el número de brazos por lo que su grado de desarrollo se cuantificó con base en el desarrollo del rudimento juvenil. En *Strongylocentrotus purpuratus*, la larva presentó brazos elongados que permitieron la asignación del estadio por el número de los mismos (fig. 2.10)

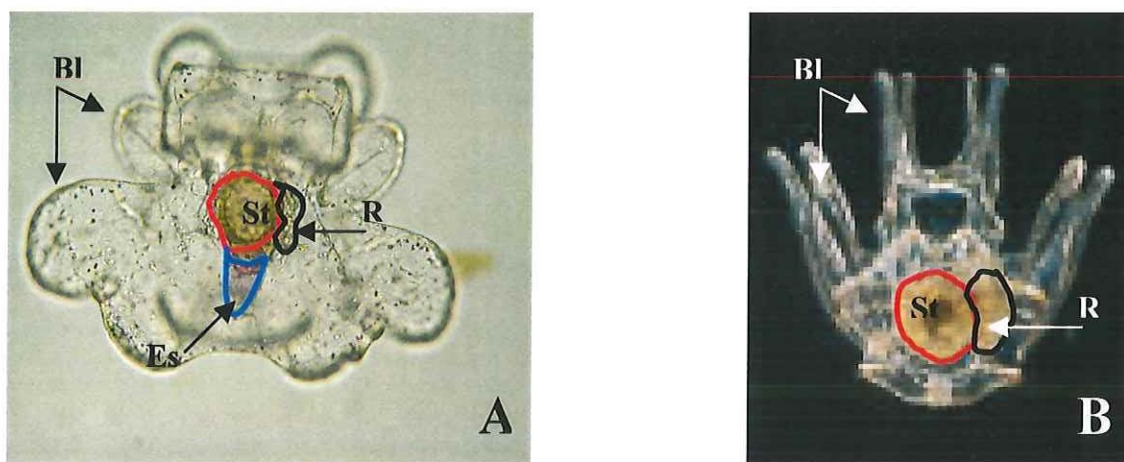


Figura 2.10. Comparación entre la morfología de una larva de *Lytechinus pictus* (A) y de *Strongylocentrotus purpuratus* (B). Nótese en *L. pictus* los brazos indefinidos en comparación con la larva de *S. purpuratus* que se encuentra casi competente y con los brazos diferenciados. Foto de *L. pictus*, Gerardo Amador. Larva de *S. purpuratus* tomada de <http://www.archivescanada.ca/english/virtual/search.asp?action=all>. Estructuras observadas: estómago (St), esófago (Es), rudimento (R) y brazos larvales (BI).

La larva de *Lytechinus pictus* que fue fijada en gluteraldehído y luego deshidratada en etanol, conservó sus estructuras y su forma (fig. 2.11), sin embargo, al rehidratar en metanol/PBS se volvía amorfa, y fue difícil apreciar las estructuras.

El estómago fue una de las estructuras que se pudo distinguir con claridad en todas las larvas rehidratadas, por lo que se tomó como referencia para determinar las regiones de la larva.

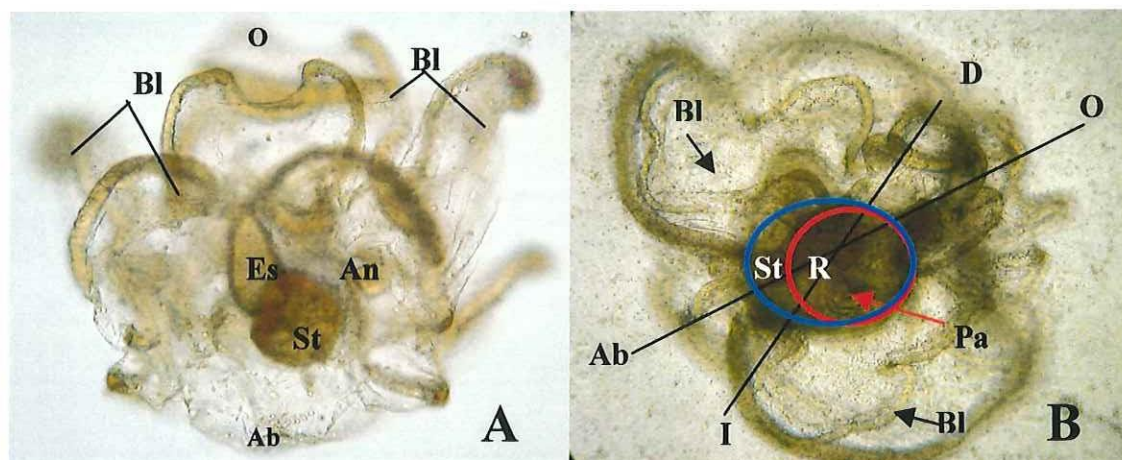


Figura 2.11. Comparación de la morfología de una larva de *Lytechinus pictus* del mismo estadio deshidratada en una serie de alcoholes y almacenada a -20°C (A) y después de haber sido rehidratada en metanol/PBST (B). Abreviación para las estructuras observadas: Esófago (Es), estómago (St), ano (An), brazos larvales (Bl), rudimento (R), pies ambulacrales (Pa). El eje observado en la figura B, muestra la región oral (O), aboral (Ab), izquierda (I), derecha (D). Las fotos fueron tomadas a 10 X.

La hibridación realizada con larva de seis brazos de *Lytechinus pictus* y que fue incubada con proteinasa K, resultó frágil para manipular y al finalizar el proceso de hibridación se desintegraba, perdiendo parte de la banda ciliada y probablemente otras estructuras. El patrón de expresión en estas larvas se encontraba localizado en la región del estómago y posiblemente en células del ectodermo aboral (fig. 2.12 B) asimismo, el estómago presentó una región en donde se está expresando el receptor COUP-TF (fig. 2.12 C).

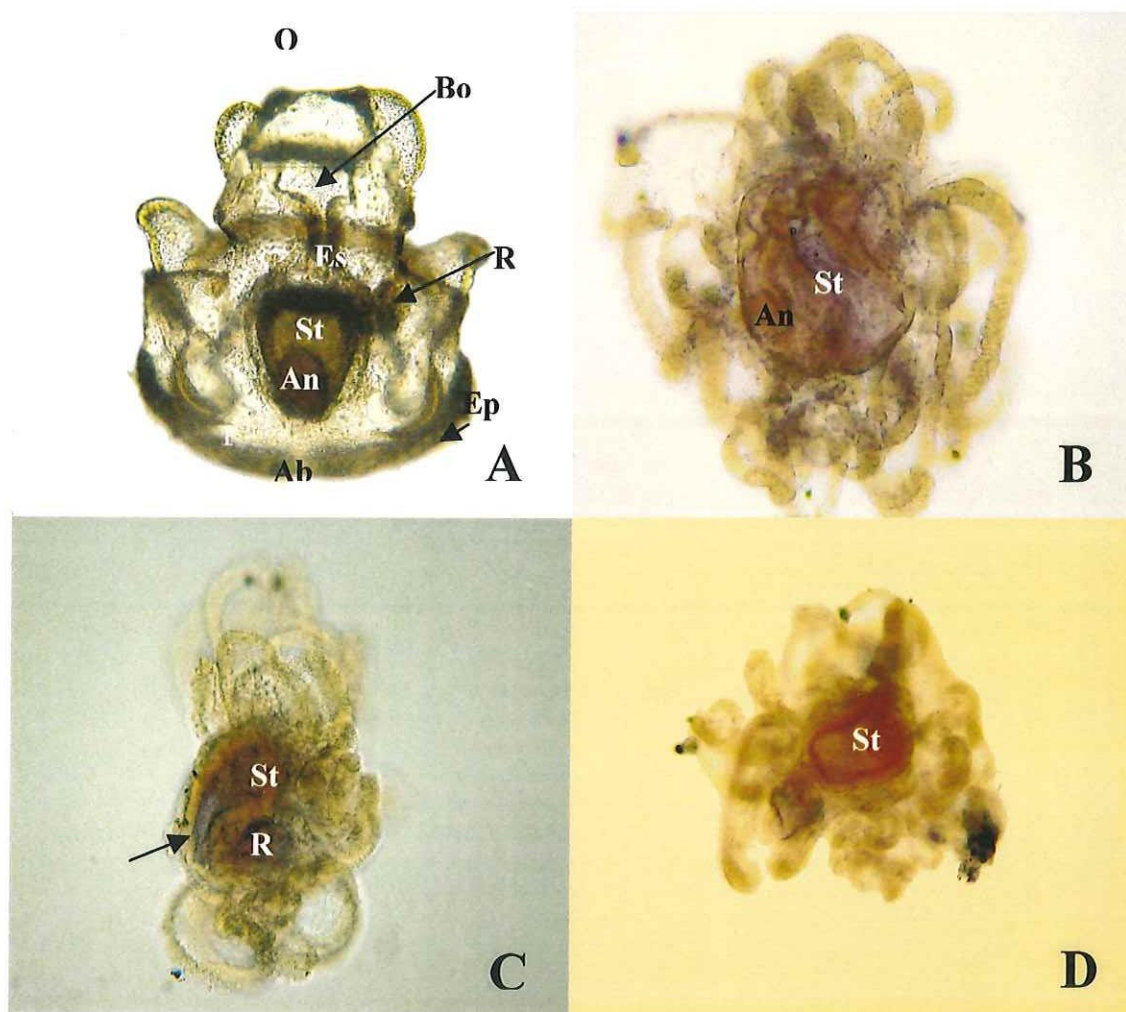


Figura 2.12. Localización del COUP-TF en larva de 15 días (6 brazos) de *Lytechinus pictus* incubada con proteinasa K y sonda de *L. pictus*. (A) larva de la misma edad fijada en formaldehído para mostrar las estructuras presentes en este estadio. (B) Expresión del COUP-TF localizado alrededor del estómago de la larva y (C) en una región aparentemente del estómago. (D) larva pasada por el proceso de hibridación sin sonda en la cual no se presenta señal. Abreviaciones: (Es) esófago, (St) estómago, (An) ano, (Ep) epauletes, (R) rudimento, (Ab) aboral, (O) oral, (Bo) brazos orales. Las fotos fueron tomadas a 10 X.

La larva de seis brazos de *L. pictus* que no fue incubada con proteinasa K, fue una larva que resistió la manipulación y el proceso de hibridación. Sin embargo la morfología característica de la especie y fotografías de mediana calidad, nos impidió determinar con exactitud cuales estructuras eran las que presentaron la expresión del COUP-TF.

En la hibridación de larva de seis brazos de *L. pictus* que no fue tratada con proteinasa K, se observaron dos patrones distintos en la expresión del receptor COUP-TF. Algunas larvas presentaron una señal intensa a lo largo de la banda ciliada y brazos orales (fig. 2.13 B), pero la mayoría de las larvas de éste estadio mostró una señal localizada en la región de las estructuras del estómago, esófago y boca (fig. 2.13 C, D, E). Es posible que se trate del ectodermo aboral que rodea a éstos órganos, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la señal de expresión pueda encontrarse delimitada a un órgano en particular, en éste caso, el estómago, que es la estructura donde aparentemente se localizó dicha señal.

En el control negativo de este experimento se observaron larvas que presentaban una señal en regiones de la banda ciliada y brazos orales, sin embargo, no era un patrón definido y posiblemente se trate de precipitación del colorante (fig. 2.14).

Para la larva de 19 días u ocho brazos de *Lytechinus pictus*, se observó un patrón similar a la larva de seis brazos. En el estómago, se observó que en una región opuesta al rudimento se expresaba el receptor COUP-TF (fig. 2.15 C, D). Asimismo, en lo que parece ser el esófago, existe también una señal de la expresión del COUP-TF en éste órgano (fig. 2.15 B, C y D). No se observó una señal en la larva a la cual no se le adicionó la sonda (no se presenta foto).

El patrón de expresión que presentó la larva de seis brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* fue similar al observado por Vlahou et al. (1996) en larvas pluteus. La banda ciliada y brazos orales son las regiones en las cuales se expresa el receptor spCOUP-TF en ésta especie (fig. 2.16).

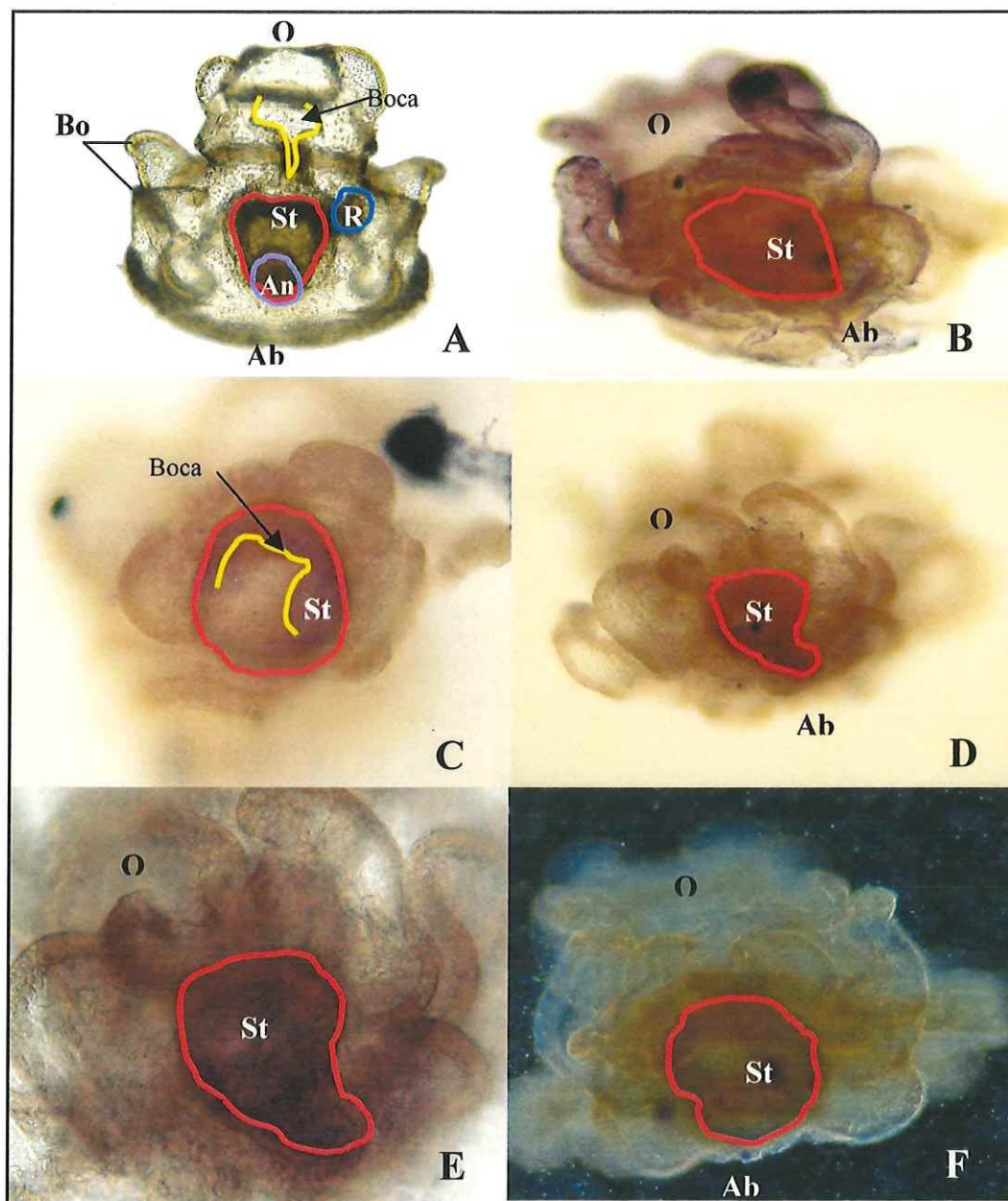


Figura 2.13. Patrón de expresión del COUP-TF en larva de 15 días (6 brazos) de *Lytechinus pictus* utilizando sonda de *S. purpuratus*. El estómago se presenta en rojo, la boca en amarillo. (B) muestra una señal a lo largo de la banda ciliada y brazos orales, sin encontrarse aparentemente una señal en la región del estómago. (C), presenta una larva vista desde el extremo oral y se observa una señal que aparentemente se localiza en el estómago que se encuentra por debajo de la boca, circundándola (rojo). (D), expresión localizada en la región del estómago. (E), larva anterior a 20 X donde se confirma la expresión sólo en la región del estómago. (F), larva que fue sometida al proceso de hibridación sin sonda. La región del estómago se encuentra delimitada en rojo y no se observa señal, tampoco en los brazos orales. Abreviaciones: (St) estómago, (R) rudimento, (An) ano, (Bo) brazos orales, (O) oral, (Ab) aboral. Fotos tomadas a 10 X.

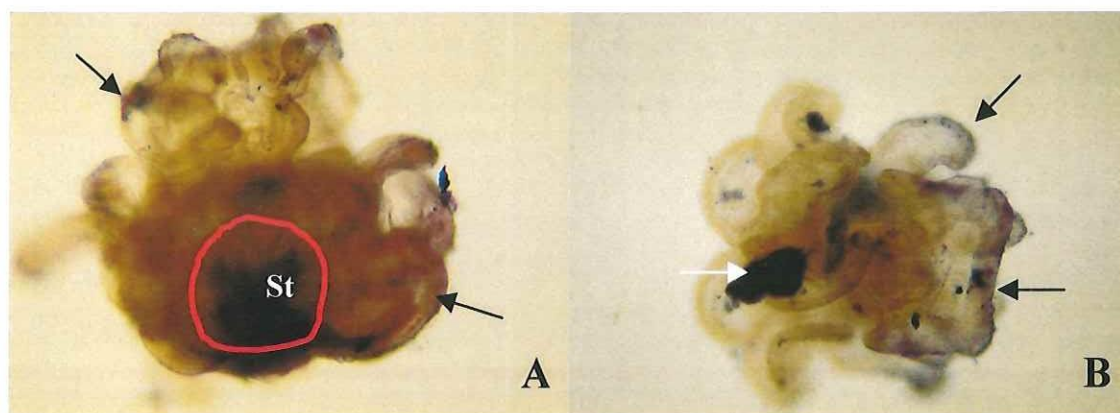


Figura 2.14. Larvas de seis brazos sin proteinasa K de *Lytechinus pictus* que conforman parte del control negativo que presentaron una aparente señal en la región de la banda ciliada y brazos orales (flechas). Así también cristales del colorante (B), (flecha blanca). La región del estómago se encuentra delimitada en rojo. Abreviaciones: (St) estómago. Fotos tomadas a 10 X.

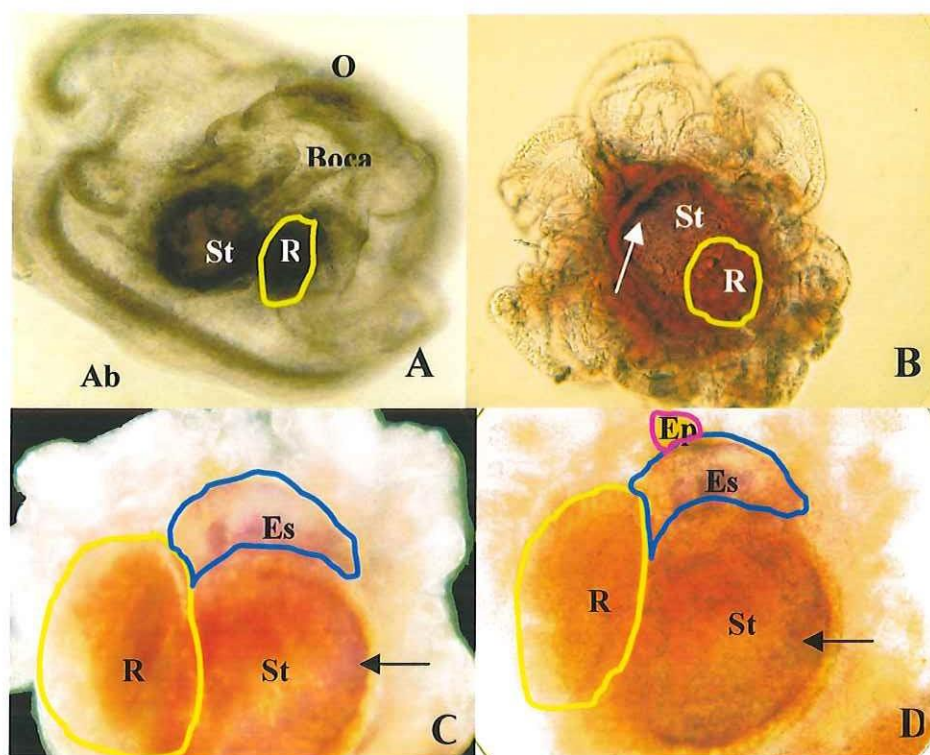


Figura 2.15. Larva de 19 días (ocho brazos) de *Lytechinus pictus* con sonda de la misma especie. El rudimento ya se encuentra formado (amarillo), así como los epauletes y pedicelaria (A). La expresión del COUP-TF se encuentra localizado en una región superior al estómago posiblemente se trate del esófago (B), (flecha). Existe una señal en la región del estómago opuesta al rudimento (C y D) (flechas). El esófago presenta una señal fuerte en este estadio (C y D). Abreviaciones: (St) estómago, (R) rudimento, (Es) esófago, (Ep) epauletes, (O) oral, (Ab) aboral. Fotos tomadas a 10 X (A y B) y a 20 X (C y D). No se presenta foto del control negativo sin sonda.

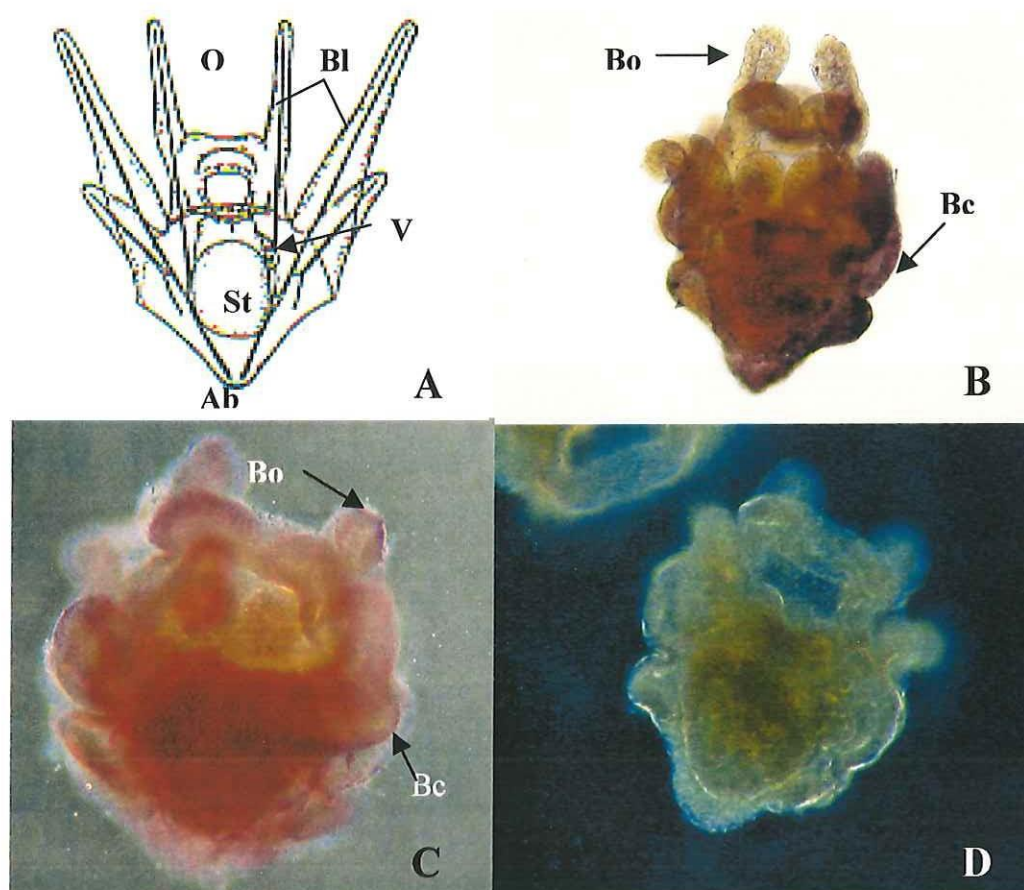


Figura 2.16. Localización del spCOUP-TF en larva de seis brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* con sonda de la misma especie. El receptor spCOUP-TF se expresa en los brazos orales y banda ciliada (B, C). Sin sonda (D) no presenta señal de expresión. Abreviaciones: (St) estómago, (V) vestibulo, (Bl) brazos larvales, (Bc) banda ciliada, (Bo) brazos orales, (O) oral, (Ab) aboral. Figura (A) Tomada de Chino et al. (1994).

5. DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIÓN DE DNA Y AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE COUP-TF EN *Lytechinus pictus*

El DNA obtenido de la extracción por medio del detergente de guanidina fue de buena calidad para la realización del PCR. Para las dos especies (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*) fue posible obtener el fragmento del COUP-TF por medio de PCR. El rendimiento durante las reacciones siempre fue mayor en *S. purpuratus*, esto se debió a la especificidad de los cebadores que fueron diseñados a partir del gen reportado para ésta misma especie.

5.2 SECUENCIACIÓN

La secuencia obtenida en éste trabajo, es una primera aproximación a la secuenciación del homólogo del receptor huérfano COUP-TF en *Lytechinus pictus*.

El fragmento obtenido del COUP-TF en la especie *Lytechinus pictus* se encuentra conservado con respecto al exón 2 del spCOUP-TF en *Strongylocentrotus purpuratus* reportado por Chan et al (1992), por lo que suponemos se trata de una región que se encuentra dentro del dominio de unión al ligando en *L. pictus*. El dominio de unión al ligando esta conservado a lo largo de la escala filogenética puesto que determina la clasificación del receptor dentro de la superfamilia de receptores de hormonas esteroides/tiroideas y dentro del grupo de receptores huérfanos (Mangelsdorf et al., 1995b).

Al presentarse sólo siete cambios a lo largo de la secuencia obtenida del COUP-TF, nos muestra diferencias mínimas entre géneros ya que el 98 % de la secuencia permanece igual en las dos especies. Sin embargo, al sólo secuenciar un fragmento del dominio de unión del ligando del receptor en *L. pictus*, es imposible determinar si en la totalidad del gen se presenten más alteraciones, o si la región de unión al DNA posea diferencias específicas de especie con respecto a *Strongylocentrotus purpuratus*, aún cuando no se han reportado en otros organismos. Una vez obtenida la totalidad de la secuencia del receptor será posible determinar las diferencias específicas de especie existentes en el receptor COUP-TF de estos dos géneros de erizo de mar.

Dentro de las mutaciones encontradas existieron dos posiciones en las cuales fue imposible determinar con exactitud la base correspondiente por la similitud en los picos del cromatograma, éste fenómeno se podría explicar como un sitio polimórfico de un nucleótido (SNP), que son variaciones comunes entre individuos. Al haber obtenido el DNA de un conjunto de larvas, ésta suposición se ve validada.

La cantidad de modificaciones encontradas en el fragmento obtenido nos sugieren un mínimo de diferencias en el dominio de unión al ligando entre los dos géneros de erizo de mar, es probable que la mayoría de las diferencias, en caso de existir, se localicen en el dominio de unión al DNA.

5.3 EXPRESIÓN DEL RECEPTOR COUP-TF

No existe un reporte previo del patrón de expresión del receptor COUP-TF en larvas de estadios posteriores a pluteus de cuatro brazos para ninguna especie de erizo de mar. Vlahou et al. (1996) reportaron la expresión espacio-temporal durante la embriología de las especies de *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus* sólo hasta larva pluteus de cuatro brazos.

En el presente trabajo los patrones de expresión del receptor COUP-TF observados en las larvas de seis y ocho brazos de *Lytechinus pictus*, difieren de aquella reportada para larva pluteus de cuatro brazos. Es de esperar que existan diferencias puesto que en el estadio de seis brazos inicia la formación del rudimento juvenil.

En la larva de seis brazos de *L. pictus* se observaron dos patrones de expresión: i) en la banda ciliada y brazos orales, y ii) en la región del ectodermo aboral que rodea a los órganos como el estómago, esófago y ano. Estas diferencias pueden deberse a que en un mismo cultivo algunas larvas se desarrollaron asincrónicamente y al momento de realizar la fijación se tomaron larvas que se encontraban retrasadas en su desarrollo con respecto a las demás.

Como la mayoría de las larvas no presentaron una señal en la banda ciliada se sugiere que aquellas que lo presentaron se encontraban menos desarrolladas que el resto y probablemente se encontraban en el estadio temprano de seis brazos en el cual el rudimento no ha empezado a formarse.

La señal en la banda ciliada desapareció una vez que aparece la señal en la región del ectodermo aboral, esto sugiere que a partir del momento en que el rudimento juvenil empieza a conformarse, el COUP-TF es requerido en ésta región y probablemente sea en el somatocele que rodea a los órganos del estómago, esófago e intestino.

No existieron diferencias en el patrón de expresión en larva de *L. pictus* cuando fue utilizada sonda producida a partir de *S. purpuratus*, lo que indica homología entre las especies, la cual se confirma por la similitud de la secuencia presentada en éste trabajo.

Cuando a la larva no se le adicionó sonda, no se observó señal en las regiones del ectodermo aboral, lo que confirma que en realidad se trata de la expresión del receptor y no precipitación del colorante. Sin embargo, en algunos controles, larvas sin sonda presentaron una ligera coloración en algunas regiones de la banda ciliada y brazos orales, sin embargo, se presentó en zonas aisladas y no sigue un patrón, por lo que no se descartó que la señal observada en la banda ciliada y brazos orales fuera expresión del COUP-TF.

En la larva de ocho brazos de *Lytechinus pictus*, se observó que la señal ahora se localiza en los órganos del estómago y posiblemente el esófago, a diferencia de la larva de seis brazos en la que se observó una señal en toda la región que corresponde a los órganos del estómago y esófago.

Las hibridaciones en larva de seis brazos de *Strongylocentrotus purpuratus* se realizaron para confirmar el patrón de expresión antes observado en ésta especie por Vlahou et al. (1996). La larva se encontraba en un estadio temprano de seis brazos, por lo que se cree aún no presentaba una invaginación del vestíbulo.

El patrón de expresión en *S. purpuratus*, dado a lo largo de la banda ciliada y brazos orales, confirman que nuestro fragmento de 455 pares de bases consiste en una porción del COUP-TF y que los resultados obtenidos representan la expresión de dicho receptor nuclear.

En el erizo de mar *S. purpuratus*, la expresión del spCOUP-TF se confinaba al ectodermo oral y a la banda ciliada, esto para la larva pluteus de cuatro brazos (Vlahou et al., 1996). Nuestros resultados indican que en la larva de seis brazos de *L. pictus* se conserva en parte este patrón, sin embargo, en la larva de ocho brazos este patrón no se aplica.

Existe una variante al menos del COUP-TF denominada COUP-TF II. En ratones y pollos se ha observado que este receptor huérfano COUP-TF II generalmente se expresa en el estómago y otros órganos derivados del endodermo como el esófago (Qiu et al., 1994b; Pereira et al., 1995). Por otra parte Lu et al. (1994) reportan la expresión de COUP-TF en el estómago, intestino y esófago, incluso en un gradiente dorso-ventral en la expresión del estómago, en adición al patrón de expresión neurógena que se le atribuye. Por estos antecedentes las señales observadas en el esófago y estómago del presente trabajo pudieran atribuirse a la expresión del COUP-TF.

Retomando la sugerencia de Vlahou de una función neurógena para el receptor spCOUP-TF, se comparó el patrón de expresión obtenido en éste trabajo con la descripción del sistema nervioso de la larva de la especie de erizo de mar *Strongylocentrotus droebachiensis* realizado por Bisgrove et al. (1987) que reportó el desarrollo del sistema nervioso hasta la competencia de la larva.

Si retomamos nuestros resultados, es posible sugerir una relación entre el COUP-TF y las células nerviosas que ocurren en las regiones donde se está expresando el receptor. Un reporte previo ya menciona un plexo de axones que rodean el esófago en larva de ocho brazos, asimismo, en éste mismo estadio, reportan células nerviosas en la parte baja del estómago (Bisgrove et al., 1987).

Para la larva de seis brazos, las células nerviosas reportadas por Bisgrove et al. (1987) se localizan en el ganglio apical y a lo largo de la banda ciliada, esto no se puede relacionar con el patrón de expresión de COUP-TF observado en éste estadio a excepción de las larvas que presentaron una señal a lo largo de la banda ciliada y brazos orales.

Sin embargo, la función que posee el COUP-TF a partir de la formación del rudimento en el erizo de mar no se conoce y no es posible deducirla a partir de los resultados obtenidos en éste trabajo, sólo se sugiere al igual que Vlahou et al. (1996) un posible rol en la diferenciación de células neurógenas.

No se descarta la posibilidad de que el fragmento de secuencia obtenido consista realmente en la forma COUP-TF II del receptor huérfano, tanto por su patrón de expresión como por las similitudes encontradas durante la alineación con respecto a las secuencias del banco de genes. Por otra parte, debido a la existencia de dos receptores COUP-TF (I y II), existe la posibilidad de un traslape de expresión que no fue posible diferenciar en el presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

- La secuencia obtenida consiste en la región más conservada del dominio de unión al ligando del COUP-TF en la especie *Lytechinus pictus* y presenta un 98 % de similitud con respecto al homólogo en *Strongylocentrotus purpuratus*.
- La secuencia del COUP-TF en *L. pictus* presenta dos posibles sitios polimórficos de un nucleótido.
- El patrón de expresión del COUP-TF difiere con respecto a la larva pluteus una vez que inicia la formación del rudimento y se localiza en la región del estómago y esófago.
- Es posible que la secuencia obtenida se trate del homólogo COUP-TF II, esto por su patrón de expresión y las similitudes encontradas en el alineamiento de secuencias.

7. RECOMENDACIONES

- Caracterizar el homólogo completo de COUP-TF en *Lytechinus pictus*.
- Determinar si el erizo de mar presenta la forma COUP-TF II dentro de su genoma.
- Realizar el patrón de expresión espacio-temporal por medio de sondas fluorescentes y visualizarlas en un microscopio confocal para evitar los inconvenientes que representa la morfología de *Lytechinus pictus*.
- Realizar experimentos de bloqueo de la expresión del COUP-TF, mediante la utilización de técnicas como RNAi (RNA de interferencia) o “Gene knockout” para deducir la función de éste receptor en la embriología del erizo de mar.

CONCLUSIÓN FINAL

La localización de un receptor huérfano de la familia esteroide/tiroidea en el genoma del erizo de mar, sugiere la posibilidad de encontrar otros receptores del tipo hormonales en éste organismo. Aún cuando no se ha documentado una regulación hormonal en equinodermos, es plausible que existan elementos tipo hormona que actúan mediante éstos receptores en procesos del desarrollo del erizo de mar.

El efecto de una hormona tiroidea sobre la metamorfosis de la larva competente del erizo de mar, nos sugiere la posible participación de algún elemento perteneciente a la ruta de transducción de las hormonas esteroides/tiroideas en el desarrollo larvario.

REFERENCIAS

- Arenas-Menas, C., Cameron, A. & Davidson, E. (2000). Spatial expression of *Hox* cluster genes in the ontogeny of the sea urchin. *Development* **127**: 4631-4643.
- Bisgrove, B. & Burke, R. (1987). Development of the nervous system of the pluteus larva of *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Cell and Tissue Research* **248**:335-343.
- Bishop, C. & Brandhorst, B. (2001). NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *The Biological Bulletin*. **201**: 394-404.
- Cameron, A. & Hinegardner, R. (1978). Early events in sea urchin metamorphosis, description and analysis. *Journal of Morphology*. **157**:21-32.
- Carpizo-Ituarte, E. & Rosa-Velez, J. (1993). L-Thyroxine induces metamorphosis in two species of marine gastropods (abstract). *American Zoologist*. **33**:41A.
- Carpizo-Ituarte, E. (1994) Efecto de la L-Tiroxina y compuestos neuroactivos en la inducción a la metamorfosis de dos especies de gasterópodos. Tesis para el grado de Maestro en Ciencias otorgado por la Universidad Autónoma de Baja California. 82 pp.
- Carpizo-Ituarte, E., Salas-Garza, A. & Parés-Sierra, G. (2002). Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas* **28**:157-166.
- Chan, S-M., Xu, N., Niemeyer, C., Bone, J. & Flytzanis, C. (1992). spCOUP-TF: a sea urchin member of the steroid/thyroid hormone receptor family. *Proceedings of the National Academy of Science*. **89**:10568-10572.
- Chino, Y., Saito, M., Yamasu, K., Sugemitsu, T. & Ishihara K. (1994). Formation of the adult rudiment of sea urchins is influenced by thyroid hormones. *Developmental Biology* **161**: 1-11.

- Cooney, A., Tsai, S., O'Malley, B. & Tsai, M-J. (1992). Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D₃, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Molecular and Cellular Biology* **12**:4153-4163.
- Evans, R. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**:889-895.
- Fukazawa, H., Hirai, H., Hori, H., Roberts, R., Nukaya, H., Ishida, H. & Tsuji, K. (2001). Induction of abalone larval metamorphosis by thyroid hormones. *Fisheries Science* **67**:985-988.
- Gilbert, S. (1994). Chap. 20. Cell interactions at a distance: Hormones as mediators of development. -En *Developmental Biology*. pp 716-753. Cuarta Edición. Editorial Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Guyton, A. & Hall, J. (2000). Chap. 76. The Thyroid Metabolic Hormones. -En *Textbook of Medical Physiology*. pp 858-868. Décima Edición. Editorial W.B. Saunders Company. U.S.A.
- Johnson, L.G. & Cartwright, C.M. (1996). Thyroxine-accelerated larval development in the crown-of-thorn starfish, *Acanthaster planci*. *The Biological Bulletin*. **190**: 299-301.
- Johnson, L. (1998). Stage-dependent thyroxine effects on sea urchin development. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **32**: 531-536.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stéhelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene family. *The European Molecular Biology Organization Journal* **11**:1003-1013.
- Lepage, T., Sardet, C. & Gache, C. (1992). Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* **150**:23-32.

- Lu, X., Salbert, G. & Pfhal, M. (1994). An evolutionary conserved COUP-TF binding element in a neural-specific gene and COUP-TF expression patterns support a major role for COUP-TF in neural development. *Molecular Endocrinology* **8**:1774-1788.
- Mangelsdorf, D. & Evans, R. (1995a). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**:841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Shütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & Evans, R. (1995b). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. & Rubin, G. (1990). The *Drosophila seven-up* gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* **60**:211-224.
- Morse, D. (1990). Recent progress in larval settlement and metamorphosis: closing the gaps between molecular biology and ecology. *Bulletin of Marine Science* **46**:465-483.
- Patricolo, E., Cammarata, M. & D'Agati, P. (2001). Presence of thyroid hormones in Ascidian larvae and their involvement in metamorphosis. *Journal of Experimental Zoology* **290**:426-430.
- Pereira, F., Qiu, Y., Tsai, M-J. & Tsai, S. (1995). Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor (COUP-TF): Expression during mouse embryogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **53**:503-508.
- Purves, W., Orinas, G., Seller, H. & Sadava, D. (1998). Chap. 15. Development: Differential Gene Expression. —En Life: The Science of Biology. Pp 330-349. Quinta Edición. Editorial Sinauer Associates, Inc. U.S.A.
- Qiu, Y., Tsai, S. & Tsai, M-J. (1994a). COUP-TF: An orphan member of the Steroid/Thyroid hormone receptor superfamily. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **5**:234-239.

- Qiu, Y., Cooney, A., Kuratani, S., DeMayo, F., Tsai, S. & Tsai, M-J. (1994b). Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **91**:4451-4455.
- Reichel, R.R. & Jacob, S.T. (1993). Control of gene expression by lipophilic hormones. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **7**:427-436.
- Rowley, R. (1989). Settlement and recruitment of sea urchins (*Strongylocentrotus* spp.) in a sea-urchin barren ground and a kelp bed: are populations regulated by settlement or post-settlement processes?. *Marine Biology* **100**:485-494.
- Saito, M., Seki, M., Amemiya, S., Yamasu, K., Suyemitsu, T. & Ishihara, K. (1998). Induction of metamorphosis in the sand dollar *Peronella japonica* by thyroid hormones. *Development, Growth and Differentiation*. **40**:307-312.
- Spangenberg, D. (1971). Thyroxine induced metamorphosis in *Aurelia*. *Journal of Experimental Zoology* **178**:183-194.
- Spangenberg, D. (1984). Effects of exogenous thyroxine on statolith synthesis and resorption in *Aurelia*. *American Zoologist*. **24**:917-923.
- Strathmann, M.F. (1987). "Phylum Echinodermata, Class Echinoidea", -En M.F. Strathmann (ed.), *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press. Seattle, Washington. 670 pp.
- Suyemitsu, T. (2000). Thyroid hormones and metamorphosis of sea urchin larvae. *Zygote (supplement)* pp. S52-S53.
- Tata, J. (1999). Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Biochimie* **81**:359-366.
- Tsai, S. & Tsai, M-J. (1997). Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factors (COUP-TFs) : coming of age. *Endocrine Reviews* **18**:229-240.

Vlahou, A., Gonzalez-Rimbau, M. & Flytzanis, C. (1996). Maternal mRNA encoding the orphan steroid receptor spCOUP-TF is localized in sea urchin eggs. *Development* **122**:521-526.

Yazaki, I. (2000). An analysis of sea urchin metamorphosis. *Zygote* (supplement) pp. S46-S47.

REFERENCIAS PARA PAGINAS DE INTERNET

Programa de elaboración de cebadores

www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1.html

Formato para ordenar la secuenciación del producto amplificado

www.sci.edu/dnacore/sdsu_dnacore.htm

Programa de análisis de cromatogramas

www.techelysium.com.au/ChromasPro.html

Imagen de una larva competente de *Strongylocentrotus purpuratus*

www.archivescanada.ca/english/virtual/search.asp?action=all

ANEXO I. EXPERIMENTOS DE INDUCCION A LA METAMORFOSIS CON L-TIROXINA

TABLA II . Muestra los reactivos y volúmenes a utilizar para los experimentos de inducción a la metamorfosis en las especies *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Se considera un volumen final de 5 ml de agua de mar en cada pozo de la placa de cultivo. Los volúmenes de los reactivos son la cantidad necesaria para obtener la concentración final en el pozo.

Tratamiento Tiroxina	Reactivo (stock de tiroxina) (1)	Larvas (2)	H ₂ O de Mar	Volumen Total	Solución Stock de Tiroxina (3)
10^{-3} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-2} M
10^{-4} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-3} M
10^{-5} M	50 μ l	30 larvas/ml	3.950ml	5.0 ml	10^{-3} M
10^{-6} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-5} M
10^{-8} M	50 μ l	30 larvas/ml	3.950ml	5.0 ml	10^{-6} M
10^{-9} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-8} M
10^{-10} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-9} M

(1) Cantidad del reactivo que se utilizará en el experimento. (2). Se utilizarán 30 larvas en 1 ml de agua de mar filtrada y estéril. (3) Concentración de la solución de la cual se tomó el reactivo para obtener la concentración final deseada en un volumen de 5 ml.

TABLA III . Muestra los reactivos y volúmenes a utilizar para los experimentos de inducción a la metamorfosis en la especie *Strongylocentrotus franciscanus*. Se considera un volumen final de 5 ml de agua de mar en cada pozo de la placa de cultivo. Los volúmenes de los reactivos son la cantidad necesaria para obtener la concentración final en el pozo.

Tratamiento Tiroxina	Reactivo (stock de tiroxina) (1)	Larvas (2)	H ₂ O de Mar	Volumen Total	Solución Stock de Tiroxina (3)
10^{-4} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-3} M
10^{-6} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-5} M
10^{-8} M	50 μ l	30 larvas/ml	3.950ml	5.0 ml	10^{-6} M
10^{-9} M	500 μ l	30 larvas/ml	3.5ml	5.0 ml	10^{-8} M

(1) Cantidad del reactivo que se utilizará en el experimento. (2). Se utilizarán 30 larvas en 1 ml de agua de mar filtrada y estéril. (3) Concentración de la solución de la cual se tomó el reactivo para obtener la concentración final deseada en un volumen de 5 ml.

TABLA IV . Muestra los reactivos y volúmenes a utilizar en los controles de los experimentos de inducción a la metamorfosis en las tres especies de erizo de mar: *Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus franciscanus* y *Lytechinus pictus*. Se considera un volumen final de 5 ml de agua de mar en cada pozo de la placa de cultivo. Los volúmenes son requeridos para la dilución final en el pozo.

Tratamiento	Reactivo (solución stock) (1)	Larvas (2)	H ₂ O de Mar	Volumen Total	Solución Stock (3)
control positivo KCl 10 ⁻¹ M	125 µl	30 larvas/ml	3.875ml	5.0 ml	4 M KCl
control negativo Agua de mar filtrada y estéril		30 larvas/ml	4.0ml	5.0 ml	
control de reactivo NaOH 10 ⁻⁴ M	50 µl	30 larvas/ml	3.950ml	5.0 ml	10 ⁻² M NaOH

(1) Cantidad del reactivo que se utilizará en el experimento. (2). Se utilizarán 30 larvas en 1 ml de agua de mar filtrada y estéril. (3) Concentración de la solución de la cual se tomó el reactivo para obtener la concentración final deseada en un volumen de 5 ml.

ANEXO II. RESUMEN DE ANOVAS PARA LOS EXPERIMENTOS DE INDUCCION CON L-TIROXINA EN LAS TRES ESPECIES DE ERIZO DE MAR

TABLA V. Análisis de Varianza de una sola vía para el experimento con larva competente de *Strongylocentrotus franciscanus*.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	1.857900	6	0.309650	29.6836	0.0
Error	0.14604	14	0.010432		
TOTAL	2.0039	20			

TABLA VI. Prueba Duncan para el experimento con larva competente de *Strongylocentrotus franciscanus*

	KCl	NaOH	Tiroxina 10 ⁻⁴ M	Tiroxina 10 ⁻⁶ M	Tiroxina 10 ⁻⁸ M	Tiroxina 10 ⁻⁹ M	AME
KCl		0.000032	0.000177	0.000090	0.000065	0.000038	0.000029
NaOH	0.000032		0.475576	0.543733	0.616879	0.792492	0.436823
Tiroxina 10 ⁻⁴ M	0.000177	0.475576		0.897124	0.804564	0.627375	0.170507
Tiroxina 10 ⁻⁶ M	0.000090	0.543733	0.897124		0.894919	0.706125	0.201402
Tiroxina 10 ⁻⁸ M	0.000065	0.616879	0.804564	0.894919		0.789968	0.235945
Tiroxina 10 ⁻⁹ M	0.000038	0.792492	0.627375	0.706125	0.789968		0.327569
AME	0.000029	0.436823	0.170507	0.201402	0.235945	0.327569	

TABLA VII. Análisis de Varianza para el primer experimento realizado con larva competente de *Lytechinus pictus*.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	2.682220	7	0.383174	112.4561	0.0
Error	0.054517	16	0.003407		
TOTAL	2.736737	23			

TABLA VIII. Prueba Duncan para el primer experimento realizado con larva competente de *Lytechinus pictus*.

	KCl	NaOH	Tiroxina $10^{-4}M$	Tiroxina $10^{-6}M$	Tiroxina $10^{-8}M$	Tiroxina $10^{-9}M$	Tiroxina $10^{-10}M$	AME
KCl		0.000033	0.000084	0.000159	0.000027	0.000025	0.000062	0.000036
NaOH	0.000033		0.403285	0.000792	0.818709	0.828567	0.665039	0.818510
Tiroxina $10^{-5}M$	0.000084	0.403285		0.002877	0.307019	0.311984	0.646853	0.517132
Tiroxina $10^{-6}M$	0.000159	0.000792	0.002877		0.000563	0.000616	0.001444	0.001092
Tiroxina $10^{-8}M$	0.000027	0.818709	0.307019	0.000563		1.000000	0.529333	0.665039
Tiroxina $10^{-9}M$	0.000025	0.828567	0.311984	0.000616	1.000000		0.535932	0.674002
Tiroxina $10^{-10}M$	0.000062	0.665039	0.646853	0.001444	0.529333	0.535932		0.818709
AME	0.000036	0.818510	0.517132	0.001092	0.665039	0.674002	0.818709	

TABLA IX. Análisis de Varianza para el experimento realizado con larva competente de *Strongylocentrotus purpuratus*.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	5.735044	9	0.637227	103.5343	0.0
Error	0.123095	20	0.006155		
TOTAL	5.858139	29			

TABLA X. Prueba Duncan para el experimento realizado con larva competente de *Strongylocentrotus purpuratus*.

	KCl	NaOH	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻⁴ M	Tiroxina 10 ⁻⁶ M	Tiroxina 10 ⁻⁸ M	Tiroxina 10 ⁻⁹ M	Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	AME
KCl		0.000020	0.000022	0.000151	0.000058	0.000033	0.000072	0.000027	0.000023	0.000029
NaOH	0.000020		1.000000	0.005924	0.452141	0.544976	0.372682	1.000000	1.000000	1.000000
Tiroxina 10 ⁻³ M	0.000022	1.000000		0.005599	0.448821	0.540288	0.370408	1.000000	1.000000	1.000000
Tiroxina 10 ⁻⁴ M	0.000151	0.005924	0.005599		0.020745	0.016804	0.023389	0.004812	0.005230	0.004329
Tiroxina 10 ⁻⁵ M	0.000058	0.452141	0.448821	0.020745		0.861701	0.866705	0.434870	0.443506	0.420444
Tiroxina 10 ⁻⁶ M	0.000033	0.544976	0.540288	0.016804	0.861701		0.747333	0.519737	0.532712	0.495365
Tiroxina 10 ⁻⁸ M	0.000072	0.372682	0.370408	0.023389	0.866705	0.747333		0.360948	0.366719	0.351823
Tiroxina 10 ⁻⁹ M	0.000027	1.000000	1.000000	0.004812	0.434870	0.519737	0.360948		1.000000	1.000000
Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	0.000023	1.000000	1.000000	0.005230	0.443506	0.532712	0.366719	1.000000		1.000000
AME	0.000029	1.000000	1.000000	0.004329	0.420444	0.495365	0.351823	1.000000	1.000000	

TABLA XI. Análisis de Varianza para el segundo experimento de *Lytechinus pictus* evaluado a las 24 horas.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	2.595353	9	0.288373	64.5284	0.0
Error	0.089378	20	0.004469		
TOTAL	2.684731	29			

TABLA XII. Prueba Duncan para el segundo experimento de *Lytechinus pictus* evaluado a las 24 horas.

	KCl	NaOH	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻⁴ M	Tiroxina 10 ⁻⁶ M	Tiroxina 10 ⁻⁸ M	Tiroxina 10 ⁻⁹ M	Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	AME
KCl		0.000020	0.000072	0.000151	0.000058	0.000033	0.000023	0.000029	0.000022	0.000027
NaOH	0.000020		0.124362	0.045279	0.596895	0.594180	1.000000	0.859637	1.000000	1.000000
Tiroxina 10 ⁻³ M	0.000072	0.124362		0.543712	0.235001	0.260349	0.118236	0.149224	0.121770	0.113336
Tiroxina 10 ⁻⁴ M	0.000151	0.045279	0.543712		0.095391	0.105236	0.042263	0.054978	0.043926	0.040179
Tiroxina 10 ⁻⁵ M	0.000058	0.596895	0.235001	0.095391		1.000000	0.589906	0.705107	0.594180	0.582928
Tiroxina 10 ⁻⁶ M	0.000033	0.594180	0.260349	0.105236	1.000000		0.582928	0.688157	0.589906	0.570918
Tiroxina 10 ⁻⁸ M	0.000023	1.000000	0.118236	0.042263	0.589906	0.582928		0.850033	1.000000	1.000000
Tiroxina 10 ⁻⁹ M	0.000029	0.859637	0.149224	0.054978	0.705107	0.688157	0.850033		0.855404	0.840842
Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	0.000022	1.000000	0.121770	0.043926	0.594180	0.589906	1.000000	0.855404		1.000000
AME	0.000027	1.000000	0.113336	0.040179	0.582928	0.570918	1.000000	0.840842	1.000000	

TABLA XIII. Análisis de Varianza para el experimento anterior evaluado a las 48 horas.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	3.00994	8	0.376238	13.57580	0.000003
Error	0.498850	18	0.027714		
TOTAL	3.50879	26			

TABLA XIV. Prueba Duncan para el experimento anterior evaluado a las 48 horas.

	KCl	NaOH	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻⁴ M	Tiroxina 10 ⁻⁶ M	Tiroxina 10 ⁻⁸ M	Tiroxina 10 ⁻⁹ M	Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	AME
Tiroxina 10 ⁻³ M		0.236036	0.083372	0.037072	0.088769	0.086569	0.072794	0.000115	0.083002	
Tiroxina 10 ⁻⁴ M	0.236036		0.492083	0.269802	0.009497	0.009062	0.007632	0.001019	0.008655	0.236036
Tiroxina 10 ⁻⁵ M	0.083372	0.492083		0.622399	0.002436	0.002375	0.002067	0.003720	0.002228	0.083372
Tiroxina 10 ⁻⁶ M	0.037072	0.269802	0.622399		0.000930	0.000926	0.000829	0.008395	0.000860	0.037072
Tiroxina 10 ⁻⁸ M	0.088769	0.009497	0.002436	0.000930		0.940071	0.943033	0.000024	1.000000	0.088769
Tiroxina 10 ⁻⁹ M	0.086569	0.009062	0.002375	0.000926	0.940071		1.000000	0.000029	0.935841	0.086569
Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	0.072794	0.007632	0.002067	0.000829	0.943033	1.000000		0.000033	0.940071	0.072794
KCl	0.000115	0.001019	0.003720	0.008395	0.000024	0.000029	0.000033		0.000026	0.000115
AME	0.083002	0.008655	0.002228	0.000860	1.000000	0.935841	0.940071	0.000026		0.083002

TABLA XV. Análisis de Varianza para el último experimento con *Lytechinus pictus* cuya evaluación se realizó a las 48 horas.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F calculada	Valor P
Tratamientos	4.741629	9	0.526848	7.81547	0.00071
Error	1.348217	20	0.067411		
TOTAL	6.089846	29			

TABLA XVI. Prueba Duncan para el último experimento con *Lytechinus pictus* cuya evaluación se realizó a las 48 horas.

	KCl	NaOH	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻³ M	Tiroxina 10 ⁻⁴ M	Tiroxina 10 ⁻⁶ M	Tiroxina 10 ⁻⁸ M	Tiroxina 10 ⁻⁹ M	Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	AME
KCl		0.000031	0.000056	0.000048	0.000169	0.001592	0.001240	0.000130	0.000036	0.000025
NaOH	0.000031		0.599876	0.694189	0.255022	0.031214	0.045054	0.308392	0.875012	0.717292
Tiroxina 10 ⁻³ M	0.000056	0.599876		0.874364	0.494682	0.077896	0.106602	0.568414	0.693619	0.403486
Tiroxina 10 ⁻⁴ M	0.000048	0.694189	0.874364		0.421328	0.061988	0.086535	0.492853	0.794722	0.478130
Tiroxina 10 ⁻⁵ M	0.000169	0.255022	0.494682	0.421328		0.226482	0.285419	0.876809	0.309334	0.153026
Tiroxina 10 ⁻⁶ M	0.001592	0.031214	0.077896	0.061988	0.226482		0.827617	0.190633	0.040263	0.016047
Tiroxina 10 ⁻⁸ M	0.001240	0.045054	0.106602	0.086535	0.285419	0.827617		0.249052	0.057403	0.023640
Tiroxina 10 ⁻⁹ M	0.000130	0.308392	0.568414	0.492853	0.876809	0.190633	0.249052		0.369025	0.189164
Tiroxina 10 ⁻¹⁰ M	0.000036	0.875012	0.693619	0.794722	0.309334	0.040263	0.057403	0.369025		0.624815
AME	0.000025	0.717292	0.403486	0.478130	0.153026	0.016047	0.023640	0.189164	0.624815	

ANEXO III. SOLUCIONES

1. Amortiguador TE 1X pH 8.0

Tris-HCl 10mM

EDTA 1mM

2. PBST 1X (Amortiguador de Fosfatos con Tween-20)

NaCl 130mM

Sodium Phosphate 10mM pH 7.2

Tween-20 0.1%

Modo de preparación sencilla:

Na ₂ HPO ₄	7.75 ml	De un Stock 1M
NaH ₂ PO ₄	2.25 ml	De un Stock 1M
NaCl	1.5 ml	De un Stock 5M
Tween-20	0.5 ml	De un stock al 10%

Adicionar primero los Fosfatos de Sodio y luego el resto de los reactivos, aforar a 50ml con agua desionizada.

3. Cloruro de Magnesio 370 mM (en agua desionizada)**4. Solución de Hibridación (en agua desionizada)**

Formamida 50%

SSC 5X

Tris-HCl pH 7.5 20mM

Heparina 500µg/ml

Denhardt's Solution (*) 1X

Tween-20 0.3%

Dextran Sulfate 10%

(*) Denhardt's Solution 100X 10ml

Ficoll	0.2 g
Polyvinylpyrrolidone	0.2 g
BSA (albúmina sérica bovina)	0.2 g

5. Standar Saline Citrate solution (SSC) 0.1X; 0.1% Tween-20 (50 ml)

SSC(0.15 M NaCl, 0.015 M Sodium Citrate) pH 7.0	20X	250µl
Tween-20	10%	1 ml

Aforar a 50 ml con agua desionizada.

6. TBST (100ml)

Sol. A pH 7.5 (20 ml)		Sol. B (20 ml)	
NaCl	1.6 g	CaCl ₂	0.3 g
KCl	0.076 g	MgCl ₂	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	0.04 g		
Trizma Base	0.6 g		

Coloca 88 ml de agua desionizada y 10 ml de la solución A; agrega gota por gota 1 ml de la solución B revolviendo constantemente. Al finalizar adiciona 1 ml de Tween-20 10%.