

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**CAMBIOS MORFOGENÉTICOS Y PROCESOS
REGULADORES EN LA METAMORFOSIS DE LOS ERIZOS DE
MAR *Strongylocentrotus purpuratus* Y *Lytechinus pictus***

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

GERARDO AMADOR CANO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO, 2007.

i

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**CAMBIOS MORFOGENÉTICOS Y PROCESOS
REGULADORES EN LA METAMORFOSIS DE LOS ERIZOS DE
MAR *Strongylocentrotus purpuratus* Y *Lytechinus pictus***

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

GERARDO AMADOR CANO

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO, 2007.

RESUMEN

La metamorfosis del erizo de mar, como la de otros invertebrados marinos, consiste en la rápida pérdida de estructuras larvales, mientras que se mantiene la funcionalidad del resto del cuerpo. La coordinación y control de los eventos de metamorfosis, dependen de factores que no han sido completamente estudiados. Estos implican desde la forma en que se recibe la señal inductora, cómo se transmite hacia el interior de los tejidos larvales, los cambios morfogenéticos en que se traduce dicha señal y la manera en que la larva se transforma en un juvenil con características distintas a las de la etapa precedente. El presente trabajo, se enfocó en caracterizar algunos de los procesos internos que regulan la metamorfosis en las larvas de los erizos de mar *Lytechinus pictus* y *Strongylocentrotus purpuratus*.

La primera parte de este trabajo consistió en identificar cuáles son los primeros pasos en la cadena de eventos que dan lugar al inicio del proceso metamórfico, enfocándose en el estudio de las rutas de transducción que regulan la transmisión de la señal externa hacia el interior de los tejidos. Para ello, larvas competentes de erizo morado fueron inducidas a la metamorfosis en presencia de fármacos que activan o inhiben algunas de estas rutas. Nuestros resultados indican la participación de la proteína cinasa C (PKC), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y del calcio como segundo mensajero durante la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*.

La segunda parte de la investigación, se fundamentó en determinar uno de los elementos que parecen ser sustanciales para la propagación de dicha señal, esto es, la participación del sistema nervioso en los eventos de transducción que intervienen en el proceso. Particularmente se estudió la participación del neurotransmisor serotonina (5HT) y los cambios en el sistema nervioso serotoninérgico durante la metamorfosis de *S. purpuratus*. Nuestros resultados indican la participación del neurotransmisor serotonina (la cual induce efectivamente la metamorfosis de los organismos al aplicarse de

manera externa) durante la metamorfosis de *S. purpuratus*. Aunado a esto, el ganglio apical es la última estructura del sistema serotoninérgico que se pierde durante la metamorfosis, lo cual ha sido reportado también para moluscos, y este y otros índices abren la posibilidad de que la zona bucal sea donde se reciben los primeros mensajes inductores en las larvas.

También se consideraron dos procesos que necesariamente forman parte de todo evento relacionado con el desarrollo de los organismos: los procesos de transcripción y traducción. La acción de inhibidores de los procesos de transcripción y traducción, dispara la metamorfosis de larvas de competentes de *L. pictus*. Dicho fenómeno puede deberse a la existencia de un represor interno de la metamorfosis, y a que su producción se inhibe por la acción de estos fármacos, lo cual induce a las larvas a la metamorfosis.

Finalmente, se exploraron parte de las consecuencias que tiene la concatenación de todos los elementos arriba mencionados, esto es, los cambios que sufren los tejidos larvales de *S. purpuratus* durante el proceso de metamorfosis. Específicamente, se estudiaron los cambios en el tejido muscular, para lo cual se utilizó marcaje fluorescente de fibras de actina. Nuestros resultados indican que la primera estructura que se pierde, es una malla de filamentos musculares formada por hexágonos bien definidos y que al desintegrarse forman conglomerados de actina. Trabajos similares sobre tejido muscular, refieren que estos conglomerados pueden indicar la presencia de muerte celular programada o apoptosis. Por otro lado, la última estructura que se desintegra es la faringe, cercana al ganglio apical, lo cual refuerza la idea de que esta es la zona donde puede recibirse la primera señal inductora.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**Cambios morfogenéticos y procesos reguladores en la
metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus
purpuratus* y *Lytechinus pictus***

TESIS

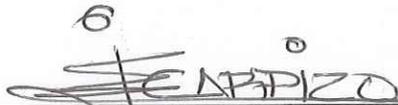
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

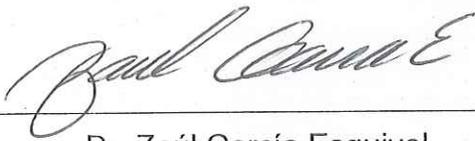
PRESENTA

Gerardo Amador Cano

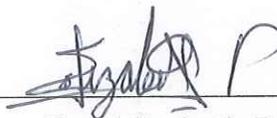
Aprobada por:



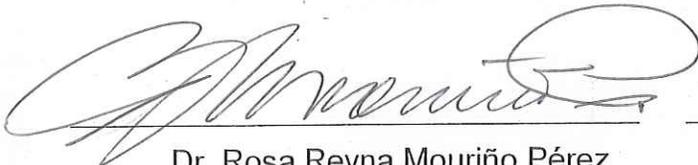
Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Presidente del jurado



Dr. Zaúl García Esquivel
Sinodal



Dra. Elizabeth Ponce Rivas
Sinodal



Dr. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Sinodal



Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa
Sinodal

Ensenada, Baja California, México. Agosto 2007.

A Varinka, tú sabes...

AGRADECIMIENTOS

- Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a través del programa de becas.
- A Eugenio Carpizo, asesor, colega y amigo, por su acertada dirección, por su paciencia en mis momentos de pobre entendimiento y su comprensión en los tiempos difíciles...Tuviste razón.
- A mis sinodales: Dr. Zaúl García Esquivel, Dra. Elizabeth Ponce Rivas, Dr. Rosa Reyna Mouríño Pérez, Dr. Francisco Delgadillo Hinojosa; por sus invaluable consejos, opiniones y apoyo para mejorar la calidad de este trabajo.
- Al departamento de Microbiología de la División de Biología Experimental y Aplicada del CICESE, por las facilidades prestadas para el uso del equipo de microscopía confocal, con el cual se obtuvieron las imágenes que son presentadas aquí.
- A mis compañeros del laboratorio de Biología del Desarrollo y anexos: Dora, Moni, Agustín, Griselda, Alfredo, Javier Pámanes, Polo, Paola, Beto, Monse, Raquel, Roxana, Vero, Luis, Juan, Caro, Omar, Rodrigo, Margarita y un largo etcétera, por su apoyo desinteresado y ayuda para llevar a buen puerto este barco.
- A Jorge de la Rosa, porque espero que al final de mi camino, tenga una vida que sea ejemplo de plenitud como lo fue para mi la de él.
- A Raquel y a Ivana, por las terapias al frente de una taza de café.
- A la familia Pedrín, por hacernos sentir parte de la ellos.
- A Vero, César, Marina y Dahen, porque aunque no siempre estuvimos de acuerdo, permanecieron ahí a lo largo del camino.
- A Kari y Fausto, por su fe, consejos y ánimo antes, durante y después de la jornada. Espero tengan boca de profeta.
- A la familia Aguilar Hernández y derivados, por ser mi familia.
- A mis tíos y a mi abuela: Lucha, Samuel, Víctor, Chaly, Ida, Raúl, Irma, Felipe y Beni; por ser ejemplo y pilar en mi formación.
- A mis hermanos, Paco, Mau y Fallo, y a mi sobrina Mitzy, porque ahora sé que Dios no juega a los dados.
- A mis padres, porque una vez más me han apuntalado a lo largo del camino...espero que sea la última.
- A todos aquellos que mi mala memoria olvida pero mi corazón reconoce.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
I.1 General	6
I.2 Particulares	6
CAPÍTULO I. Rutas de transducción durante la metamorfosis del erizo de mar <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> .	8
I.1 Introducción	8
I.2 Materiales y Métodos	13
I.3 Resultados	19
I.4 Discusión	35
CAPÍTULO II. Serotonina como inductor de la metamorfosis.	44
II.1 Introducción	44
II.2 Materiales y Métodos	46
II.3 Resultados	49
II.4 Discusión	61
CAPÍTULO III. Transcripción y traducción durante la metamorfosis del erizo de mar <i>Lytechinus pictus</i> .	67
III.1 Introducción	67
III.2 Materiales y Métodos	70
III.3 Resultados	72
III.4 Discusión	76
CAPÍTULO IV. Cambios en la musculatura durante la metamorfosis del erizo de mar <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	82
IV.1 Introducción	82
IV.2 Materiales y Métodos	84
IV.3 Resultados	86
IV.4 Discusión	104
DISCUSIÓN FINAL	108
CONCLUSIONES	116
REFERENCIAS	119
ANEXOS	136

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Fármacos utilizados en larvas competentes de erizo de mar <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> . Los fármacos marcados con asterísco (*) son aquellos que tuvieron efecto significativo en la metamorfosis	19
Tabla II. Secuencia del proceso de marcaje de células con receptores de serotonina (5HT) en larvas y postlarvas del erizo de mar <i>S. purpuratus</i>	47
Tabla III. Secuencia del proceso de marcaje de fibras de actina en larvas y postlarvas del erizo de mar <i>S. purpuratus</i>	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar <i>S. purpuratus</i> después de 8(A), 16(B) y 24 h(C) de exposición a diferentes concentraciones de TPA como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterísco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de TPA que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua filtrada y esterilizada.....	20
Figura 2. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar <i>S. purpuratus</i> expuesto a diferentes concentraciones de indolactam como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterísco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (DMSO, AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de indolactam que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones de indolactam.	22
Figura 3. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar <i>S. purpuratus</i> expuesto a diferentes concentraciones de suramin como inhibidor (N=3). Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de suramin por 15 minutos antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en la presencia del inhibidor. Después de 15 minutos se removió la solución y se reemplazó por solución fresca de suramin y AMF a las concentraciones que se indican en el eje de las X. Las barras indican el error estándar. El asterísco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de suramin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.	24

- Figura 4. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) de *S. purpuratus* después de 6(A), 12(B) y 24 h (C) horas de exposición a diferentes concentraciones de suramin como inhibidor (N=3), y una película bacteriana como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (Biopelícula). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de suramin indicadas en el eje de las X, Biopelícula, 10-12 día de desarrollo de película bacteriana en tanques con adultos; AMF, agua de mar filtrada y esterilizada. 25
- Figura 5. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 24 h (C) horas de exposición a suramin como inhibidor a una concentración de 100 μ M (N=3), y KCl como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: Biopelícula+24h, suramin incubado 24 h sin película bacterial; 0 h, suramin sin incubación; KCl, 0.1 M (15 minutos, después, AMF); AMF agua de mar filtrada y esterilizada. 27
- Figura 6. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 6(A), 12(B) y 24 h (C) horas de exposición a diferentes concentraciones de guanosin como inhibidor (N=3), y KCl como inductor. Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de guanosin durante 15 minutos antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en la presencia del inhibidor. Después de 15 minutos la solución se removió y se reemplazó con solución fresca de guanosin en AMF a las concentraciones que se indican en el eje de las X. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de guanosin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada. 29
- Figura 7. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 8(A), 16(B) horas de exposición a diferentes concentraciones de guanosin como inhibidor (N=3), y película bacteriana como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (Biopelícula). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de guanosin que se indican en el eje de las X; Biopelículas, 10-12 días de desarrollo de la película bacteriana en un tanque con adultos; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada, 30
- Figura 8. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del ionóforo A23187 como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos

comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del ionóforo A23187 que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones del ionóforo A23187..... 32

Figura 9. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones de thapsigargin como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de thapsigargin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones de thapsigargin..... 33

Figura 10. Rutas de transducción propuestas en la metamorfosis de *S. purpuratus*: GP= proteína G, MR= receptor de membrana, PLC= fosfolipasa C, PIP_2 = fosfatidilinositol difosfato, DAG= diacilglicerol, IP_3 = inositol trifosfato, PKC= proteína cinasa C. El modelo propuesto se basa en el ciclo propuesto por Nishizuka (1984), el cual considera una ruta única donde la activación de GPCRs (receptores asociados a proteínas G) activan a su vez la fosfolipasa C, la cual divide al fosfatidil-inositol-4, 5-difosfato. A partir de esta separación se generan IP_3 y DAG. El DAG a su vez activa la PKC, mientras que el IP_3 activa a otro receptor de membrana en el retículo endoplasmático y libera calcio. La otra fuente de calcio es el espacio extracelular, y puede ingresar al citoplasma de la célula a través de canales iónicos. 42

Figura 11. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus* después de 24 h (A) y 48 h (B) de encontrarse expuesto a diferentes concentraciones de 5HT (serotonina) como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: Concentración de 5HT según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada. 50

Figura 12. Vista frontal abanal de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ganglio apical. 52

Figura 13. Vista lateral derecha de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100

- µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ganglio apical; H, ano..... 53
- Figura 14. Imágenes confocales que exponen el detalle del ganglio apical en una vista frontal (I) y lateral (II), de una larva competente de *S. purpuratus* mostrando células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (50 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: B, boca; D, faringe; G, ganglio apical. 54
- Figura 15. 15 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra la vista frontal de una larva de *S. purpuratus* con células marcadas con receptores de 5HT, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; F, brazos larvales; G, ganglio apical..... 55
- Figura 16. 45 minutos post-inducción. Vista frontal (I) y lateral (II) de una larva de *S. purpuratus* pasados 45 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. Se muestra imágenes confocales del organismo con células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (100 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; F, brazos larvales; G, ganglio apical. 56
- Figura 17. 90 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra la vista frontal de una larva de *S. purpuratus* con células marcadas con receptores de 5HT, pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; C, rudimento juvenil; F, brazos larvales; G, ganglio apical..... 58
- Figura 18. Vista oral de una postlarva de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente. La barra indica la escala (100 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, pies ambulacrales; B, lámpara de Aristóteles; C, espinas 59
- Figura 19. Imágenes confocales que exponen el detalle de una espina (I) y un pie ambulacral (II) de una postlarva de *S. purpuratus* mostrando células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (50 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, espina; B, pie ambulacral 60
- Figura 20. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *L. pictus* después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de DRB (5, 6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol) como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen:

- Concentración de DRB según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada. 73
- Figura 21. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *L. pictus* después de 6 (A), 12 (B) y 24 h (C) de exposición a diferentes concentraciones de emetine diclorhídrico como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: Concentración de emetine según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada. 74
- Figura 22. Vista frontal anal de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando tejido muscular. II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales. 87
- Figura 23. Vista lateral izquierda de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando tejido muscular. II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ano. 88
- Figura 24. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la faringe del erizo de mar *S. purpuratus*. I faringe de una larva competente; II, interacción boca-estómago a través de la faringe en una larva precompetente de 6 brazos. La barra indica la escala con respecto a la imagen en I (20 μm) y II (50 μm). Las flechas indican la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; D, faringe. 89
- Figura 25. Imagen confocal que muestra el detalle del tejido muscular en el rudimento juvenil de larvas competentes de erizo de mar *S. purpuratus*. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A; pies ambulacrales; B, base de las espinas. 90
- Figura 26. Imágenes confocales que exponen el detalle de la malla de fibras de actina en el epitelio de larvas competentes de erizo de mar *S. purpuratus* I, detalle general de la malla en la zona cercana a lo boca. II, detalle del área superior de la boca, se observan hexágonos conformando la red filamentosa. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a las imágenes y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, hexágono formado por filamentos de actina; B, boca. 92
- Figura 27. 15 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una vista frontal anal una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μm) con

- respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales..... 93
- Figura 28. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular en desintegración de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. El círculo enmarca conglomerados globulares de actina que aún conservan marcaje con Faloidina. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe. 94
- Figura 29. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular de la faringe de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (50 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe..... 96
- Figura 30. 45 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una vista frontal anal (I) y lateral izquierda (II) de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales 97
- Figura 31. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la faringe (I) y el rudimento juvenil (II) en una larva de *S. purpuratus*, 45 minutos posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (50 μm) con respecto a las imágenes y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, faringe; B, base de una espina en el rudimento juvenil; C, pies ambulacrales..... 98
- Figura 32. 90 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una larva de *S. purpuratus* pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, faringe; B, cuerpo larval en desintegración; C, base de espinas en el rudimento juvenil; D, pies ambulacrales en el rudimento juvenil; E, brazos larvales. 99
- Figura 33. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular de la faringe de una larva de *S. purpuratus*, pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe..... 100
- Figura 34. Imagen confocal que muestra el tejido muscular en una postlarva de erizo morado *S. purpuratus* 24 horas posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCL. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, lámpara de Aristóteles; B. base de las espinas; C, pies ambulacrales. 102

Figura 35. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la base de las espinas y los pies ambulacrales (I), así como de la llamada lámpara de Aristóteles (II) en postlarvas de erizo de mar *S. purpuratus* 24 horas posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, base de las espinas; B, pies ambulacrales; C, lámpara de Aristóteles. 103

INTRODUCCIÓN

Diversas especies de invertebrados marinos presentan ciclos de vida complejos, en los cuales se presentan uno o más estadios de desarrollo de vida libre que eventualmente lleva al organismo a transformarse, a través de un proceso de metamorfosis, en un juvenil que es morfológicamente (y en algunos casos ecológica y fisiológicamente) distinto de su estadio anterior (Pechenik *et al.*, 1998). Estos ciclos de vida complejos, que son también comunes entre insectos y anfibios, se encuentran representados ampliamente entre los diferentes fila de animales tan diversos como esponjas; cnidarios, moluscos gasterópodos y bivalvos; gusanos poliquetos; cangrejos, balanos y otros crustáceos; ascideos hemicordados y equinodermos (Thorson, 1950).

Para la mayoría de los invertebrados marinos, la metamorfosis en sí consiste en la rápida pérdida de las estructuras larvales específicas, mientras que se mantiene la funcionalidad del resto del cuerpo, iniciando el funcionamiento de estructuras juveniles preformadas (Hadfield, 1998). Una definición general aceptada, es la que presentan Hadfield *et al.* (2001), quienes mencionan que la metamorfosis es "Un proceso de desarrollo que es precedido por una etapa larval de vida libre, y que resulta en una etapa juvenil o adulta. La metamorfosis normalmente involucra la pérdida de los caracteres larvales, y el surgimiento de los caracteres juveniles. Para la mayoría de los invertebrados

marinos, la metamorfosis comienza con una larva pelágica que de manera inevitable se sitúa en el lecho marino e inicia la degeneración de los caracteres larvales específicos. Finaliza cuando las estructuras juveniles esenciales han emergido y el organismo juvenil es funcional en el hábitat adulto definitivo”.

La metamorfosis de estos organismos se dispara en respuesta a factores ambientales específicos, que incluyen temperatura (e. g. Gaudette *et al.*, 2001) e inductores químicos y biológicos, los cuales han sido asociados a algunos sustratos naturales presentes en el medio (e. g. Clare y Matsumura, 2000; Krug y Zimmer, 2000; Bryan y Quian, 1998; Bryan *et al.*, 1997; Pawlik, 1990). En algunas especies la inducción al asentamiento y la metamorfosis puede dispararse en ausencia de inductores naturales por diversos compuestos químicos. Sustancias neuroactivas (e. g. GABA, DOPA, catecolaminas, derivados de colina), algunos solventes orgánicos y compuestos inorgánicos (e. g. NH_3 , H_2S , H_2O_2), y varios iones inorgánicos, son conocidos como inductores del asentamiento o metamorfosis de una amplia variedad de invertebrados marinos bentónicos (Pearce y Scheibling, 1994; Pawlik, 1990; Dahlström *et al.*, 2005; Amador-Cano *et al.*, 2006).

Antes de dispararse la metamorfosis y a partir de un huevo fertilizado, el desarrollo larval debe producir una serie de estadios que lleven a la formación de una larva de vida libre, la cual sea capaz de realizar cambios morfogenéticos a través de la metamorfosis (Hadfield *et al.*, 2001). Este último estadio se conoce como competencia metamórfica, y se define como la

capacidad de las larvas de responder a estímulos, ya sea internos o externos, que las lleven a la metamorfosis (Hadfield, 2000). En los invertebrados marinos bentónicos, prácticamente todos los estímulos que llevan a la metamorfosis son externos (Pawlik, 1992, Hadfield y Paul, 2001). La competencia metamórfica provee a las larvas la habilidad de permanecer en el plancton durante largos periodos de tiempo, hasta que localicen o encuentren hábitats adecuados para su asentamiento y metamorfosis, haciendo que la dispersión sea efectiva (Pechenik, 1990; Pawlik, 1992; Pechenik *et al.*, 1998).

En el caso del erizo de mar, su periodo larval se caracteriza por una etapa precompetente, que dura de tres a cuatro semanas dependiendo de la especie, al final de la cual la larva se encuentra preparada para responder a estímulos que la lleven a metamorfizarse (Cameron y Hinegardner, 1974; Cameron *et al.*, 1989).

El proceso de metamorfosis incluye una serie de cambios dramáticos en los tejidos de la larva. En el erizo de mar este proceso se inicia con una flexión anormal de los brazos de la larva, seguido de un colapso del epitelio larval y, finalmente, se cierra el epitelio vestibular formado sobre la superficie aboral adulta (Cameron y Hinegardner, 1978). La coordinación y control de los eventos de metamorfosis en el erizo de mar, dependen de factores que no han sido completamente estudiados (Cameron *et al.*, 1989).

La metamorfosis del erizo de mar, como la de otros invertebrados marinos, presenta una complejidad que va mas allá del simple hecho de transitar de una

fase de desarrollo a otra. El tránsito debe iniciarse en tiempo y espacio adecuados en respuesta a una señal externa, de manera que se incrementen las posibilidades de sobrevivencia de los recién metamorfozados organismos juveniles. Esto conlleva una secuencia de eventos de los cuales aun no se conoce el detalle. Con esto en mente, el presente trabajo de investigación se enfocó en tratar de dilucidar algunos de los procesos internos que regulan en las larvas y su dramática transformación en minúsculas réplicas de los erizos de mar adultos, que no guardan ninguna semejanza con su etapa de desarrollo anterior.

Para ello, la primera parte de este trabajo consistió en identificar cuáles son los primeros pasos en la cadena de eventos que daban lugar al inicio del proceso metamórfico, enfocándose en el estudio de las rutas de transducción que regulan la transmisión de la señal externa hacia el interior de los tejidos. La segunda parte de la investigación, se fundamentó en determinar uno de los elementos que parecen ser sustanciales para la propagación de dicha señal, esto es, la participación del sistema nervioso en los eventos de transducción que intervienen en el proceso. En tercer lugar, se consideraron dos procesos que necesariamente forman parte de todo evento relacionado con el desarrollo de los organismos: los procesos de transcripción y traducción. Finalmente, se exploraron parte de las consecuencias que tiene la concatenación de todos los elementos arriba mencionados, esto es, los cambios que sufren los tejidos

larvales durante el proceso de metamorfosis, y específicamente, se estudiaron los cambios en el tejido muscular.

OBJETIVOS

I.1 GENERAL

Caracterizar diferentes procesos de cambio y reguladores durante la metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*.

I.2 PARTICULARES

1. Determinar si existe participación de receptores asociados a proteínas G, la proteína cinasa C y el Ca^{2+} como segundo mensajero en los procesos de transducción que regulan la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.
2. Investigar la participación del neurotransmisor serotonina durante la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.
3. Caracterizar los cambios en el sistema nervioso serotoninérgico que tienen lugar durante la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.
4. Identificar si los procesos de transcripción-traducción regulan la metamorfosis del erizo de mar *Lytechinus pictus*.

5. Caracterizar los cambios en la musculatura que tienen lugar durante la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.

CAPÍTULO I.

Rutas de transducción durante la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*.

I.1 INTRODUCCIÓN

En invertebrados marinos, los estímulos que inducen la metamorfosis de los organismos son agentes específicos, ya sean químicos o biológicos, que se encuentran asociados a ciertos substratos naturales los cuales incluyen películas microbianas, presas potenciales o algas (Pawlik, 1992; Rodriguez *et al.*, 1993; Hadfield, 1998; Hadfield *et al.*, 2000). En algunas especies, la activación de los cambios morfogenéticos puede ser provocada, en ausencia de inductores naturales, por diversos compuestos orgánicos e inorgánicos que funcionan como inductores artificiales. Éstos incluyen sustancias neuroactivas como GABA, DOPA, catecolaminas y derivados colina, compuestos orgánicos e inorgánicos, y algunos iones inorgánicos Mg^{2+} , Li^+ , NH_4^+ , Cs^+ , y K^+ (Pearce y Scheibling, 1994; Ávila *et al.*, 1996; Fleck, 1998; Kawaii *et al.*, 1999; Carpizo-Ituarte *et al.*, 2002).

Estos inductores artificiales, han sido utilizados tradicionalmente para estudiar posibles rutas de transducción que actúan durante la metamorfosis de

diversos invertebrados marinos (Pawlik, 1990; Hadfield, 1998). Sin embargo, en el erizo de mar los mecanismos por los cuales la señal externa es detectada por la larva, interiorizada hacia los tejidos y traducida en los cambios morfogénéticos que ocurren durante la metamorfosis se encuentran aún poco entendidos, aunque, como en muchas otras larvas de invertebrados, la respuesta inicial a la señal metamórfica parece involucrar una respuesta neurosensorial (Burke, 1983; Bishop y Brandhorst, 2001).

Las investigaciones sobre posibles rutas de transducción implicadas en la metamorfosis, han sido realizadas sobre diversos filo de invertebrados. Éstos incluyen, cnidarios (Freeman y Ridgway, 1990; Fleck y Bischoff, 1992; Henning *et al.*, 1996; Fleck, 1997; Leitz, 1997; Siefker *et al.*, 2000; Thieme y Hofmann, 2003), gusanos poliquetos (Pawlik, 1990, 1992; Ilan *et al.*, 1993; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 1998; Holm *et al.*, 1998; Biggers y Laufer, 1999), moluscos (Baxter y Morse, 1987; Morse, 1992; Hadfield, 1998, Hadfield, *et al.*, 2000), crustáceos (Clare *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Clare, 1996), equinodermos (Bishop y Brandhorst, 2001, 2003) y ascidios (Bishop *et al.*, 2001). Algunas de estas rutas implican al adenosin-monofosfato cíclico (cAMP) y al inositol-1,4,5-trisfosfato/diacilglicerol (IP₃/DAG), en conjunto con receptores asociados a proteínas G (GPCRs), la proteína cinasa C (PKC) y al calcio como segundo mensajero. Estos tres últimos elementos parecen ser un tema común en las rutas de transducción presentes durante la metamorfosis de larvas de invertebrados marinos (pero ver Holm *et al.*, 1998 para una excepción).

Además en estudios recientes, se ha documentado al sistema del óxido nítrico/guanosin-monofosfato cíclico (NO/cGMP) durante la metamorfosis del ascidio *Boltenia villosa* y *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop *et al.*, 2001), del caenogasteropodo *Ilyanassa obsoleta* (Leise *et al.*, 2001) y del erizo de mar *Lytechinus pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001, 2003).

En eucariotes, una amplia proporción de receptores celulares de membrana son GPCRs. A partir de ellos se transducen una extensa variedad de señales extracelulares, incluso señales físicas, químicas o biológicas, como luz, iones de calcio, nucleótidos, aminoácidos, feromonas, lípidos, péptidos y glicoproteínas (Bai, 2004). Siendo tan abundantes como receptores, e implicados en la percepción olfatoria de mamíferos e insectos (Reed, 2004), no sorprende que se considere que los GPCRs pueden estar implicados en las rutas de transducción durante la metamorfosis de larvas invertebrados marinos. Hidrozoarios y balanos parecen emplear GPCRs de la familia de siete dominios transmembranales en el inicio de su metamorfosis (Schneider y Leitz, 1994; Clare, 1996), mientras que en moluscos, en abulones particularmente, algunas investigaciones indican que se emplea el mismo mecanismo (Baxter y Morse, 1987, 1992).

Otro elemento común presente durante la inducción a la metamorfosis de larvas de invertebrados marinos, es la activación de la PKC. Esto ha sido documentado como la parte de la cascada de señales internas durante la metamorfosis de cnidarios como *Mitrocomella polydiademata*, *Cassiopea* spp.,

Aurelia aurita, *Chrysaora hysoscella* y *Cyanea lamarckii* (Freeman and Ridgway, 1990; Fleck and Bischoff, 1992; Siefker *et al.*, 2000), y el crustáceo *Balanus amphitrite* (Yamamoto *et al.*, 1996). Biggers y Laufer (1999) utilizaron hormonas que activan PKC, como inductores de la metamorfosis del poliqueto *Capitella sp.* Estos autores sugieren que la activación de esta enzima modula canales de calcio y de potasio durante la metamorfosis de estos organismos. Sin embargo, los mecanismos específicos por los cuales la PKC y el calcio regulan la metamorfosis en *Capitella* no fueron determinados.

El papel de calcio como un segundo mensajero durante la metamorfosis de invertebrados marinos ha sido parcialmente documentado para diferentes fila, incluyendo el gasterópodo *Haliotis rufescens* (Baxter y Morse, 1987), el poliqueto *Phragmatopoma californica* (Ilan *et al.*, 1993), el braquiópodo *Terebratalia* (Freeman, 1993), el crustáceo *Balanus amphitrite* (Clare *et al.*, 1995; Clare, 1996), el hidrozooario *Phialidium gregarium* (McCauley, 1997) y en el hidroide *Tubularia mesembryanthemum* (Kawaii *et al.*, 1999). En todos estos organismos, los compuestos utilizados incidieron sobre rutas dependientes del cAMP, que involucran al sistema IP_3/DAG y a canales de calcio. Sin embargo, los eventos específicos dentro de las rutas estudiadas no se encuentran completamente entendidos para ninguno de los organismos mencionados.

El presente estudio se enfocó en determinar si las rutas de transducción dependientes de GPCRs y PKC se encuentran presentes durante el proceso de metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*, y si el calcio participa como un

segundo mensajero en estos acontecimientos. Esta aproximación consistió en probar diversos compuestos farmacológicos que se sabe activan o inhiben estos 3 elementos, asumiendo que 1) los activadores de PKC, GPCRs y promotores del flujo de calcio provocará la metamorfosis y 2) los inhibidores de estos elementos transducción inhibirán el progreso de la metamorfosis.

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de larvas

Adultos de erizo morado *S. purpuratus* se obtuvieron de la zona costera de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México, transportado inmediatamente al laboratorio y mantenidos en estanques con agua de mar corriente hasta ser utilizados como reproductores.

Los huevos y la esperma fueron obtenidos con base en el método descrito por Hinegardner (1969), que consistió en una inyección de 1 mL de KCl a 0.53 M, en la cavidad intercelómica. Los organismos fueron colocados individualmente en frascos de cristal de 100 mL, con el hemisferio oral hacia arriba. Los frascos se llenaron previamente con agua de mar filtrada a 1 μ m y esterilizada por irradiación UV (AMF). Los gametos liberados por los animales fueron colectados en estos contenedores y posteriormente fueron fertilizados *in vitro* de acuerdo al método descrito por Strathmann (1987).

Una vez fertilizados, los huevos fueron colocados en cubetas plásticas de 18 L con AMF y sin aireación durante un periodo de 48 a 72 h, tiempo en el cual la mayor parte de los embriones habían alcanzado la etapa de prisma. Posteriormente, las larvas fueron transferidas a tanques cónicos de 45 L conteniendo de AMF, en una concentración inicial de 2 larvas/mL. La temperatura durante el período de cultivo se mantuvo en un intervalo entre 15° a 17. °C, y los organismos fueron alimentados con *Rhodomonas spp*, mientras

que la aireación fue proporcionada de manera constante. Después de 26-28 días, la competencia metamórfica se determinó por la presencia del rudimento juvenil, que en esta etapa ocupa la mitad izquierda del cuerpo larval. Paralelamente, cinco pies ambulacrales se muestran claramente visibles en el rudimento y las larvas tienen la tendencia de estar cerca del fondo de los contenedores (Burke, 1980).

Desarrollo experimental

Una vez que las larvas alcanzaron la etapa competente, fueron inducidas a la metamorfosis en la presencia de fármacos que estimularon o inhibieron GPCRs y PKC, o afectaron el flujo de calcio (Tabla I).

Inicialmente, se seleccionaron entre 20 y 30 larvas con edad oscilando entre 26-29 días posteriores a la fertilización, y fueron elegidas con base a los criterios para determinar competencia descritos anteriormente. Las larvas fueron colocadas en cajas de pozos múltiples (Falcon 1006), previamente preparadas con un volumen conocido de AMF y la concentración deseada del fármaco a probar. Este procedimiento se realizó para cada fármaco elegido y con tres réplicas por cada concentración probada. Cada experimento fue realizado al menos dos veces. En todos los experimentos, se incluyó un control positivo para determinar competencia metamórfica, este consistió en AMF con KCl adicionado a una concentración final de 0.1 M. Las larvas permanecieron en esta solución durante 15 minutos, para posteriormente sustituir la solución por medio fresco de AMF según el método descrito por Carpizo-Ituarte *et al.*

(2002). El control negativo consistió en larvas mantenidas en AMF durante el experimento. Aquí se presentan sólo los resultados de uno de los experimentos realizados para cada fármaco utilizado. Los criterios para seleccionar los resultados incluidos, fueron que exhibieran la mejor respuesta de las larvas a los controles positivos con KCl como una medida de competencia, y los valores más bajos de metamorfosis espontánea en los controles negativos con AMF. Sin embargo, los resultados en todos los experimentos realizados mostraron el mismo patrón de respuesta y diferencias estadísticas similares.

En tratamientos en los cuales se utilizó algún solvente para disolver los compuestos probados (p. ej. Dimetil Sulfóxido o DMSO), se colocó paralelamente como control un tratamiento con la cantidad equivalente del solvente usado en el diseño experimental.

En los tratamientos donde se esperó un efecto de inhibición por parte del fármaco, dicho inhibidor se añadió 15 minutos antes de añadir KCl. Pasado este período de incubación, el KCl se agregó de la misma manera en que se realizó para el control positivo. Una vez que fue removido el medio conteniendo KCl a la par que inhibidor, el fármaco inhibidor fue adicionado nuevamente de modo que las larvas permanecieran en su presencia durante el resto del período experimental.

Se realizaron también experimentos paralelos para probar la interacción entre inhibidores de proteína G (suramin y guanosine) y películas bacterianas. La efectividad de las biopelículas como inductores naturales de la

metamorfosis de larvas de *S. purpuratus*, ha sido demostrada extensamente en experimentos realizados en nuestro laboratorio. Para generar las películas bacterianas, las mismas cajas de pozos múltiples (Falcon 1006) fueron colocadas en un estanque conteniendo organismos adultos de erizo morado. Dichas cajas permanecieron en el estanque durante un lapso de 10 a 12 días. Después de este período, los platos fueron lavados con AMF, y 5 mL de esta misma AMF fueron añadidos con la concentración deseada del inhibidor a probar (suramin o guanosine). Posteriormente, veinte a treinta larvas competentes fueron añadidas y permanecieron en incubación durante un periodo de hasta de 24 horas. Se colocó un control positivo para probar competencia metamórfica, el cual consistió en una caja de pozos múltiples conteniendo únicamente AMF y la película bacteriana.

Con el fin de determinar si la biopelícula degradó el inhibidor de proteína G, se realizó un experimento final en el cual suramin, a concentración final de 100 μM , fue incubado 24 h en la presencia y ausencia de la biopelícula antes de la introducción de las larvas. Después de que la solución de suramin fue incubada bajo las condiciones descritas, esta se utilizó como medio en cajas multi pozos para probar la efectividad del KCl como inductor. Se incluyó un control positivo con KCl (0.1 M, 15 minutos) para probar la competencia larval, y un control negativo consistente en larvas incubadas únicamente en AMF para determinar metamorfosis espontánea.

El progreso de metamorfosis fue comprobado 24 h después de la adición inicial de los diferentes fármacos probados, lo cual se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico Stemi 2000 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). En algunos experimentos (TPA, suramin, guanosine), el progreso de la metamorfosis fue registrado al menos tres veces, entre las 6 y las 24 h después de la inducción inicial. Las larvas se consideraron metamorfoseadas, si los juveniles presentaban colapso y degradación del epitelio larval así como espinas y pies ambulacrales emergidos. También en esta etapa, las postlarvas avanzaban lentamente en el fondo del plato usando sus pies ambulacrales. Las larvas y postlarvas muertas, se distinguieron de las vivas por características morfológicas y de pigmentación. Las larvas que se caracterizaron como vivas al final de experimento, se encontraban aun nadando y agitaban sus bandas ciliares con movimientos activos. Las postlarvas vivas mostraron movimientos activos de sus espinas y de sus pies ambulacrales, además presentaron pigmentación clara entre rojiza y verdosa. Las larvas y juveniles muertos presentaron movilidad nula, pigmentación marrón opaca y sus tejidos contrahechos.

Todos los fármacos empleados fueron obtenidos de la compañía Calbiochem. Las soluciones stock de suramin, guanosine, mastoparan, guanylyl, cafeína y TMB-8 clorhídrico, fueron preparadas en agua destilada; mientras que los fármacos K252a, bisindolylmaleimide I, TPA, indolactam V, 1,2 didecanoyl-rac-glicerol, nifedipine, ionóforo A23187 free acid, ácido

cyclopiazonico y thapsigargin fueron disueltos en DMSO. Bay K 8644 fue disuelto en etanol (EtOH) 100%.

Análisis estadístico

Los resultados están expresados como el número de individuos metamorfizados dividido por el total de individuos inspeccionados. A los datos así obtenidos, se les aplicaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. Si los datos no presentaron una distribución normal ni fueron homogéneos, se utilizó estadística no paramétrica. Posteriormente se aplicó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para determinar si existieron diferencias significativas entre las concentraciones de los fármacos empleadas. En el caso de presentarse, se utilizaron pruebas a posteriori para establecer entre qué concentraciones se presentaron dichas diferencias. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Sigma Stat (Jandel Scientifics).

I.3 RESULTADOS

Un total de 16 fármacos relacionados con rutas de transducción específicas fueron probados durante los experimentos. Sólo seis resultaron eficaces como promotores o inhibidores de la metamorfosis y se muestran marcados con asteriscos en la Tabla I. El resto de los compuestos no tuvo ningún efecto o fueron tóxicos para las larvas.

Tabla I. Fármacos utilizados en larvas competentes de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Los fármacos marcados con asterisco (*) son aquellos que tuvieron efecto significativo en la metamorfosis

ACCIÓN	FÁRMACO	EFFECTO ESPERADO
PKC Inhibidores	K252a; Bisindolylmaleimide I	INHIBICIÓN
PKC Activadores	TPA (forbol-12-miristato-13-acetato)*; Indolactam V*; 1,2 Didecanoyl-rac-glicerol	ACTIVACIÓN
PG Inhibidores	Suramin, sal de sodio*; Guanosine*	INHIBICIÓN
PG Activadores	Mastoparan; Guanylyl-5'-imidodifosfato, sal tetralítica	ACTIVACIÓN
Flujo de Ca ²⁺ Inhibidores	Cafeína; Nifedipine; TMB-8, Clorhídrico	INHIBICIÓN
Flujo de Ca ²⁺ Promotores	Ionóforo A23187 Free Acid*; Bay K 8644; Ácido Cyclopiazonico; Thapsigargin*	ACTIVACIÓN

Activadores de PKC

TPA (forbol-12-miristato-13-acetato) fue el inductor de la metamorfosis más eficaz en las larvas de *S. purpuratus* (Figura 1). A las 8 h de exposición al fármaco, el porcentaje más alto de la metamorfosis se situó en 84 % a concentración de 0.1 µM, y disminuyó con las menores concentraciones a 12 %

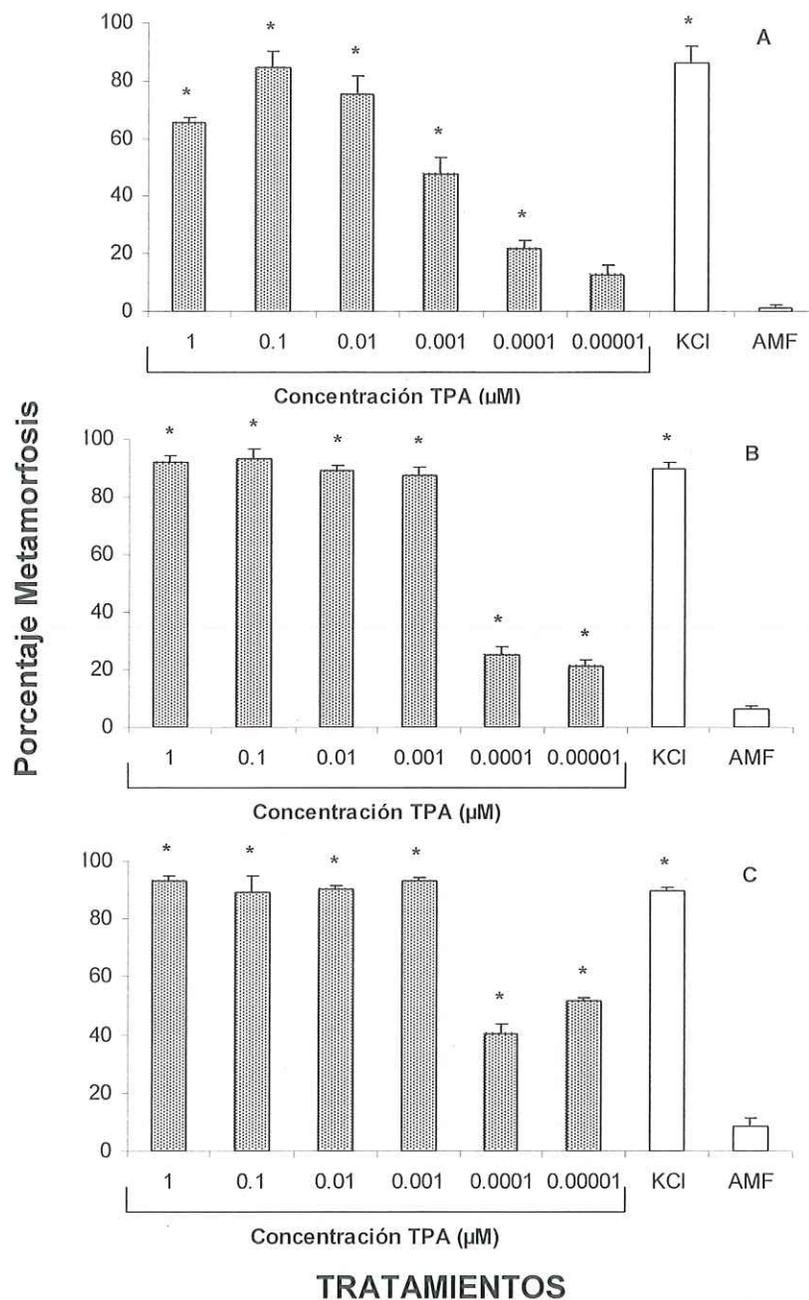


Figura 1. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 8(A), 16(B) y 24 h(C) de exposición a diferentes concentraciones de TPA como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de TPA que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua filtrada y esterilizada.

en 0.00001 μM . A las 16 y 24 h posteriores a la inducción inicial, el porcentaje de metamorfosis obtenido en las concentraciones más altas (1 a 0.001 μM) se encontró cercano al 100 %, y alcanzó entre el 20 al 51 % en las concentraciones restantes (0.0001 y 0.00001 μM). También a ocho horas de exposición, los porcentajes de metamorfosis obtenidos en los tratamientos con TPA fueron significativamente distintas con respecto al control negativo en todas las concentraciones, con excepción de 0.00001 μM (Tukey, $p < 0.05$); paralelamente, las concentraciones entre 0.01 μM y 0.00001 μM presentaron diferencias significativas entre ellas (Tukey, $p < 0.05$) (Figura 1A).

Entre las 16 y 24 h, la respuesta se niveló en las concentraciones más altas (entre 1 μM y 0.001 μM) y no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones e incluso con respecto al control positivo con KCl (Tukey, $p > 0.05$) (Figuras 1B, C). Entre estos mismos intervalos de tiempo, las concentraciones 0.0001, 0.00001 μM no fueron significativamente diferentes entre ellas (Tukey, $p > 0.05$), pero sí significativamente distintas que el resto de los tratamientos. La mortalidad en los experimentos con TPA no fue mayor a 8 % en todos los tratamientos, y el DMSO empleado para disolver el TPA no tuvo ningún efecto sobre la metamorfosis de las larvas.

Indolactam fue un inductor de la metamorfosis menos efectivo que TPA (Figura 2). A las 24 h el porcentaje más alto de la metamorfosis (84 %) fue obtenido con la concentración más baja probada (0.001 μM). No se

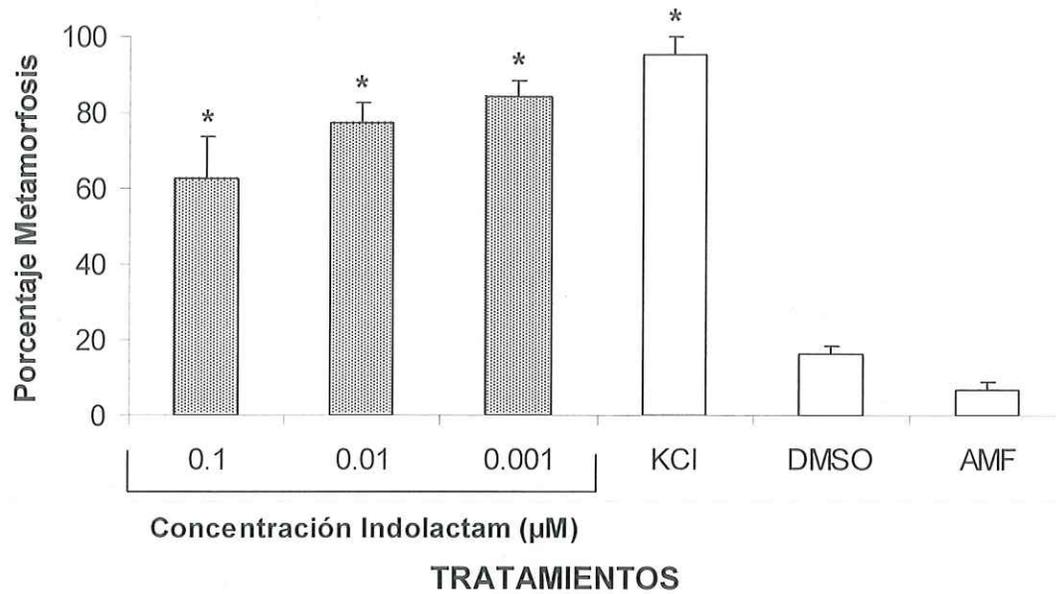


Figura 2. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones de indolactam como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (DMSO, AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de indolactam que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones de indolactam.

encontraron diferencias significativas entre las concentraciones inductoras de indolactam (0.1, 0.01 y 0.001 μ M) y el control con KCl (Tukey $p > 0.05$), pero estas concentraciones fueron significativamente distintas con respecto al control negativo (AMF) y el control con DMSO (Tukey, $p < 0.05$). Indolactam fue tóxico a las larvas en concentraciones mayores a 0.1 μ M (datos no mostrados).

Inhibidores de Proteínas G

Suramin inhibió la metamorfosis en presencia de KCl como inductor a las 24 h posteriores a la inducción inicial (Figura 3). La inhibición fue eficaz a las concentraciones de suramin de 10, 50 y 100 μ M (72, 58 y el 64 % respectivamente), siendo los porcentajes significativamente diferentes a los obtenidos a la concentración 1 μ M (92 %) y el control positivo con KCl (95 %) (Tukey, $p < 0.05$).

El efecto de suramin en presencia de una película bacteriana como inductor también fue probado. A las 6 h posteriores al contacto inicial con el inductor natural y la sustancia química probada, los porcentajes de metamorfosis obtenidos en las concentraciones a 50 y 100 μ M fueron significativamente menores (Tukey, $p < 0.05$) que los obtenidos en el control positivo que contenía únicamente la biopelícula (Figura 4A). Tampoco existieron diferencias estadísticas (Tukey, $p > 0.05$) entre estos tratamientos en comparación con el control negativo con AMF (Figura 4A). A las 12 h posteriores a la inducción, el porcentaje de metamorfosis en la concentración

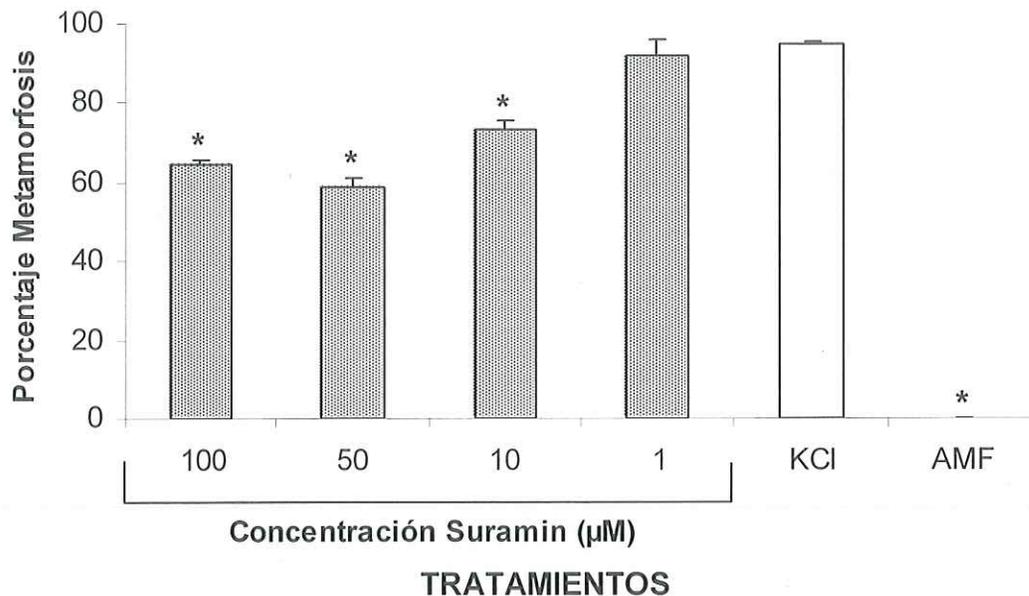


Figura 3. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones de suramin como inhibidor (N=3). Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de suramin por 15 minutos antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en la presencia del inhibidor. Después de 15 minutos se removió la solución y se reemplazó por solución fresca de suramin y AMF a las concentraciones que se indican en el eje de las X. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de suramin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

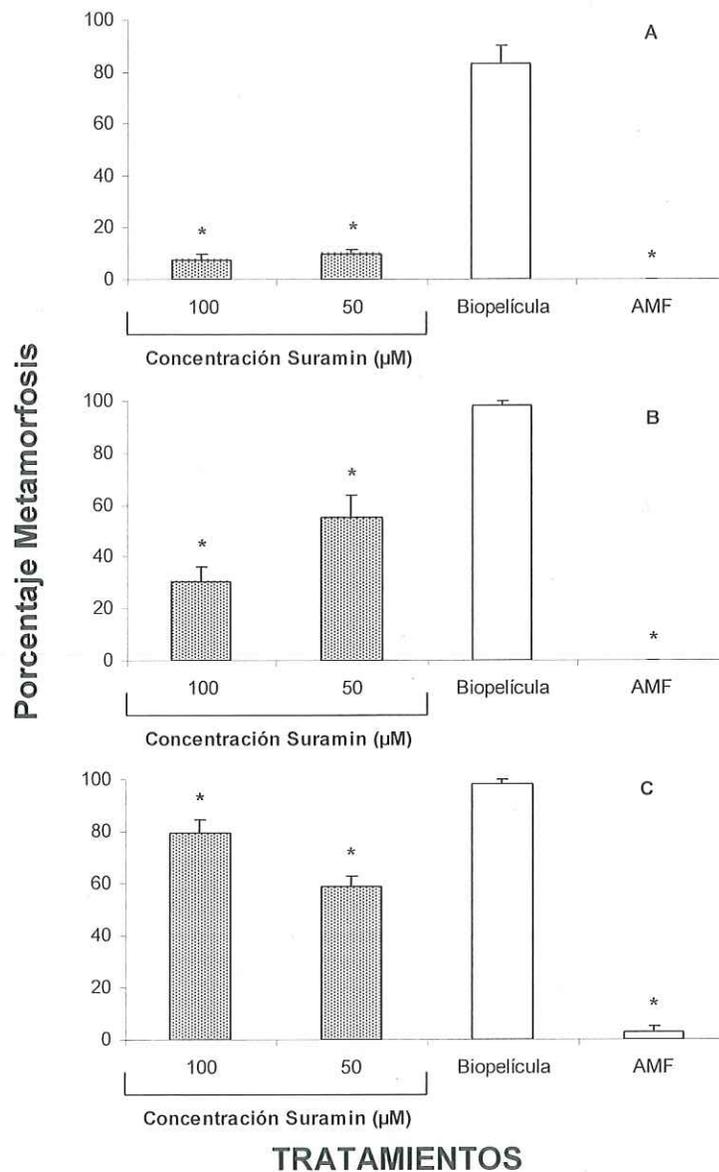
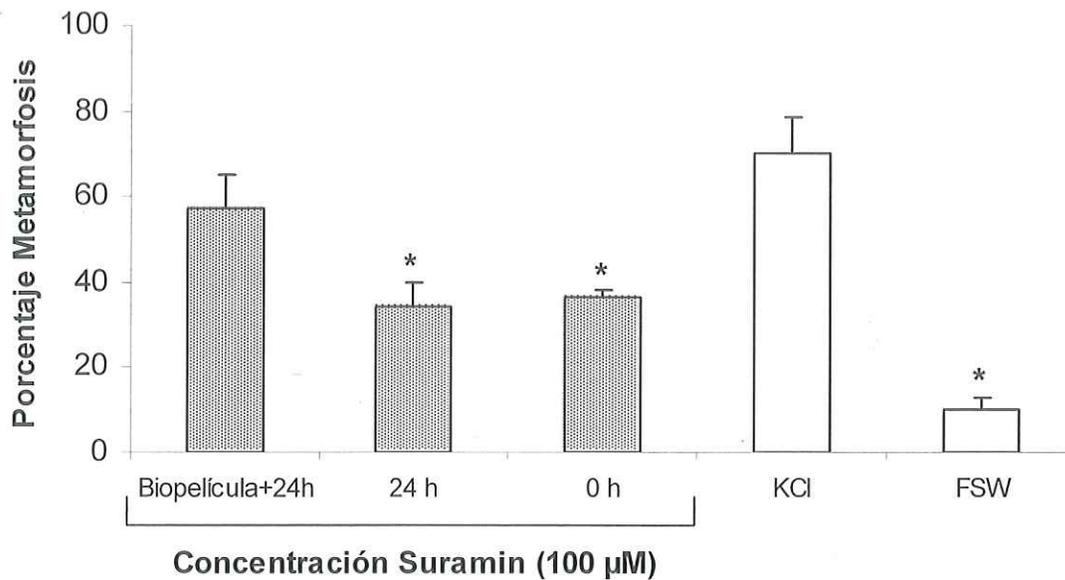


Figura 4. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) de *S. purpuratus* después de 6(A), 12(B) y 24 h (C) horas de exposición a diferentes concentraciones de suramin como inhibidor (N=3), y una película bacteriana como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (Biopelícula). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de suramin indicadas en el eje de las X, Biopelícula, 10-12 día de desarrollo de película bacteriana en tanques con adultos; AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

más alta (100 μM) se encontró cerca del 35 %, mientras la concentración más baja (50 μM) mostró porcentajes de la metamorfosis cercanos a 60 % (Figura 4B). En el mismo experimento, pasadas 24 h de contacto con suramin y la película bacteriana, las concentraciones de 100 y 50 μM en los tratamientos con suramin presentaron nuevamente diferencias significativas entre ellos y comparados con los controles positivo (con biopelícula) y negativo (solo FSW) (Tukey, $p < 0.05$); sin embargo de manera contrastante, la concentración de 100 μM mostró porcentajes más altos de metamorfosis (cerca del 80 %) en comparación con el tratamiento a concentración 50 μM , donde los porcentajes de metamorfosis se encontraron cercanos al 60 %. Existe la posibilidad que la película bacteriana cause la degradación de suramin, y que debido a esto el efecto inhibitorio se haya reducido a las 24 h de iniciado el experimento (Figura 4C). Con la finalidad de probar esta hipótesis, suramin fue preincubada en presencia de una biopelícula.

En el experimento donde se probó la posible degradación del inhibidor de proteínas G suramin por la presencia de la biopelícula utilizada como inductor natural, los porcentajes más altos de metamorfosis (57 %) correspondieron al tratamiento donde fármaco usado fue preincubado 24 h en presencia de biopelícula, y el porcentaje más bajo de metamorfosis (34 %) correspondió al tratamiento donde el inhibidor no tuvo ninguna incubación previa (Figura 5). Los porcentajes de metamorfosis en todos los tratamientos con suramin fueron significativamente distintos con respecto al control positivo con KCl (Newman-



TRATAMIENTOS

Figura 5. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 24 h (C) horas de exposición a suramin como inhibidor a una concentración de $100 \mu\text{M}$ ($N=3$), y KCl como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: Biopelícula+24h, suramin incubado 24 h sin película bacteriana; 0 h, suramin sin incubación; KCl, 0.1 M (15 minutos, después, AMF); AMF agua de mar filtrada y esterilizada.

Keuls, $p < 0.05$), excepto donde el inhibidor usado fue preincubado 24 h en presencia de película bacteriana ($p > 0.05$). La mortalidad no fue mayor a 8% en todos los experimentos donde suramin tuvo un efecto inhibitor de la metamorfosis.

Guanosine tuvo un marcado efecto sobre la metamorfosis de *S. purpuratus* (Figura 6). A las 6 y 12 h posteriores a la inducción inicial con KCl, el efecto inhibitorio

En el experimento donde se probó el efecto de *guanosine* en presencia de una biopelícula bacteriana como inductor, el tratamiento con el porcentaje más bajo de metamorfosis (4 %) fue 100 μM pasadas 8 horas de la inducción inicial, aumentando el porcentaje de organismos metamorfoseados conforme la concentración del inhibidor decreció en los tratamientos restantes. En todos los casos, los porcentajes de la metamorfosis presentaron diferencias significativas (Newman Keuls, $p < 0.05$) con respecto a los controles positivos (biopelícula y KCl) (Figura 7). A las 16 h de permanencia en el fármaco, el porcentaje más bajo de metamorfosis (43 %) se obtuvo en la concentración más alta probada (100 μM), y fue significativamente distinto a los tratamientos con película bacteriana y KCl (Tukey, $p < 0.05$). Las concentraciones restantes, por lo visto no tuvieron ningún efecto inhibitor sobre la metamorfosis de las larvas, obteniéndose incluso porcentajes de metamorfosis mayores que en los controles positivos. Después de 24 h de inducción, un evento de mortalidad no

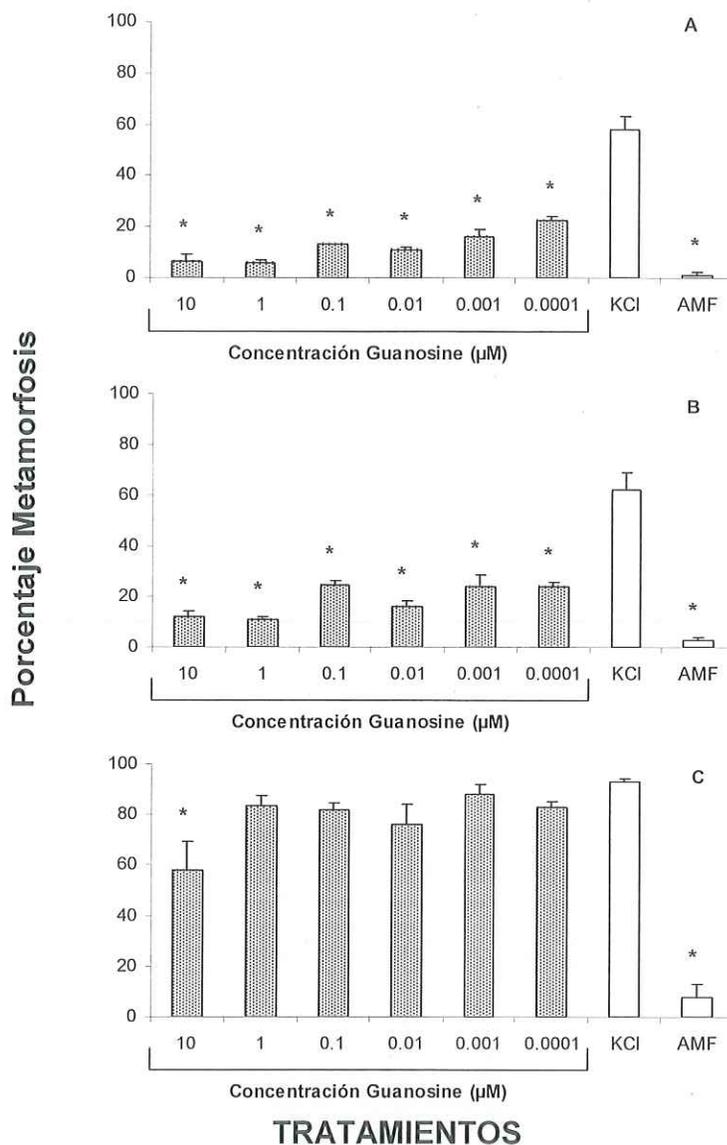


Figura 6. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 6(A), 12(B) y 24 h (C) horas de exposición a diferentes concentraciones de guanosin como inhibidor (N=3), y KCl como inductor. Las larvas fueron expuestas a las diferentes concentraciones de guanosin durante 15 minutos antes de ser inducidas a la metamorfosis con KCl en la presencia del inhibidor. Después de 15 minutos la solución se removió y se reemplazó con solución fresca de guanosin en AMF a las concentraciones que se indican en el eje de las X. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (KCl). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de guanosin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

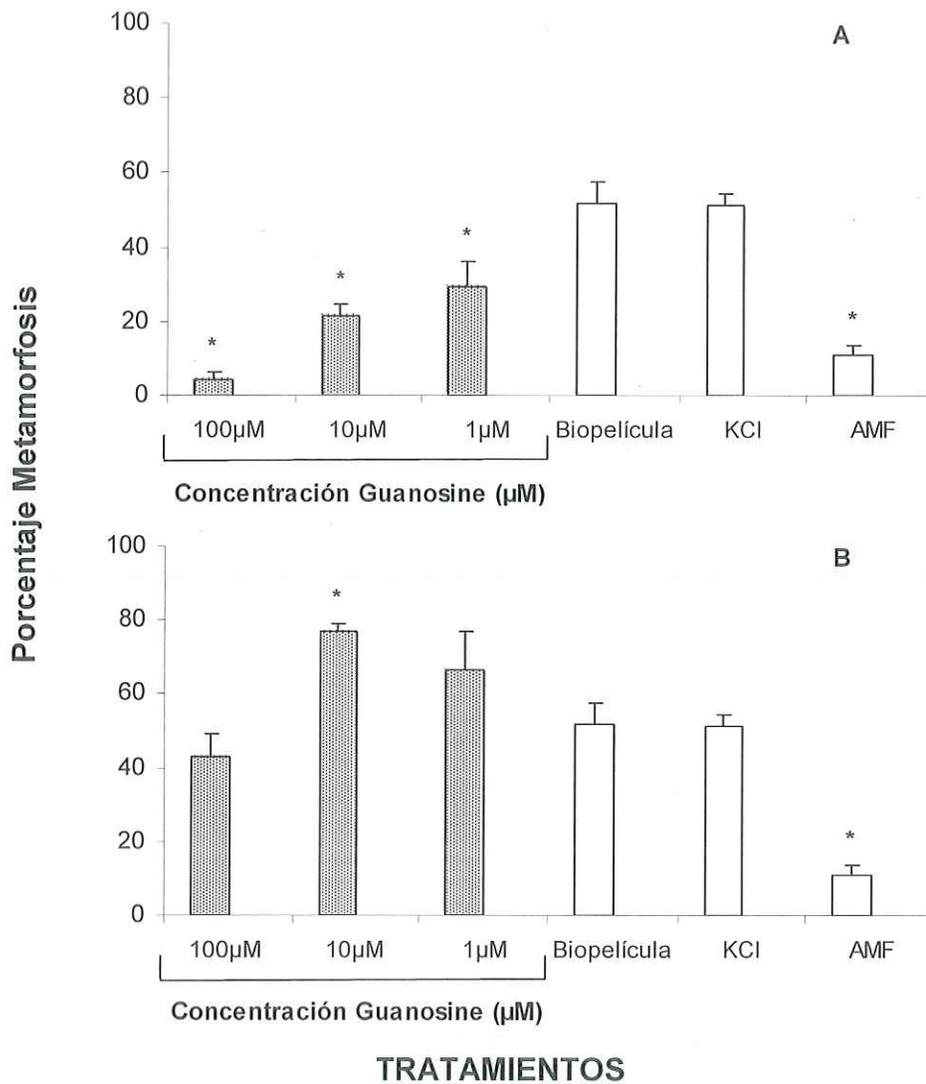


Figura 7. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* después de 8(A), 16(B) horas de exposición a diferentes concentraciones de guanosin como inhibidor (N=3), y película bacteriana como inductor. Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control positivo (Biopelícula). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de guanosin que se indican en el eje de las X; Biopelículas, 10-12 días de desarrollo de la película bacteriana en un tanque con adultos; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada,

selectiva fue observado en todos los tratamientos en este experimento particular, incluso los controles.

Flujo de Calcio

Ionóforo A23187. Los resultados obtenidos con el ionóforo A23187, apoyan la participación de calcio como segundo mensajero durante la metamorfosis de erizo de mar (Figura 8). El porcentaje más alto de metamorfosis se obtuvo en las concentraciones de 5 y 10 μM (48 y el 49 % respectivamente), en donde la metamorfosis fue significativamente mayor que la obtenida en AMF (Tukey, $p < 0.05$). Por su parte, en las concentraciones del ionóforo menores (0,1 y 1 μM), los porcentajes de metamorfosis obtenidos no fueron diferentes significativamente con respecto al control con AMF (Tukey, $p > 0.05$). Sin embargo, los porcentajes de metamorfosis en todas las concentraciones utilizadas fueron significativamente menores que aquellos obtenidos con KCl (Tukey, $p < 0.05$). La mortalidad en todos los tratamientos no excedió el 12 % en todos los tratamientos (datos no mostrados).

Thapsigargin fue un inductor más eficaz de la metamorfosis que el ionoforo A23187 (Figura 9). En concentraciones de 50 y 100 μM , thapsigargin indujo la metamorfosis significativamente más que en el control positivo con KCl (Tukey, $p < 0.05$) y negativo con AMF (Tukey, $p < 0.05$). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de 1 y 10 μM en comparación con el control con AMF (Tukey, $p > 0.05$). No existió ningún efecto por parte del solvente

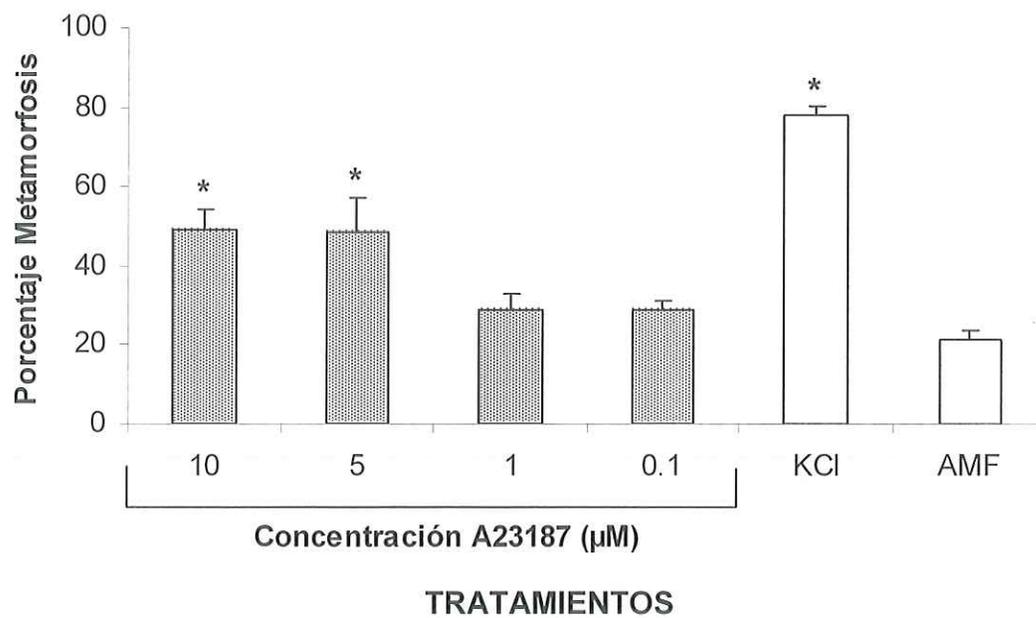


Figura 8. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del ionóforo A23187 como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones del ionóforo A23187 que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones del ionóforo A23187.

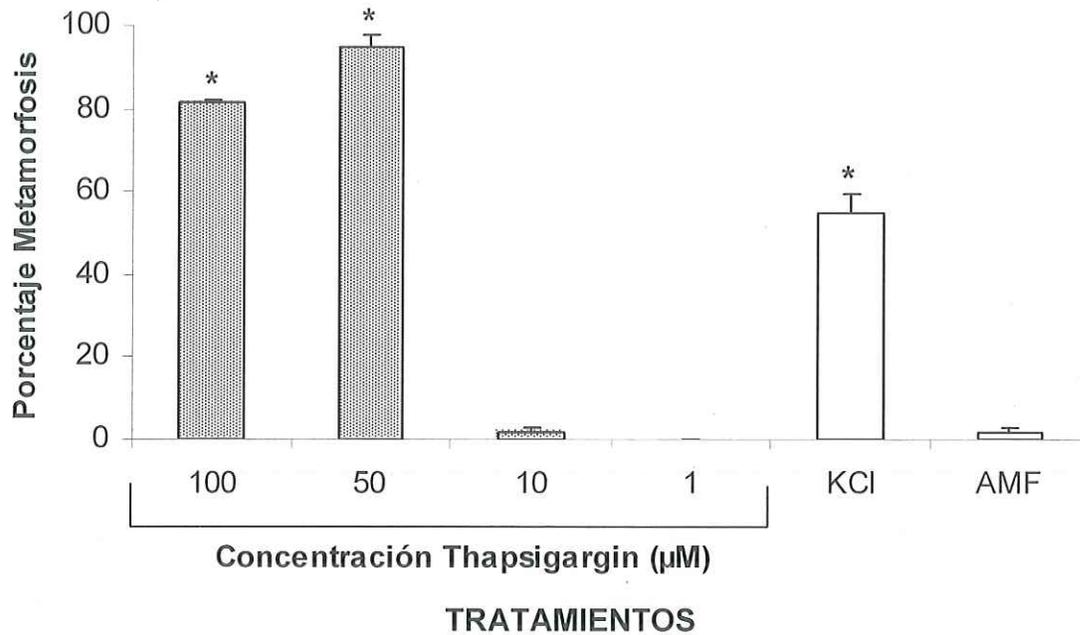


Figura 9. Porcentaje de metamorfosis (± 1 EE) del erizo de mar *S. purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones de thapsigargin como inductor (N=3). Las barras indican el error estándar. El asterisco (*) en la parte superior de las columnas indica las diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos comparados con el control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: las concentraciones de thapsigargin que se indican en el eje de las X; KCl, 0.1 M (15 minutos, después AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada; DMSO, concentración mayor de DMSO utilizado en la preparación de las soluciones de thapsigargin.

empleado para disolver thapsigargin (DMSO) sobre la metamorfosis de las larvas (datos no mostrados).

I.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican la participación del sistema inositol trisfosfato-diacilglicerol (IP₃/DAG), receptores asociados a proteínas G (GPCRs) y proteína cinasa C (PKC) durante la inducción a la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*. El calcio puede intervenir como un segundo mensajero en las rutas de transducción asociadas con este proceso. Sin embargo, esta suposición está basada en la eficacia de sólo 6 de los 16 compuestos probados (Ver anexo 1). La exposición de larvas completas a productos químicos aplicados de manera externa, y que dichos químicos se presume pueden incidir sobre sitios de transducción específicos, es una limitación experimental para elucidar en qué nivel los compuestos pueden actuar. En tales experimentos, la ausencia de respuesta al fármaco probado no necesariamente significa que el objetivo en la ruta de transducción no se encuentra implicado, esto se explica por diversas razones: (1) se asume que los compuestos farmacológicos probados interactúan con las rutas de transducción de manera similar a la forma en que lo hacen en células aisladas de otras especies animales; (2) la permeabilidad de algunos compuestos podría ser diferente cuando son probados en células de invertebrados marinos; (3) pudieran presentar un comportamiento diferente cuando se aplican sobre larvas enteras. Futuros estudios con tejidos larvales aislados o enfocado a regiones específicas de la larva que se presuponga estén implicados en

desencadenar el proceso metamórfico, ayudarán en el esclarecimiento de estos puntos que ahora no son claros.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos para otras especies de invertebrados marinos, donde compuestos similares fueron usados para caracterizar rutas de transducción durante el proceso de metamorfosis (ver Freeman y Ridgway, 1990; Fleck y Bischoff, 1992; Clare, 1996). Baxter y Morse (1987), demostraron la existencia de receptores de lisina acoplados a proteínas G, los cuales posiblemente facilitan la respuesta al GABA, que se sabe estimula la metamorfosis en las larvas del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Al menos una proteína $G\alpha$, la cual es muy similar a los miembros de la familia Gq y que se sabe controlan la actividad de la fosfolipasa C, es expresada en los cilios de la larval del abulón rojo (Wodicka y Morse, 1991). Los GPCRs también han sido caracterizados como parte de las señales de transducción que se activan durante la metamorfosis del balano *Balanus amphitrite* (Clare, 1996) y del hidrozoario *Hydractinia* (Schneider y Leitz, 1994).

La activación de la PKC durante la metamorfosis ha sido documentada para diferentes larvas de invertebrados marinos, esto mediante el uso de forbol-ésteres, los cuales son conocidos por mimetizar la acción del DAG durante la cascada de eventos donde se activa la PKC (Nishizuka, 1984). Los forbol-ésteres han sido caracterizados como inductores efectivos de la metamorfosis para diversas especies de cnidarios (ver Siefker *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2001) y balanos (Yamamoto *et al.*, 1995). En el presente estudio,

el forbol-éster TPA fue el inductor más eficaz de la metamorfosis en larvas del erizo de mar *S. purpuratus*. Freeman y Ridgway (1990), reportan resultados similares con concentraciones equivalentes de TPA en la inducción a la metamorfosis del hidrozooario *Mitrocomella polydiademata*. Estos mismos autores, mostraron una disminución en los porcentajes de inducción de *M. polydiademata* a concentraciones de TPA entre 10^{-7} y 10^{-9} M, lo cual coincide con nuestros resultados, ya que TPA fue menos eficaz como inductor de la metamorfosis de *S. purpuratus* en concentraciones menores a 10^{-9} M pasadas 8 h de permanencia en el fármaco. Los resultados encontrados con TPA como inductor, son reforzados con el efecto inductivo mostrado con larvas tratadas con indolactam, otro activador de PKC. La respuesta contrainductiva a indolactam, donde las larvas respondieron mejor a concentraciones inferiores del compuesto, podría ser explicada por una respuesta bifásica de los receptores a este compuesto, donde concentraciones bajas potencian la acción del mismo y concentraciones altas son inhibitorias. Se conoce que este tipo de la respuesta se presenta en receptores que modulan la concentración interna de calcio en células de mamíferos (ver Hajnóczky y Thomas, 1994; Clapham, 1995).

Con KCl utilizado como inductor, sólo los inhibidores de proteínas G, guanosine y suramin, tuvieron efecto sobre la metamorfosis, al parecer en un sitio corriente abajo del sitio de acción del K^+ . No se sabe hasta el momento como el K^+ activa la metamorfosis, pero evidencias recientes recabadas por

Hadfield *et al.* (2000), apunta a que su efecto se presenta ulterior al de las células sensoriales primarias en *Phestilla sibogae*. Sin embargo, aun en esta especie, el sitio de acción específico del K^+ aun no ha sido determinado.

Excepto durante las primeras 6 h, en donde guanosine presenta al parecer una respuesta dosis dependiente (ver Figura 6A), en el resto de los periodos evaluados este compuesto sólo retrasa la metamorfosis. Esto podría explicarse por una baja afinidad del compuesto con la proteína G correspondiente.

Por otra parte, en los experimentos donde comparamos la respuesta de *S. purpuratus* al inductor natural (película bacteriana) en presencia de los inhibidores de proteínas G suramin y guanosine, observamos una respuesta inhibitoria similar a la observada en presencia de KCl a las 6 y 12 h posteriores a la inducción inicial. Estos resultados abren la posibilidad de que las rutas de transducción activadas por el inductor natural (biopelícula) y el artificial (KCl) sean las mismas, e incluyan los mismos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

A las 24 h de iniciada la inhibición, la eficacia de suramin al parecer disminuye. Una explicación a este efecto, podría ser que las bacterias degradaron el compuesto antes de poder actuar sobre las larvas. Los experimentos donde el inhibidor suramin fue preincubado 24 h en la presencia de una película bacteriana antes de tener contacto con las larvas, apoyan esta explicación. Guanosine posiblemente tuvo un patrón de respuesta similar al

observado en suramin, donde el fármaco fue degradado por bacterias, no obstante esto no fue probado.

El efecto de los inhibidores de proteína G sobre la metamorfosis durante los períodos más largos es intrigante, ya que por lo visto existe un efecto de potenciación de la metamorfosis en las concentraciones más altas. Una posible explicación a este efecto, radica en la generación de un subproducto por la degradación bacteriana del inhibidor en la biopelícula, lo cual podría realzar la respuesta metamórfica.

Con respecto al papel de calcio en la ruta de transducción metamórfica, nuestros resultados confirman reportes previos del efecto inductivo del ionóforo A23187 sobre el erizo de mar *S. purpuratus* (Pearse y Cameron, 1991). En el presente estudio, el ionóforo A23187 y un inhibidor de la ATPasa del calcio (thapsigargin), fueron efectivos activando la metamorfosis de las larvas. Como el ionóforo transporta calcio al interior de la célula sin la participación de un receptor de la membrana, es posible que el calcio actúe como un inductor de la metamorfosis por sí mismo. Por otra parte thapsigargin, al inhibir la ATPasa del calcio en el retículo endoplasmático, posiblemente permitió acumulación de calcio en el citoplasma y actuó de forma equivalente a incrementar los niveles de calcio dentro de la célula por otras fuentes. Aunque nuestro estudio no contempló probar el uso de exceso de calcio a manera de inductor, esto se ha demostrado en otras especies de invertebrados marinos. En *B. amphitrite* por ejemplo, concentraciones de calcio 5 mM por encima de los niveles normales

en el agua de mar activan la metamorfosis, mientras que concentraciones 10 mM por encima de estos mismos niveles la inhiben (Clare, 1996). Por otra parte, la reducción de los niveles de concentración de calcio en el agua, inhibe la metamorfosis en el hidroide *Tubularia mesembryanthemum* (Kawaii *et al.*, 1999). En larvas del erizo de mar *Lytechinus variegatus*, el exceso de calcio estimula la metamorfosis, y se presenta además una tendencia a disminuir el número de larvas metamorfoseadas con un aumento mayor en la concentración de calcio (Cameron *et al.*, 1989).

La efectividad del calcio como segundo mensajero durante la metamorfosis de invertebrados marinos ha sido documentada para diversas especies (ver Ilan *et al.*, 1993; Clare *et al.*, 1995; Clare, 1996; McCauley, 1997; Kawaii *et al.*, 1999). Además, la participación del calcio podría estar relacionada con las rutas de transducción donde participan los GPCRs y la PKC. La cascada de eventos generados por la activación del sistema IP₃-DAG, provoca la liberación de calcio del retículo endoplasmático y promueve la activación de distintos tipos de PKC (α , βI , βII y γ) (Clapham, 1995; Cullen, 2003). Este podría ser el caso durante la metamorfosis de *S. purpuratus*, donde, según nuestros resultados, estos tres elementos, GPCR, PKC y calcio, tienen participación en la transmisión de la señal inductora.

El modelo que proponemos para la activación de la metamorfosis en erizos de mar vía las rutas de transducción referidas con anterioridad, se encuentra basado en el ciclo del fosfoinositol (Nishizuka, 1984), y considera una ruta

única donde la activación de receptores acoplados a proteínas G estimulan la liberación de la fosfolipasa C (PLC). Una vez que la PLC es activada, esta actúa sobre el fosfatidil-inositol-4, 5-bisfosfato (PIP₂), transformándolo en inositol-1, 4, 5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Se sabe además que el DAG activa también la PKC (ver Leitz y Klingmann, 1990). Una segunda posibilidad consiste en que los GPCRs y la PKC son activados de forma independiente durante la metamorfosis de erizo de mar, y que cada uno por sí solo es suficiente para disparar la metamorfosis. En ambos casos, el calcio actuaría como un segundo mensajero. La Figura 10 ilustra un modelo hipotético en el cual las rutas de transducción mencionadas anteriormente se relacionan, y muestra también los sitios de acción de los agentes farmacológicos empleados. En este modelo, consideramos que los GPCRs, la PKC y el Ca²⁺ actúan juntos para regular la metamorfosis. Estudios recientes realizados por Bishop y Brandhorst (2001) sobre el erizo de mar *Lytechinus pictus*, indican la participación del sistema NO/cGMP (óxido nítrico/guanosinmonofosfato cíclico) como regulador negativo de la metamorfosis. Estos autores proponen que la generación de óxido nítrico en las larvas, inhibe la metamorfosis del erizo, esto con la participación del chaperón molecular HSP90 (Bishop y Brandhorst, 2001). Considerando que un mecanismo similar podría funcionar en *S. purpuratus*, dos posibilidades existen para relacionar las rutas caracterizadas durante el presente estudio con el sistema NO/cGMP: (1) la cascada de eventos que inicia con la activación de GPCRs o PKC se localiza

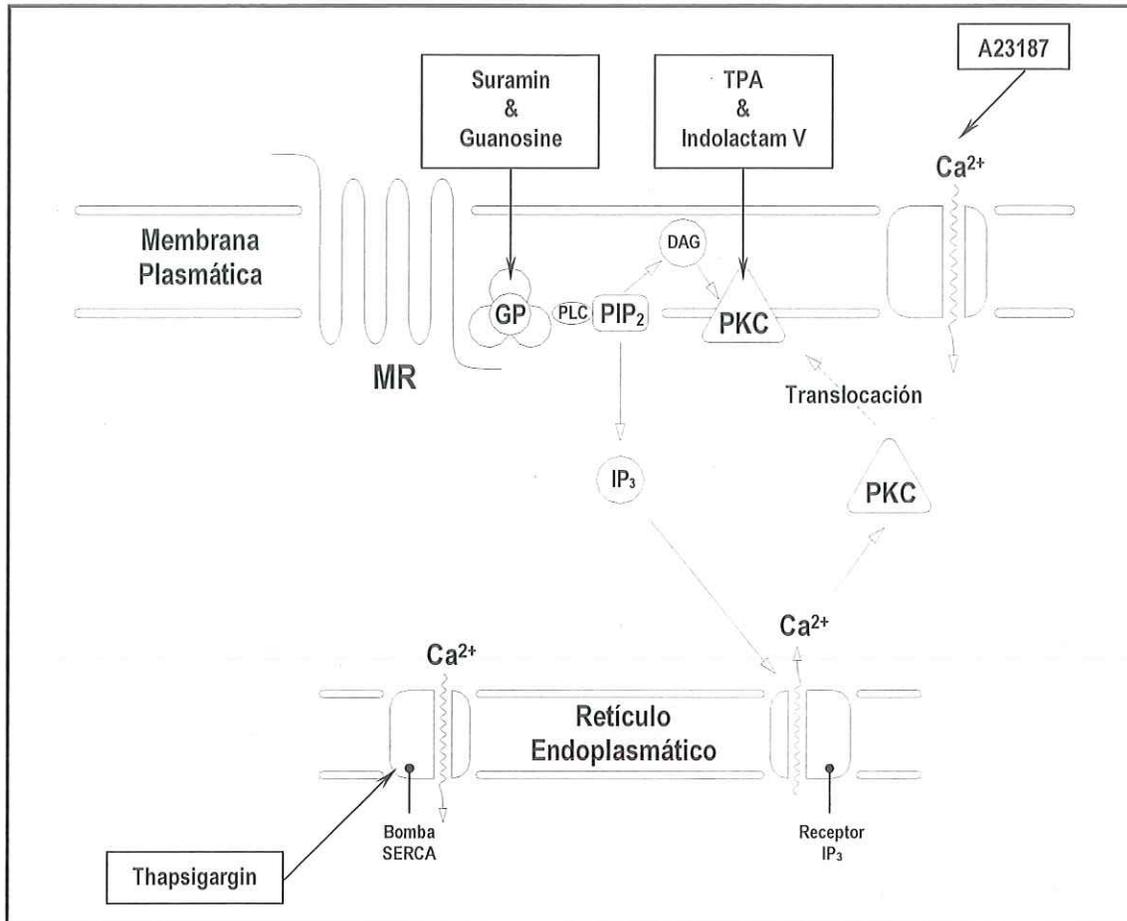


Figura 10. Rutas de transducción propuestas en la metamorfosis de *S. purpuratus*: GP= proteína G, MR= receptor de membrana, PLC= fosfolipasa C, PIP₂= fosfatidilinositol difosfato, DAG= diacilglicerol, IP₃= inositol trisfosfato, PKC= proteína cinasa C. El modelo propuesto se basa en el ciclo propuesto por Nishizuka (1984), el cual considera una ruta única donde la activación de GPCRs (receptores asociados a proteínas G) activan a su vez la fosfolipasa C, la cual divide al fosfatidil-inositol-4, 5-difosfato. A partir de esta separación se generan IP₃ y DAG. El DAG a su vez activa la PKC, mientras que el IP₃ activa a otro receptor de membrana en el retículo endoplasmático y libera calcio. La otra fuente de calcio es el espacio extracelular, y puede ingresar al citoplasma de la célula a través de canales iónicos.

corriente arriba del sistema del NO, y su activación desemboca en el cese de producción de NO, ya sea por la inhibición de genes específicos o por la producción de una proteína que inhibe la NOS (sintetasa del óxido nítrico) o el chaperón HSP90; (y 2) la señal causada por la activación de GPCRs o de la PKC es más potente que el efecto inhibitorio producido por el sistema del NO. Recientemente, la activación de un tipo específico de PKC en células humanas monocíticas, ha sido relacionada con la regulación de la sintetasa inductiva del óxido nítrico (iNOS) (Pham *et al.*, 2003).

Estos resultados indican que los GPCRs, la PKC y el calcio son componentes de las rutas de transducción que participan en la activación de la metamorfosis de larvas de *S. purpuratus*. Estudios posteriores deben enfocarse a determinar dónde y cuándo se expresan estos componentes en la larva, y cómo son regulados durante la metamorfosis. Los datos de las secuencias obtenidas del mapa genético del erizo de mar (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006), servirán para esclarecer la regulación molecular de la metamorfosis en larvas del erizo de mar. Tener acceso a los datos de secuencias de genes que podrían participar durante la metamorfosis del erizos de mar, abre la posibilidad de documentar los modelos de expresión genética regulados probablemente por las rutas de transducción sugeridas aquí.

CAPÍTULO II.

Serotonina como inductor de la metamorfosis.

II.1 INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso presente en las larvas de equinodermos, posee gran parte de los sistemas neuronales desarrollados en vertebrados (Katow *et al.*, 2004). Ejemplo de ellos es el sistema serotoninérgico, el cual se encuentra relacionado con varias funciones cerebrales básicas como la búsqueda de alimento, el comportamiento sexual y el control del sueño (Weiger, 1997).

En invertebrados marinos, la presencia de un sistema nervioso serotoninérgico es un elemento común en el desarrollo larval de diversos phyla, ejemplo de ello se presenta en el phoronido *Phoronis pallida* (Santagata, 2002), el hidrozooario *Phialidium gregarium* (McCauley, 1997), en el crustaceo *Balanus amphitrite* (Yamamoto *et al.*, 1996) y en moluscos como *Aplysia californica* e *Ilyanassa obsoleta* (Marois y Carew, 1997; Dickinson y Croll, 2003). La presencia de este sistema nervioso se ha relacionado con diversas funciones, que van desde procesos de desarrollo hasta el control del movimiento de las bandas ciliares y la regulación del proceso de metamorfosis (ver Leise *et al.*, 2001).

En el phylum echinodermata en particular, la presencia de células con receptores de serotonina se ha descrito en tres de sus cuatro clases: en la estrella de mar *Patiriella regularis* (Chee y Byrne, 1999), el holoturoideo *Parastycopus californicus* (Burke *et al.*, 1986) y del equinoideo *S. purpuratus* (Bisgrove y Burke, 1986). La función de este sistema neural ha sido implicado mayormente en procesos de desarrollo (e. g. Cameron *et al.*, 1994), aunque se ha especulado sobre su participación en el desplazamiento larval, la búsqueda de alimento y la metamorfosis de los organismos (ver Byrne, 2000). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha demostrado la participación del neurotransmisor serotonina en la metamorfosis de los organismos, y prácticamente ninguno se ha enfocado a la descripción del desarrollo del sistema nervioso durante la metamorfosis.

El presente trabajo se enfoca a describir la evolución del sistema nervioso serotoninérgico durante la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*, así como la posible regulación de dicho proceso por parte del neurotransmisor serotonina.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción por 5HT (Serotonina)

Los experimentos de inducción con serotonina (5-Hydroxytryptamine, Sigma-Aldrich), se realizaron de manera similar a los descritos en el Capítulo I para experimentos farmacológicos con inductores. Serotonina fue disuelta en AMF.

Larvas competentes de erizo morado *S. purpuratus* se colocaron en AMF en presencia del inductor durante un periodo de 24 horas, al finalizar se retiró el medio y se adicionó AMF. Esto se realizó debido a que en experimentos iniciales se observó una alta mortalidad en todas las concentraciones de serotonina empleadas después de este lapso.

El seguimiento de la metamorfosis se determinó por inspección con el microscopio estereoscópico a las 24 y 48 horas posteriores a la inmersión inicial de las larvas en el medio con serotonina.

Los resultados fueron analizados de igual forma a los obtenidos en los estudios farmacológicos descritos en el Capítulo I. Se les aplicaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas y posteriormente se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. En el caso de presentarse diferencias significativas, se utilizaron pruebas a posteriori para establecer entre cuáles concentraciones se presentaron dichas diferencias.

Marcaje Fluorescente de Sistema Nervioso Serotoninérgico (Inmunocitoquímica)

Larvas competentes fueron inducidas a la metamorfosis mediante inmersión en solución de AMF y cloruro de potasio (0.1 M durante 15 min). Posteriormente se seleccionaron de 80 a 100 larvas en proceso de metamorfosis a los 15, 45 y 90 min posteriores a la inducción y se realizó el proceso de marcaje como se describe a continuación. En forma adicional, también fueron seleccionadas larvas competentes y postlarvas recién metamorfozadas para someterlas al mismo procedimiento.

Durante todo el proceso se mantuvo a los organismos cubiertos y a temperatura de 4 °C para evitar la incidencia de la luz y el fotoblanqueado. Los organismos seleccionados se transfirieron a tubos de microcentrífuga conteniendo las soluciones utilizadas en el marcaje, de acuerdo a los tiempos y concentraciones referidas en la Tabla II

Tabla II. Secuencia del proceso de marcaje de células con receptores de serotonina (5HT) en larvas y postlarvas del erizo de mar *S. purpuratus*.

PASO	ACCIÓN	SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	TIEMPO
1	Lavado	MgCl ₂	370 mM	10 min
2	Fijación	Paraformaldehído (en PBS 1×)	4%	12 h
3	Lavado	PBS (Buffer Salino de Fosfato)	1×	4 x 20 min
4	Inmersión	Anticuerpo Primario: Anti-serotonina de conejo (en PBS 1×/Triton 1:100)	1:500	48 h
5	Lavado	PBS	1×	4 x 20 min
6	Inmersión	Anticuerpo secundario: Anti IgG de Conejo de Cabra conjugado con Rodamina (en PBS 1×/Triton 1:100)	1:100	24 h
7	Lavado	PBS	1×	4 x 20 min
8	Montaje	Glicerol/Tris/n-Propil galato	90%/5mM(pH 9.5)/4%	→Microscopio

Se incluyeron controles negativos para detectar marcaje accidental o autofluorescencia en los especímenes. Estos consistieron en someter organismos en los mismos estadios de desarrollo al protocolo anteriormente descrito, excepto que en estos casos se omitió el anticuerpo primario.

La observación de las características del desarrollo del sistema nervioso durante la metamorfosis de *S. purpuratus*, se realizó con un sistema confocal LSM-510 Meta acoplado a un microscopio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), en conjunto con un láser de argón para una excitación de 543 nm y filtros de emisión de 560 nm. Se utilizó un objetivo Plan-Neofluar 10×/0.3, y la intensidad del láser se situó hasta un máximo de 80 %. Las imágenes presentan 512×512 píxeles, y son reconstrucciones 3D a partir de series Z-Stack de entre 40 y 50 cuadros. Las imágenes confocales fueron capturadas utilizando el programa para computadora LSM-510 (versión 3.2, Carl Zeiss).

II.3 RESULTADOS

Inducción por Serotonina (5HT)

La inducción a la metamorfosis de larvas competentes de erizo morado *S. purpuratus*, fue efectiva en presencia de 5HT a una concentración de 1 mM a las 24 y 48 h posteriores a la adición del fármaco. Con esta concentración, los porcentajes de metamorfosis (31% y 65% respectivamente) fueron significativamente diferentes con respecto al control negativo con AMF (Tukey, $p < 0.05$). Asimismo, aunque los porcentajes de metamorfosis en las concentraciones de 0.1 y 0.01 mM fueron mayores con respecto al mismo control durante todo el desarrollo experimental, no fueron estadísticamente distintos con respecto a este (ver Figura 11). En experimentos preliminares, se utilizó adicionalmente la concentración de 5 mM, la cual fue tóxica para los organismos durante las primeras seis horas posteriores a la inducción (datos no mostrados). Los organismos considerados metamorfizados en los tratamientos con 5HT, en el sentido estricto de las observaciones se considera que desarrollaron "metamorfosis parcial". Esto es, las postlarvas presentaron remanentes del tejido larval, sobre todo en la zona aboral donde todavía fue posible observar los epauletes, los cuales permitieron a las postlarvas nadar aun cuando el rudimento se observó emergido con pies ambulacrales y espinas notablemente desarrolladas. Considerando estas características, las larvas fueron consideradas como metamorfizadas.

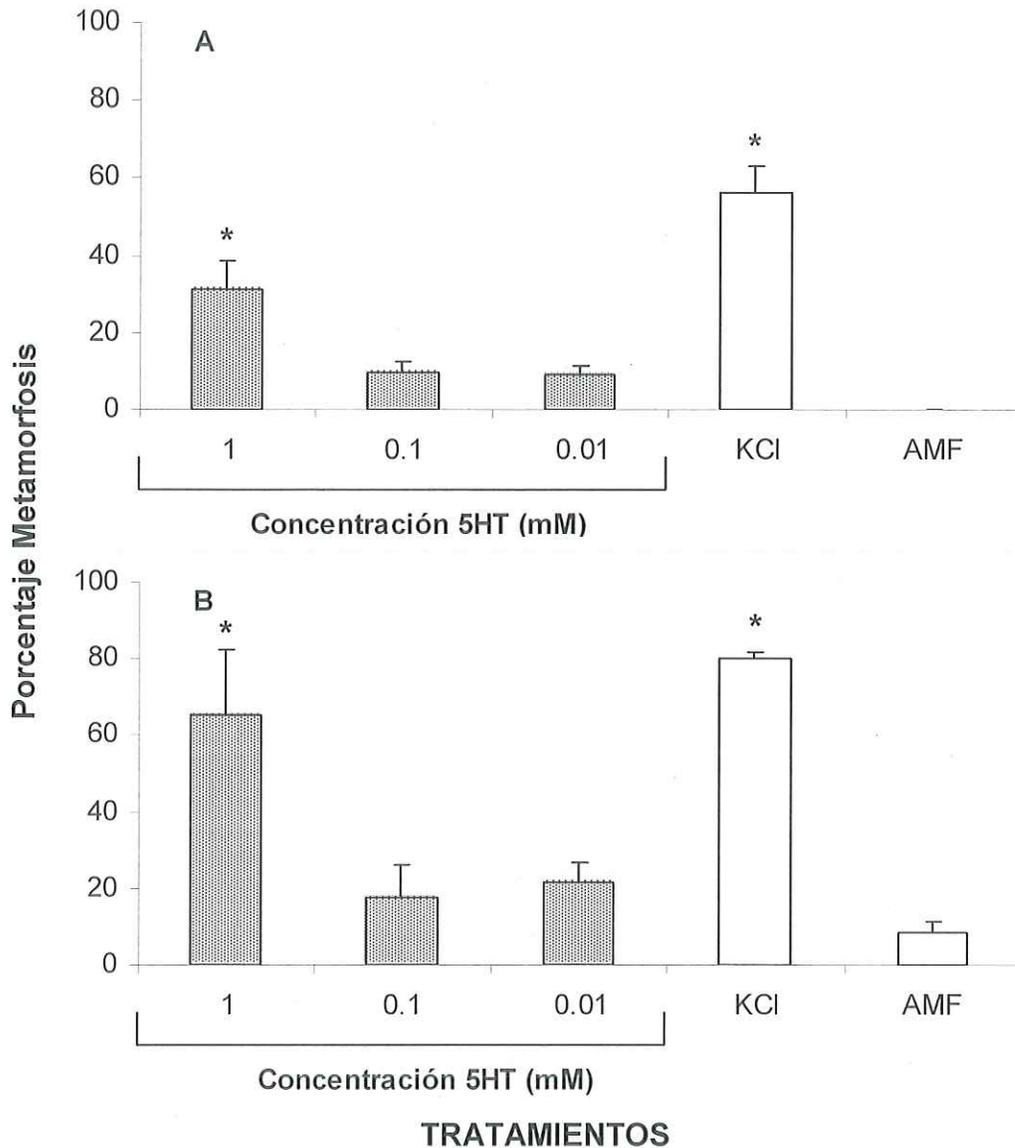


Figura 11. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus* después de 24 h (A) y 48 h (B) de encontrarse expuesto a diferentes concentraciones de 5HT (serotonina) como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: Concentración de 5HT según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

Los organismos tratados con serotonina presentaron un aumento inusual en su actividad durante el transcurso de los experimentos, contrastando con los organismos presentes en los controles con KCl y AMF.

Sistema Nervioso Serotonérgico Durante la Metamorfosis

Larva Competente (Figuras 12, 13 y 14).

La larva competente de *S. purpuratus* mostró un ganglio apical en la base de la cavidad preoral, el cual extiende sus axones hacia los brazos larvales y a lo largo del epitelio larval. También presentó grupos de células serotoninérgicas en la conjunción de la faringe y el estómago así como alrededor de la boca. El estómago presentó autofluorescencia, y el rudimento juvenil mostró la morfología característica del organismo metamorfozado.

A los 15 minutos post-inducción (Figura 15).

El rudimento juvenil comenzó a emerger por el lado izquierdo de la larva, y los axones que comunicaron al ganglio apical con la zona aboral del organismo, comenzaron a desaparecer por el costado izquierdo. El ganglio apical y las células de la faringe permanecieron, al parecer, intactos.

A los 45 minutos post-inducción (Figura 16).

En general se aprecia que los axones continuaron desintegrándose alrededor de la larva, sin embargo, los axones que se localizaron hacia los brazos larvales, se identificaron aun bien diferenciados en este punto avanzado del desarrollo de la metamorfosis. El ganglio apical y las células de la faringe

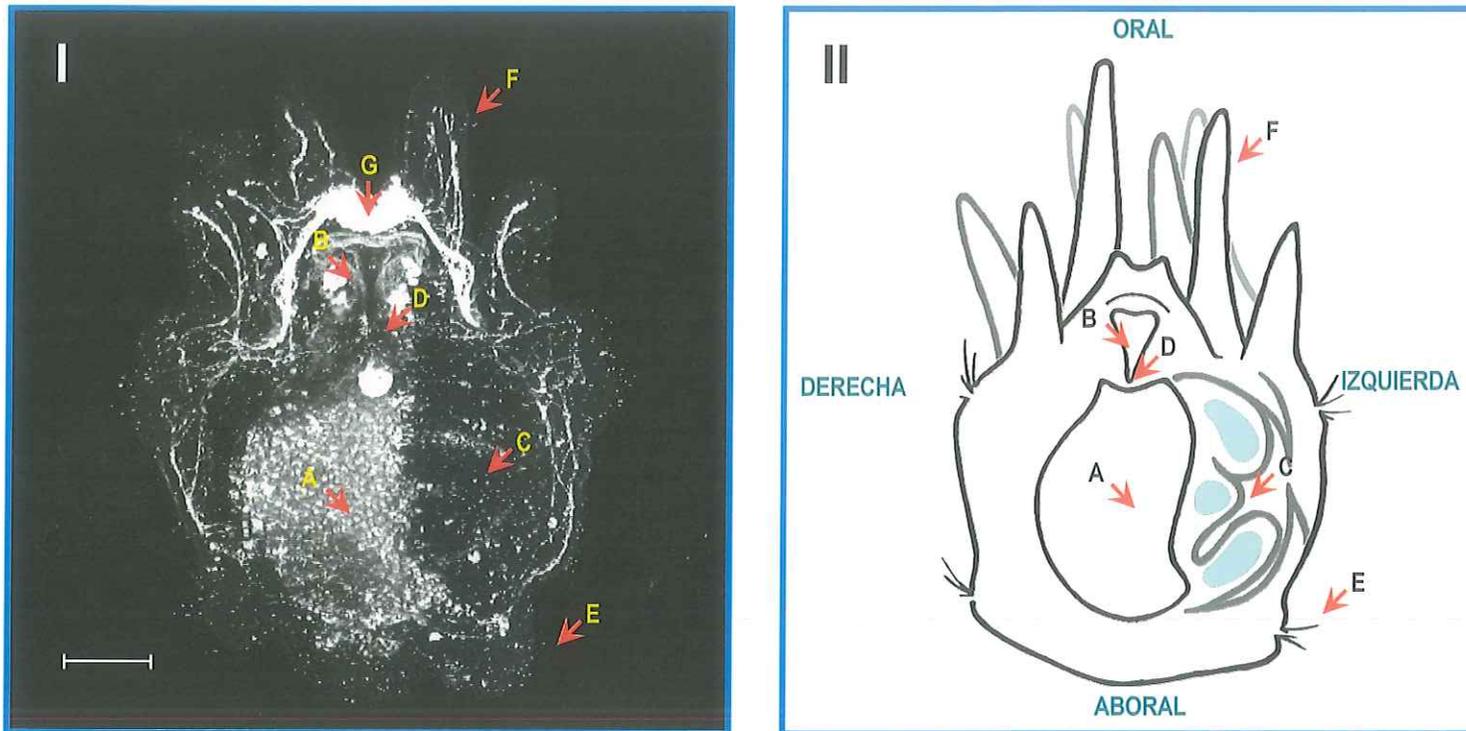


Figura 12. Vista frontal abanal de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ganglio apical.

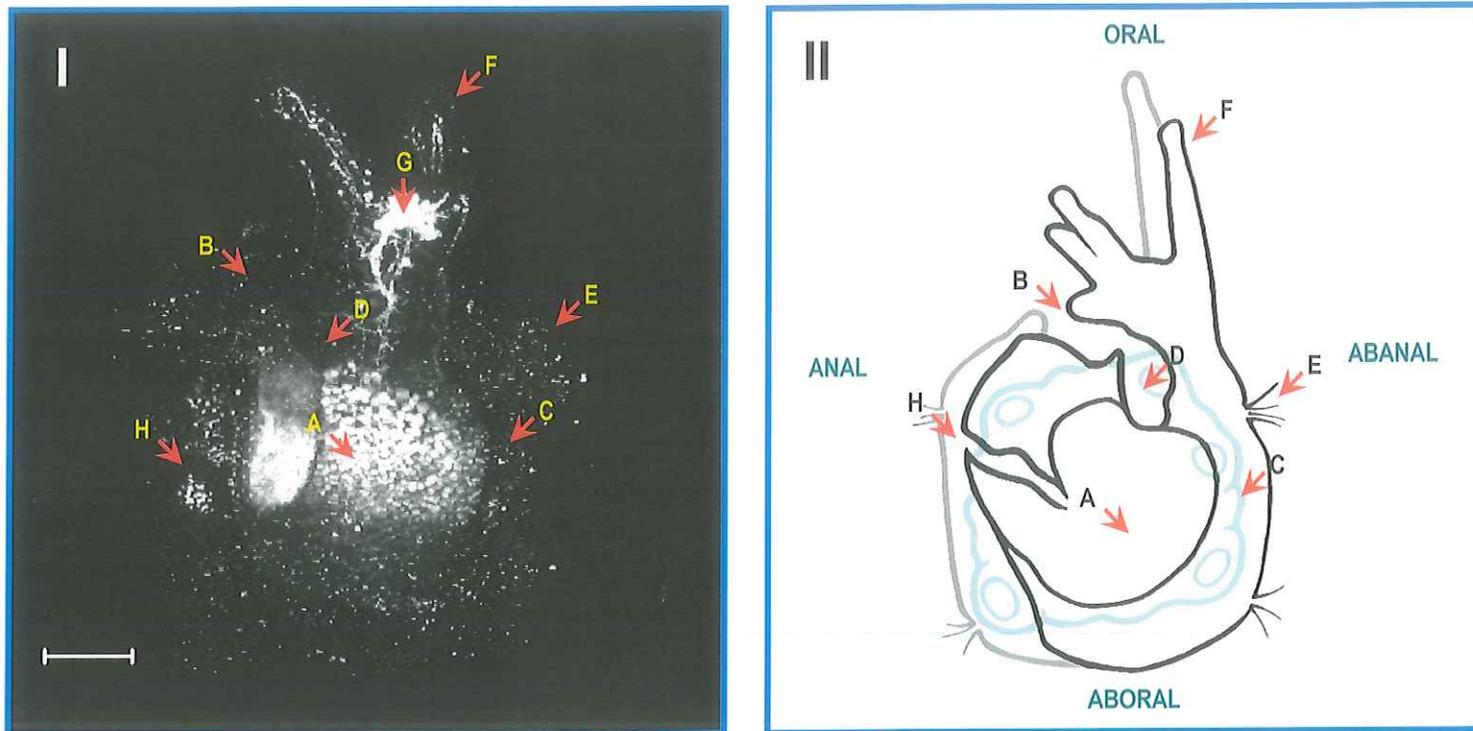


Figura 13. Vista lateral derecha de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ganglio apical; H, ano.

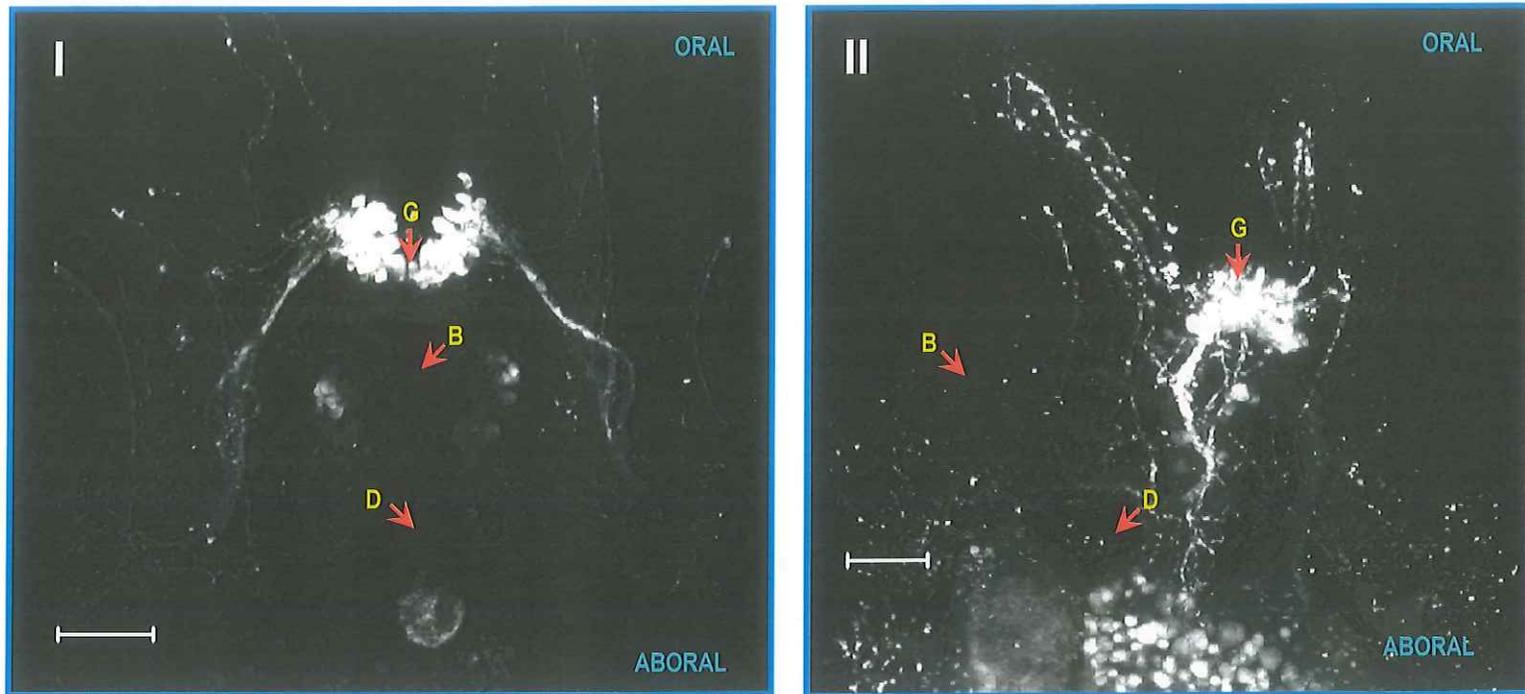


Figura 14. Imágenes confocales que exponen el detalle del ganglio apical en una vista frontal (I) y lateral (II), de una larva competente de *S. purpuratus* mostrando células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (50 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: B, boca; D, faringe; G, ganglio apical.

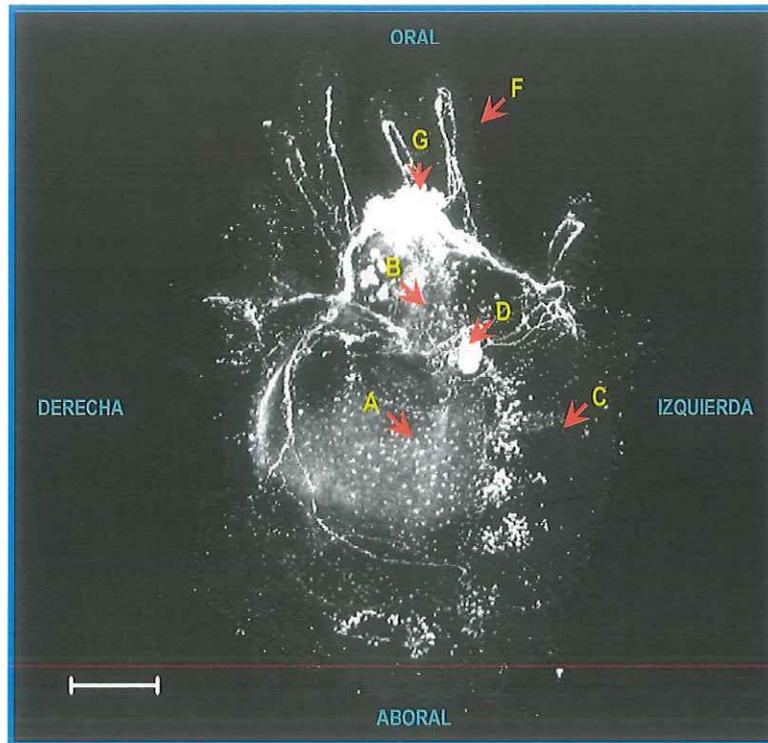


Figura 15. 15 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra la vista frontal de una larva de *S. purpuratus* con células marcadas con receptores de 5HT, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; F, brazos larvales; G, ganglio apical.

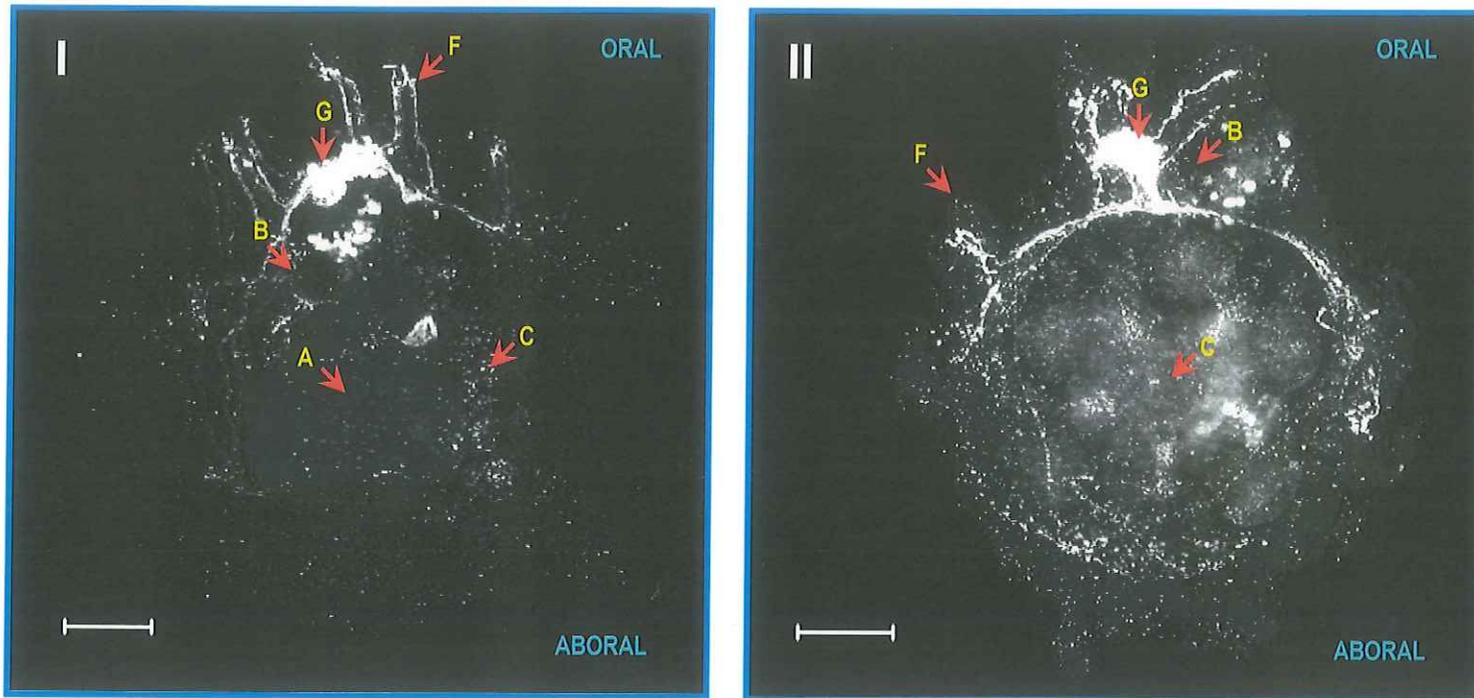


Figura 16. 45 minutos post-inducción. Vista frontal (I) y lateral (II) de una larva de *S. purpuratus* pasados 45 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. Se muestra imágenes confocales del organismo con células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; F, brazos larvales; G, ganglio apical.

se observaron todavía bien diferenciados, aunque comenzaron a perder la forma característica que poseían en la larva competente.

A los 90 minutos post-inducción (Figura 17)

Los axones desaparecieron alrededor de la larva, solo quedaron algunos proyectados hacia los brazos larvales. La única estructura reconocible aún, fue el ganglio apical.

Estadio de Postlarva (Figura 18).

Se observaron células serotoninérgicas a lo largo de las espinas (Figura 19-I) y alrededor de la zona oral (Figura 18). También se encontraron, aunque sin tanta profusión, conformando los pies ambulacrales (Figura 19-II).

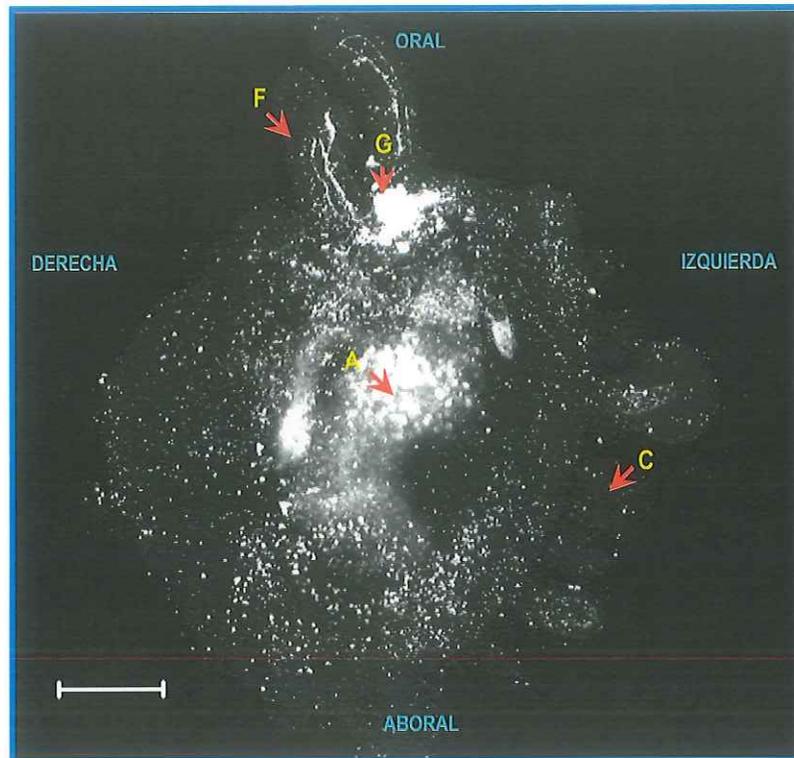


Figura 17. 90 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra la vista frontal de una larva de *S. purpuratus* con células marcadas con receptores de 5HT, pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; C, rudimento juvenil; F, brazos larvales; G, ganglio apical.

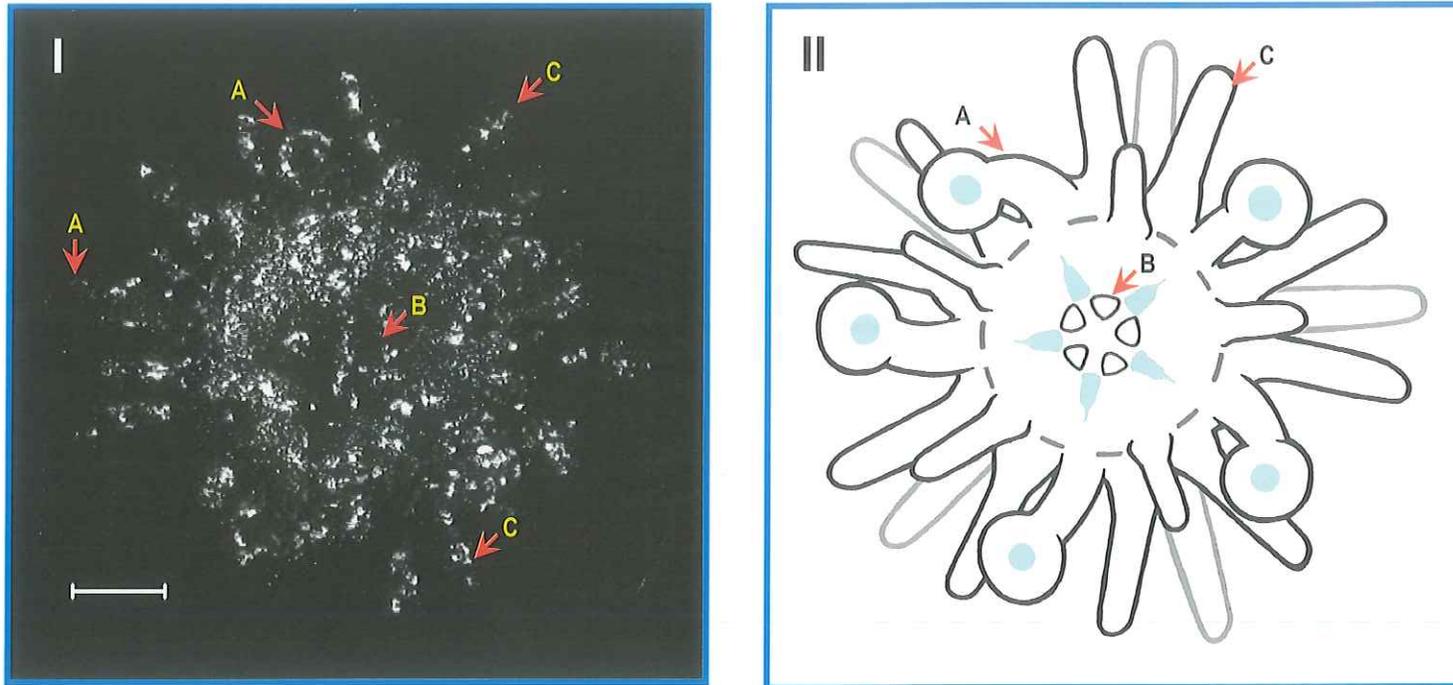


Figura 18. Vista oral de una postlarva de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando las células marcadas con receptores de serotonina (5HT). II, esquema que muestra la morfología correspondiente. La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, pies ambulacrales; B, lámpara de Aristóteles; C, espinas

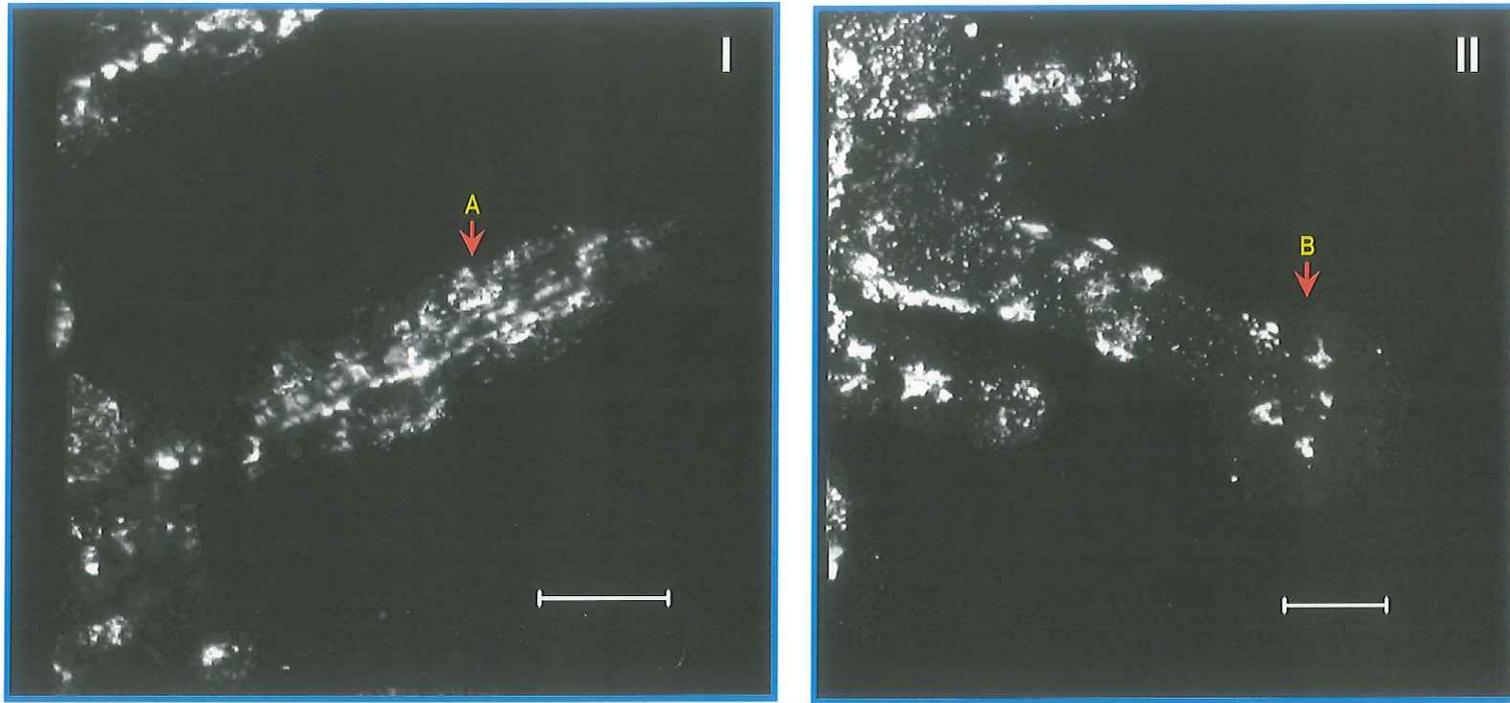


Figura 19. Imágenes confocales que exponen el detalle de una espina (I) y un pie ambulacral (II) de una postlarva de *S. purpuratus* mostrando células marcadas con receptores de 5HT. La barra indica la escala (50 µm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, espina; B, pie ambulacral

II.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren indican la posible participación de la serotonina durante la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*.

Coincide este hallazgo con lo encontrado para otras especies de invertebrados marinos, donde el uso de serotonina de manera exógena fue suficiente para inducir la metamorfosis de los organismos. Tal es el caso del hidrozooario *Phialidium gregarium* (McCauley, 1997), en donde con serotonina a concentración 1 mM se obtuvo un porcentaje de metamorfosis de 62%, similar al encontrado en este trabajo a la misma concentración. Otros resultados similares se obtuvieron con el caenogasterópodo *Ilyanasa obsoleta* (Leise *et al.*, 2001), y el balano *Balanus amphitrite* (Yamamoto *et al.*, 1996, 1999).

En trabajos recientes, durante el proceso de metamorfosis de *S. purpuratus* se ha demostrado la participación de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) (Amador-Cano *et al.*, 2006). De igual forma, en invertebrados marinos en general tales como hidrozooarios, balanos, equinodermos y moluscos (en particular el abulón), se sabe que la metamorfosis se encuentra posiblemente mediada por GPCRs de la familia de siete dominios transmembranales (Schneider y Leitz, 1994; Clare, 1996, Baxter y Morse, 1987, 1992). Existe además evidencia de que en la red nerviosa de el erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus*, se encuentran receptores de serotonina acoplados a proteínas G de la misma familia de receptores transmembranales (Katow *et al.*, 2004). Considerando en conjunto lo anterior,

no sería difícil que la metamorfosis de *S. purpuratus* se encontrara mediada por receptores de serotonina, y que estos se encontraran acoplados a proteínas G de los pertenecientes a la familia de siete dominios transmembranales.

Por otro lado, el efecto de la serotonina sobre la metamorfosis de *S. purpuratus* utilizado de forma externa podría indicar su producción interna durante el proceso. Un ejemplo de lo anterior lo refieren Okazaki y Shizuri (2001), quienes encontraron que serotonina y dopamina podrían participar en el proceso de metamorfosis de dichos organismos de manera interna, ya que demostraron la expresión del gen *AADC* ("aromatic L-amino acid decarboxylase") durante la metamorfosis del balano *B. amphitrite*. Este gen se sabe que regula la síntesis de serotonina y dopamina en *Drosophila*, y estos dos neurotransmisores pueden activar la metamorfosis de *B. amphitrite* cuando se les aplica de manera externa.

La metamorfosis parcial que se presentó durante los experimentos, puede tomarse como un indicador confiable de la efectividad del inductor serotonina para disparar los primeros cambios morfogenéticos. El proceso incompleto de metamorfosis ha sido reportado en otros organismos inducidos artificialmente por agentes químicos diversos, y se le han dado distintas explicaciones en función del agente inductor empleado en cada caso en particular. En el nudibranquio *Phestilla sibogae* por ejemplo, se observa únicamente pérdida del velum en larvas competentes cuando estas se encuentran en presencia de ciertas catecolaminas, esta pérdida del velum se considera como un primer

paso esencial en el proceso metamórfico, y al no darse ningún paso subsiguiente es considerado como metamorfosis parcial de los organismos (Hadfield, 1984). Estudios posteriores sin embargo, demuestran que la acción inductora (parcial) no es propiciada por las catecolaminas en sí sino por uno de los productos de su oxidación: el peróxido de hidrógeno (Pires y Hadfield, 1991). La acción inductora parcial del peróxido de hidrógeno, se especula que es el resultado de un efecto citotóxico específico en el área velar de los organismos, también se presume que puede activar ciertas rutas de transducción mimetizando la acción de la insulina al fosforilar receptores de membrana afines. En corales también se ha reportado metamorfosis parcial, esto se ha dado en larvas de *Acropora spp* que se metamorfizan en presencia de algas coralinas que fungen como inductor natural pero empleando como medio agua de mar artificial. O bien la metamorfosis parcial se presenta en agua de mar no artificial y una película bacteriana como inductor natural, pero utilizando como substrato de asentamiento una superficie cerámica (Negri *et al.*, 2001). En el primero de ambos casos, se especula que el agua de mar artificial podría carecer de algunos aminoácidos y minerales esenciales para que la metamorfosis total se lleve a cabo, mientras que en el segundo caso se cree que el substrato cerámico no proporciona el carbonato de calcio que naturalmente se obtiene cuando las larvas se asientan sobre otros corales, y que esto limita el desarrollo normal de la metamorfosis.

En el caso de las larvas competentes del erizo de mar *S. purpuratus* inducidas a la metamorfosis con serotonina, es posible que el mecanismo de acción de este neurotransmisor sea más cercano a la respuesta que presentan las larvas competentes del hidroide *Hydractinia echinata* a ciertos iones inorgánicos y a algunos inhibidores de proteínas. Estas larvas, al ser sometidas a concentraciones óptimas de estos agentes inductores, se metamorfozan parcialmente, y esta metamorfosis parcial puede realizarse en la mitad del cuerpo larval, ya sea la zona anterior o posterior del mismo dependiendo del inductor empleado. Las larvas inducidas parcialmente de esta manera conservan su competencia, esto es, pueden completar el proceso metamórfico mediante la acción de algún otro inductor. Se propone que la explicación a este comportamiento, es que el agente inductor empleado se produce naturalmente de manera interna al iniciarse el proceso de metamorfosis cuando se dispara por algún otro inductor natural o artificial, y que esta producción interna sólo actúa en un área restringida del tejido larval, no propagándose el mensaje hacia el resto de los tejidos larvales (para una revisión ver Walther *et al.*, 1996). Como se mencionó en párrafos anteriores, existe indicios de producción interna de serotonina durante la metamorfosis de algunos organismos, tal es el caso del crustáceo *B. amphitrite*, y se ha demostrado además que dichos organismos pueden ser inducidos por la misma serotonina a una metamorfosis completa si se aplica de manera externa (Yamamoto *et al.*, 1996, 1999; Okazaki y Shizuri, 2001). El erizo de mar pudiera estar asociado a una

respuesta similar, esto es, la inducción a la metamorfosis de los organismos por la aplicación externa de serotonina, podría indicar la producción interna de la misma. De ser este el caso, la serotonina podría ser necesaria para iniciar el proceso metamórfico mas no suficiente para provocar una metamorfosis total en larvas de *S. purpuratus*.

Finalmente, el ganglio apical de *S. purpuratus* que presenta varias células serotoninérgicas en su conformación, podría ser además el receptor del primer mensaje inductor de la metamorfosis. De acuerdo a nuestros resultados, el ganglio apical es uno de los últimos órganos que se pierden durante la metamorfosis de *S. purpuratus*. Esto es análogo a lo que sucede en diversas especies de moluscos, en donde este órgano llamado también órgano apical sensorial y que contiene comúnmente entre 3 y 5 neuronas serotoninérgicas, se pierde al final del proceso de metamorfosis (Dickinson y Croll, 2003; Leise *et al.*, 2001; Marois y Carew, 1997; Lin y Leise, 1996a). Adicionalmente, se ha encontrado que, en larvas del nudibranchio *Phestilla sibogae*, la foto-ablación de este órgano previene la respuesta metamórfica al inductor natural de este gasterópodo. Lo anterior proporciona una fuerte evidencia sobre la posibilidad de que el ganglio apical sea el receptor del primer mensaje inductor de la metamorfosis en esta especie (Hadfield *et al.*, 2000). De manera similar, en la larva pluteus de la galleta de mar *Dendraster excentricus*, la aplicación de estímulos eléctricos en la zona del cono oral larval (cercano al órgano apical) induce la metamorfosis de estos organismos (Burke, 1982), lo cual apoya la

idea de que esta pueda ser la región receptora del los primeros estímulos metamórficos en el erizo de mar.

CAPÍTULO III.

Transcripción y traducción durante la metamorfosis del erizo de mar *Lytechinus pictus*.

III.1 INTRODUCCIÓN

Hasta el momento, solo algunos trabajos existen que refieren los mecanismos moleculares mediante los cuales las larvas de invertebrados marinos llevan al cabo la metamorfosis. Okazaki y Shizuri (2000) reportaron la expresión de seis genes *bcs* (*bcs-1*, *bcs-2*, *bcs-3*, *bcs-4*, *bcs-5* y *bcs-6*) durante la metamorfosis de balanos, y que dicha expresión se incrementa conforme avanza la metamorfosis. Por su parte Arnold *et al.* (1997a, 1997b), señalan que el gen *Hemps* ("*Herdmania curvata* Metamorphosis Papillae Signalling") se encuentra involucrado en los procesos de desarrollo a la competencia y regulación de la metamorfosis del ascidio *Herdmania curvata*, mientras que Eri *et al.* (1999) mencionan que la proteína recombinante del gen *Hemps* eleva la tasa de metamorfosis del mismo organismo al fungir como señal interna. A este respecto, Okazaki y Shizuri (2001) demostraron la expresión del gen *AADC* ("aromatic L-amino acid decarboxilase") en todos los estadios de vida (larva nauplio, larva cipris y adulto) del balano *B. amphitrite*, dicho gen se conoce que

cataliza la biosíntesis de serotonina y dopamina en *Drosophila melanogaster* (ver Bray *et al.*, 1989; Dynlacht *et al.*, 1989), los cuales inducen la metamorfosis de los balanos de manera exógena (Kon-ya y Endo, 1995; Yamamoto *et al.*, 1996). También en ascidios, Nakayama *et al.* (2001) aislaron dos genes (*Ci-meta1* y *Ci-meta2*) que no se expresan en la larva nadadora, pero que se expresan inmediatamente después de iniciada la metamorfosis.

Sin embargo, otros estudios muestran que quizás la participación de genes durante la metamorfosis, no juegan un papel primordial en los cambios iniciales que moldean la larva y la transforman en un juvenil. En el nudibranquio *Phestilla sibogae*, al parecer la activación de la metamorfosis posterior a la primera señal inductora no requiere de transcripción activa, pero la fase final de elongación durante el proceso metamórfico se inhibe mediante el uso del inhibidor de la transcripción 5, 6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol o DRB (Del Carmen y Hadfield, 1999, 2000). En esta misma línea, el inicio de la metamorfosis del poliqueto *Hydroides elegans* no es inhibida por DRB o el inhibidor de la síntesis de proteínas emetine diclorhídrico. Sin embargo, hacia el final del proceso, cuando los tentáculos branquiales se han desarrollado y comienza el crecimiento del organismo, este crecimiento puede ser inhibido con dichos fármacos lo que indica la necesidad de generar nuevos transcritos y síntesis de proteínas (Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003). No obstante en otros casos, la metamorfosis en invertebrados marinos ha sido inhibida al inicio de su desarrollo. En larvas competentes del hidroide *Hydractinia echinata*, la

aplicación simultánea de emetine con inductores de la metamorfosis producen organismos que presentan tanto estructuras larvales como de pólipos, en lugar de las formas pólipo normales (Krohler *et al.*, 1991).

El presente trabajo pretende dilucidar si los cambios morfogénéticos durante la metamorfosis del erizo de mar *L. pictus*, se encuentran regulados por los procesos de transcripción y traducción.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción por DRB (5, 6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol) y Emetine Diclorhídrico

Los experimentos de inducción con DRB y emetine (Sigma-Aldrich), se realizaron de manera similar a los descritos en el Capítulo I, para experimentos farmacológicos con inductores.

Emetine fue disuelto en agua destilada, mientras que DRB se disolvió en DMSO. Ninguno de los solventes empleados afectan significativamente la metamorfosis de las larvas a las concentraciones empleadas (ver Figuras 20 y 21), por lo cual no se utilizaron controles con los solventes.

Larvas competentes de erizo blanco *L. pictus* se colocaron en presencia del inductor durante un periodo de 12 horas (en el caso de emetine) a 24 horas (con DRB), al finalizar el cual se retiró el medio y se adicionó medio fresco consistente en agua de mar filtrada y esterilizada (AMF).

El seguimiento de la metamorfosis se determinó por inspección visual con ayuda de un microscopio estereoscópico Stemi 2000 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) a las 24 horas posteriores a la inmersión inicial de las larvas en el medio con los fármacos.

Los resultados fueron analizados de igual forma a los obtenidos en los estudios farmacológicos descritos en el Capítulo I. Se les aplicaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas y posteriormente una prueba de

análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía. En los casos en donde se presentaron diferencias significativas, se utilizaron pruebas a posteriori.

III.3 RESULTADOS

Inducción con DRB (5, 6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol)

Las inducción de larvas competentes de erizo blanco *Lytechinus pictus* fue efectiva en presencia de DRB, a la concentración de 50 μM y 100 μM a las 24 horas posteriores a la adición del fármaco (ver Figura 20). A estas concentraciones, los porcentajes de metamorfosis (16% y 56% respectivamente) fueron significativamente diferentes con respecto al control negativo con AMF (Newman-Keuls, $p < 0.05$), y significativamente distintos entre sí denotando dosis dependencia.

No se presentó mortalidad en las larvas tratadas después de 24 h de seguimiento, y el desarrollo y motilidad de los organismos fue similar en todos los tratamientos (incluidos los controles).

Inducción con Emetine Diclorhídrico

El inhibidor de síntesis de proteínas emetine diclorhídrico fue efectivo como inductor de la metamorfosis en el erizo blanco. A las 6 horas posteriores al ingreso de las larvas a los tratamientos no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones con emetine y el control negativo con AMF (Newman-Keuls, $p > 0.05$) (ver Figura 21A).

A las 12 horas posteriores a la inducción de las larvas, emetine fue efectivo induciendo la metamorfosis a las concentraciones de 10 μM (19 %), 50 μM (100 %) y 100 μM (100 %) (Newman-Keuls, $p < 0.05$) (ver Figura 21B). Sin

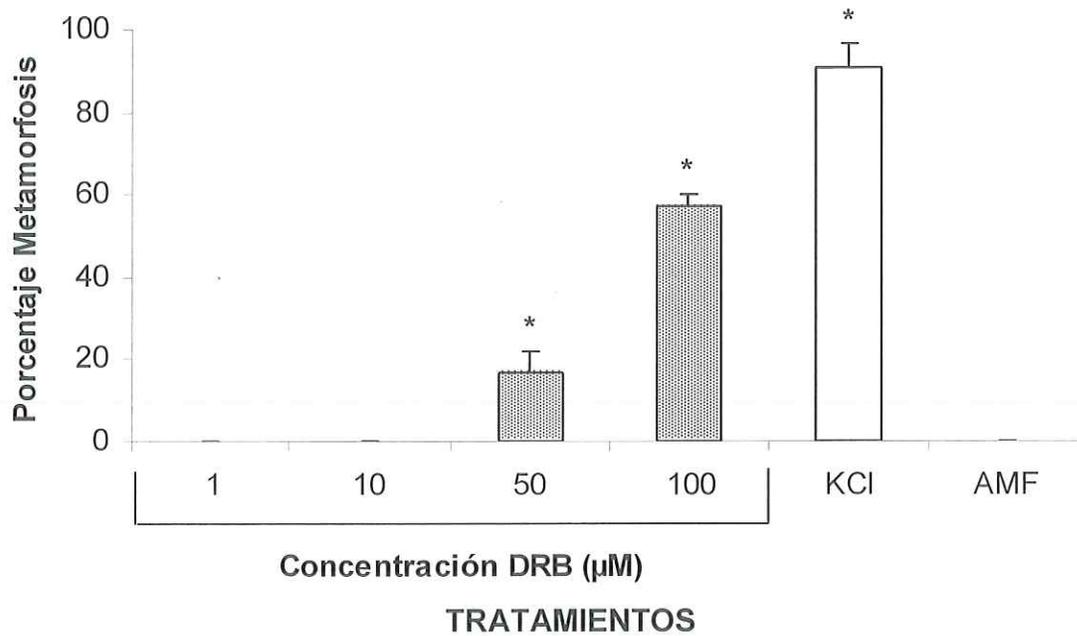


Figura 20. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *L. pictus* después de 24 h de exposición a diferentes concentraciones de DRB (5, 6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol) como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: Concentración de DRB según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

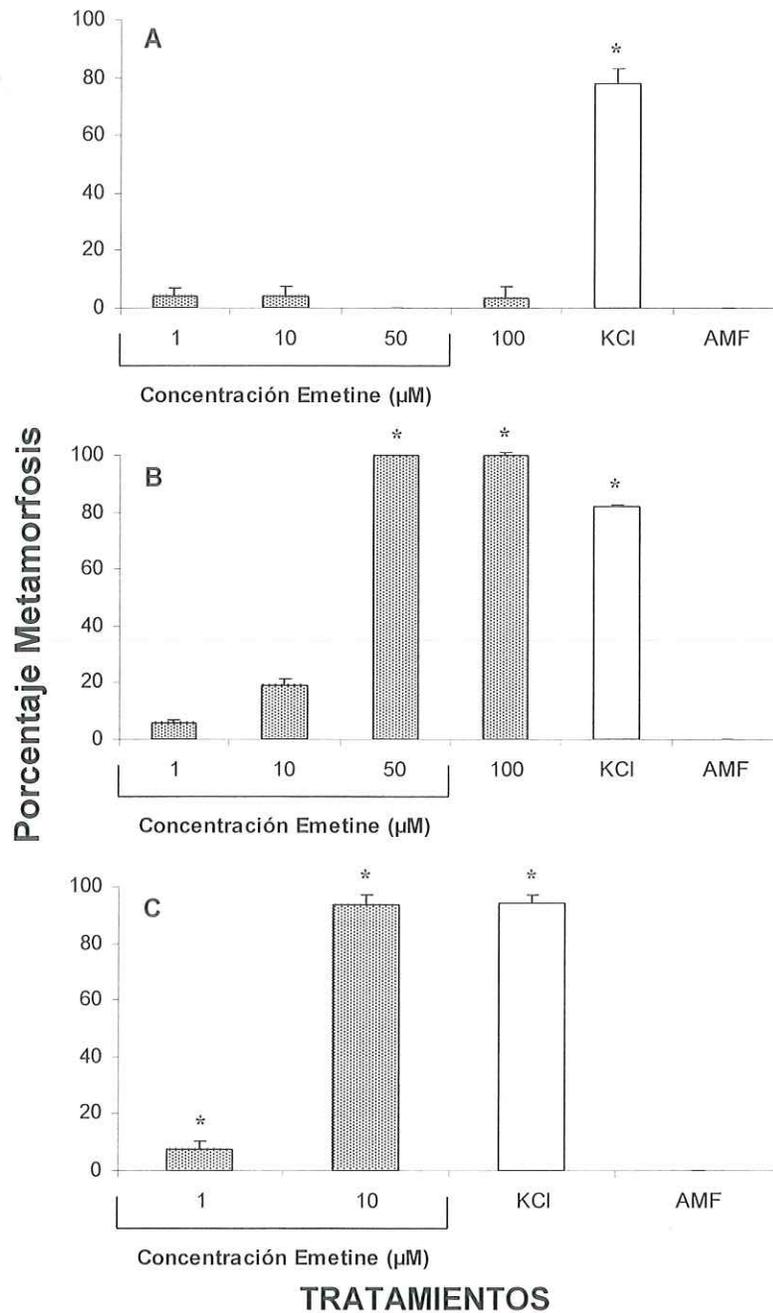


Figura 21. Porcentajes (± 1 EE) de metamorfosis del erizo de mar *L. pictus* después de 6 (A), 12 (B) y 24 h (C) de exposición a diferentes concentraciones de emetine diclorhídrico como inductor (N=3). Las barras indican error estándar. Los asteriscos (*) sobre las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (AMF). Los tratamientos incluyen: Concentración de emetine según lo indicado en el eje X; KCl, 0.1 M (15 minutos, posteriormente AMF); AMF, agua de mar filtrada y esterilizada.

embargo, en las dos concentraciones mayores los organismos presentaron baja motilidad. A partir de este conteo, el medio conteniendo emetine fue reemplazado con medio fresco consistente en AMF.

A las 24 horas posteriores a la inducción, las concentraciones de 1 μM y 10 μM fueron significativamente distintas (7% y 94%, respectivamente. Ver figura 21C) con respecto al control con AMF (Newman-Keuls, $p < 0.05$), lo cual indica la efectividad del fármaco como inductor de la metamorfosis. En las concentraciones de 50 μM y 100 μM , todos los organismos presentaron falta de motilidad y coloración opaca, por lo cual se consideró 100% de mortalidad en estos tratamientos (datos no presentados).

Experimentos preliminares mostraron que la permanencia de emetine durante un periodo de incubación de 24 horas, incrementa la mortalidad de las larvas a la concentración de 10 μM , incluso aquellas consideradas vivas presentan baja motilidad, lo cual es índice de un posible efecto tóxico a estos niveles de concentración y por lo cual se retiró el medio a las 12 horas posteriores a la adición de los organismos a los tratamientos. Esto no sucedió con DRB, el inhibidor de la síntesis de RNA, con el cual las larvas permanecieron durante 24 horas en todos los experimentos realizados, sin que se apreciara algún efecto tóxico por parte del fármaco.

III.4 DISCUSIÓN

Tradicionalmente, el uso de compuestos inhibidores del proceso de generación de nuevos transcritos y de la síntesis de proteínas durante la metamorfosis de larvas de invertebrados marinos, se ha proyectado para generar la inhibición del proceso metamórfico en los organismos tratados (ver Krohier *et al.*, 1991; Del Carmen y Hadfield, 1999, 2000; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003). De manera que su efecto sirva como índice para poder verificar si la intervención de estos procesos básicos (transcripción y traducción) en el funcionamiento de cualquier organismo, participan de manera activa en la regulación de los cambios morfogénéticos que se presentan durante la metamorfosis.

En el erizo blanco *L. pictus*, la metamorfosis no es inhabilitada por agentes inhibidores de la transcripción y la síntesis proteica. De acuerdo a nuestros resultados, el someter larvas competentes a diferentes concentraciones de DRB y emetine lejos de inhibir, induce la metamorfosis de los organismos de forma dosis dependiente.

Una posible explicación a estos resultados, se puede encontrar en una de las diferentes rutas de transducción que se han caracterizado como reguladoras del proceso metamórfico en invertebrados marinos. Trabajos recientes en el gasterópodo *Ilyanassa obsoleta* (Froggett y Leise, 1999), en los ascidios *Boltenia villosa* y *Cnemidocarpa finmarkiensis* (Bishop *et al.*, 2001), y el erizo de mar *L. pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001), refieren la posible

participación de la ruta del óxido nítrico/guanosin monofosfato cíclico (NO/cGMP) como represor de la metamorfosis en larvas competentes de estos organismos. Para ello utilizaron inhibidores de la enzima que sintetiza al óxido nítrico (óxido nítrico sintetasa) y de su chaperón molecular "heat shock protein 90" (HSP90), con lo cual indujeron la metamorfosis de las larvas. Nuestros resultados son congruentes con lo referido por los autores arriba mencionados. Es posible que el efecto inhibitorio de los fármacos empleados (DRB, emetine), resulte en el cese de la producción de óxido nítrico al inactivar la generación de alguna de las proteínas involucradas en la ruta NO/cGMP, lo cual inhibiría el represor natural de la metamorfosis y propiciaría la iniciación de los cambios morfogenéticos que se presentan durante la misma.

A partir del punto en que la metamorfosis se dispara por la posible inhibición del represor interno, la metamorfosis se lleva a cabo de forma aparentemente normal, la síntesis de nuevos transcritos y proteínas parece no requerirse durante la morfogénesis metamórfica hasta que los caracteres larvales son sustituidos por las formas juveniles. Esto es consistente con lo reportado por otros autores. Carpizo-Ituarte y Hadfield (2003) por ejemplo, al emplear DRB y emetine durante la metamorfosis del poliqueto *H. elegans*, refieren que existe una reducción de más del 80 % de la síntesis del RNA y proteínas, y que aun bajo estas condiciones los organismos se metamorfozan hasta antes de desarrollar los tentáculos branquiales. Resultados similares se han encontrado en el nudibranquio *P. sibogae*, donde la inhibición de la

transcripción y la traducción por agentes farmacológicos, se reduce significativamente y sin embargo los organismos son inducidos a la metamorfosis (Del Carmen y Hadfield, 1999). Contrariamente, en algunos otros invertebrados marinos como el hidroide *H. echinata*, la metamorfosis es inhibida en presencia de emetine aplicado de manera simultánea con inductores artificiales (Kroiher *et al.* 1991).

En este trabajo, el inhibidor de la síntesis proteica emetina fue retirado a las 12 horas debido al efecto tóxico que se presentó en prácticamente todas las concentraciones utilizadas al aumentar el tiempo de permanencia, y aun bajo estas condiciones, en las mayores concentraciones la mortalidad ascendió al 100 % a las 24 horas post-inducción. Por otro lado, los organismos sometidos a concentraciones de 50 y 100 μM de emetina también se metamorfosearon en un 100 % a las 12 horas posteriores a la inducción. Este efecto en el erizo blanco, puede ser una respuesta similar a lo observado en otros invertebrados marinos, donde los organismos llevan al cabo la metamorfosis en presencia de inhibidores de transcripción y traducción, pero que al llegar al punto donde los juveniles comienzan a desarrollar nuevas estructuras o inician el crecimiento, la permanencia de los inhibidores en el medio imposibilita continuar el desarrollo (ver Del Carmen y Hadfield, 1999, 2000; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003). En el erizo de mar *L. pictus* redundaría en la muerte de los organismos.

En el caso del abulón *Haliotis rufescens*, el uso de emetina como inhibidor de la metamorfosis parece arrojar resultados mas parecidos a los obtenidos en

el presente estudio. Fenteany y Morse (1993), han reportado que la emetina inhibe significativamente la síntesis proteínica permitiendo el inicio de la metamorfosis en *H. rufescens* hasta su asentamiento, esto es, pérdida del velum y fijación al substrato, pero que inhibe la formación de la concha peristomal y que progresivamente resulta tóxico para los organismos. Estos mismos autores reportan que emetina genera la pérdida del velum aun en ausencia del inductor artificial GABA, sin embargo proponen que este resultado es consecuencia del efecto tóxico del fármaco. Las similitudes entre el estudio realizado por Fenteany y Morse (1993) con los resultados encontrados en el presente trabajo, son evidentes. La pérdida de la corona ciliar de las larvas del abulón rojo en presencia de emetine y ausencia del inductor GABA podrían ser un índice de su efectividad como inductor, mientras que su toxicidad posterior podría deberse a la imposibilidad de las larvas a continuar con su desarrollo.

Es interesante notar que en varios de los estudios sobre metamorfosis en los que se utilizan inhibidores de la transcripción y la traducción, la efectividad de los fármacos sobre la metamorfosis de los organismos sobreviene una vez que se inicia el crecimiento post-metamorfosis, y que esta efectividad se traduce en la inhibición de este crecimiento o en su mortalidad con el consecuente freno en el desarrollo del organismo (ver Fenteany y Morse 1993; Del Carmen y Hadfield, 1999, 2000; Carpizo-Ituarte y Hadfield, 2003). El erizo de mar *L. pictus* no es la excepción, observaciones realizadas en nuestro laboratorio muestran que una vez que las estructuras larvales se han perdido,

se inicia una elongación de las espinas y pies ambulacrales en estos animales. El hecho de que *L. pictus* sobreviva hasta perder los caracteres larvales en presencia de un inhibidor de la traducción, pero que este resulte tóxico una vez que inicia su crecimiento puede deberse a la ausencia inicial y reactivación final de la proliferación celular dado que dicho proceso requiere invariablemente de síntesis de proteínas. A este respecto, algunas investigaciones parecen apoyar esta idea. Larvas de *H. echinata* mantenidas a bajas temperaturas, reducen su proliferación celular en índices cercanos a cero durante 60 a 70 días sin verse afectadas en su habilidad para ser inducidas a la metamorfosis, sin embargo, una vez activada la metamorfosis se reactiva la proliferación celular (Plickert *et al.* 1988). Por su parte, experimentos preliminares en el poliqueto *Hydroides elegans* utilizando el anticuerpo monoclonal PCNA ("Proliferating Cell Nuclear Antigen"), refieren que la proliferación celular disminuye drásticamente una vez que las larvas alcanzan la competencia, pero se incrementa notablemente una vez que los juveniles recién asentados inician el desarrollo de sus tentáculos branquiales (Carpizo-Ituarte, resultados no publicados).

Finalmente, los procesos de transcripción y de traducción en el erizo blanco *L. pictus*, parecen ser actores principales en la regulación de la etapa competente de la larva que precede a la metamorfosis, al participar en la producción de un inhibidor natural que al dejarse de fabricar dispara el proceso metamórfico. Y en la etapa de crecimiento posterior al inicio de la metamorfosis, donde el inicio del crecimiento de la nueva postlarva puede estar

caracterizado por la reiniciación del proceso de proliferación celular, la cual requiere de forma indispensable de estos procesos para llevarse a cabo. Sin embargo, durante el proceso mismo de metamorfosis, donde los cambios morfogénéticos toman lugar, la transcripción y la traducción parecen no ser indispensables para que estos cambios ocurran.

CAPÍTULO IV.

Cambios en la musculatura durante la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*

IV.1 INTRODUCCIÓN

No existen líneas de investigación dentro del campo de la metamorfosis en invertebrados marinos que se puedan considerar como agotadas o completas (Hadfield, 1998). En esta tónica, una de las áreas poco exploradas es aquella que se refiere a la transformación de los sistemas muscular y nervioso durante la metamorfosis de las diferentes especies que presentan ciclos de vida complejos (Marois y Carew, 1990; Page y Pedersen, 1998). La coordinación y control de estos y otros eventos de la metamorfosis en el erizo de mar, dependen de factores que no se han investigado completamente (Cameron *et al.*, 1989).

En algunas especies de invertebrados marinos, así como en insectos y anfibios, la transformación de los tejidos musculares durante la metamorfosis parece venir acompañada de un coordinación con el sistema nervioso de los mismos (Consoulas y Levine, 1998; Santagata, 2002), sin embargo, poca

atención se le ha dado a esta posible relación entre estos sistemas en larvas de equinodermos.

Otro aspecto a considerar, es la relación entre la desintegración de los tejidos musculares durante la metamorfosis de diversos organismos, y el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Se han detectado patrones de cambio específicos en la transformación de actina fibrosa a actina globular durante el proceso apoptótico. Lo anterior podría considerarse como un indicador de la participación del proceso de apoptosis durante la metamorfosis de invertebrados marinos (ver Bursch *et al.*, 2000).

El presente trabajo, documenta los cambios del tejido muscular durante la metamorfosis del erizo morado *S. purpuratus*.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Marcaje de actina con Faloidina

Larvas competentes de *S. purpuratus* fueron inducidas a la metamorfosis mediante inmersión en solución de AMF y KCl (0.1 M durante 15 min). A los 15, 45 y 90 min posteriores a la inducción, se seleccionaron de 80 a 100 larvas en proceso de metamorfosis y se realizó el proceso de marcaje de fibras de actina con el marcador Faloidina (Invitrogen), como se describe a continuación. Adicionalmente, también fueron seleccionadas larvas competentes y postlarvas recién metamorfozadas para someterlas al mismo procedimiento.

Durante todo el proceso de marcaje se mantuvo a los organismos cubiertos para evitar el fotoblanqueamiento y a una temperatura de 4 °C. Los organismos seleccionados se transfirieron a tubos de microcentrífuga conteniendo las soluciones utilizadas en el marcaje, de acuerdo a los tiempos y concentraciones referidos en la Tabla III.

Tabla III. Secuencia del proceso de marcaje de fibras de actina en larvas y postlarvas del erizo de mar *S. purpuratus*.

PASO	ACCIÓN	SOLUCIÓN	CONCENTRACIÓN	TIEMPO
1	Lavado	MgCl ₂	370 mM	10 min
2	Fijación	Paraformaldehído (en PBS 1×)	4%	12 h
3	Lavado	PBS (Buffer Salino de Fosfato)	1×	4 x 20 min
4	Inmersión	Marcador de Actina: Rodamina Faloidina (en PBS 1×/Triton 1:100)	1:100	48 h
5	Lavado	PBS	1×	4 x 20 min
6	Montaje	Glicerol/Tris/n-Propil galato	90%/5mM(pH 9.5)/4%	→Microscopio

Se adicionaron controles negativos para detectar marcaje accidental o autofluorescencia en los especímenes. Estos controles consistieron en someter organismos en los mismos estadios de desarrollo al protocolo anterior, excepto que en estos casos se omitió la inmersión en Faloidina.

La observación de las características del tejido muscular durante la metamorfosis de *S. purpuratus*, se realizó con un sistema confocal LSM-510 Meta acoplado a un microscopio invertido Axiovert 200 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania), en conjunto con un láser de argón para una excitación de 543 nm y filtros de emisión de 560 nm. Se utilizó un objetivo Plan-Neofluar 10×/0.3, y la intensidad del láser se situó hasta un máximo de 80 %. Las imágenes presentan 512×512 píxeles, y son reconstrucciones 3D a partir de series Z-Stack de entre 40 y 50 cuadros. Las imágenes confocales fueron capturadas utilizando el programa para computadora LSM-510 (versión 3.2, Carl Zeiss).

IV.3 RESULTADOS

Larva Competente

Las larvas competentes de erizo morado *S. purpuratus*, mostraron una amplia distribución de células musculares en el cuerpo larval. Algunas estructuras se observaron bien diferenciadas. Como se observa en la Figura 22-I, hacia la zona donde se encuentra la cavidad oral, una estructura con forma que asemeja un fardo se puede identificar como la faringe. Se encuentra circunscrita por filamentos de actina bien diferenciados, se observó con mayor claridad en larvas más jóvenes y que aun no han desarrollado un rudimento juvenil, mostrándose claramente la interacción boca-estómago a través de la faringe (ver Figura 24-I y II).

El marcaje de la musculatura con Faloidina mostró el rudimento juvenil completamente desarrollado, el cual se destacó en el lado izquierdo de la larva con varias estructuras que compondrán posteriormente a la postlarva tras el proceso de metamorfosis (Figura 22-I y 23-I). Se observaron cinco pies ambulacrales bien desarrollados y acentuadamente muscularizados, con betas de actina que los surcan longitudinalmente. Se observaron también, entre los cinco segmentos que dividen los pies ambulacrales y que marcan la incipiente simetría pentaradial, grupos de cuatro estructuras en forma de conos constituidos por filamentos musculares, estos conforman las bases de las espinas del que será el nuevo organismo juvenil (Figura 25).

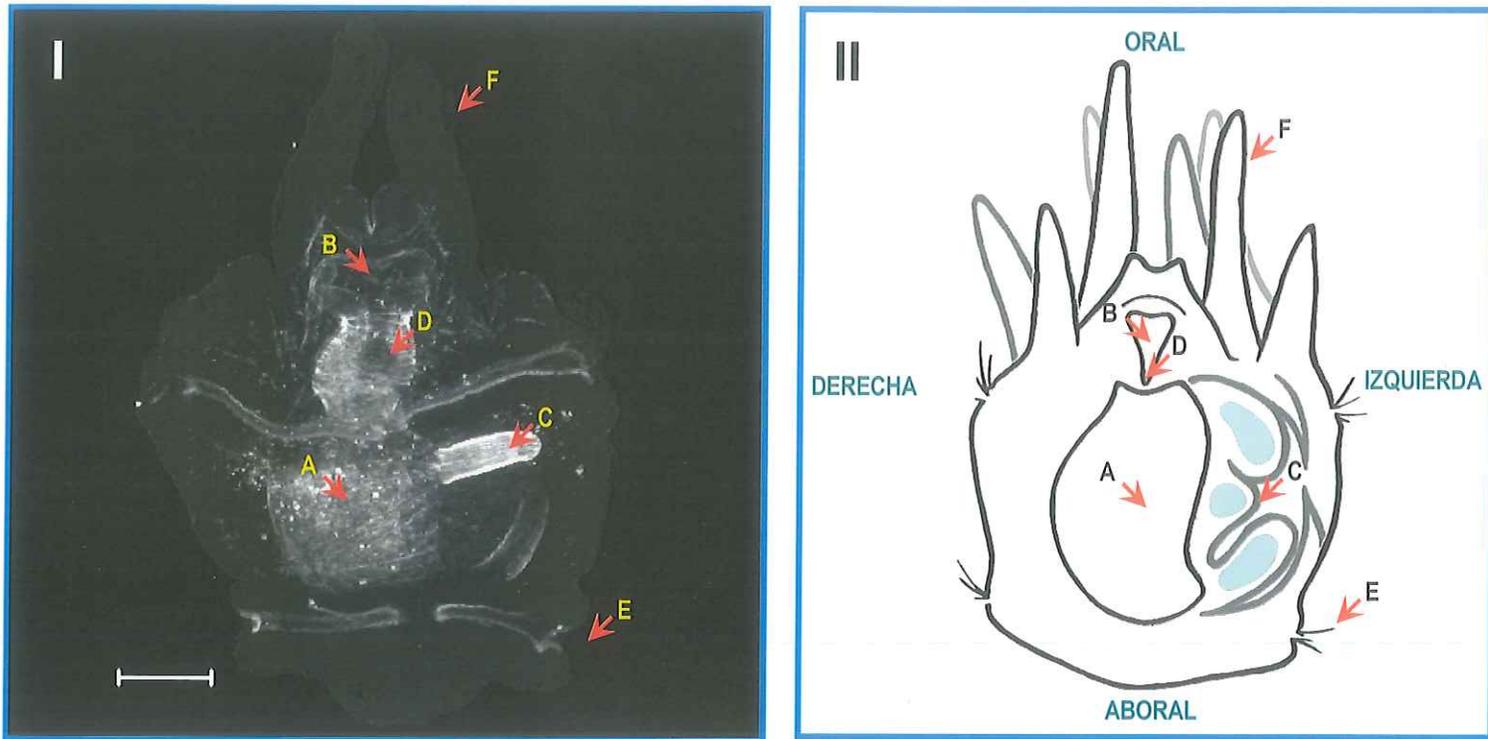


Figura 22. Vista frontal anal de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando tejido muscular. II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales.

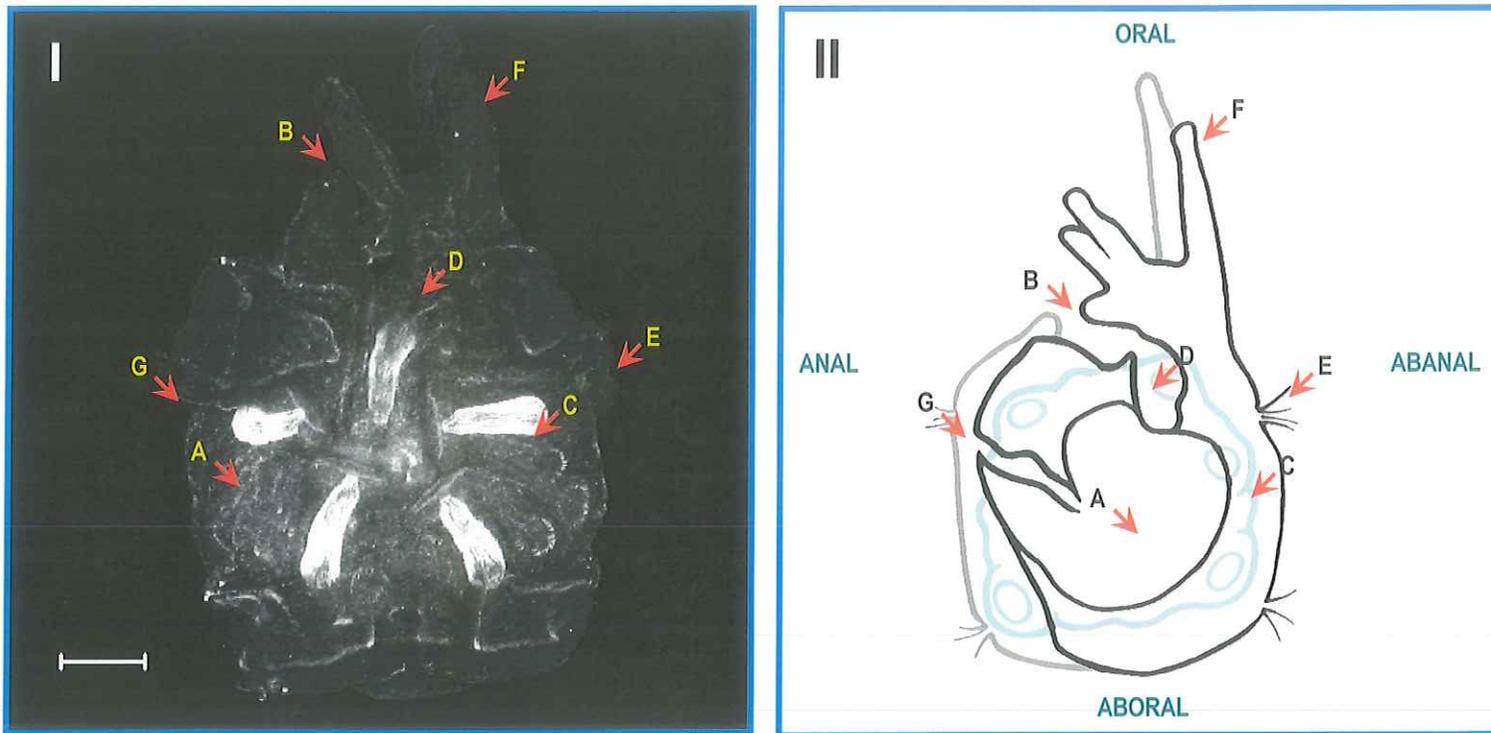


Figura 23. Vista lateral izquierda de una larva competente de *S. purpuratus*. I, imagen confocal del organismo mostrando tejido muscular. II, esquema que muestra la morfología correspondiente (con base en lo referido en Arenas-Mena *et al.*, 2000). La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales; G, ano.

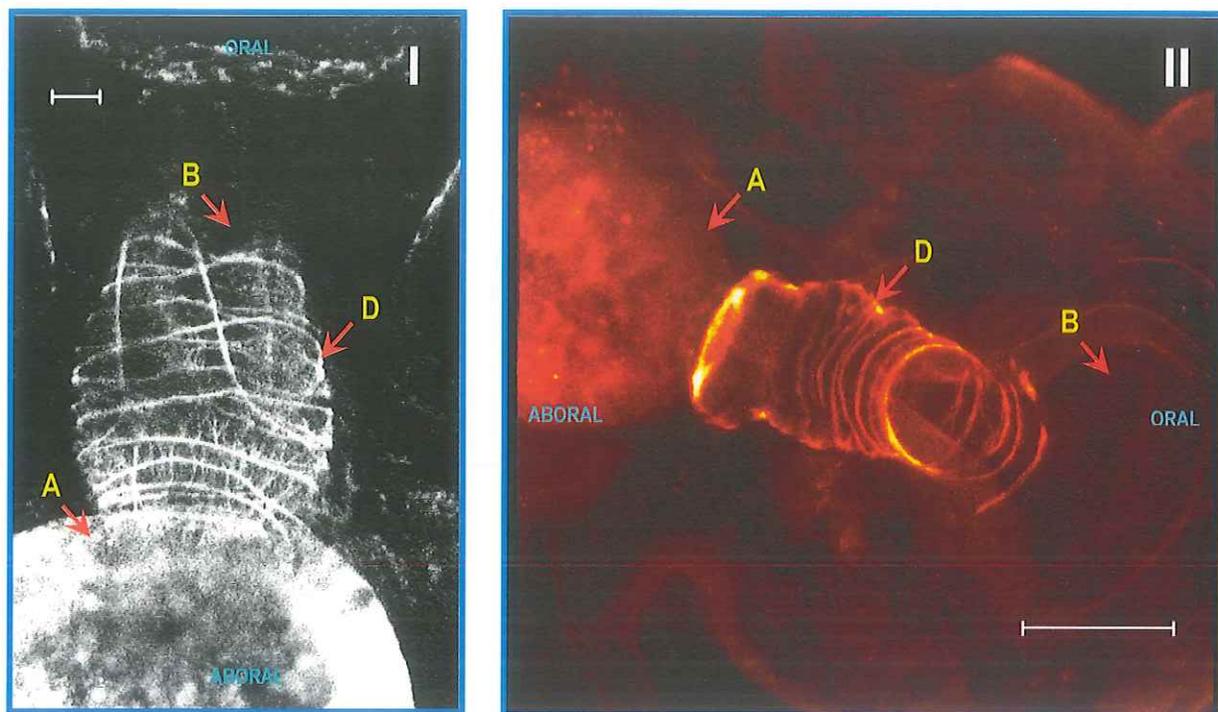


Figura 24. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la faringe del erizo de mar *S. purpuratus*. I faringe de una larva competente; II, interacción boca-estómago a través de la faringe en una larva precompetente de 6 brazos. La barra indica la escala con respecto a la imagen en I (20 μm) y II (50 μm). Las flechas indican la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; D, faringe

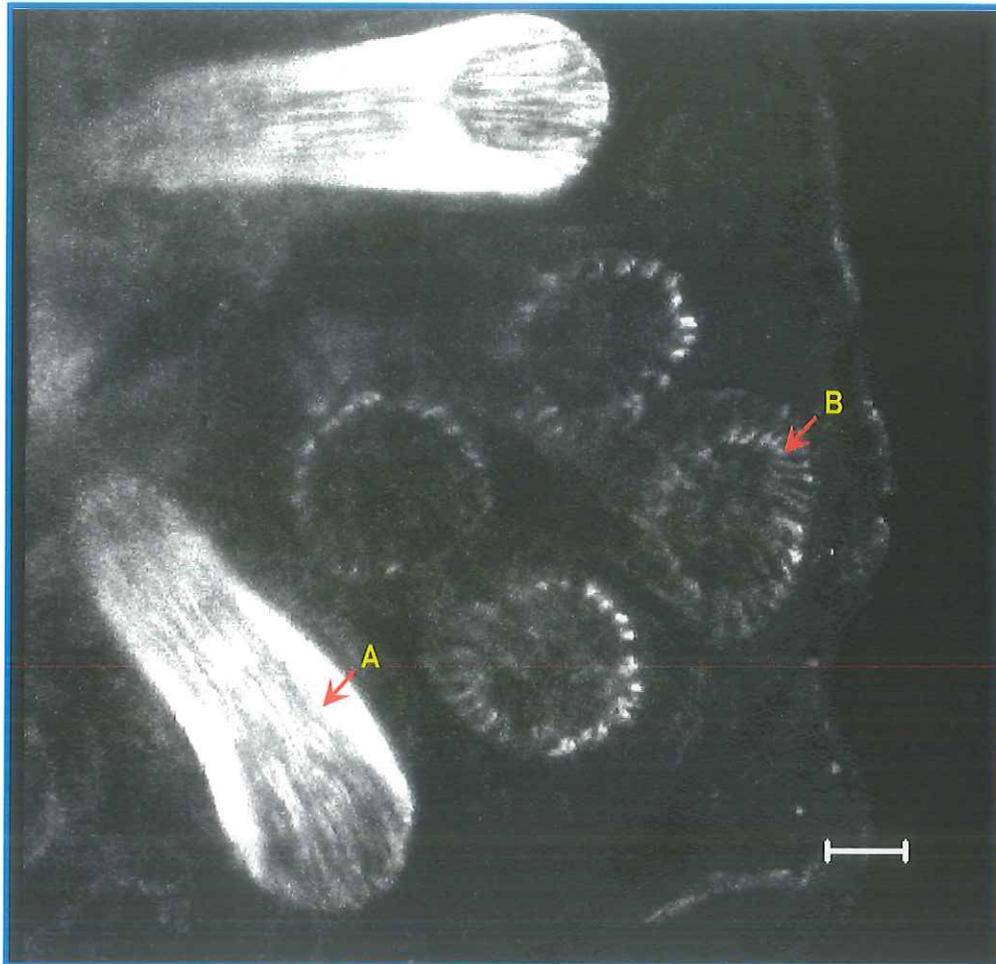


Figura 25. Imagen confocal que muestra el detalle del tejido muscular en el rudimento juvenil de larvas competentes de erizo de mar *S. purpuratus*. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A; pies ambulacrales; B, base de las espinas

El cuerpo larval en su conjunto, se observó recortado difusamente contra el fondo oscuro de la imagen (Figuras 22-I y 23-I). Aunque a primera impresión pareciera que esto es consecuencia de una depositación uniforme en el epitelio larval del marcador Faloidina, y que pudiera no haber sido removido con los lavados durante el proceso de marcaje, en un análisis más detallado de la muestra se apreció que el tejido de la larva está formado por una malla de fibras de actina (ver Figura 26-I). Esta malla se observó en todo el epitelio larval, esto es, el que conforman los brazos larvales, zona alrededor de la boca, áreas ventrales anal y abanal, y por encima de los epauletes del extremo aboral. La red se encontró constituida por una serie de hexágonos bien definidos (Figura 26-II), y cabe destacar que se observó también en larvas de 8 brazos precompetentes (datos no mostrados).

A los 15 minutos post-inducción

Después de quince minutos de retirado el agente inductor de la metamorfosis, el tejido larval mostró pérdida aparentemente total de la malla muscular que caracterizó a la larva competente (ver Figura 27). Sin embargo, el resto de las estructuras se observaron aun bien definidas.

Una observación mas detallada de la forma en que el tejido inició su desintegración se aprecia en la Figura 25. Las fibras de actina que formaban la retícula en todo el epitelio larval, pasaron a formar conglomerados globulares de actina (que conservaron su marcaje con Faloidina) en todo el cuerpo de la

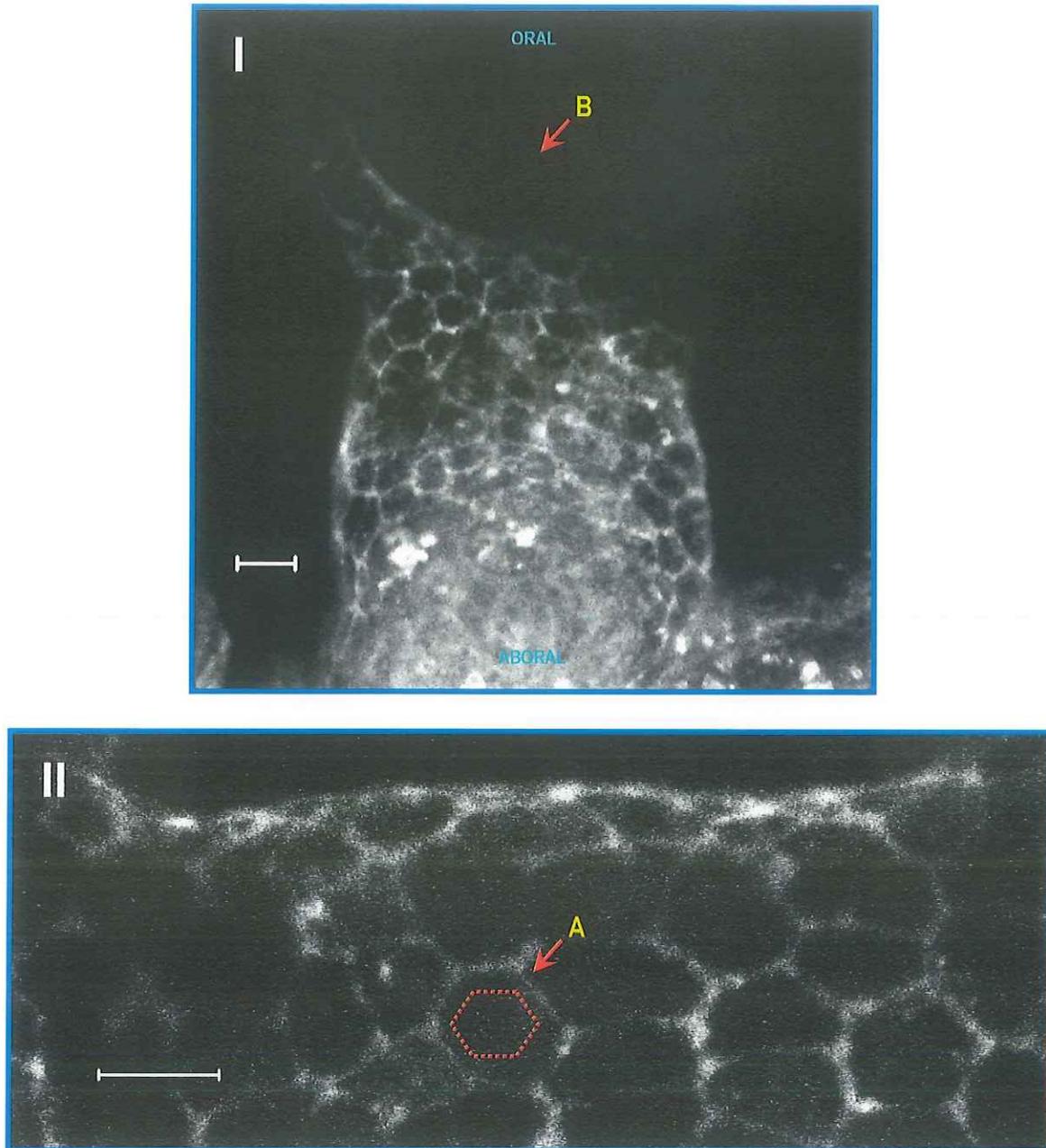


Figura 26. Imágenes confocales que exponen el detalle de la malla de fibras de actina en el epitelio de larvas competentes de erizo de mar *S. purpuratus* I, detalle general de la malla en la zona cercana a lo boca. II, detalle del área superior de la boca, se observan hexágonos conformando la red filamentosa. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a las imágenes y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, hexágono formado por filamentos de actina; B, boca

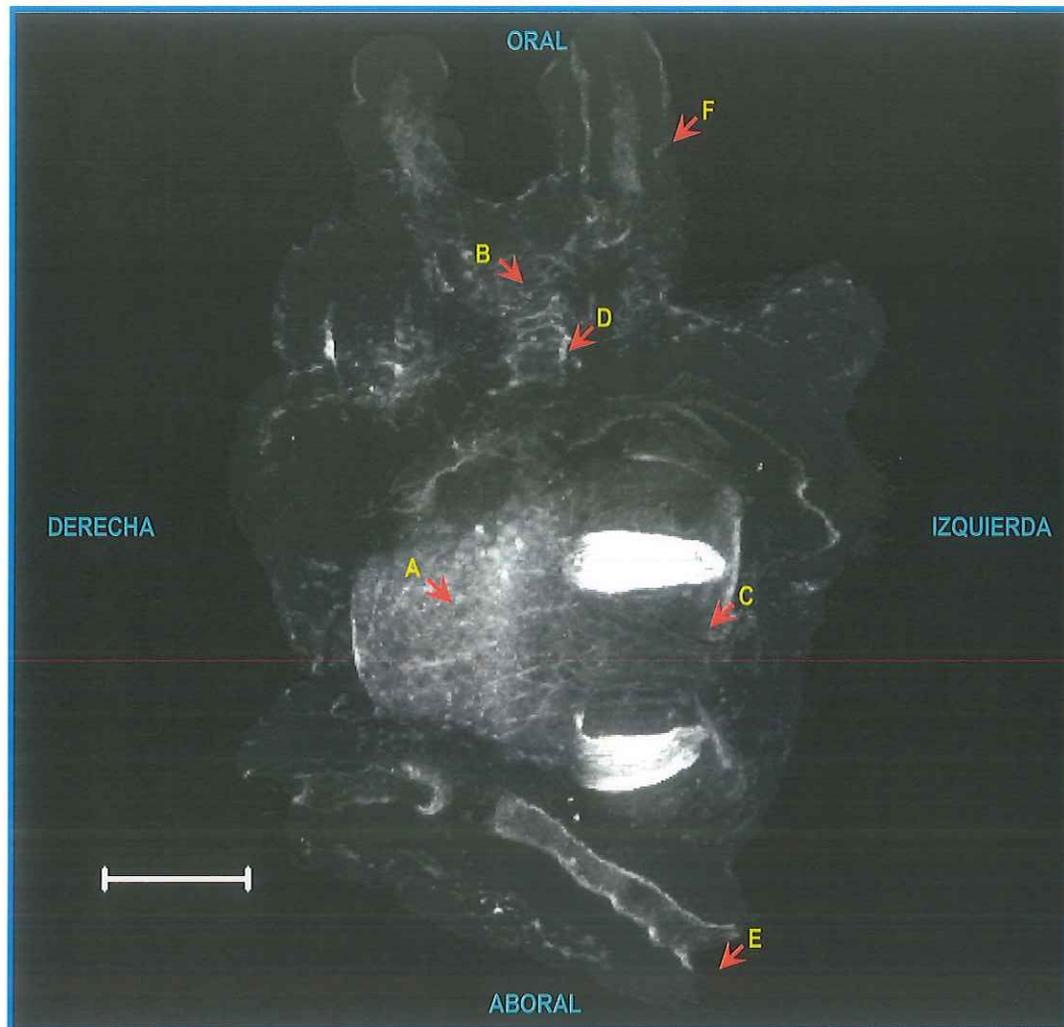


Figura 27. 15 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una vista frontal anal una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; B, boca; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales.

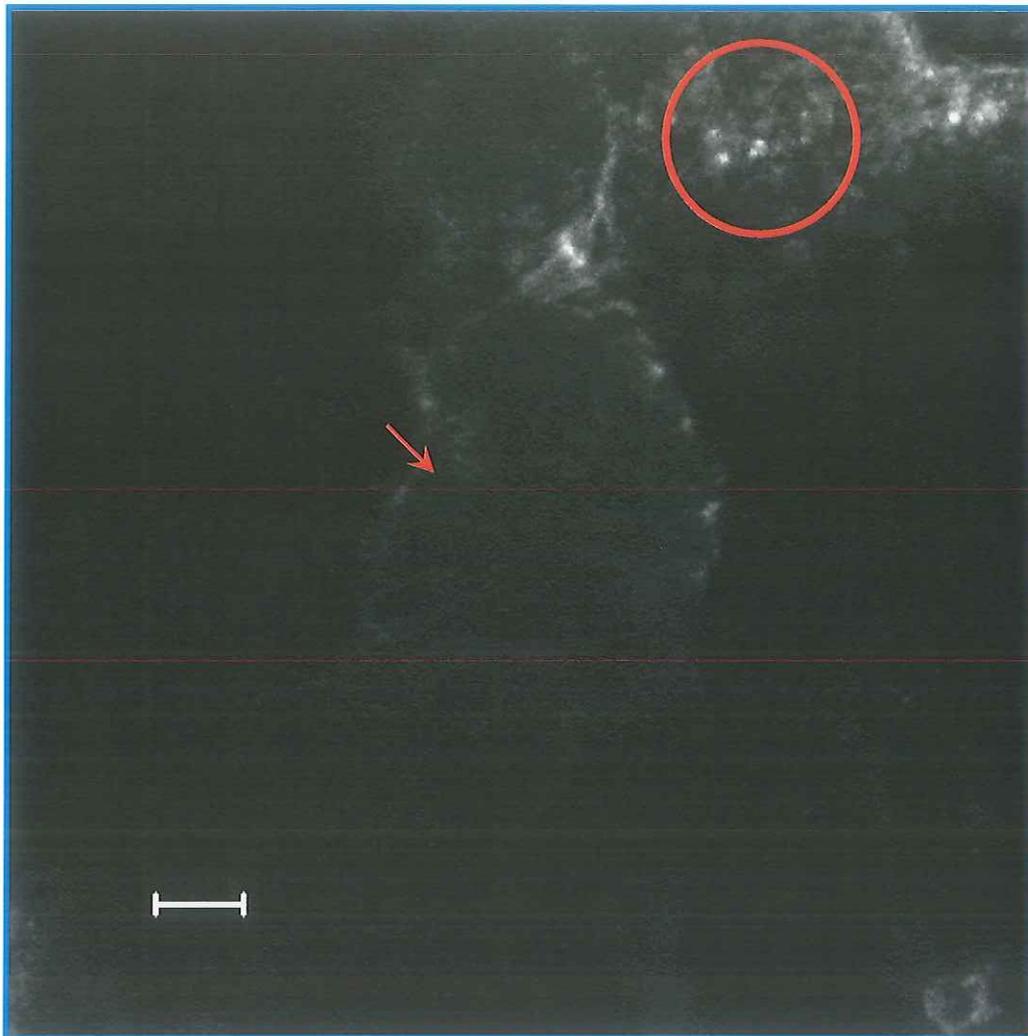


Figura 28. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular en desintegración de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. El círculo enmarca conglomerados globulares de actina que aún conservan marcaje con Faloidina. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe.

larva (Figura 28).

Paralelamente, el tejido larval empezó a contraerse y el rudimento comenzó a emerger por la zona vestibular en el lado izquierdo de la larva. Los pies ambulacrales se notaron un poco más distendidos y el rudimento juvenil empezó a perder su forma característica que semeja un "puño cerrado".

Aunque la desintegración del epitelio larval enmascara parcialmente a la faringe, en la Figura 29 se observa que aun se encuentra perfectamente definida y aparentemente intacta en este punto de desarrollo de la metamorfosis.

A los 45 minutos post-inducción

A los 45 minutos posteriores a la inducción inicial de las larvas a la metamorfosis, el epitelio larval continuó desintegrándose mientras que el rudimento comenzó a emerger por el costado izquierdo de la larva (Figuras 30-I y II). Los pies ambulacrales y las bases de las espinas que formarán a la nueva postlarva, las cuales son estructuras bien diferenciadas por su musculatura, se observaron con mucha mayor claridad. La única estructura del cuerpo larval que permaneció aparentemente intacta, fue el esófago (Figuras 31-I y II).

A los 90 minutos post-inducción

El epitelio larval inició su cierre sobre la superficie aboral postlarval. En este punto de desarrollo de la metamorfosis, el organismo perdió prácticamente toda semejanza con su forma original (Figura 32). El rudimento juvenil

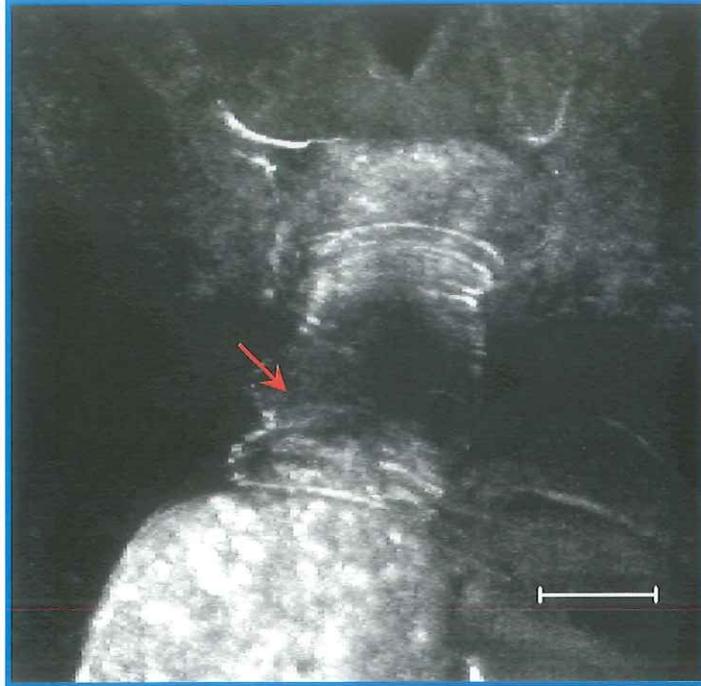


Figura 29. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular de la faringe de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (50 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe.

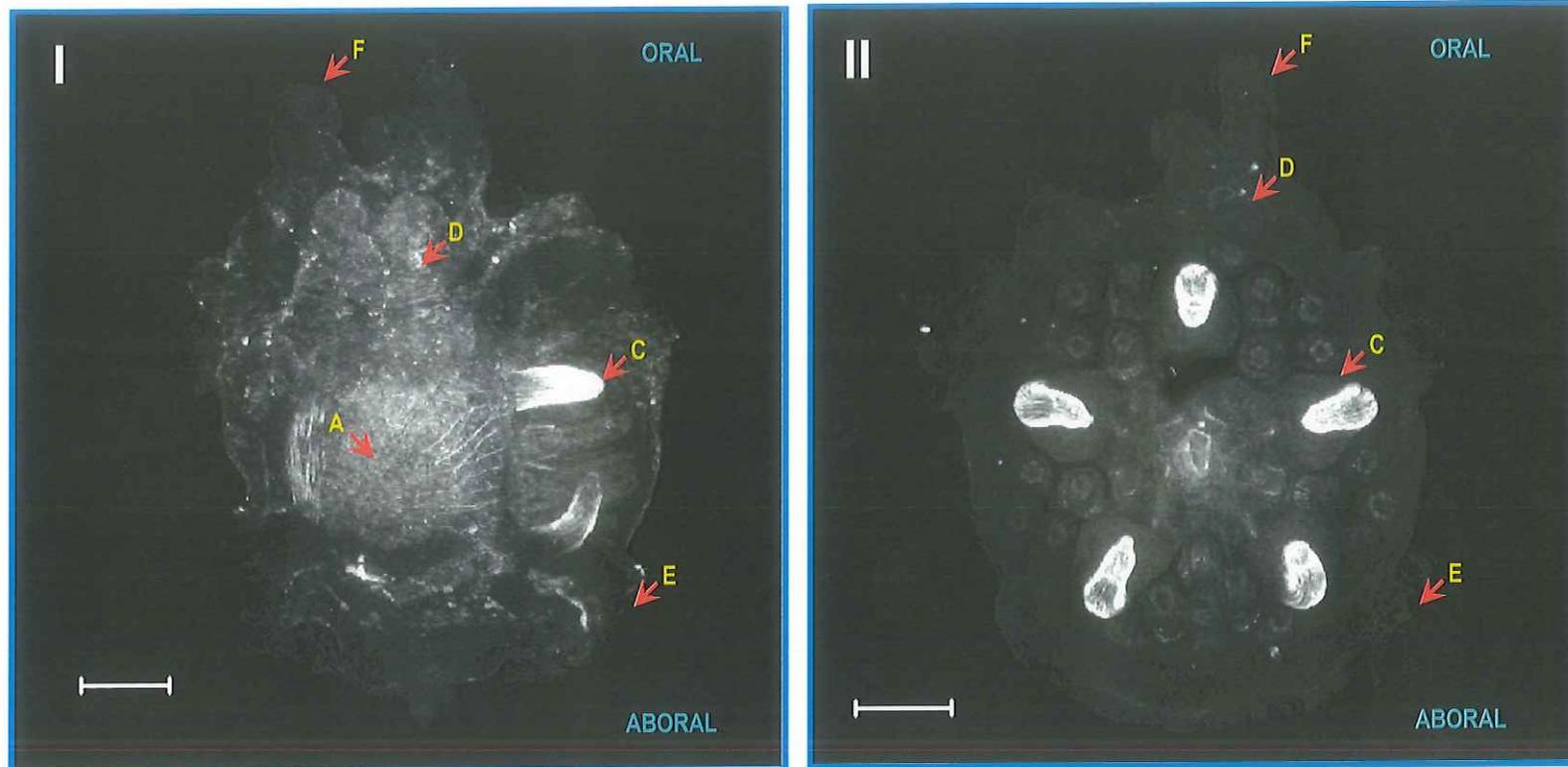


Figura 30. 45 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una vista frontal anal (I) y lateral izquierda (II) de una larva de *S. purpuratus*, pasados 15 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, estómago; C, rudimento juvenil; D, faringe; E, epauletes; F, brazos larvales

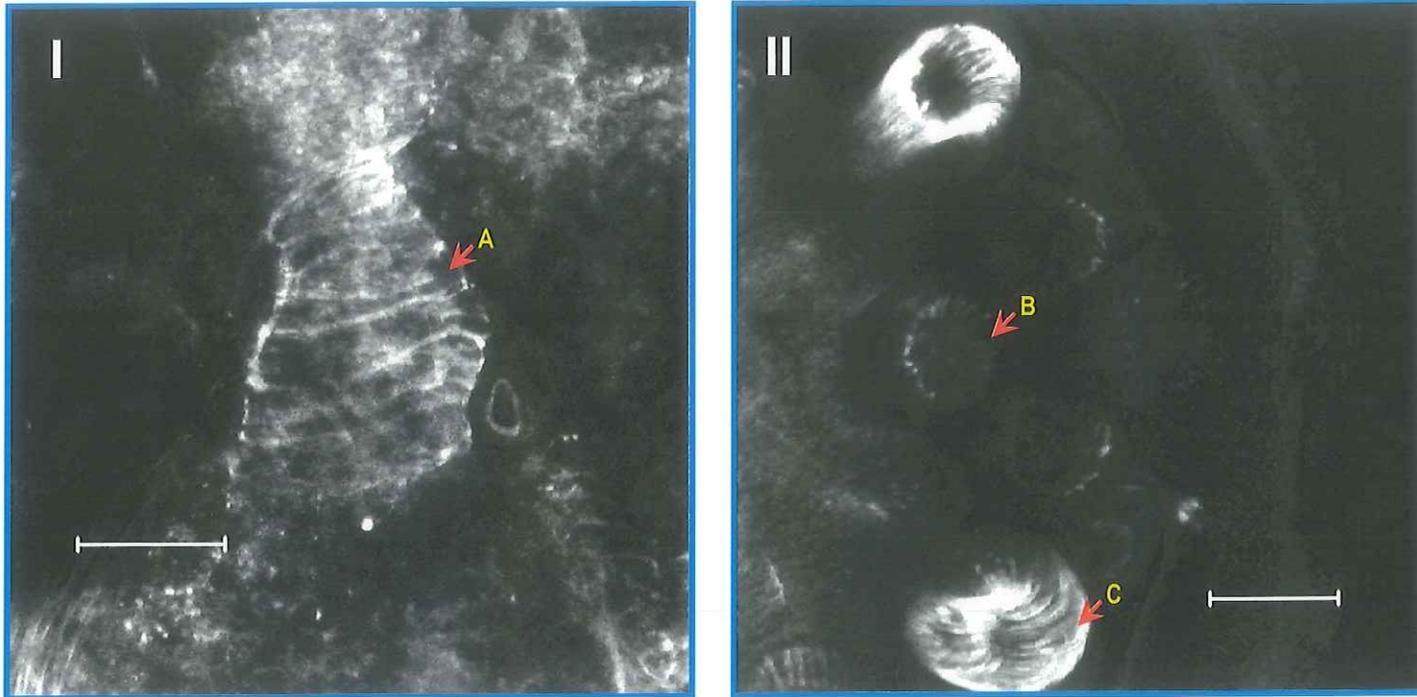


Figura 31. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la faringe (I) y el rudimento juvenil (II) en una larva de *S. purpuratus*, 45 minutos posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (50 μm) con respecto a las imágenes y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, faringe; B, base de una espina en el rudimento juvenil; C, pies ambulacrales.

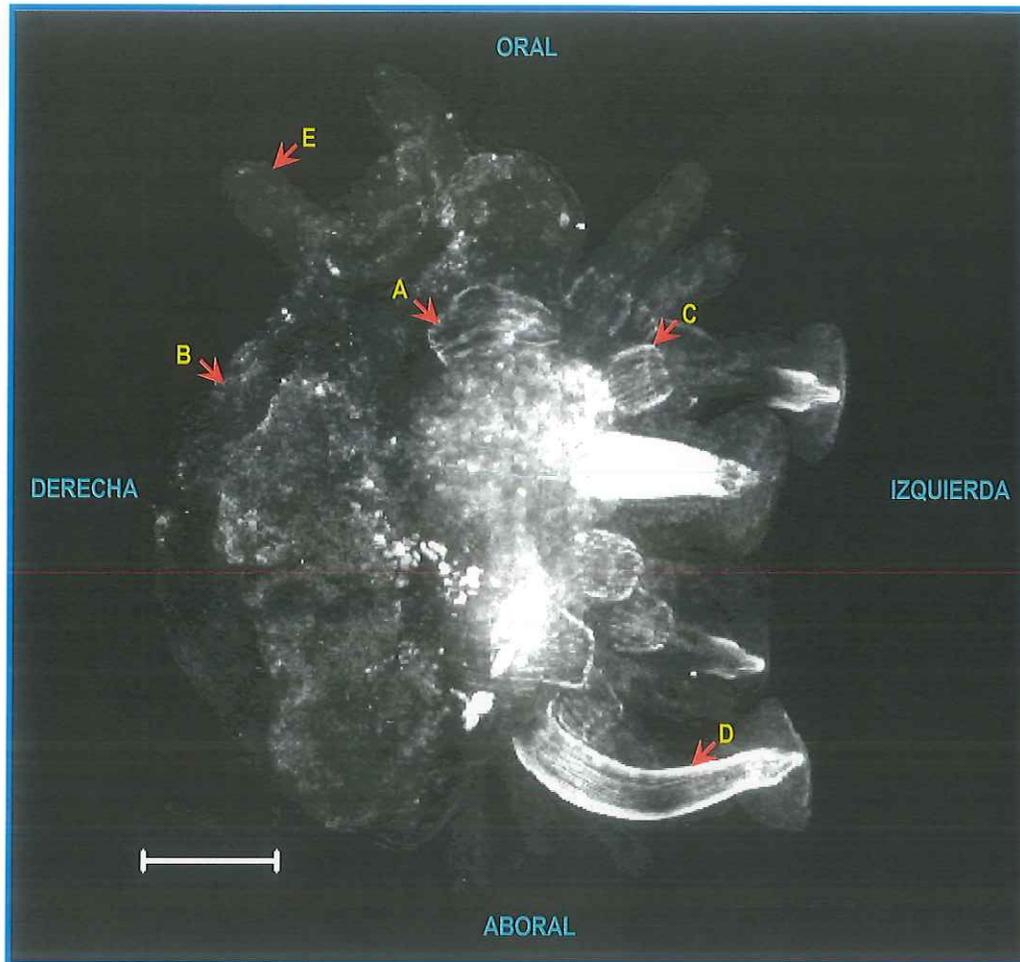


Figura 32. 90 minutos post-inducción. Imagen confocal que muestra tejido muscular en una larva de *S. purpuratus* pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (100 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, faringe; B, cuerpo larval en desintegración; C, base de espinas en el rudimento juvenil; D, pies ambulacrales en el rudimento juvenil; E, brazos larvales.

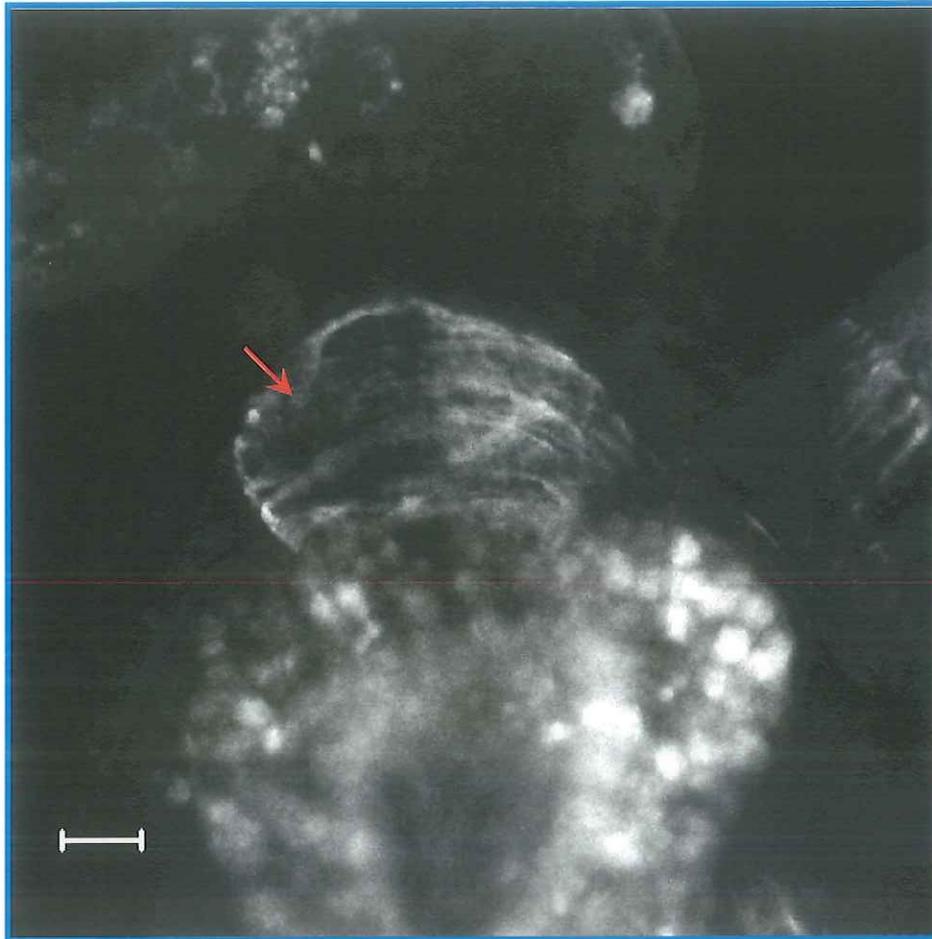


Figura 33. Imagen confocal que exponen el detalle del tejido muscular de la faringe de una larva de *S. purpuratus*, pasados 90 minutos de su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (20 μm) con respecto a la imagen y la flecha la localización aproximada de la faringe.

comenzó a distenderse, los pies ambulacrales dejaron de formar un núcleo compacto que, junto con las espinas, se mostraron proyectadas hacia fuera de la apertura vestibular por completo dislocada. La base de las espinas reveló su forma de cono inconcluso. Pese a toda esta descomposición del tejido larval, aún se pudo apreciar bien definido el cuerpo muscular que compone la faringe, pero éste tampoco conservó sus líneas originales (Figura 33).

Estadio de Postlarva

A las 24 horas posteriores a la inducción, el nuevo organismo juvenil presenta diversas estructuras que lo acompañarán durante el resto de su vida, según se puede apreciar en la Figura 34.

Las espinas ahora bien desarrolladas, presentaron una base cónica formada por acumulaciones de filamentos musculares (Figura 35-I). Los cinco pies ambulacrales se mostraron marcadamente muscularizados, las betas de actina destacadas en su conformación, hacen un todo apretado que los muestra como si el tejido muscular fuera continuo (Figura 35-I).

Alrededor de la boca del organismo, la llamada "Lámpara de Aristóteles" desplegó una amplia distribución del tejido muscular. Un anillo de actina pudo apreciarse formando el perímetro de lo que será la mandíbula, mientras que otro anillo encierra al primero. Este segundo anillo se rompe en cinco puntos y proyecta líneas musculares que alcanzan la base de los pies ambulacrales, según se aprecia en la Figura 35-II.

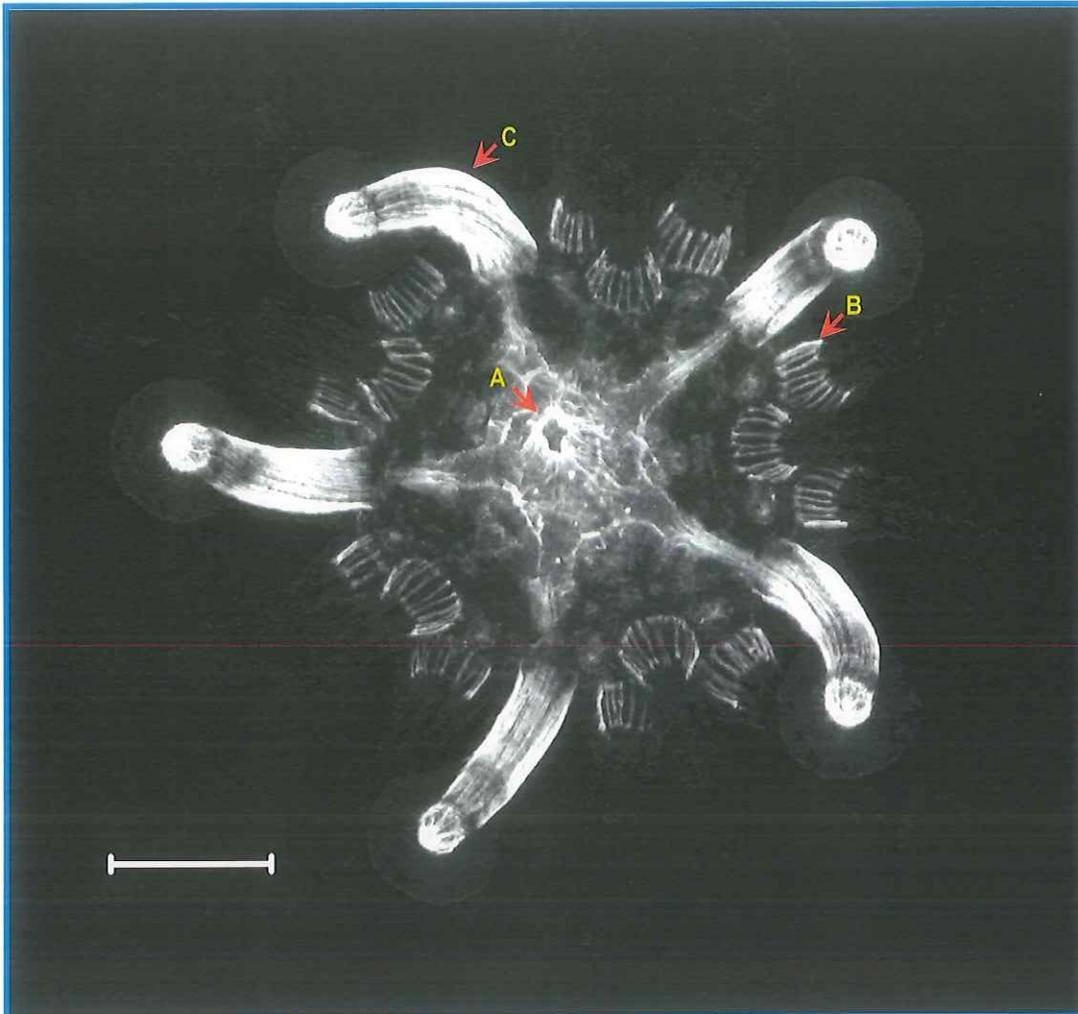


Figura 34. Imagen confocal que muestra el tejido muscular en una postlarva de erizo morado *S. purpuratus* 24 horas posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCL. La barra indica la escala (100 μm) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, lámpara de Aristóteles; B, base de las espinas; C, pies ambulacrales.



Figura 35. Imágenes confocales que exponen el detalle del tejido muscular que conforma la base de las espinas y los pies ambulacrales (I), así como de la llamada lámpara de Aristóteles (II) en postlarvas de erizo de mar *S. purpuratus* 24 horas posteriores a su inducción a la metamorfosis con KCl. La barra indica la escala (20 μ m) con respecto a la imagen y las flechas la localización aproximada de las estructuras: A, base de las espinas; B, pies ambulacrales; C, lámpara de Aristóteles.

IV.4 DISCUSIÓN

Las observaciones realizadas en los cambios de la musculatura de *S. purpuratus*, contrastan en cierta medida con los reportados en otras especies de invertebrados marinos. En diversos fila durante el desarrollo de la metamorfosis, se presenta mayormente una remodelación y destrucción selectiva de los tejidos musculares, en lugar de una pérdida total de los mismos (Wanninger *et al.*, 1999; Weeks, 1999). En otros casos, como en ascideos, la metamorfosis se caracteriza además por la aparición de nuevas estructuras soportadas por tejido muscular (Davidson *et al.*, 2003). En la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*, a diferencia de los casos anteriores se presenta una pérdida total de la musculatura que formó parte del tejido larval. Sin embargo, el rudimento juvenil una vez expulsado conserva todas las características que lo distinguieron en el interior de la larva competente, esto es, se conservan intactos los pies ambulacrales que se muestran profusamente muscularizados, la base de las espinas mantiene su forma cónica por mediación de fibras musculares y la zona oral se muestra aun con grandes betas de tejido muscular. Este colapso masivo de los tejidos larvales, corresponde a la descripción de lo que ha sido llamado como desarrollo indirecto máximo (Peterson y Davidson, 2000), y es característico entre los deuterostomos, del grupo de equinodermos-hemicordados al cual pertenece *S. purpuratus*.

A los quince minutos posteriores a la inducción a la metamorfosis, el tejido muscular ha iniciado una degradación que produce patrones específicos en la forma que adopta al desintegrarse. La retícula de fibras musculares que caracterizó a la larva competente, es lo primero que se desintegra y pasa a formar conglomerados globulares de actina que aún se destacan con el marcaje por Faloidina. La despolimerización de actina filamentosa a actina globular, ha sido caracterizada en células que fenecen mediante el proceso conocido como apoptosis o muerte celular programada (ver Bursch *et al.*, 2000). El proceso de apoptosis ha sido bien documentado durante la metamorfosis de insectos y anfibios (ver Weeks, 1999; Su *et al.*, 1999), sin embargo, pocos trabajos se han realizado sobre invertebrados marinos. Santagata (2002), refiere patrones de desintegración de tejido muscular durante la metamorfosis de *Phoronis pallida*, similares a los encontrados durante el presente trabajo para *S. purpuratus*, este autor considera que podrían ser indicadores de la presencia de células apoptóticas desintegrándose durante el proceso. Aunque este podría ser el caso del erizo morado *S. purpuratus*, los resultados aquí encontrados deben tomarse como una primera aproximación y pueden corroborarse mediante el uso de otras técnicas que verifiquen la participación de un proceso apoptótico.

La red de filamentos de actina que se presenta en la larva competente, parece no tener parangón en otros estudios realizados sobre equinodermos. Sin embargo, se ha reportado que un entramado similar se desarrolla durante

la metamorfosis del ascideo *Boltenia villosa* (Davidson *et al.*, 2003). Estos autores refieren que al segundo día de iniciado el proceso de metamorfosis, se genera una malla filamentosa de actina formada por polígonos muy similares a los encontrados en el epitelio larval de *S. purpuratus*, y esta malla le sirve a *B. villosa* como tejido de sostén para la creación de nuevas estructuras que permanecerán aún después de la metamorfosis. En el caso del erizo morado *S. purpuratus*, esta podría ser la función que desempeña en el cuerpo de la larva: dar forma y soporte al organismo en su conjunto. No obstante, su desintegración al inicio del proceso metamórfico parece indicar que no le es necesario para mantener más estructuras que las requeridas durante su periodo de vida en el plancton.

Finalmente, cabe destacar que la última estructura muscular que se pierde durante la metamorfosis del erizo morado, es la que forma la faringe de la larva. Esto es congruente con el hecho que la última estructura que se desintegra en el sistema nervioso serotoninérgico, es el ganglio apical que se localiza hacia la misma zona donde se desarrolla la faringe (ver Capítulo II). En diversos invertebrados, la relación entre el tejido muscular y el sistema nervioso es clave para el desarrollo de la metamorfosis (Santagata, 2002; Consoulas y Levine, 1998), ambos componentes se coordinan y participan en el desarrollo del proceso de forma activa o pasiva. El caso del erizo de mar no parece ser la excepción, aunque la faringe aparenta tener una función más de sostén, ya que incluso durante el desarrollo larval no parece tener movimiento

incluso para el transporte del alimento hacia el interior de la larva (Strathmann y Bone, 1993). Durante la metamorfosis del erizo de mar puede que mantenga esa zona relativamente intacta de manera que el ganglio apical permanezca íntegro hasta el final del proceso. Esto con la finalidad de que siga regulando la transmisión de mensajes a los tejidos que llevan a cabo los cambios morfogenéticos.

Es evidente que mucho más debe de hacerse con el objetivo de dilucidar los aspectos que regulan la metamorfosis en el erizo de mar *S. purpuratus*, futuros estudios deben considerar las relaciones que existen entre la desaparición de los tejidos larvales en coordinación con las señales sinápticas que los anteceden. Deben explorarse además nuevas aproximaciones que demuestren la participación de procesos como la muerte celular programada durante la metamorfosis de invertebrados marinos en general, aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo indiquen fuertemente la participación de este proceso en la regulación de los cambios morfogenéticos que sufre la larva de *S. purpuratus* al metamorfizarse.

DISCUSIÓN FINAL

Visto desde una perspectiva general, la metamorfosis del erizo de mar aunque manifieste diversos componentes separados, resulta en el tránsito de una etapa de vida larval libre a otra de vida bentónica. Para alcanzar este estado, los componentes individuales de la metamorfosis poseen una relación estrecha entre cada uno de ellos, y presentan una secuencia ordenada o actúan de forma paralela. Analizados por separado, en el presente trabajo se abordaron cuatro de estos componentes individuales. Estos cuatro elementos deben necesariamente encontrarse interconectados ¿cuál es la relación que guardan entre sí y cómo podría estar estructurado el orden en la cascada de eventos que llevan a la metamorfosis? A continuación planteamos algunas ideas.

Por principio, el presente trabajo sugiere que existe evidencia sobre la posible participación de rutas de transducción que involucran a receptores de membrana asociados a proteínas G, la participación de la proteína cinasa C en el proceso y al calcio como segundo mensajero intercalado entre ambos. Estas rutas podrían activarse al recibirse el mensaje inductor inicial, o bien, inmediatamente después. Esto lo refiere el hecho de que solo los inhibidores de proteína G actuaron sobre la metamorfosis de los organismos aun al ser

disparada con KCl como inductor artificial, y aunque aún no se sabe cómo el KCl actúa como activador de la metamorfosis de un gran número de invertebrados marinos, se ha encontrado evidencia de su acción en células corriente abajo de las activadas por el mensaje inicial (ver Hadfield *et al.*, 2000). Una vez recibido el mensaje inductor, la transmisión al interior de los tejidos puede estar a cargo, cuando menos parcialmente, del sistema nervioso serotoninérgico.

Además de nuestros resultados, otras investigaciones proporcionan indicios de la participación del neurotransmisor serotonina en el proceso de metamorfosis del erizo de mar. En primera instancia, la señal más evidente es la conformación de parte del sistema nervioso larval por neuronas poseedoras de receptores de serotonina (Bisgrove y Burke, 1986). Estos receptores de membrana serotoninérgicos, podrían estar relacionados con proteínas G como se mencionó en el capítulo II de este escrito, pero además existe la posibilidad de que formen parte de rutas de transducción donde participen el inositol trifosfato/diacilglicerol y el calcio como segundo mensajero.

Para comprender esto último, se tiene que hacer referencia al conocimiento general sobre el sistema serotoninérgico en vertebrados.

Se ha encontrado que existen siete familias de receptores de membrana serotoninérgicos actuando en el sistema nervioso de vertebrados. Seis de ellas pertenecen a grupos de receptores que poseen siete dominios transmembranales y que se encuentran asociados a proteínas G. Asimismo,

uno de estos seis grupos de receptores (el $5HT_2$) con su proteína G asociada, activan diversas isoformas de la enzima fosfolipasa C, la cual a su vez puede desencadenar la liberación de calcio del retículo endoplasmico y la activación de la PKC al producir inositol tris-fosfato y diacilglicerol (para una compilación, ver Nichols y Sanders-Bush, 2001).

Como se demuestra en el capítulo I, las proteínas G, el inositol trisfosfato/diacilglicerol, la proteína cinasa C y el calcio, parecen participar en la transmisión de la señal externa al interior del tejido larval durante la metamorfosis de *S. purpuratus*. La posible relación entre el sistema nervioso de vertebrados y el de equinodermos, la refieren investigaciones realizadas recientemente, específicamente en la red nerviosa del erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus*, en la cual se han identificado células con receptores de serotonina acoplados a proteínas G, y existe evidencia que apunta a que estos receptores pertenecen concretamente a la familia $5HT_2$ (ver Katow *et al.*, 2004), que como se mencionó, activan la ruta que se presume participa en la metamorfosis de *S. purpuratus*. En síntesis, los resultados obtenidos nos podrían indicar que los primeros mensajes inductores son transmitidos al interior de los tejidos larvales vía sistema serotoninérgico, en conjunto con las rutas estudiadas.

Con respecto a la inhibición de los procesos de transcripción y de traducción por medio de los fármacos DRB y emetina respectivamente, el orden que guardan entre sí o la relación entre los distintos procesos estudiados

que participan en la metamorfosis, es más difícil de descifrar. Como se menciona en el capítulo III, el uso de emetina y DRB al ser utilizados sobre larvas competentes, lejos de impedir que la metamorfosis se lleve a cabo provoca su activación. Se especula que esto se debe a la inhibición de la producción de un posible represor natural de la metamorfosis, el cual ayuda a mantener el estado de competencia de las larvas. Esto coloca a los procesos de transcripción y traducción en un papel preponderante para la metamorfosis de los organismos, pero solo al inicio del proceso. Existe la posibilidad de una actuación más protagónica de estos procesos durante la transformación de las larvas competentes en juveniles, y esta posibilidad se abre a raíz de dos hechos principalmente.

El primero de ellos es que la inhibición de los procesos no es total. Pese a que nuestro trabajo no contempló la medición de la proporción inhibida de transcriptos y proteína traducida (medidos por la cantidad de uracilo y metionina marcados radiactivamente que son incorporados, por ejemplo), algunos trabajos sí han cuantificado la efectividad de emetina y DRB. En cultivos puros de células eucariotas, por ejemplo, la efectividad de ambos fármacos puede fluctuar entre el 50% y 70% en comparación con sus controles ausentes de inhibidores (ver Grollman, 1968; Tamm *et al.*, 1976). Y directamente aplicados para incidir sobre la metamorfosis de invertebrados marinos, Carpizo-Ituarte y Hadfield (2003), utilizando estos mismos fármacos, refieren que existe una reducción de más del 80 % de la síntesis del RNA y

proteínas durante la metamorfosis del poliqueto *Hydroides elegans*. Estos resultados nos hablan de que los procesos de transcripción y traducción, debido a esa fracción que no es inhibida por la acción de los fármacos, aun pueden formar parte importante del proceso metamórfico. Para que esto sea posible, la acción de inhibición debe presentar cierta especificidad, lo cual nos lleva al segundo punto a considerar.

La actuación sobre sitios específicos en la organización celular, por parte de ambos fármacos, se encuentra bien documentada. Emetine por ejemplo, se sabe que actúa en distintos sitios de sub-unidades ribosomales específicas (Madjar *et al.*, 1982). Por su parte, el DRB deja fuera uno de los elementos que inciden sobre la metamorfosis de estos organismos. Experimentos realizados en células humanas *HeLa*, indican que este fármaco trabaja inhibiendo la activación de cierta proteína cinasa aislada de dichas células y deja intactas otras proteínas del mismo tipo. No obstante, la enzima inhibida parece que no participar en rutas que incluyan al cAMP, lo cual deja fuera la posibilidad de que esta cinasa sea la PKC que parece estar involucrada en la metamorfosis de erizo (Zandomeni y Weinmann, 1984). El que el DRB y emetine presenten sitios de acción específicos, deja abierta la posibilidad de que estos sitios en los que actúan se encarguen de regular procesos que no sean indispensables para que el erizo blanco *L. pictus* lleve al cabo su proceso de metamorfosis.

Cabe destacar que la última estructura muscular que se pierde durante la metamorfosis del erizo morado, es la que forma el esófago de la larva (ver

capítulo IV). Esto es congruente con el hecho que la última estructura que se desintegra en el sistema nervioso serotoninérgico, es el ganglio apical que se localiza hacia la misma zona donde se desarrolla el esófago (ver Capítulo II de este mismo trabajo). En diversos invertebrados, la relación entre el tejido muscular y el sistema nervioso es clave para el desarrollo de la metamorfosis (Consoulas y Levine, 1998; Santagata, 2002), ambos componentes se coordinan y participan en el desarrollo del proceso de forma activa o pasiva. El caso del erizo de mar no parece ser la excepción, aunque el esófago aparenta tener una función más de sostén, ya que incluso durante el desarrollo larval no parece tener movimiento incluso para el transporte del alimento hacia el interior de la larva (Strathmann y Bone, 1993). Durante la metamorfosis del erizo de mar puede que mantenga esa zona relativamente intacta de manera que el ganglio apical permanezca íntegro hasta el final del proceso. Esto con la finalidad de que siga regulando la transmisión de mensajes a los tejidos que llevan a cabo los cambios morfogénéticos.

Un aspecto poco explorado y menos entendido dentro de la metamorfosis de invertebrados marinos, es la regulación genética del proceso metamórfico en su conjunto, y en particular, algunos de los mecanismos involucrados. A este respecto, los datos recién publicados sobre la secuenciación del genoma del erizo morado *S. purpuratus* (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006), arrojan nueva luz sobre algunos de los procesos involucrados en los

cambios metamórficos y refuerzan ciertos aspectos de las investigaciones realizadas a la fecha.

De los 23,000 genes que codifican en el genoma por ejemplo, se identificaron 1200 involucrados en procesos de transducción, y dentro de estos procesos, se cuentan 323 que incluyen proteínas cinasas de diversas familias, entre las que pondrían encontrarse aquellas que codifican para cinasas involucradas en el proceso de metamorfosis como la PKC (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006). Otro aspecto a considerar, es el hecho de que dentro del genoma del erizo morado también se encuentran secuencias que codifican para GPCRs, con representantes de las cinco familias mayores de dichos receptores. Paralelamente, se reportan enzimas que propician la síntesis, el transporte, la recepción y la hidrólisis de diversos neurotransmisores, incluyendo la serotonina, lo cual refuerza la posibilidad de que la metamorfosis se encuentre mediada por señales serotoninérgicas en conjunto con GPCRs.

Dentro de estos mismos GPCRs, se encontraron aquellos que codifican en cordados para hormonas peptídicas. Asimismo, en diversos fila de invertebrados marinos, se han reportado respuestas al estrés que incluyen la generación de señales mediadas por hormonas, las cuales a su vez se han encontrado asociadas al proceso metamórfico (Heyland y Moroz, 2006). Esto abre la posibilidad de que la metamorfosis del erizo de mar se encuentre mediada por procesos hormonales

Mucho queda aún por hacer alrededor de la metamorfosis del erizo de mar. Como se ha demostrado a través de este trabajo de tesis, este proceso se reviste de gran complejidad y con lo realizado hasta el día de hoy solo se ha comenzado a descifrar parte del proceso. Además, debe ahondarse en cada uno de los mecanismos estudiados a través de este trabajo de tesis, ya que lo encontrado solo representa una primera aproximación y como tal no es completamente concluyente. Futuras investigaciones deben abordar estos temas si se quiere llegar a tener un conocimiento integral de cómo se lleva a cabo el proceso de metamorfosis en el erizo de mar y otros organismos relacionados.

CONCLUSIONES

- ≡ Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican la participación del sistema inositol trisfosfato-diacilglicerol (IP3/DAG), receptores asociados a proteínas G (GPCRs) y proteína cinasa C (PKC) durante la inducción a la metamorfosis del erizo de mar *S. purpuratus*. El calcio puede intervenir como un segundo mensajero en las rutas de transducción asociadas con este proceso.
- ≡ La exposición de larvas completas a productos químicos aplicados de manera externa, y que dichos químicos se presume pueden incidir sobre sitios de transducción específicos, es una limitación experimental para elucidar en qué nivel los compuestos pueden actuar.
- ≡ El neurotransmisor serotonina actúa en la regulación del proceso de metamorfosis de *S. purpuratus*.
- ≡ El ganglio apical presente en larvas competentes de *S. purpuratus*, es la última estructura que se pierde durante el proceso de metamorfosis, y la zona oral en donde se localiza puede ser el sitio donde se reciben los primeros mensajes inductores.
- ≡ Esta posibilidad se abre debido a que en moluscos, la pérdida de esta estructura se presenta también al final de la metamorfosis, y el ganglio apical

es considerado blanco de los primeros mensajes inductores. Así mismo, la aplicación de estímulos eléctricos en la zona oral cercana al ganglio apical en larvas del equinodermo *Dendraster excentricus*, inducen la metamorfosis de estos organismos, lo cual es otro indicador de que esta zona podría recibir los primeros mensajes inductores.

- ≡ El someter larvas competentes de *L. pictus* a compuestos inhibidores de los proceso de transcripción y traducción, lejos de inhibir, induce la metamorfosis de los organismos en forma dosis dependiente. Esto quizás debido al cese de la producción de un represor interno de la metamorfosis.
- ≡ La primera estructura muscular que se pierde al inicio de la metamorfosis de *S. purpuratus*, es la malla filamentosa de actina que caracteriza a al larva competente. La última estructura en desintegrarse es la faringe.
- ≡ La forma en que se desintegra la malla hexagonal de actina, formando conglomerados globulares, refiere la posibilidad de que el proceso de apoptosis o muerte celular programada, se encuentre formando parte del proceso metamórfico en *S. purpuratus*.
- ≡ La desintegración de la faringe al final del proceso, concuerda con lo encontrado en el sistema nervioso serotoninérgico, y refuerza la posibilidad de que esta sea la zona donde se reciben los primeros mensajes inductores.
- ≡ Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son solo primeras aproximaciones, debe ahondarse en cada uno de los temas a fin de dilucidar

mas ampliamente cómo se encuentra regulado el proceso metamórfico en el erizo de mar.

REFERENCIAS

- Amador-Cano, G., E. Carpizo-Ituarte y D. Cristino-Jorge. 2006. The role of protein kinase C, G-protein coupled receptors and calcium flux during metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Biol. Bull. 210: 121-131
- Arenas-Mena, C., R. A. Cameron, E. H. Davidson. 2000. Spatial expression of Hox cluster genes in the ontogeny of a sea urchin. Development. 127: 4631-4643.
- Arnold, J. M., C. Kennet, B. M. Degnan, y M. F. Lavin. 1997a. Transient expression of a novel serine protease in the ectoderm of the ascidian *Herdmania momus* during development. Dev. Genes Evol. 206: 455-463.
- Arnold, J. M., R. Eri, B. M. Degnan y M. F. Lavin. 1997b. Novel gene containing multiple epidermal growth factor-like motifs transiently expressed in the papillae of the ascidian tadpole larvae. Dev. Byn. 210: 264-273.
- Avila, C., C. T. Tamse, y A. M. Kuzirian. 1996. Induction of metamorphosis in *Hermisenda crassicornis* larvae (Mollusca: Nudibranchia) by GABA, choline and serotonin. Invertebr. Reprod. Dev. 29: 127-141.

- Bai, M. 2004. Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cellular Signalling*. 16: 175-186.
- Baxter, G. y D. E. Morse 1987. G protein and diacylglycerol regulate metamorphosis of planktonic molluscan larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 1867-1870.
- Baxter, G. T. y D. E. Morse 1992. Cilia from abalone larvae contain a receptor-dependent G protein transduction system similar to that in mammals. *Biol. Bull.* 183: 147-154.
- Biggers, W.J. y H. Laufer. 1999. Settlement and metamorphosis of *Capitella* larvae induced by juvenile hormone-active compounds is mediated by protein kinase C and ion channels. *Biol. Bull.* 196: 187-198.
- Bisgrove, B. W. y R. D. Burke. 1986. Development of Serotonergic Neurons in Embryos of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Develop. Growth and Differ.* 28(6): 569-574.
- Bishop, C. D., y B. P. Brandhorst. 2001. NO/cGMP signaling and HSP90 activity represses metamorphosis in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Biol. Bull.* 201: 394-404.
- Bishop, C. D., y B. P. Brandhorst. 2003. On nitric oxide signaling, metamorphosis, and the evolution of biphasic life cycles. *Evol. Dev.* 5: 542-550.

- Bishop, C. D., W. R. Bates y B. P. Brandhorst. 2001. Regulation of metamorphosis in ascidians involves NO/cGMP signaling and HSP90. *J. Exp. Zool.* 289: 374-384.
- Bray, S. J., B. Burke, N. H. Brown y J. Hirsh. 1989. Embryonic expression pattern of a family of *Drosophila* proteins that interact with a central nervous system regulatory element. *Genes Dev.* 3: 1130-1145.
- Brayan, P. J. y P-Y. Quian. 1998. Induction of larval attachment and metamorphosis in the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223: 39-51.
- Brayan, P. J. y P-Y. Quian. 1997. Kreider, J. L. y Chia F-S. 1997. Induction of larval settlement and metamorphosis by pharmacological and conspecific associated compounds in the serpulid polychaete *Hydroides elegans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 146: 81-90.
- Burke, R. D. 1980. Podial sensory receptors and the induction of metamorphosis in echinoids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 47: 223-234.
- Burke, R. D. 1982. Echinoid metamorphosis: retraction and resorption of larval tissues. Proceedings of the International Conference, Tampa Bay, 14-17 September 1981. J. M. Lawrence, Ed. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Burke, R. D. 1983. Neural control of metamorphosis in *Dendraster excentricus*. *Biol. Bull.* 164: 176-188.

- Burke, R. D., D. G. Brand y B. W. Bisgrove. 1986. Structure of the nervous system of the auricularia larva of *Parastycopus californicus*. Biol. Bull. 170: 450-460.
- Bursch, W., K. Hochegger, L. Török, B. Marian, A. Ellinger y R. S. Hermann. 2000. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. Journal of Cell Science. 113: 1189-1198
- Byrne, M. 2001. Evolution of neurogenesis in the sea star genus *Patiriella*. En: M.F. Barker, ed. Echinoderms 2000. Balkema, Lisse. Pp. 151-158.
- Cameron, R. A. y R. T. Hinegardner. 1974. Initiation of metamorphosis in laboratory-cultured sea urchins. Biol. Bull. 146: 335-342.
- Cameron, R. A. y R. T. Hinegardner. 1978. Early events in sea urchin metamorphosis, description and análisis. J. Morph. 157: 21-32.
- Cameron, R. A., G. Mahairas, J. P. Rast, P. Martinez, T. R. Biondi, S. Swartzell, J. C. Wallace, A. J. Poustka, B. T. Livingston, G. A. Wray, C. A. Etensohn, H. Lehrach, R. J. Britten, E. H. Davidson y L. Hood. 2000. A sea urchin genome project: sequence scan, virtual map, and additional resources. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9514-9518.
- Cameron, R. A., L. C. Smith, R. J. Britten y E. H. Davidson. 1994. Ligand-dependent stimulation of introduced mammalian brain receptors alters

spicule symmetry and other morphogenetic events in sea urchin embryos. *Mech. Dev.* 45: 31-47.

Cameron, R. A., T. R. Tosteson y V. Hensley. 1989. The control of sea urchin metamorphosis: ionic effects. *Develop. Growth Differ.* 31: 589-594.

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

Carpizo-Ituarte, E. y M. G. Hadfield. 2003. Transcription and translation inhibitors permit metamorphosis up to radiole formation in the serpulid polychaete *Hydroides elegans* Haswell. *Biol. Bull.* 204: 114-125.

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

Chee, F. y M. Byrne. 1999. Development of the larval serotonergic nervous system in the sea star *Patiriella regularis* as revealed by confocal imaging. *Biol. Bull.* 197: 123-131.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80: 259-268.

Clare, A. S. 1996. Signal transduction of barnacle settlement: calcium-revisited. *Biofouling.* 10: 141-159.

- Clare, A. S., R. F. Thomas y D. Rittschof. 1995. Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of barnacle settlement. *J. Exp. Biol.* 198: 655-664.
- Clare, A. S., y K. Matsumura. 2000. Nature and perception of barnacle settlement pheromones. *Biofouling* 15: 57-71.
- Consoulas C. y R. B. Levine. 1998. Presynaptic Function during Muscle Remodeling in Insect Metamorphosis. *The Journal of Neuroscience.* 18(15): 5817-5831
- Cullen, P. J. 2003. Calcium signalling: the ups and downs of protein kinase C. *Curr. Biol.* 13: R699-R701.
- Dahlström, M., F. Lindgren, K. Berntsson, M. Sjögren, L. G. E. Mårtensson, P. R. Jonsson, y H. Elwing. 2005. Evidence for different pharmacological targets for imidazoline compounds inhibiting settlement of the barnacle *Balanus improvisus*. *Journal of Experimental Zoology.* 303A:551-562
- Davidson, B., S. E. Smith-Wallace, R. A. Howsmon y B. J. Swalla. 2003. A morphological and genetic characterization of metamorphosis in the ascidian *Boltenia villosa*. *Dev. Genes. Evol.* 213:601-611
- Del Carmen, K. A. y M. G. Hadfield. 1999. Metamorphosis in a marine gastropod: the role of transcription. *Am. Zool.* 39: 20A.

- Del Carmen, K. A. y M. G. Hadfield. 2000. Metamorphosis in a marine gastropod: the role of transcription. En: Larval Biology Meetings Abstract Book, Santa Cruz, CA. P. 37A
- Dickinson, A. J.G. y R. P. Croll. 2003. Development of the Larval Nervous System of the Gastropod *Ilyanassa obsoleta*. J. Comp. Neurol. 466:197–218.
- Dynlacht, B. D., L. D. Attardi, A. Admon, M. Freeman y R. Tjian. 1989. Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated *Drosophila* transcription factor that binds neuronal cis elements. Genes Dev. 3: 1677–1688.
- Eri, R., J. M. Arnold, V. F. Hinman, K. M. Green, M. K. Jones, B. M. Degnan y M. F. Lavin. 1999. *Hemps*, a novel EGF-like protein, plays a central role in ascidian metamorphosis. Development. 126: 5809-5818.
- Fenteany, G. y D. E. Morse. 1993. Specific inhibitors of protein synthesis do not block RNA synthesis or settlement in larvae of a marine gastropod mollusk (*Haliotis rufescens*). Biol. Bull. 184: 6-14.
- Fleck, J. 1997. Phosphatidylinositol (PI) signaling and subsequent events in metamorphosis induction of Cnidarian larvae. Proc 8th Int. Coral Reef Symp. 2: 1225-1230.
- Fleck, J. 1998. Chemical fate of a metamorphic inducer in larval-like buds of the cnidarian *Casiopea andromeda*. Biol. Bull. 194: 83-91.

- Fleck, J. y A. Bischoff. 1992. Protein Kinase C is possibly involved in chemical induction of metamorphosis in *Cassiopea spp.* (Cnidaria: Scyphozoa). Proc. 7th Int. Coral Reef Symp. Guam. 1: 456-462.
- Frank, U., T. Leitz and W. A. Müller. 2001. The hydroid *Hydractinia*: a versatile, informative cnidarian representative. Bioassays 23: 963-971.
- Freeman, G. 1993. Metamorphosis in the brachiopod *Terebratalia*: evidence for a role of calcium channel function and dissociation o shell formation from settlement. Biol. Bull. 184: 15-24.
- Freeman, G. y E. B. Ridgway. 1990. Cellular and intracellular pathways mediating the metamorphic stimulus in hydrozoan planulae. Roux's Arch. Dev. Biol. 199: 63-79.
- Froggett, S. J. y E. M. Leise. 1999. Metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*, Yes or No?. Biol. Bull. 196: 57-62.
- Gaudette, F. M., J. L. Lowther y J. A. Pechenik. 2001. Heat shock induces metamorphosis in the larvae of the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 266: 151-164.
- Grollman, A. P. 1968. V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in *HeLa* cells. J. Biol. Chemi. 243: 4089-4094
- Hadfield, M. G. 1984. Settlement requirements of molluscan larvae: New data on chemical and genetic roles. Aquaculture. 183: 283-298

- Hadfield, M. G. 1998. The D P Wilson lecture. Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future. *Biofouling*. 12: 9-29.
- Hadfield, M. G. 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. *Cell and Dev. Biol.* 11: 437-443.
- Hadfield, M. G. y V. J. Paul. 2001. Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. En: *Marine Chemical Ecology*, McClintock J. B. y Baker B. J. eds. CRC press.
- Hadfield, M.G., E. A. Meleshkevitch y D. Y. Boudko. 2000. The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues. *Biol. Bull.* 198: 67-76.
- Hadfield, M. G., E. Carpizo-Ituarte, K. Del Carmen y B. T. Neved. 2001. Metamorphic competence, a major adaptive convergence in marine invertebrate larvae. *Amer. Zool.* 41: 1123-1131.
- Hajnóczky, G. y A. P. Thomas. 1994. The inositol trisphosphate calcium channel is inactivated by inositol trisphosphate. *Nature* 370: 474-477.
- Henning, G., D. K. Hofmann y Y. Benayahu. 1996. The phorbol ester TPA induces metamorphosis in Red Sea coral planulae (Cnidaria: Anthozoa). *Experientia*. 52: 744-749.

- Heyland, A. y L. L. Moroz. 2006. Signaling mechanisms underlying metamorphic transitions in animals. *Integrative and Comparative Biology*. 46(6):743-759
- Hinegardner, R. T. 1969. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* 137: 465-475.
- Holm, E. R., B. T. Nedved, E. Carpizo-Ituarte y M. G. Hadfield. 1998. Metamorphic-signal transduction in *Hydroides elegans* (Polychaeta: Serpulidae) is not mediated by a G protein. *Biol. Bull.* 195: 21-29.
- Ilan, M., R. A. Jensen y D. E. Morse. 1993. Calcium control of metamorphosis in polychaete larvae. *J. Exp. Zool.* 267: 423-430.
- Katow, H., S. Yaguchi, M. Kiyomoto y M. Washio. 2004. The 5HT receptor cell is a new member of secondary mesenchyme cell descendants and forms a major blastocoelar network in sea urchin larvae. *Mechanisms of Development*. 121: 325-337.
- Kawaii, S., K. Yamashita, M. Nakai, M. Takahashi, y N. Fusetani. 1999. Calcium dependence of settlement and nematocyst discharge in actinulae of the hydroid *Tubularia mesembryanthemum*. *Biol. Bull.* 196: 45-51.
- Kon-ya, K. M. y Endo. 1995. Catecholamines as settlement inducers of barnacle larvae. *J. Mar. Biotechnol.* 1: 193-195.

- Kroiher, M., M. Walther y S. Berking. 1991. Necessity of protein synthesis for metamorphosis in the marine hydroid *Hydractinia echinata*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 200: 336 – 341.
- Krug, P. J. y R. K. Zimmer. 2000. Larval settlement: chemical markers for tracing production, transport, and distribution of a waterborne cue. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 207: 283–296
- Leise, E. M., K. Thavaradhara, N. R. Durham and B. E. Turner. 2001. Serotonin and nitric oxide regulate metamorphosis in the marine snail *Ilyanassa obsoleta*. *Amer. Zool.* 41: 258-267.
- Leitz, T. 1997. Induction of settlement and metamorphosis of cnidarian larvae: signal and signal transduction. *Invertebr. Reprod. Dev.* 31: 109-122.
- Leitz, T. y G. Klingmann. 1990. Metamorphosis in *Hydractinia*: studies with activators and inhibitors aiming at protein kinase C and potassium channels. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199: 107-113.
- Lin M. F. y E. M. Leise. 1996. Gangliogenesis in the prosobranch gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J. Comp. Neurol.* 374: 180 – 193.
- Madjar J.-J., K. Nielsen-Smith, M. Frahm y D. J. Roufa. 1982. Emetine resistance in Chinese hamster ovary cells is associated with an altered ribosomal protein S14 mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 79: 1003-1007
- Marois, R. y T. J. Carew. 1997. Ontogeny of serotonergic neurons in *Aplysia californica*. *J. Comp. Neurol.* 386:477-490.

- McCauley, D. W. 1997. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium*. *Dev. Biol.* 190: 229-240.
- Morse D. E. 1992. Molecular mechanism controlling metamorphosis and recruitment in abalone larvae. en *Abalone of the world*, S. A. Sheperd, M. J. Tegner and S. A. Guzman, eds. Blackwell, Oxford. Pp. 107-119
- Nakayama, A., S. Yutaka, y N. Satoh. 2001. Isolation and characterization of genes that are expressed during *Ciona intestinalis* metamorphosis. *Dev. Genes and Evol.* 211(4): 184-189.
- Negri, A. P., N. S. Webster, R. T. Hill y A. J. Heyward. 2001. Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 223: 121-131
- Nichols, C. D. y E. Sanders-Bush. 2001. Serotonin receptor signaling and hallucinogenic drug action. *The Heffter Review of Psychedelic Research.* 2: 73-79
- Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698.
- Okazaki, Y. y Y. Shizuri. 2000. Structures of six cDNAs expressed specifically at cypris larva of barnacles, *Balanus amphitrite*. *Gene.* 250: 127-135.
- Okazaki, Y. y Y. Shizuri. 2001. Identification of the aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) gene and its expresión in the attachment and

metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *Develop. Growth Differ.* 43: 33-41.

Pawlik, J. R. 1990. Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phracmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: Sabellariidae), with acritical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 46: 512-536.

Pawlik, J. R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Ocenogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 30: 273-335.

Pearce, C. M. y R. E. Scheibling. 1994. Induction of metamorphosis of larval echinoids (*Strongylocentrotus droebachiensis* and *Echinarachnius parma*) by potassium chloride (KCl). *Invertebrate Reproduction and Development.* 26: 213-220.

Pearse, J. S. y R. A. Cameron. 1991. Echinodermata: Echinoidea. Pp. 513-662 in *Reproduction of Marine Invertebrates, Vol V1: Echinoderms and Lophophorates* A. C. Giese, J. S. Pearse and V. B. Pearse, eds. The Boxwood Press, Pacific Grove, California.

Pechenik, J. A. 1990. Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: does it occur? Is there a price to pay?. *Ophelia* 32: 63-94.

Pechenik, J. A., D. E. Wendt y J. N. Jarrett. 1998. Metamorphosis is not a new beginning. Larval experience influences juvenile performance. *BioScience* 48: 901-910.

- Peterson K. J. y E. H. Davidson. 2000. Regulatory evolution and the origin of the bilaterians. PNAS 97:4430–4433
- Pham, T. N. Q., B. L. Brown, P. R. M. Dobson y V. J. Richardson. 2003. Protein kinase C-eta (PKC- η) is required for the development of inducible nitric oxide synthase (iNOS) positive phenotype in human monocytic cells. Nitric Oxide. 9: 123-134.
- Pires, A. y M. G. Hadfield. 1991. Oxidative breakdown products of catecholamines and hydrogen peroxide induce partial metamorphosis in the nudibranch *Phestilla sibogae* Bergh (Gastropoda: Opisthobranchia). Biol. Bull. 180: 310-317.
- Plickert G., M. Krohner y A. Munck. 1988. Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata*. Development. 103: 795-803.
- Reed, R. R. 2004. After the Holy Grail: establishing a molecular basis for mammalian olfaction. Cell. 116: 329-336.
- Rodríguez, S. R., F. P. Ojeda y N. C. Inestrosa. 1993. Settlement of benthic marine invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 97: 193-207.
- Santagata, S. 2002. Structure and metamorphic remodeling of the larval nervous system and musculature of *Phoronis pallida* (Phoronida). Evol. Dev. 4: 28-42

- Schneider, T. y Leitz, T. 1994. Protein kinase C in hydrozoans: involvement in metamorphosis of *Hydractinia* and in pattern formation in *Hydra*. Roux's Arch Dev. Biol. 203: 422-428.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. 2006. The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science: 314: 941-952
- Siefker B., M. Kroiher and S. Berking. 2000. Induction of metamorphosis from the larval to the polyp stage is similar in Hydrozoa and a subgroup of Scyphozoa (Cnidaria: Semaestomeae) Helgol. Mar. Res. 54: 230-236.
- Strathmann, M. F. 1987. Phylum Echinodermata, class Echinoidea. En *Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press, Seattle, Washington. Pp. 670
- Strathmann, R. R. y Q. Bone. 1993. Ciliary feeding assisted by suction from the muscular oral hood of phoronid larvae. Biol. Bull. 193: 153- 162
- Su, Y., S. Damjanovski, Y. Shi y Y. B. Shi. 1999. Molecular and cellular basis of tissue remodeling during amphibian metamorphosis. Histol. Histopathol. 14: 175-183
- Tamm, I., R. Hand y L. A. Caliguiri. 1976. Action of dichlorobenzimidazole riboside on RNA synthesis in L-929 and HeLa cells. J. Cell Biol. 69: 229-240

- Thieme, C. y D. K Hofmann. 2003. Control of head morphogenesis in an invertebrate asexually produced larva-like bud (*Cassiopea andromeda*; Cnidaria: Scyphozoa). *Dev. Genes Evol.* 213: 127-133.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25:1-45.
- Walther M., R. Ulrich, M. Kroiher y S. Berking. 1996. Metamorphosis and pattern formation in *Hydractinia echinata*, a colonial hydroid. *Int. J. Dev. Biol.* 40: 313-322
- Wanninger, A., Bernhard Ruthensteiner, Susanne Lobenwein, Willibald Salvenmoser, Wim J. A. G. Dictus y Gerhard Haszprunar. 1999. Development of the musculature in the limpet *Patella* (Mollusca, Patellogastropoda). *Dev. Genes Evol.* 209: 226 – 238
- Weeks, J. C. 1999. Steroid hormones, dendritic remodeling and neuronal death: insights from insect metamorphosis. *Brain, Behavior and Evolution.* 54:51-60
- Weiger, W. A. 1997. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol. Rev.* 72: 61-95.
- Wodicka, L. M. y D. E. Morse. 1991. cDNA sequences reveal mRNAs for two $G\alpha$ signal transducing proteins from larval cilia. *Biol. Bull.* 180: 318-327.

- Yamamoto, H., A. Tachibana, y N. Fusetani., 1999. Roles of dopamine and serotonin in larval attachment of the barnacle, *Balanus amphitrite*. J. Exp. Zool. 284:746-758.
- Yamamoto, H., A. Tachibana, K. Matsumura, y N. Fusetani. 1995. Protein kinase C (PKC) signal transduction system involved in larval metamorphosis of the barnacle *Balanus amphitrite*. Zool. Sci. 12: 391-396.
- Yamamoto, H., A. Tachibana, S. Kawaii, K. Matsumura y N. Fusetani. 1996. Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. J. Exp. Zool. 275: 339-345.
- Zandomeni, R. y R. Weinmann. 1984. Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole on a Protein Kinase. J. Biol. Chem. 23: 14804-14811

ANEXOS

Anexo 1. Tabla de fármacos y su efecto en células eucariotas empleados en la caracterización de rutas de transducción involucradas en la metamorfosis del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Información tomada del Catálogo General Calbiochem 2000/2001, Calbiochem-Novabiochem Corporation, Darmstadt-Alemania.

Nombre	Efecto
<i>1,2 Didecanoyl-rac-glicerol</i>	Activa la proteína cinasa C (PKC) en plaquetas intactas. Mimetiza los efectos del betanecol en canales de calcio tipo L.
<i>Ácido Cyclopiazonico</i>	Inhibidor reversible de la ATPasa del calcio (Ca^{2+} ATPasa) del retículo endoplasmático. Es permeable a la célula. Libera Ca^{2+} de las mismas reservas que Thapsigargin. Inhibe la acumulación de Ca^{2+} en cultivos celulares de músculo suave arterial
<i>Bay K 8644</i>	Actúa como agonista de canales lentos de calcio en células neuroendócrinas, musculares y tiroideas. Prolonga el tiempo de apertura de canales individuales de Ca^{2+} sin afectar su tiempo de cerrado. Agonista de canales de Ca^{2+} tipo L.
<i>Bisindolylmaleimide I</i>	Inhibidor altamente selectivo de la PK C. Permeable a la célula. Actúa como un inhibidor competitivo del sitio de acción del ATP en la PKC. Muestra alta selectividad por PKC α , β I, β II, γ , δ , y ϵ .
<i>Cafeína</i>	Actúa como potente estimulante del sistema nervioso central. En altas concentraciones, produce taquicardia e interfiere con la acumulación de calcio en el retículo endoplasmático en células de músculo esquelético. Previene apoptosis y los efectos del ciclo celular inducidos por algunas sustancias.
<i>Guanosine*</i>	Análogo no hidrolizable del GDP, inhibe la activación de proteínas G al competir por su activación contra GTP y sus análogos. Estimula la actividad de la adenilato ciclasa en membranas sarcolemas al inactivar proteínas G $_i$.
<i>Guanylyl-5'-imidodifosfato, sal tetralítica</i>	Análogo no hidrolizable del GTP, que es utilizado en estudios de enzimas dependientes del GTP. Se une fuertemente a proteínas G de forma irreversible.
<i>Indolactam V*</i>	Activador sintético de PKC, se une igual a todas las isoenzimas de PKC.
<i>Ionóforo A23187 Free Acid*</i>	Transportador móvil que forma complejos estables con cationes divalentes. Útil para incrementar los niveles de Ca^{2+} intracelular. También actúa como inhibidor de la actividad de la Ca^{2+} ATPasa mitocondrial.
<i>K252a</i>	Inhibidor permeable a la célula de la proteína cinasa. Potente inhibidor de la CaM Cinasa II. También inhibe las proteínas cinasas A, C y G, así como la actividad de la proteína tirosina cinasa en los receptores NGF. Induce a la apoptosis y detiene el ciclo celular al inhibir Cdc2 y Cdc25c.
<i>Mastoparan</i>	Péptido sintético permeable a la célula. Activa proteínas G sensibles a la toxina pertussis, mediante un mecanismo similar al de los receptores acoplados a proteínas G. Puede incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} libre. Puede inhibir la actividad de la ATPasa del Na^+ - K^+ .
<i>Nifedipine</i>	Bloqueador de canales de Ca^{2+} , vasodilatador e inductor de apoptosis en células glioblastoma humanas.
<i>Suramin, sal de sodio*</i>	Desacopla proteínas G de sus receptores posiblemente bloqueando su interacción con dominios de receptores intracelulares. Inhibe el intercambio GDP-GTP. Inhibidor competitivo de la transcriptasa reversa. Inhibe la Ca^{2+} ATPasa en el retículo endoplasmático. También inhibe el acoplamiento en la superficie celular de varios factores de crecimiento, los cuales incluyen EGF, PDGF y TGF- β .
<i>Thapsigargin*</i>	Permeable a la célula, libera Ca^{2+} de sus reservas internas al inhibir la ATPasa del Ca^{2+} . No incrementa los niveles de inositol trisfosfato ni tiene efecto sobre la PKC.
<i>TMB-8, Clorhídrico</i>	Inhibe la liberación del Ca^{2+} de sus reservas internas. Disminuye el movimiento transmembranal de Ca^{2+} y la sensibilidad post-sináptica del receptor de acetilcolina. Se utiliza para distinguir la dependencia de las reservas de Ca^{2+} intracelular-extracelular
<i>TPA (forbol-12-miristato-13-acetato)*</i>	Es el forbol-éster de uso más común. Activa la PKC <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Promueve la expresión de la óxido nítrico sintetasa en hepatocitos cultivados.