

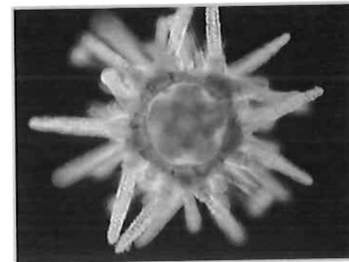
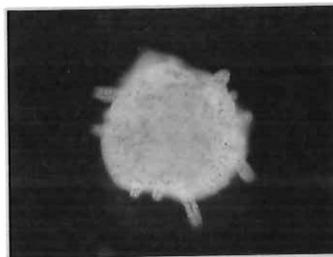
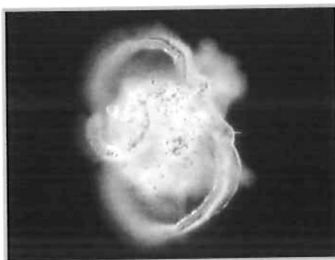
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“ EL PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA (Cinasa) C Y
RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS G, EN LA
METAMORFOSIS DEL ERIZO DE MAR ”**



T E S I S

que para obtener el titulo de

O C E A N O L Ó G O

Presenta

DORA BEATRIZ CRISTINO JORGE

Ensenada, B. C., marzo de 2003.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"EL PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA (CINASA) C Y
RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS G EN LA
METAMORFOSIS DEL ERIZO DE MAR"

TESIS

que para obtener el título de Oceanólogo

Presenta

DORA BEATRIZ CRISTINO JORGE

Aprobada por:



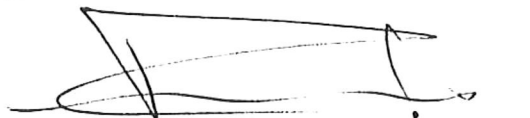
Dr. Eugenio Carpizo Ituarte

Director



Dr. Jorge de la Rosa Velez

Sinodal



M. C. Roberto Escobar Fernández

Sinodal

Ensenada, B. C., marzo de 2003

DEDICATORIA

A mi océano de inspiración, mis hijos ABRIL Y DARVY. Si en algún momento dudé en continuar, solo me bastó recordar lo afortunada que soy al contar con ustedes.

A DARVY, con quien he compartido de las experiencias más bellas de mi vida, ésta es una de ellas. Este reto no hubiera sido posible sin ti.

A mi constante apoyo: mis padres ADELA Y EPIFANIO por su amor. Ustedes han sido mi ejemplo de trabajo y lucha.

A mis queridos hermanos, quienes siempre me han apoyado: Lupita, Víctor, Héctor, Oly y muy en especial a mi hermana Paz.

A mis entrañables sobrinos Sergio, Ulises, Sol, Jesús, Luis, Carlos, Edna.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte por aceptar ser mi director al confiarme y proponerme el tema de esta tesis. Por su valiosos apoyo, paciencia y acertada dirección.

A mis sinodales Dr. Jorge de la Rosa Velez y M. C. Roberto Escobar Fernández por sus observaciones para hacer más productivo este trabajo.

A mis profesores de Marinas por sus enseñanzas y participar en mi formación durante la carrera.

Al M. C. Juan Vaca por otorgarme un poco de su valioso tiempo para asesorarme en el momento que lo necesité.

A Carmen quien siempre estuvo pendiente de mí.

A Agustín Hernández por su incondicional apoyo en el laboratorio y su buen humor.

A mis compañeros con quienes tuve oportunidad de convivir, aprender y pasar momentos de los que no se olvidan. A los pinnípedos, totoabos, orcas, sharkcologos. Muy en especial a Zarina, Angélica, Oscar, Paola, Rodrigo.

A Gerardo Amador por sus fotos para la portada de esta tesis.

A la Asociación de Locatarios de la Bufadora A.C. (ALBAC) por que utilicé su equipo de computo como mío para realizar este trabajo.

ÍNDICE

Página

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- HIPOTESIS	7
3.- OBJETIVO	7
4.- METODOLOGÍA	7
4.1 Obtención y cultivo de larva competente	7
4.2 Diseño experimental	8
4.3 Bioensayos	9
4.4 Análisis estadístico	13
5.- RESULTADOS	14
5.1 Experimentos con fármacos que afectan la actividad de proteína Quinasa C	14
5.1.1 Activadores de PKC	14
5.1.2 Inhibidores de PKC	21
5.2 Experimentos con fármacos que afectan la actividad de proteínas G	25
5.2.1 Activadores de proteínas G	25
5.2.2 Inhibidores de proteínas G	30
6.- DISCUSIÓN	35
7.- CONCLUSIONES	42
8.- LITERATURA CITADA	43
9.- ANEXO	49

Lista de Tablas

Página

Tabla I. Fármacos utilizados en los experimentos de inducción o inhibición de la metamorfosis en el erizo de mar.	10
Tabla II. Metodología con la cual se trabajó para inhibidores de PKC y proteínas G.	12
Tabla III.- Prueba de contrastes de Tukey del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con TPA a diferentes concentraciones (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	50
Tabla IV.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Indolactam V a diferentes concentraciones (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	51
Tabla V.- Prueba de contrastes de Dunn's, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Didecanoyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	52
Tabla VI.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Didecanoyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	53
Tabla VII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con K 252a a diferentes concentraciones (10^{-8} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	54
Tabla VIII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Bisindolylmaleimide a diferentes concentraciones (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M). ($\alpha = 0.05$)	55
Tabla IX.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Mastoparan a diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M). ($\alpha = 0.05$)	56

Tabla X.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Guanilyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M). ($\alpha = 0.05$)	57
Tabla XI.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Guanilyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M). ($\alpha = 0.05$)	58
Tabla XII.- Prueba de contrastes de Dunn's, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Suramin a diferentes concentraciones (10^{-4} , 10^{-7} , $2 \cdot 10^{-5}$, 10^{-5} , 10^{-6} M). ($\alpha = 0.05$)	59
Tabla XIII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Guanosine a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$)	60
Tabla XIV.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Guanosine a diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). ($\alpha = 0.05$).	61

Lista de Figuras

Página

- Fig. 1. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M del activador de PKC TPA, 24 h después de la exposición al inductor. **15**
- Fig. 2. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M del activador de PKC Indolactam V, 24 h después de la exposición al inductor. **17**
- Fig. 3. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M del activador de PKC Didecanoyl, 24 h después de la exposición al inductor. **19**
- Fig. 4. Metamorfosis de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a las concentraciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M del activador de PKC Didecanoyl, 24 h después de la exposición al inductor. **20**
- Fig. 5. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-8} , 10^{-9} M del inhibidor de PKC K 252a, 24 h después de la exposición al inhibidor. **22**
- Fig. 6. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , M del inhibidor de PKC Bisindolylmaleimide I, 24 h después de la exposición al inhibidor. **24**
- Fig. 7. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , M del activador de proteínas G Mastoparan, 24 h después de la exposición al inductor. **26**
- Fig. 8. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , M del activador de proteínas G Guanylyl, 24 h después de la exposición al inductor. **27**

Fig. 9. Metamorfosis de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a las concentraciones $10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ M del activador de proteínas G Guanilyl 24 h después de la exposición al inductor. **29**

Fig. 10. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones $10^{-4}, 2 * 10^{-5}, 10^{-5}, 10^{-6}$ M del inhibidor de proteínas G suramin, 24 h después de la exposición al inhibidor. **31**

Fig. 11. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a las concentraciones $10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}$ M del inhibidor de proteínas G Guanosine, 24 h después de la exposición al inhibidor. **32**

Fig. 12. Metamorfosis de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a las concentraciones $10^{-5}, 10^{-7}, 10^{-9}$ M del inhibidor de proteínas G Guanosine, 24 h después de la exposición al inhibidor. **34**

RESUMEN

Los sistemas del Inositoltrisfosfato diacilglicerol proteína quinasa C (IPI /DAG/ PKC) así como receptores acoplados a proteínas G han estado presumiblemente involucrados en la metamorfosis de diversos grupos de invertebrados marinos. En el erizo de mar se desconoce cual es la ruta o rutas que participan durante la metamorfosis. Este trabajo sugiere la participación de los sistemas mencionados. Los activadores e inhibidores de proteína quinasa C (PKC) tuvieron el efecto esperado en la metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* mientras que en *S. franciscanus* no hubo efecto. TPA resultó el más efectivo inductor a la metamorfosis. Mientras que K 252a, inhibidor de PKC inhibió la metamorfosis en un 30 % respecto a las larvas mantenidas en la solución con KCl 0.1 M. Los activadores de proteínas G no tuvieron el efecto esperado en la metamorfosis, mientras que los inhibidores al tener efecto demuestran una participación de receptores asociados a proteínas G en la metamorfosis del erizo. El resultado de este trabajo sienta un precedente por primera vez del involucramiento del sistema (IPI /DAG/ PKC) y proteínas G en la metamorfosis del erizo de mar. Se observó una respuesta diferencial entre las especies de erizo morado y rojo al inhibidor de proteínas G, Guanosine. Los resultados de este trabajo contribuyen en la búsqueda de la participación de varias rutas de transducción durante la metamorfosis en este organismo. La compleja respuesta de la metamorfosis de la larva de erizo, tanto espacial como temporalmente pronostican interacciones moleculares todavía por aclarar.

1. INTRODUCCIÓN

Diversos grupos de invertebrados marinos incluyen al final de la etapa larvaria un cambio abrupto a su forma adulta. En el caso de los equinoideos durante esta transición ocurren una serie de cambios morfogénéticos que culminan con la metamorfosis (Scheltema, 1974; Cameron y Hinegardner, 1978).

El periodo larvario en el erizo de mar dura de tres a cuatro semanas, y se le conoce como etapa precompetente. En este periodo la larva es incapaz de responder a estímulos para la metamorfosis. Posteriormente se presenta la etapa competente, la cual se caracteriza por presentar un rudimento juvenil, la presencia de uno o más pedicelaria así como de pies ambulacrales (Cameron y Hinegardner, 1974).

En la etapa competente las larvas adquieren la capacidad de responder a estímulos para metamorfizarse (Scheltema, 1974). Estos estímulos para iniciar la metamorfosis se les denomina inductores, de los cuales existen naturales (E.G: película de diatomeas bentónicas asociadas con bacterias), y artificiales, que incluyen compuestos neuroactivos, iones y moduladores de rutas de transducción entre otros (Cameron y Hinegardner, 1974; Cameron y Schroeter, 1980; Highsmith, 1982; Pearce y Scheibling, 1994; Carpizo-Ituarte *et al.*, 2002).

En la inducción a la metamorfosis del erizo de mar se desconocen los mecanismos mediante los cuales la señal externa a través de receptores

celulares se convierte en una respuesta al interior del organismo. La señal externa es transmitida al interior de la célula y activa elementos citoplasmáticos o nucleares de las células desencadenando sistemas enzimáticos o modificando la expresión genética. Los mecanismos mediante los cuales las células comunican el estímulo externo a su interior y que se traducen en respuestas celulares se les conoce como rutas de transducción.

Una gran cantidad de receptores celulares utilizan diversas rutas de transducción para comunicarse al interior celular. Entre estos se encuentran neurotransmisores, canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G y receptores acoplados a rutas asociadas con enzimas del tipo de la proteína quinasa C (Féger *et al.*, 1994).

Los receptores asociados a proteínas G y PKC han estado presumiblemente involucrados en la metamorfosis de larvas de diversos invertebrados marinos (Baxter y Morse, 1987; Schneider y Leitz, 1994; Clare, 1996; Hadfield, 1998).

Durante las últimas dos décadas se ha puesto un mayor énfasis en tratar de entender los mecanismos mediante los cuales los receptores celulares en las larvas, que reciben el mensaje inductor, transmiten la señal al interior del organismo para orquestar los cambios morfogenéticos que ocurren durante la metamorfosis (Hadfield, 1998).

En los últimos 15 años, se han estudiado en invertebrados marinos tres de las principales rutas de transducción (Baxter y Morse, 1987; Leitz y

Klingmann, 1990; Clare *et al.*, 1995; Clare, 1996; Holm *et al.*, 1998). Las rutas que presumiblemente están involucradas en la metamorfosis de diversas formas larvales marinas incluyen el sistema de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), el sistema del inositol trisfosfato/ diacylglycerol/ PKC (InP3/ DAG/ PKC) y el efecto del calcio (E. Carpizo-Ituarte, comunicación personal. IIO/UABC).

En invertebrados marinos las rutas de transducción utilizadas por las larvas durante la metamorfosis aun no han sido totalmente caracterizadas para ninguna especie. Pero una temática común esta emergiendo en diversos fila (Holm *et al.*, 1998; Bishop y Brandhorst, 2001). Como producto de la investigación se cuenta actualmente con información sobre posibles rutas de transducción durante la metamorfosis en celenterados (Freeman y Ridgway, 1990; Leitz, 1997) poliquetos (Pawlik, 1990; 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) y crustáceos (Clare *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; Clare, 1996). Recientemente, el sistema del oxido nítrico/ monofosfato de guanosina cíclico (NO/cGMP) han sido documentados durante la metamorfosis del erizo *Lytechinus pictus* (Bishop y Brandhorst, 2001).

Otros autores establecen la existencia de una regulación separada y rutas inductoras que controlan la metamorfosis en larvas de *Haliotis rufescens* (Baxter y Morse, 1987). Lo anterior como respuesta a dos clases

de señales químicas externas del medio ambiente. Las rutas de regulación operan independientemente por medio de un segundo mensajero en este caso DAG asociado a proteínas G y los subsecuentes eventos aparentemente controlados por diaminoácidos en la columna de agua, los cuales pueden ampliar la respuesta larval a inductores de la metamorfosis. Una ruta similar de regulación basada en el control externo de un segundo mensajero asociado a una proteína G también puede gobernar respuestas a estímulos en otros sistemas sensoriales desarrollados.

Yamamoto *et al.*, (1995) documentaron que los forbol esteroides inducen la metamorfosis de la larva de *Balanus amphitrite* pero no el asentamiento al sustrato. Sus resultados pueden indicar el involucramiento de la activación de la PKC en la metamorfosis. Por otro lado se ha demostrado que la manipulación farmacológica de los canales de calcio en la célula con inhibidores de estos están involucrados en el asentamiento de las larvas de *B. Amphitrite* (Clare, 1996). Las larvas de este crustáceo requieren calcio para el asentamiento.

Freeman y Ridgway (1990), al trabajar con celenterados sugieren que la liberación de calcio en el citoplasma celular del hidrozooario *Mitrocomella polydiademata* provee un encadenamiento crucial entre el receptor y el efector celular para el inicio de la metamorfosis. Los autores mencionados anteriormente indican que la liberación de calcio en el citoplasma celular no ocurre durante la inducción a la metamorfosis con phorbol esteroides, indicando

que ambos actúan en pasos diferentes durante la metamorfosis. El trabajo en celenterados también han sido documentado por Leitz y Klingmann (1990), quienes proponen que la activación de la metamorfosis en la larva de *Hydractinia sp.* toma lugar en algunas células de la parte anterior como resultado de la activación de la PKC, la cual directa o indirectamente permite el cierre de los canales de potasio. La hipótesis anterior unifica conocimientos acerca del rol de los canales de K^+ y el sistema del fosfatidilinositol en la metamorfosis en *Hydractinia* (Leitz y Klingmann, 1990).

Se ha documentado la participación del sistema cAMP en la metamorfosis del poliqueto *Phragmatopoma lapidosa californica* (Pawlik, 1990). Este autor demostró que el inhibidor de fosfodiesterasas Isobutilmetilxantina (IBMX) induce la metamorfosis en *P. l. californica*. Otros autores que han trabajado con larvas del poliqueto *Hydroides elegans* indican que los receptores acoplados a proteínas G y las rutas de transducción por los sistemas de la adenilato ciclasa- AMP cíclico o la ruta del (PI / DAG/ PKC) no son parte de la ruta morfogénica que es directamente responsable de las señales metamórficas en *H. elegans* (Holm *et al.*, 1998). Por otro lado Biggers y Laufer (1999), investigaron la ruta de transducción por medio de hormonas juveniles que inducen al asentamiento y metamorfosis de la larva del anélido poliqueto *Capitella sp.* Estos autores probaron activadores de PKC, y sugirieron que las hormonas pueden causar la activación de PKC con la subsecuente modulación de canales de calcio y potasio. Los mecanismos

por los cuales la PKC y el calcio pueden regular la metamorfosis de la larva de *Capitella* no fueron clarificados en el estudio presentado por los autores mencionados.

Bishop y Brandhorts (2001), reportan que el sistema del NO/ cGMP es un importante regulador de los eventos alrededor de la transformación de la larva a juvenil en *Lytechinus pictus*. Este sistema puede ser disparado por una señal natural, y su regulación parece ser dependiente de la interacción entre la proteína "heat shock" 90 (HSP 90), la oxido nítrico sintetasa (NOS) y el sistema de la guanilato ciclasa (Bishop y Brandhorts, 2001).

En el erizo de mar, se desconoce que ruta o rutas de transducción participan durante la metamorfosis. El presente trabajo pretende conocer si rutas de transducción ligadas a receptores asociados a proteínas G y PKC desempeñan algún papel durante la metamorfosis del erizo de mar. Con lo anterior se generarían las bases que nos permitan tener mejor control en el periodo de metamorfosis en el erizo de mar, así como mejorar la biotecnología de su cultivo.

Este trabajo forma parte del proyecto titulado: Mecanismos que Regulan la metamorfosis del Erizo de Mar que se realiza en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), y es financiado parcialmente por el CONACyT.

2. HIPÓTESIS

La inducción a la metamorfosis en el erizo de mar *S. purpuratus* esta mediada por la activación de rutas de transducción, las cuales incluyen la participación de receptores asociados a proteínas G y rutas asociadas a proteína quinasa C.

3. OBJETIVO

Documentar la posible participación de rutas de transducción asociadas a proteína quinasa C y/o receptores asociados a proteínas G, y que resulten en la activación de la metamorfosis en el erizo de mar.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención y cultivo de larva competente

Se colectaron organismos maduros de las especies *S. purpuratus* (erizo morado) y *S. franciscanus* (erizo rojo) de la zona intermareal en Campo Kennedy localizado en las inmediaciones de la Bahía Todos Santos en el municipio de Ensenada, B.C. Los organismos fueron inducidos al desove según el método descrito por Strathmann (1987), que consiste en inyectar en la región intercelómica de 2 a 4 ml de cloruro de potasio (KCl, 0.53 M), de acuerdo al tamaño del erizo. Los erizos desovaron de manera individual en frascos de vidrio con agua de mar, irradiada con luz ultravioleta y filtrada hasta 1 μm (AMF).

Para llevar a cabo la fertilización se utilizó el método descrito por Strathmann (1987). Los huevos en presencia de espermatozoides, se dejaron en

contacto por un periodo de 15 minutos para garantizar la fertilización, la cual se comprobó por el levantamiento de la membrana de fertilización, que ha sido descrita en diversos invertebrados marinos (Chase, 1967; Epel, 1978).

Los huevos fertilizados se lavaron en un tamiz de 45 μm para quitar el exceso de esperma. Por último los óvulos fertilizados se colocaron en un recipiente de 18 litros con AMF, donde permanecieron durante 48 h, tiempo en el que alcanzan el estadio prisma.

Las larvas se mantuvieron en estanques cónicos de 45 litros con AMF. El desarrollo larvario tuvo una duración aproximada de un mes. La densidad del cultivo fue de 2 larvas/ ml, y se alimentaron con la microalga *Rhodomonas* sp . La ración diaria de alimento se aumentó cada semana de la siguiente manera 10,000, 15,000 y 20,000 cel/ ml (de acuerdo con experiencia en el laboratorio). Recambios de agua del 50 % del volumen se realizaron cada tercer día y del 100 % una vez por semana. Las larvas se cuantificaron cada semana hasta el inicio de los experimentos, cuando alcanzaron el estadio competente.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Inducción a la metamorfosis con fármacos que afectan la actividad de PKC y proteínas G.

Se utilizaron 3 activadores de PKC. De los tres activadores utilizados Indolactam V (Indolactam) y el forbol -12- miristato-13 acetato (TPA) se

pusieron a prueba en erizo morado. El compuesto 1,2-Didecanoyl-rac-glycerol (Didecanoyl) se experimentó en ambas especies de erizo (morado y rojo). Los inhibidores de PKC, K252a (K 252) y Bisindolylmaleimide I se utilizaron con erizo morado.

Se utilizaron 2 activadores de proteínas G. De los fármacos activadores utilizados, Guanylyl-5'-imidodiphosphate (Guanylyl) se puso a prueba en erizo morado y rojo. Mastoparan se experimentó solo en erizo morado. De los dos fármacos inhibidores de proteínas G utilizados Suramin (Suramin) fue puesto a prueba en erizo morado. Guanosine 5'-0-(2-Thiodiphosphate) (Guanosine) se experimentó en ambas especies de erizo (morado y rojo). Todos los reactivos fueron adquiridos en Calbiochem.

4.3 Bioensayos

Treinta larvas competentes fueron colocadas en cajas Petri de depósitos múltiples de plásticos de 10 ml (Falcon de 6 depósitos) con un volumen total de 5 ml de agua de mar filtrada y con la concentración requerida del fármaco (Tabla 1).

Se evaluó el efecto de los diversos fármacos en nueve experimentos para receptores asociados a proteínas G o PKC (Tabla I).

Tabla I. Fármacos utilizados en los experimentos de inducción o inhibición de la metamorfosis en el erizo de mar.

Vía de transducción a afectar	Fármaco utilizado	Sitio de acción	Concentración utilizada (M)	Efecto esperado
Ruta asociada a proteína quinasa C	TPA	Activa PKC y calcio ATPeasa, induce la formación de cAMP.	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9}	E
	Indolactam V	Activa PKC, ligado a afinidades similares de todas las isoformas de PKC.	10^{-7} 10^{-8} 10^{-9}	E
	1,2 Didecanoyl-rac-glycerol	Activa PKC, imita el efecto de betanecol (agonista muscarínico) sobre canales de Ca^{+2} del tipo L.	10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} 10^{-9}	E
	K-252a	Inhibidor de PKC, la cadena ligera miosina y tirosina.	10^{-6} 10^{-8} 10^{-9}	I
	Bisindolylmaleimide I	Inhibidor de CaM (calmodulina), la cadena ligera miosina. Antagonista intracelular de Ca^{+2} .	10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} 10^{-10}	I
Ruta asociada a proteínas G	Suramin	Inhibidor de PG, así como la tasa de intercambio de GDP-GTP limitando el paso en la activación de la subunidad G_{α} .	10^{-4} 5×10^{-5} 10^{-5} 10^{-6}	I
	Guanosine	Inhibidor de PG análogo a GDP. Estimula la adenilato ciclasa por la inhibición de P_i .	10^{-3} 10^{-5} 10^{-7} 10^{-9}	I
	Mastoparan	Activa PG por un mecanismo análogo a los receptores acoplados a PG.	10^{-5} 10^{-6} 10^{-8} 10^{-10}	E
	Guanilyl	Activa PG, análogo a GTP.	10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}	E

Abreviaturas: I = Inhibir; E = Estimular; cAMP = monofosfato de adenosina cíclico; Ca^{+2} = calcio; GDP = difosfato de guanosina; P_i = fosforo inorgánico; PG = proteínas G., G_{α} = subunidad alfa de las PG; GTP = trifosfato de guanosina.

Para el caso de los experimentos que se realizaron con activadores, las larvas se mantuvieron durante 24 h con el inductor. En el caso de los inhibidores se procedió de acuerdo a lo descrito en la Tabla II.

En cada experimento se incluyó un control positivo que consistió, en introducir a las larvas por 15 a 20 minutos en un tratamiento con una solución de KCl 0.1 M. El cual es un método efectivo para inducir la metamorfosis en erizos (Carpizo-Ituarte et al, 2002). Además, se incluyó un control negativo que consistió en agua de mar esterilizada (AME). Las soluciones stock de los fármacos se prepararon con AME, agua desionizada (AD) o sulfóxido de dimetil (DMSO), según se requirió. Se incluyeron tres réplicas para cada tratamiento. Cuando fue necesario se incluyó un control en cada tratamiento para evaluar el posible efecto de los solventes. La respuesta de las larvas a los diferentes fármacos se evaluó 24 h después de agregar el compuesto. Las larvas se consideraron metamorfozadas al perder el epitelio y brazos del cuerpo larval.

Tabla II. Metodología con la cual se trabajó para inhibidores de PKC y proteínas G.

Fármacos inhibidores	Tratamiento
* K 252a ** Guanosine	1) 15 min con inhibidor 2) se agregó solución de KCl por 15 min junto con inhibidor 3) se retiró solución 4) el tratamiento permaneció por 24 h con AME
* Bisindolylmaleimide I ** Suramin	1) 15 min con inhibidor 2) se agregó solución de KCl por 15 min junto con inhibidor 3) se retiró solución 4) el tratamiento permaneció por 24 h con inhibidor

Abreviaturas: * = Inhibidores de PKC ** = inhibidores de proteínas G. ;

AME =agua de mar esterilizada

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de Embriología de Organismos Marinos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), de la Universidad Autónoma de Baja California.

4.4 Análisis estadístico

El porcentaje de larvas metamorfizadas obtenido en cada replica fue sujeto a una transformación angular y posterior cálculo de promedios y varianzas. Para verificar las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó el programa estadístico SIGMA STAT. Cuando estas condiciones se cumplieron, se realizó un análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para probar diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas no se cumplieron se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis Para las diferencias entre tratamientos específicos ($\alpha < 0.05$) se aplicaron las pruebas de Tukey y Dunn's.

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos con fármacos que afectan la actividad de PKC.

5.1.1 *Activadores de PKC*

Los fármacos inductores de PKC activaron la metamorfosis en las larvas de *Strongylocentrotus purpuratus*. TPA fue el inductor más efectivo de la metamorfosis en las larvas de erizo morado (Fig. 1). La concentración donde hubo mayor porcentaje de larvas metamorfozadas fue con la concentración 10^{-9} M. Sin embargo, los porcentajes de metamorfosis obtenidos en el espectro de concentraciones probadas con este fármaco resultaron no significativos entre ellas y cercanos al 100 % (Tukey, $P < 0.05$). Las larvas que fueron inducidas con la solución de KCl 0.1 M alcanzaron un porcentaje de metamorfosis tan alto como las expuestas a las diferentes concentraciones de TPA y no fueron significativamente diferente a estos (Tukey, $P < 0.05$). El porcentaje de metamorfosis obtenido en las concentraciones utilizadas con TPA resultó significativo respecto al obtenido con las larvas mantenidas en AME donde no hubo efecto (Tukey, $P < 0.05$). El DMSO utilizado para poner en solución el TPA tuvo un efecto muy reducido y equivalente en porcentaje a las larvas mantenidas en AME (Tukey, $P < 0.05$).

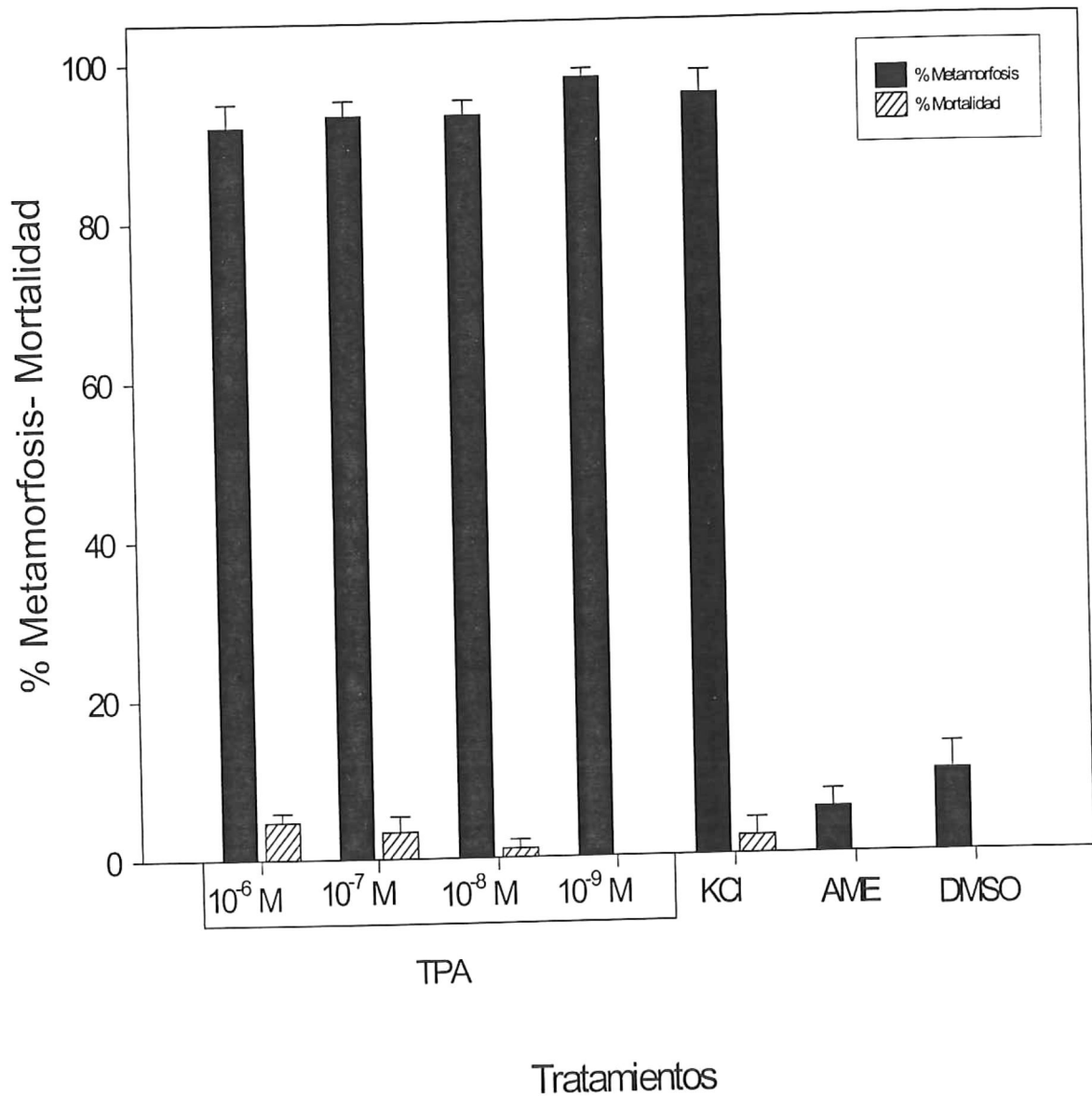


Figura 1. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del activador de PKC. TPA. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas/ tratamiento), evaluadas 24 h después de estar expuestas al inductor. DMSO = sulfoxido de dimetil. KCL = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AME = agua de mar esterilizada.

Los resultados obtenidos en la inducción a la metamorfosis con TPA tuvieron niveles de mortalidad mínimos o nulos en los diferentes tratamientos.

Al inducir a la metamorfosis con Indolactam se obtuvieron porcentajes menores respecto a TPA. El mayor porcentaje de metamorfosis en la inducción con Indolactam se obtuvo en el tratamiento con la concentración de 10^{-9} M. Este porcentaje de metamorfosis fue entre 60 y 85 % (Fig. 2). El porcentaje de metamorfosis obtenido en la inducción con Indolactam resultó mayor al disminuir la concentración del fármaco. Este incremento gradual en el porcentaje de metamorfosis entre las concentraciones utilizadas del fármaco no fue significativo entre las mismas (Tukey, $P < 0.05$). La exposición de las larvas a la solución con KCl 0.1 M resultó en un porcentaje de metamorfosis mayor al 90 %. Este resultado no fue significativo respecto al obtenido con las concentraciones utilizadas de Indolactam (Tukey, $P < 0.05$). Los porcentajes de metamorfosis obtenidos en la inducción a la metamorfosis con Indolactam fueron significativos respecto a las larvas mantenidas en AME y DMSO (Tukey, $P < 0.05$). Por otra parte, la inducción a la metamorfosis con Indolactam resultó tóxica en las concentraciones de 10^{-5} y 10^{-6} M.

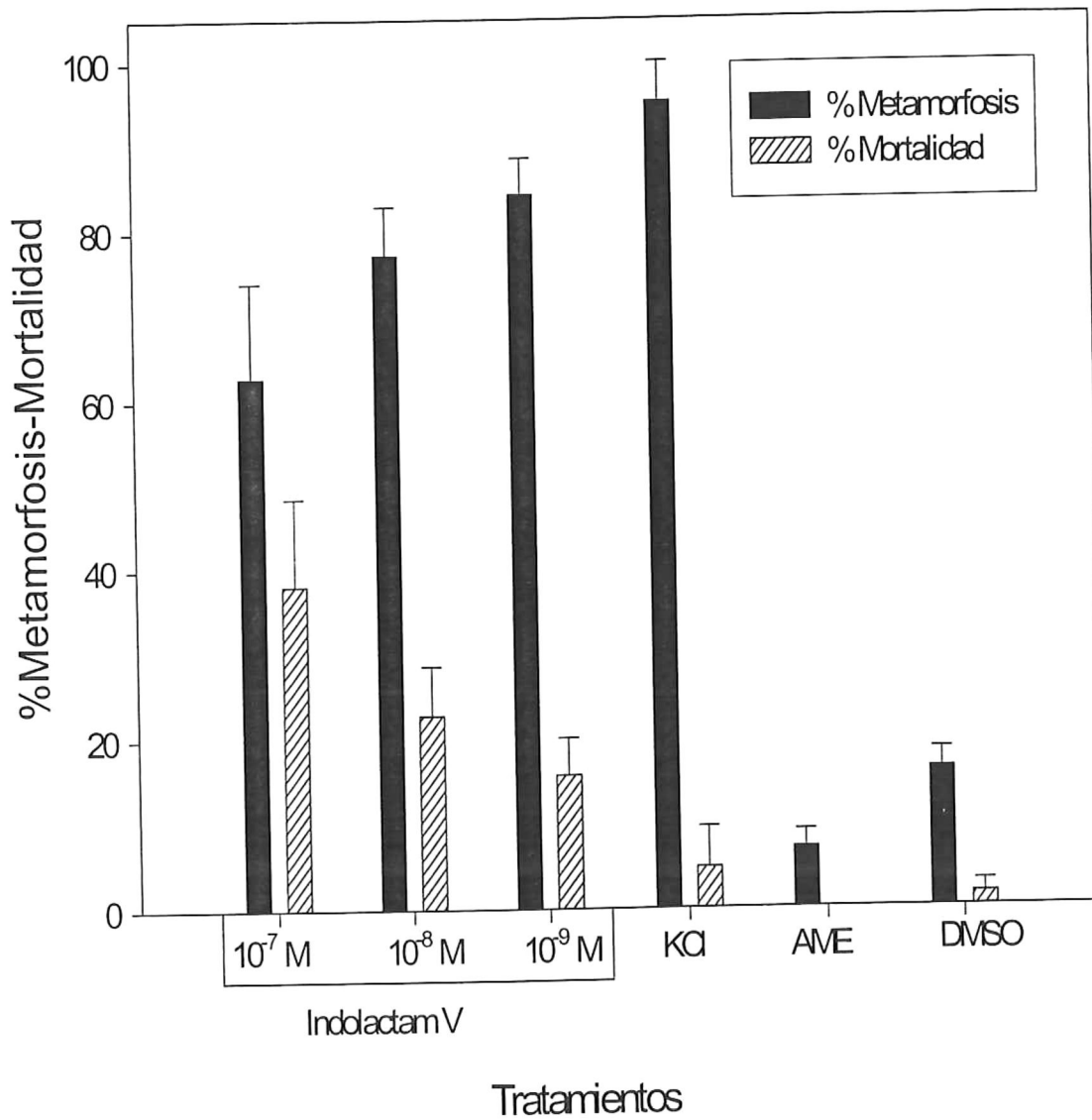


Figura 2. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del activador de PKC **Indolactam V**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas /tratamiento), evaluadas 24 h después de estar expuestas al inductor. Las concentraciones 10^{-5} y 10^{-6} M fueron tóxicas para las larvas, la mortalidad fue del 100 %. DMSO = sulfoxido de dimetil. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AME = agua de mar esterilizada.

El porcentaje de mortalidad en el resto de las concentraciones probadas con Indolactam disminuyó al ser menor la concentración del fármaco. La mortalidad fue mínima en el resto de los tratamientos y nula en el control negativo (Fig. 2).

La inducción con Didecanoyl tuvo un efecto mínimo en la activación de la metamorfosis en *Strongylocentrotus purpuratus* y *S. franciscanus*. De los inductores utilizados, fue el menos efectivo de los activadores de PKC. Al inducir a la metamorfosis con Didecanoyl el mayor porcentaje obtenido fue cercano al 15 % en la concentración 10^{-3} M en ambas especies de erizo (Figs. 3,4). En contraste las larvas inducidas con la solución de KCl 0.1 M se metamorizaron en porcentajes cercanos al 80 % tanto en erizo rojo como morado (Figs. 3 y 4). El resultado obtenido en la inducción a la metamorfosis con Didecanoyl no fue diferente entre las concentraciones probadas del fármaco en ambas especies de erizo. El resultado anterior fue significativo al compararse con el porcentaje de metamorfosis que se obtuvo en las larvas inducidas con la solución de KCl (Figs. 3 y 4). El nivel de mortalidad en las concentraciones con Didecanoyl fue mínimo. Esta mortalidad fue ligeramente superior en erizo morado respecto al rojo (Figs. 3 y 4).

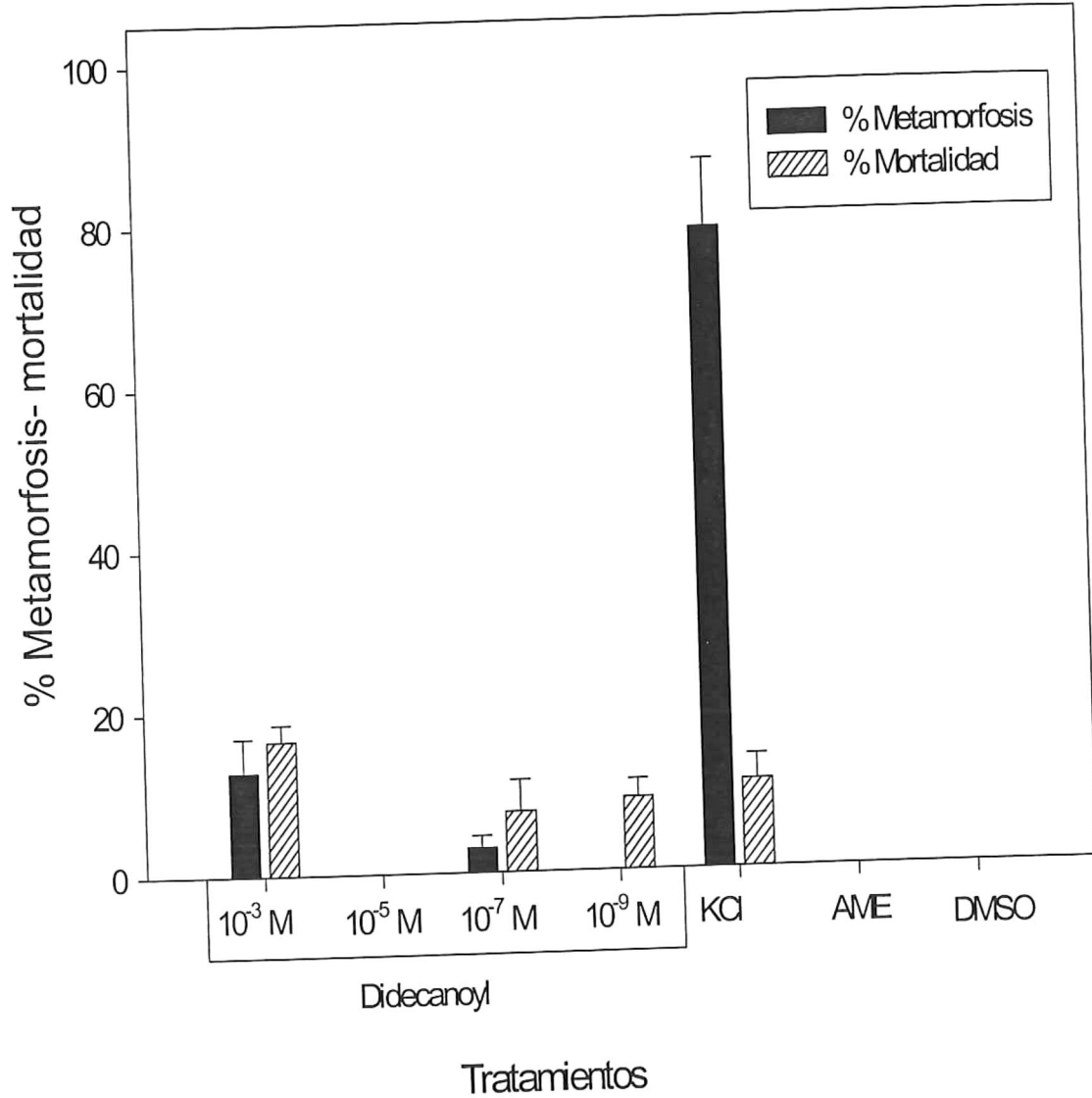


Figura 3. Metamorfosis de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a distintas concentraciones del activador de PKC **1,2-Didecanoyl-rac-glycerol**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluadas 24 después de estar expuestas al inductor. En las concentraciones 10⁻⁵ y 10⁻⁹ M no hubo efecto, DMSO = sulfoxido de dimetil. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AME = agua de mar esterilizada.

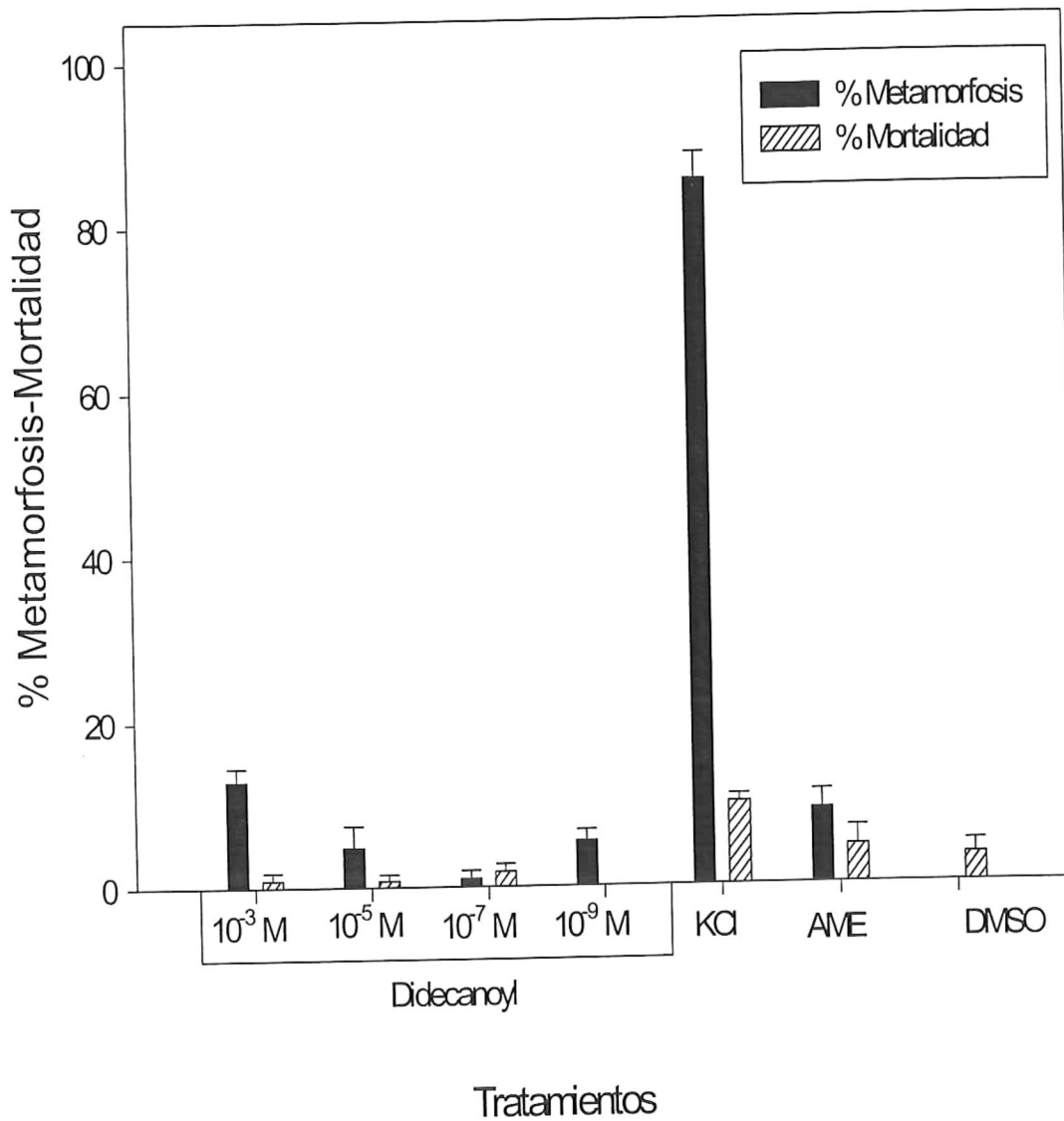


Figura 4. Metamorfosis de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a distintas concentraciones del activador de PKC **1,2-Didecanoyl-rac-glycerol**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas /tratamiento), evaluadas 24 después de estar expuestas al inductor. DMSO = sulfoxido de dimetil. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AME = agua de mar esterilizada.

5.1.2 *Inhibidores de PKC.*

En los tratamientos con fármacos inhibidores de PKC se notó un decremento en la metamorfosis en las larvas de *S. purpuratus*, respuesta que resultó acorde al efecto esperado de estos compuestos.

El fármaco K 252a (K 252) inhibió la metamorfosis del erizo morado (Fig. 5). El porcentaje de metamorfosis que se obtuvo en las concentraciones 10^{-8} y 10^{-9} M fue de alrededor del 55. El resultado que se obtuvo con las larvas inducidas con KCl 0.1 M fue de un porcentaje del 75 % de metamorfosis. El efecto inhibitor de K 252, se pudo observar en los niveles de metamorfosis que se obtuvieron entre las concentraciones utilizadas del fármaco y la respuesta que se obtuvo con el control positivo (Fig. 5). Se registró un 20 % de diferencia en la metamorfosis entre las primeras respecto al segundo. La concentración 10^{-6} M de K 252 fue tóxica para las larvas, ocasionando mortalidades del 100 % de las mismas. El nivel de mortalidad fue de alrededor del 8 % en las concentraciones utilizadas de K 252, nulo en el control negativo así como en el tratamiento con el DMSO utilizado para disolver el fármaco (Fig. 5).

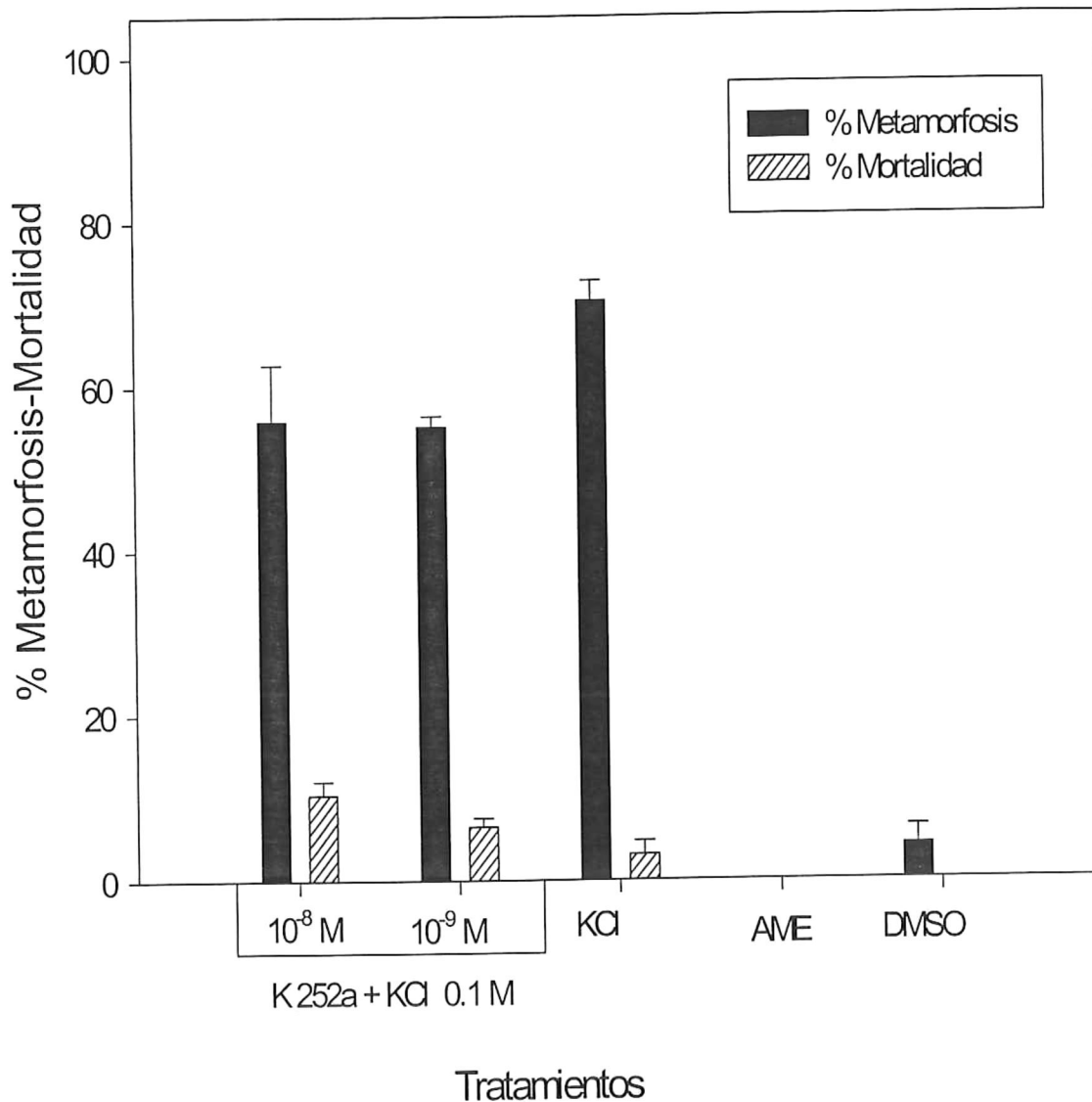


Figura 5. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del inhibidor de PKC. **K 252a**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluado 24 h después de estar expuestas al inductor. La concentración 10^{-6} M fue tóxica para las larvas se obtuvo una mortalidad del 100 %. DMSO = sulfoxido de dimetil. AVE = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos.

Bisindolylmaleimide I no tuvo efecto inhibitor en la metamorfosis en erizo morado (Fig. 6). El porcentaje de metamorfosis obtenido en la concentración 10^{-10} M con Bisindolylmaleimide I tuvo una diferencia de un 15 % respecto al resultado con el control positivo. Los porcentajes de metamorfosis que se presentaron con Bisindolylmaleimide I fueron entre 76 y 94 % y no hubo diferencia significativa entre ellos ni respecto al control positivo (Tukey $P < 0.05$). Mientras que el resultado obtenido con las concentraciones del fármaco fue significativo al compararlo con la metamorfosis que resultó en las larvas mantenidas en AME y DMSO (Tukey $P < 0.05$). La mortalidad resultó en niveles de entre 5 y 18 % en todos los tratamientos, y fue cero en las larvas mantenidas en AME (Fig. 6).

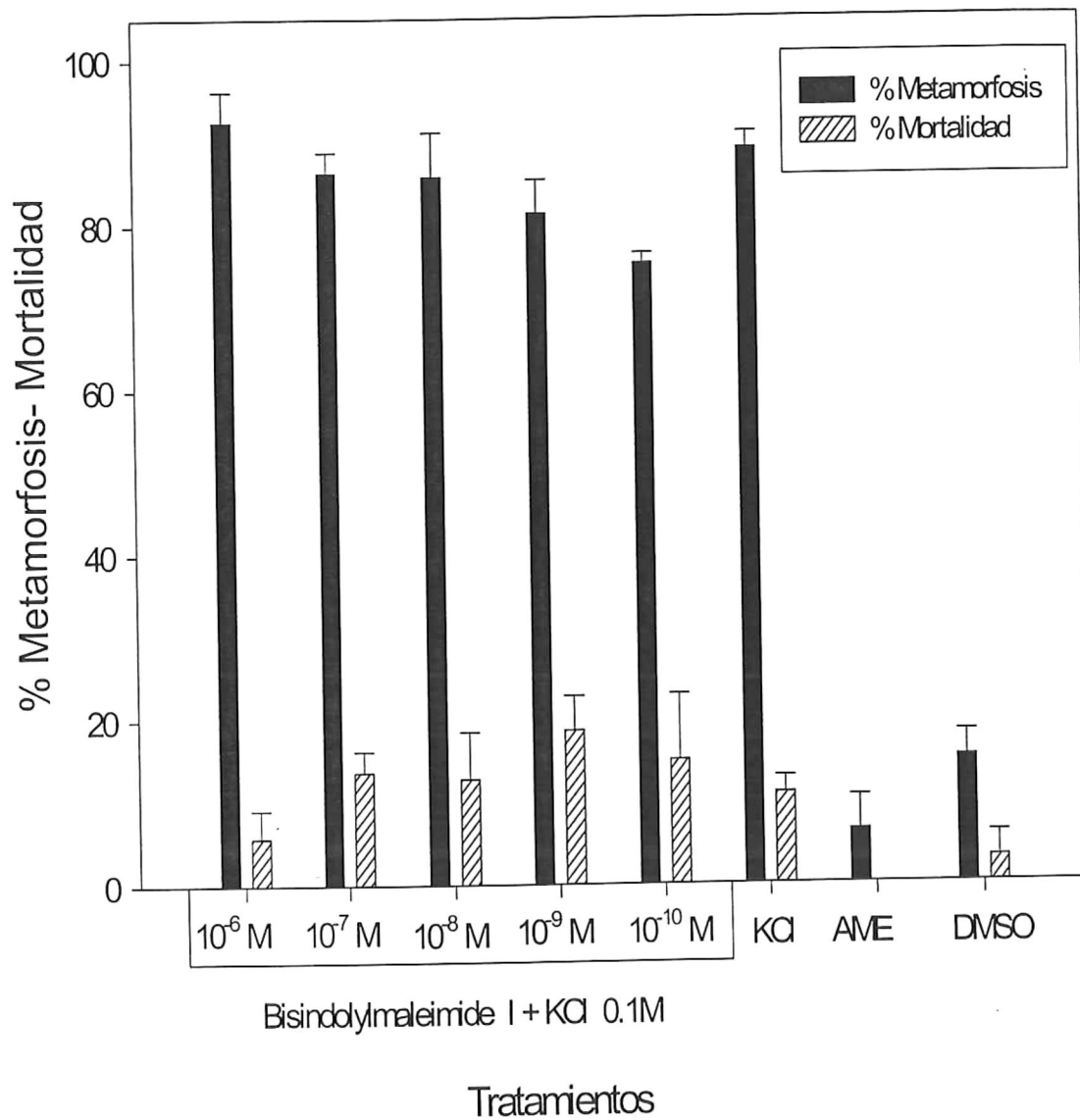


Figura 6. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del inhibidor de PKC, Bisindolylmaleimide I. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas /tratamiento), evaluado a las 24 h después de la exposición al inhibidor. DMSO = sulfoxido de dimetil. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos.

5.2 Experimentos con fármacos que afectan la actividad de proteínas G.

5.2.1 *Activadores de proteínas G*

La inducción con activadores de proteínas G tuvo un ligero efecto activador para el caso de erizo rojo. Este porcentaje de metamorfosis fue de alrededor del 45% (Fig. 7). Mientras que el resultado obtenido con erizo morado fue casi nulo (Fig. 8).

Para el erizo rojo, el mayor porcentaje de metamorfosis obtenido con el fármaco Guanilyl fue de alrededor del 45 % con la concentración 10^{-5} M (Fig. 7). Este resultado fue significativo respecto a la concentración 10^{-4} M no así entre el resto de las concentraciones utilizadas del fármaco (Tukey, $P < 0.05$). La inducción a la metamorfosis con Guanilyl contrasta respecto al porcentaje de metamorfosis cercano al 100 de larvas que se indujeron en la solución con KCl 0.1 M (Tukey, $P < 0.05$). Por otro lado no se encontraron diferencias significativas al comparar el efecto obtenido entre las concentraciones probadas del fármaco y las larvas mantenidas en AME. La mortalidad en este experimento fue nula, excepto para la concentración 10^{-4} M donde el nivel de mortalidad fue cercano al 5 %.

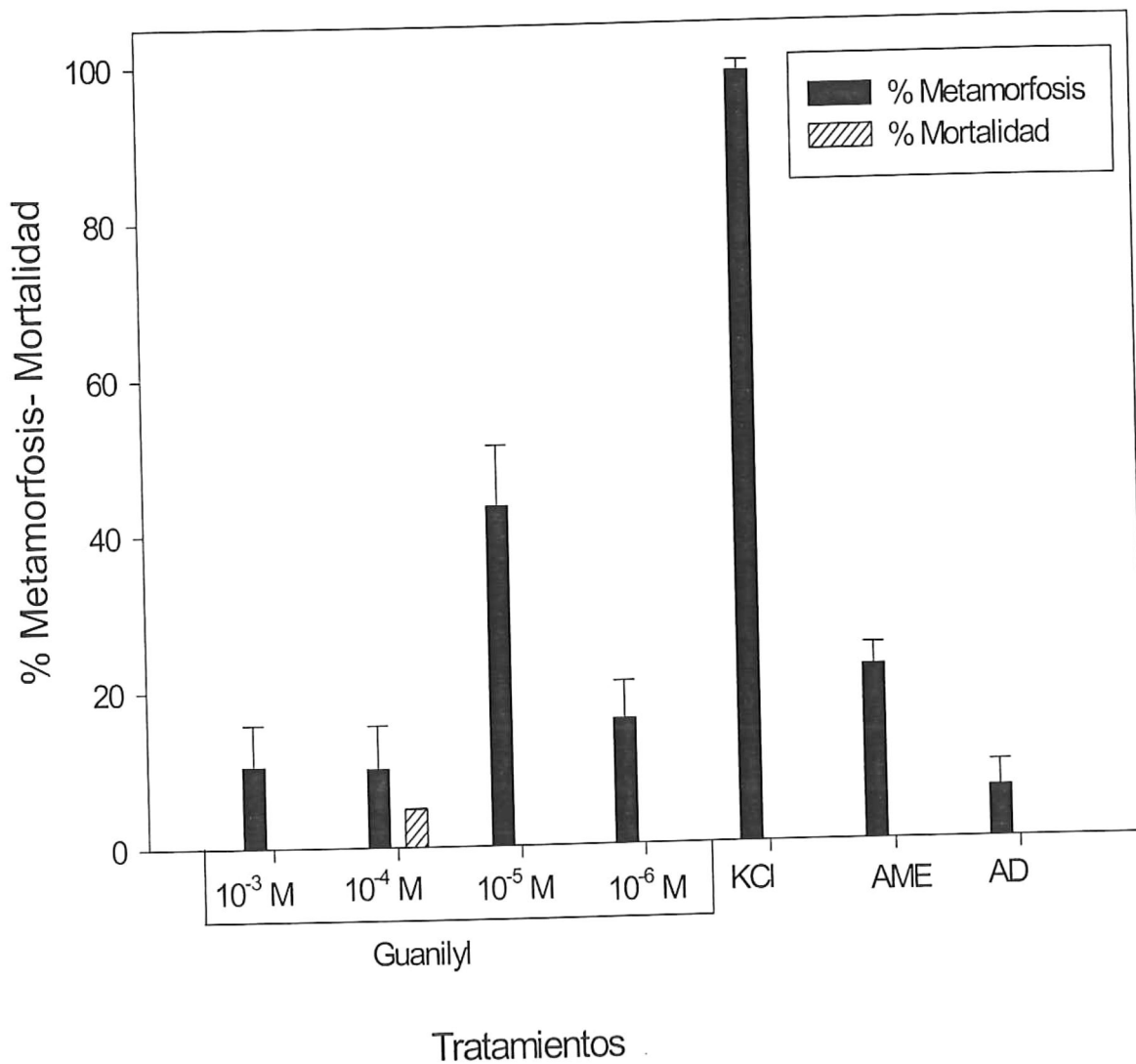


Figura 7. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a distintas concentraciones del activador de Proteínas G. **Guanilyl**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluado a las 24 h después de la exposición al inductor. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AD = control con el volumen de agua desionizada que se utilizó para la primera concentración utilizada del fármaco.

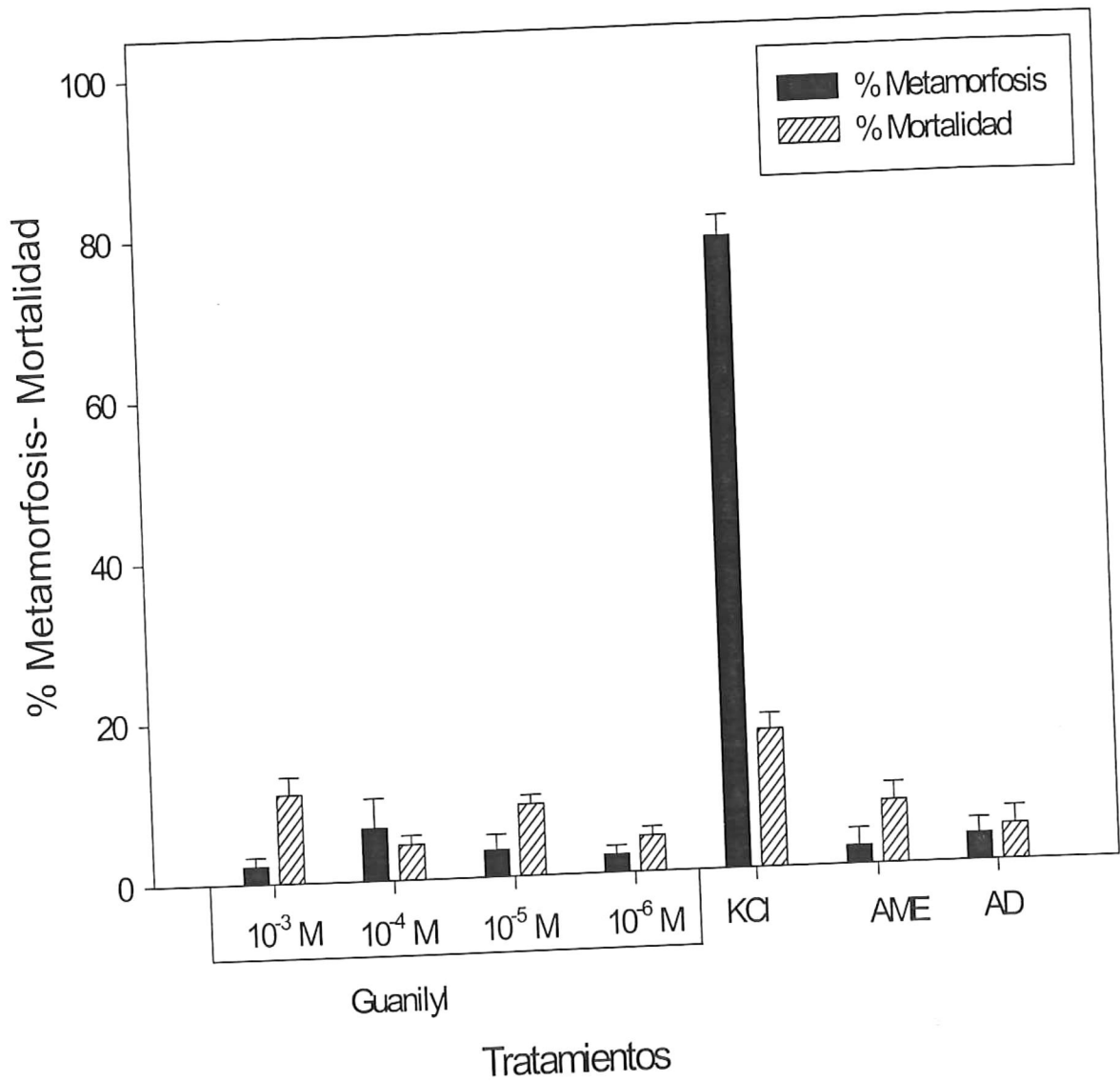


Figura 8. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a distintas concentraciones del activador de Proteínas G. **Guanilyl**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas /tratamiento), evaluado a las 24 h después de la exposición al inductor. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AD = control con el volumen de agua desionizada que se utilizó para la primera concentración utilizada del fármaco.

El efecto de la inducción a la metamorfosis con Guanilyl para erizo morado fue mínimo (Fig. 8). El mayor porcentaje de metamorfosis alcanzado fue cercano al 10 % con la concentración de 10^{-3} M. Este porcentaje no fue significativo respecto al obtenido en el resto de las concentraciones probadas con Guanilyl (Tukey, $P < 0.05$). El caso contrario se observó en las larvas expuestas a la solución con KCl 0.1 M, ya que se metamorfizaron en un porcentaje cercano al 80% (Fig. 8). La respuesta anterior fue significativamente diferente al efecto que hubo con los tratamientos probados con Guanilyl (Tukey, $P < 0.05$). El porcentaje de metamorfosis entre las concentraciones utilizadas del fármaco y las larvas mantenidas en AME no fue significativo (Tukey, $P < 0.05$).

El resultado en la inducción a la metamorfosis con Mastoparan, fue de un 10 a un 20 % en erizo morado (Fig. 9). Estos porcentajes no fueron significativos entre las cuatro concentraciones utilizadas del fármaco (Tukey $P < 0.05$). Este resultado fue significativo respecto al 60 % de metamorfosis obtenido en la inducción con KCl 0.1 M. (Tukey $P < 0.05$). La concentración 10^{-5} M fue significativa respecto a las larvas mantenidas en AME, no así el resto de las concentraciones (Tukey $P < 0.05$). La mortalidad que se presentó en los tratamientos de inducción a la metamorfosis con Mastoparan fue de entre un 3 a 7 % (Fig. 7).

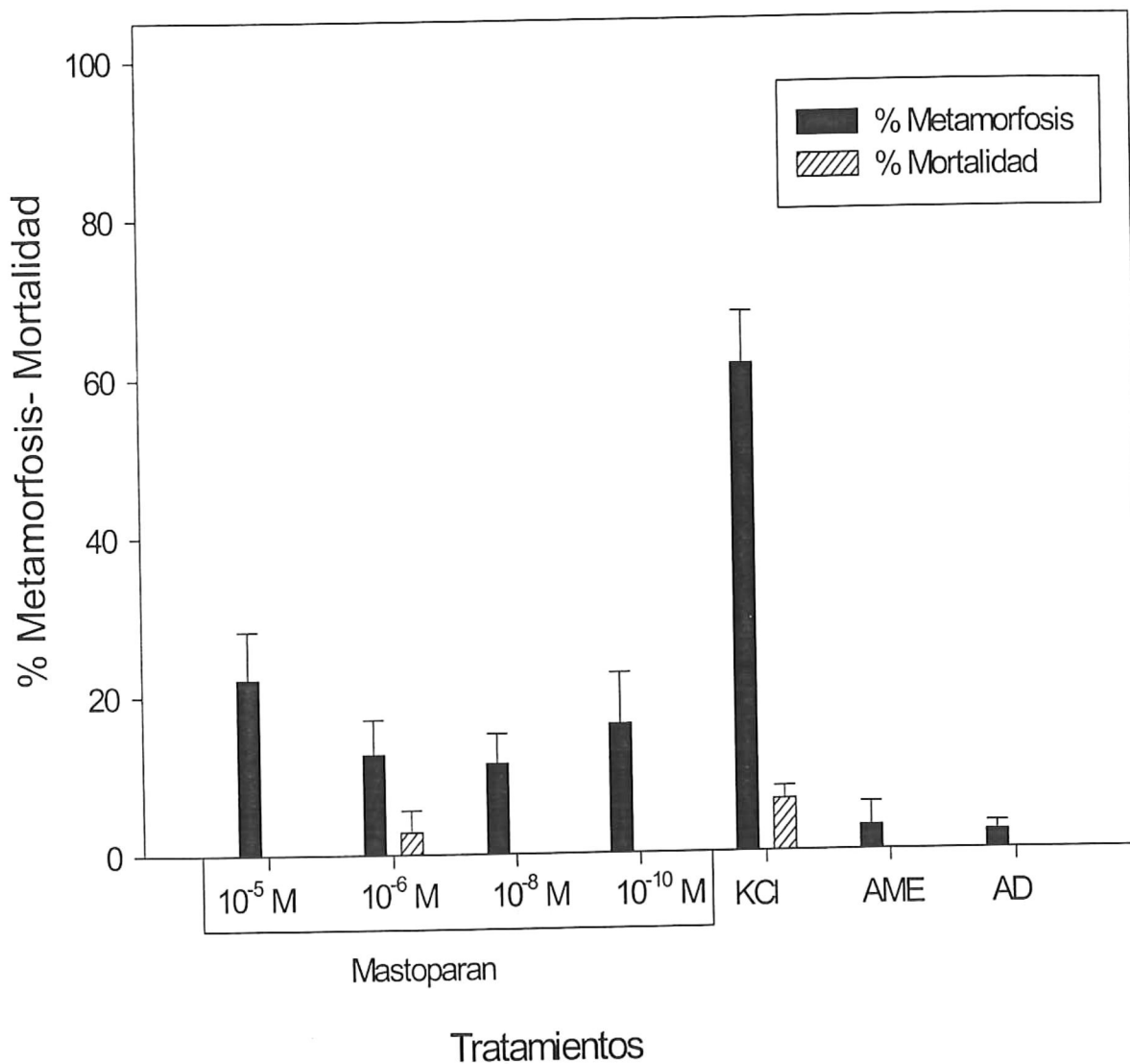


Figura 9. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del activador de Proteínas G. **Mastoparan**. Las barras indica porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluado 24 h después de la exposición al inhibidor. DMSO = sulfoxido de dimetil. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos. AD = control con el volumen de agua desionizada que se utilizó para la primera concentración utilizada del fármaco.

5.2.2 *Inhibidores de proteínas G*

Los fármacos inhibidores de proteínas G inhibieron la metamorfosis en las larvas de *Strongylocentrotus purpuratus* (Fig. 10), mientras que la respuesta obtenida en *S. franciscanus* fue diferente respecto a la obtenida para erizo morado (Fig. 11 y 12).

El resultado obtenido con Suramin mostró una inhibición de la metamorfosis en erizo morado (Fig. 10). Hubo una diferencia de aproximadamente 40 % entre el porcentaje de metamorfosis obtenido con la concentración 2×10^{-5} M respecto al resultado obtenido con el control positivo. El porcentaje de metamorfosis obtenido con las concentraciones utilizadas de Suramin fue entre 60 y 90 % (Fig. 10). Estos porcentajes se mantuvieron por abajo del control positivo donde la metamorfosis llegó a ser del 95 %. El resultado obtenido con el control positivo y las concentraciones utilizadas con el fármaco contrastó significativamente respecto al efecto nulo obtenido con AME (Dunn's, $P < 0.05$). La mortalidad en los tratamientos con Suramin fue aproximadamente de 8 % y nula en la concentración 10^{-6} M (Fig. 10).

El efecto obtenido con Guanosine en la metamorfosis de erizo morado fue considerable con las concentraciones de 10^{-9} y 10^{-7} M (Fig. 11).

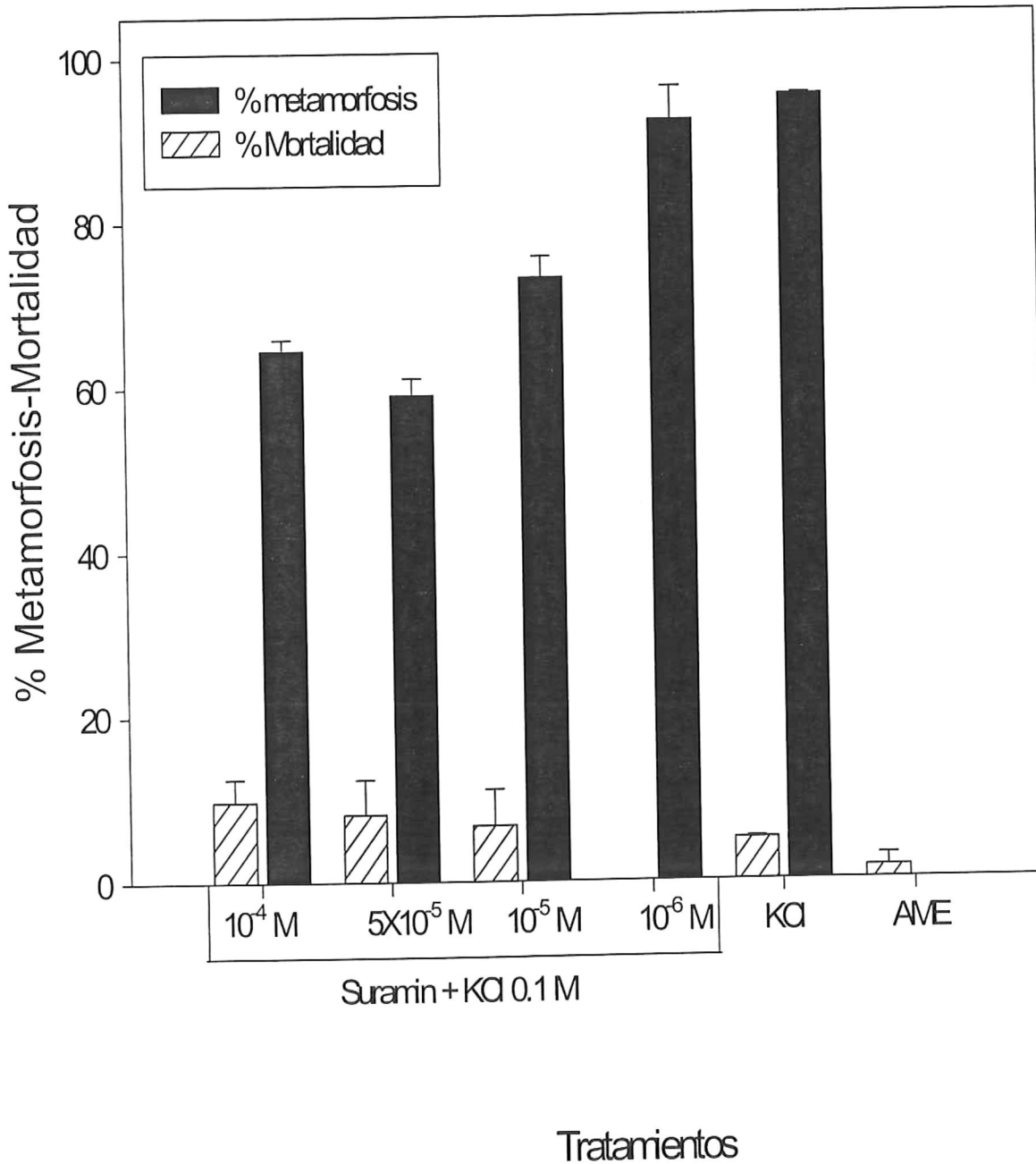


Figura 10. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del inhibidor de Proteínas G. **Suramin**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluado 24 h después de la exposición al inhibidor. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos.

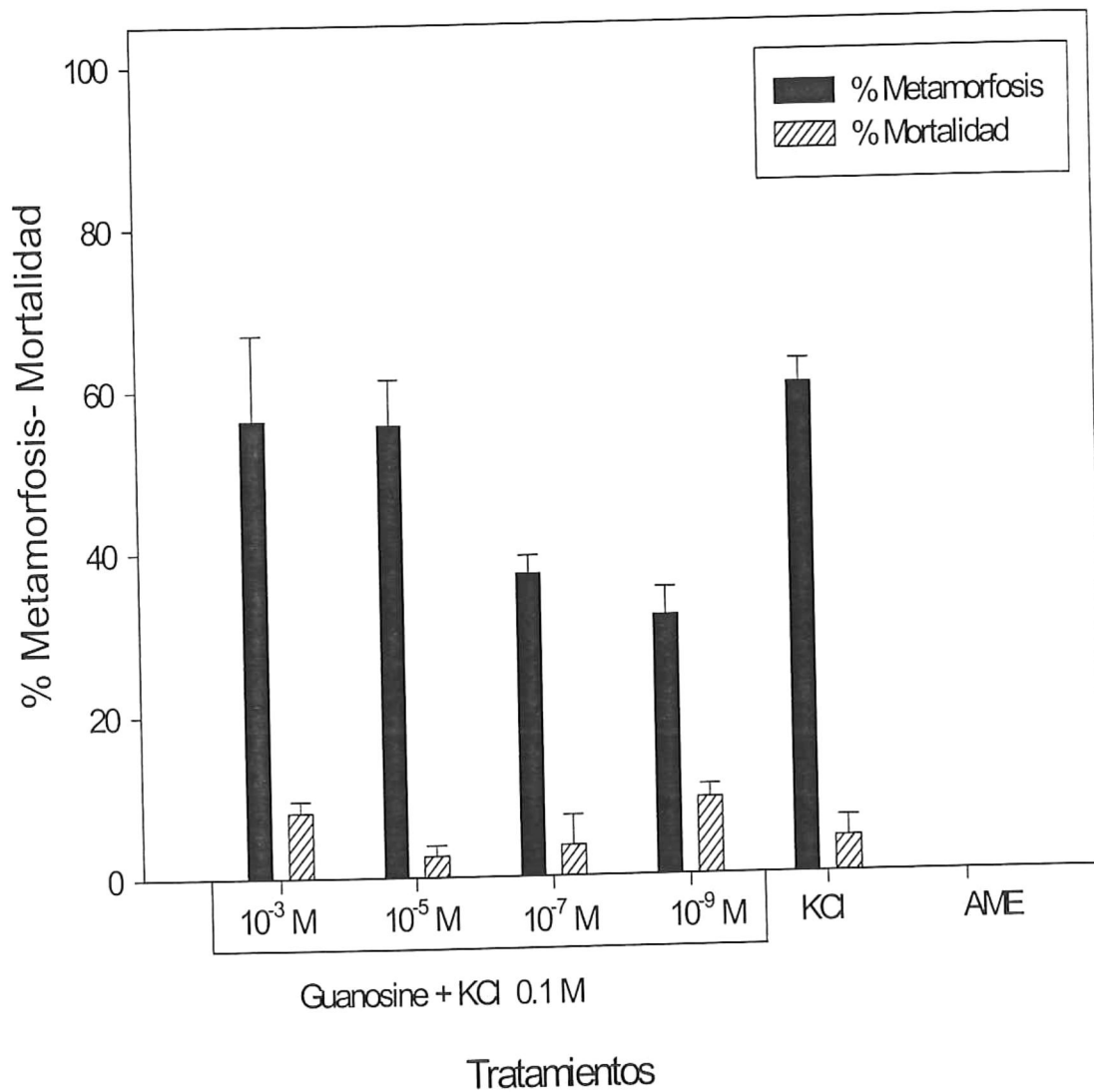


Figura 11. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus purpuratus* expuesto a diferentes concentraciones del inhibidor de Proteínas G. **Guanosine**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad \pm 1 EE (n = tres replicas / tratamiento), evaluado a las 24 h después de la exposición al inhibidor. AME = agua de mar esterilizada. KCl = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos.

Las diferencias entre los porcentajes que se obtuvieron entre el control positivo y las concentraciones mencionadas fue de alrededor de 30 % (Fig. 11). Las concentraciones con Guanosine de 10^{-3} y 10^{-5} M tuvieron porcentajes de metamorfosis mayores a las observadas en las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-9} M, sin embargo los niveles fueron por abajo de lo obtenido con el control positivo. El porcentaje de metamorfosis en AME fue de 0% (Fig. 11) y significativamente diferente al de los distintos tratamientos experimentales con el fármaco así como con el control positivo (Tukey, $P < 0.05$). La mortalidad en presencia de Guanosine osciló entre 5 y 10 % y fue nula en el control negativo.

El efecto de Guanosine para erizo rojo fue nulo ya que no hubo inhibición de la metamorfosis en presencia de KCl (Fig. 12). Las diferentes concentraciones del fármaco tuvieron porcentajes de metamorfosis por arriba del control positivo, donde ésta llegó a ser del 90 %. Los porcentajes de metamorfosis obtenidos en las concentraciones con Guanosine no fueron significativos entre ellos ni respecto al control positivo (Fig. 12) (Tukey, $P < 0.05$). El porcentaje de metamorfosis obtenido con las concentraciones del fármaco fue significativamente diferente al porcentaje obtenido con larvas mantenidas en AME (Tukey, $P < 0.05$). La mortalidad con Guanosine en erizo rojo osciló entre 0 y 8 %, mientras que en el control negativo fue del 0 %.

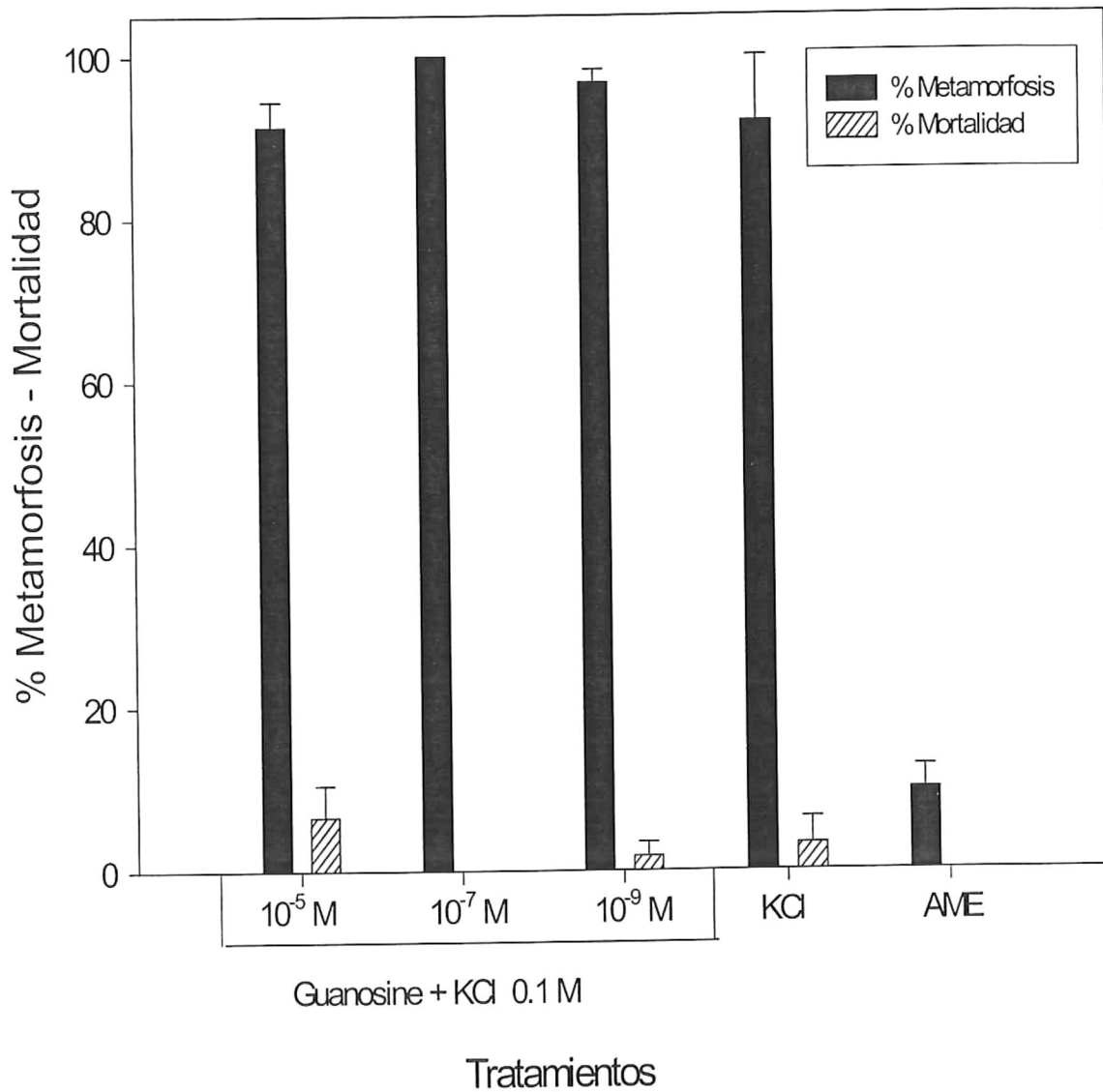


Figura 12. Metamorfosis de la larva de *Strongylocentrotus franciscanus* expuesto a diferentes concentraciones del inhibidor de Proteínas G **Guanosine**. Las barras indican el porcentaje promedio de metamorfosis y mortalidad ± 1 EE (n = tres replicas /tratamiento), evaluado 24 h después de la exposición al inhibidor. AME = agua de mar esterilizada. KC = solución de cloruro de potasio 0.1 M por 15 minutos.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo sugieren la participación del sistema del inositol trisfosfato/ diacylglycerol /PKC (InP3/ DAG/ PKC), así como de receptores asociados a proteínas G en la inducción a la metamorfosis de los erizos de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y *Strongylocentrotus franciscanus*. Con este resultado se establece un precedente en la inducción a la metamorfosis del erizo de mar con fármacos activadores o inhibidores de las rutas de transducción mencionadas.

La activación de la PKC por medio de forbol esterés como TPA ha sido documentado como un mecanismo de activación de la metamorfosis en el hidrozooario *Mitrocomella polydiademata* (Freeman y Ridgway, 1990). De manera similar, TPA activa la metamorfosis en el cnidario *Cassiopea* spp., mientras que el inhibidor de PKC psicósina ("psychisine") bloquea la acción del forbol esteré mencionado (Fleck y Bischoff, 1992). Estos autores sugieren que la PKC puede estar involucrada en las señales de transducción ligadas a los estímulos químicos y las respuestas morfogenéticas que ocurren durante la metamorfosis. Además de cnidarios, la inducción a la metamorfosis por medio de forbol esterés también ha sido documentada en larvas del crustáceo cirripedio *Balanus amphitrite*, por lo que se considera que la ruta de

transducción en donde participa la PKC, esta también involucrada en la metamorfosis de estos organismos (Yamamoto *et al.*, 1995).

En el erizo de mar se desconoce si la señal inductora de la metamorfosis es recibida por alguna región particular de la larva. Se desconoce también, hasta donde existe participación de células nerviosas sensoriales del epitelio. En forma general, se presupone que el sistema nervioso media la activación de la metamorfosis en larvas de diversos invertebrados marinos. En forma particular, existe cierta evidencia circunstancial, de que el sistema nervioso recibe y regula el estímulo metamórfico en larvas de equinoideos (Burke, 1983). Por otra parte, algunos trabajos apuntan hacia la participación de todo el sistema nervioso de las larvas, como es el caso del molusco *Adalaria proxima* (Todd *et al.*, 1991) o de regiones específicas, como en el abulón rojo *Haliotis rufescens*, donde ha sido reportado que receptores de lisina en los cilios del velo de la larva pueden estar asociados a proteínas G (Baxter y Morse, 1992). La organización más simple de los tejidos de la larva en cnidarios facilita la posibilidad de que la conducción del estímulo metamórfico se lleve a cabo a través de todo el epitelio en hidrozorios (Freemann y Ridgway, 1990). Otros autores proponen que la activación de la metamorfosis en la larva de *Hidradactinia echinata* tiene lugar en algunas células de la parte anterior del

organismo (Leitz y Klingmann, 1990). Lo anterior como resultado de la activación de la PKC, la cual directa o indirectamente permite el cierre de los canales de K^+ (Leitz y Klingmann, 1990).

En forma similar, la inducción al asentamiento y metamorfosis en el poliqueto *Capitella* con hormona juvenil y metil farnesoato (MF) se sugiere que activan la ruta de la PKC y la subsecuente modulación de canales de calcio y potasio (Biggers y Laufer, 1999). Otros resultados indican que los canales de calcio dependientes de voltaje pueden jugar un papel en la metamorfosis del braquiópodo *Terebratalia transversa* (Freeman, 1993).

Al igual que en otros organismos, la activación del flujo iónico mediante canales en la membrana celular pudo haber sido independiente de la participación de receptores asociados a proteínas G durante la metamorfosis del erizo de mar. Asimismo, los resultados del presente estudio no permiten determinar la independencia entre receptores acoplados a proteínas G y la ruta de transducción que involucra la activación de la PKC. Por otra parte, se ha documentado, que en diversas especies, existen rutas de transducción que son necesarias, pero no suficientes para la activación de la metamorfosis (Leitz, 1998). Situaciones similares pueden ocurrir durante la inducción a la metamorfosis del erizo de mar, en donde, la participación de canales de calcio puede ser una condición necesaria, mas no suficiente para

la activación de la metamorfosis. La existencia de dos rutas separadas, una reguladora y otra inductora, que se activan en forma independiente, ha sido documentada en larvas de *Haliotis rufescens* por (Baxter y Morse, 1987). Estos autores mostraron que la ruta reguladora opera independientemente a través de la cascada de receptores asociados a proteínas G y diacilglicerol. Esta ruta reguladora es controlada por receptores quimiosensoriales específicos para la lisina y sus análogos y la señal es transducida por un receptor asociado a proteínas G (Baxter y Morse, 1987).

Por otra parte, se observó una respuesta diferencial entre las especies de erizo al inhibidor de proteínas G Guanosine. Esta respuesta diferencial al inhibidor mencionado de receptores asociados a proteína G, puede ser una respuesta especie específica. La respuesta especie específica, a inductores artificiales ha sido reportada para diversas especies de poliquetos como *Phragmatopoma* spp. (Pawlik, 1990) e *Hydroides elegans* (Carpizo-Iltuarte y Hadfield, 1998) y equinodermos como *Strongylocentrotus droebachensis* y *Echinarachnius parma* (Pearce y Scheibling, 1994).

El efecto mínimo de los inductores de proteínas G utilizados en el presente trabajo para inducir la metamorfosis del erizo, tiene que ser tomado con precaución, ya que no es posible verificar en forma directa la acción que presumiblemente llevan a cabo los diversos compuestos. Raimondi y Keough

(1990) reportaron compuestos que no indujeron la metamorfosis en hidrozoarios. Asimismo Holm *et al.*, (1998), trabajaron con fármacos inductores e inhibidores de proteínas G los cuales no tuvieron efecto en la metamorfosis de *H. elegans*. Sin embargo no descartan la posibilidad de que la señal metamórfica puede ser transducida vía las rutas AC/ cAMP o PI/DAG/PKC. Todos estos resultados no permiten concluir de manera contundente la participación de las diversas rutas presumiblemente afectadas. Lo anterior debido a que en todos los casos los experimentos se realizaron exponiendo a las larvas directamente a los compuestos. En estas condiciones no es posible verificar si aspectos como la baja permeabilidad de los fármacos en el epitelio larval, les impidiera activar las rutas en las que han sido probados en células de vertebrados.

La interacción de receptores asociados a proteínas G con la enzima fosfolipasa de la membrana y la participación de esta en la activación de PKC ubican a esta enzima como un blanco para clarificar los eventos de transducción que ocurren durante la metamorfosis. Probar fármacos que tengan como blanco de acción la fosfolipasa puede ser un elemento más para aclarar las rutas de transducción que participan en la metamorfosis del erizo de mar. En la misma forma, probar agonistas que nos permitan dilucidar cuales son los receptores a los que se acoplan en la membrana celular y sí

éstos activan directamente los canales iónicos en las células blanco, es otro paso que nos puede ayudar a clarificar la participación de estas rutas en la inducción a la metamorfosis de las larvas de erizo de mar.

Aunado a lo anterior, sería conveniente realizar observaciones continuas sobre el comportamiento de las larvas al ser expuestas a los diferentes fármacos, ya que esto puede ayudar a clarificar el comportamiento de las mismas, en la presencia del fármaco antes de la evaluación final, que normalmente se realiza hasta las 24 h.

En el presente trabajo, la mayoría de los fármacos fueron utilizados con erizo morado, por lo que se hace necesario trabajar los mismos fármacos en erizo rojo, para verificar y comparar su efecto. Como se mencionó anteriormente diferencias especie específicas han sido detectadas ya para algunos de ellos.

Finalmente, otras rutas de transducción seguramente están involucradas durante la metamorfosis del erizo de mar. Hay autores que proponen que la producción de ON (óxido nítrico) reprime el inicio de la metamorfosis en el erizo *Lytechinus pictus* y que la respuesta sensorial a las señales medioambientales reducen la producción de ON y consecuentemente cGMP para iniciar la metamorfosis (Bishop y Brandhorst, 2001).

El papel del calcio en la metamorfosis es parte complementaria en la búsqueda de respuestas que ayudarán a resolver los eventos que ocurren durante la metamorfosis del erizo de mar. Resultados iniciales indican que el calcio participa durante la metamorfosis de éstos organismos (G. Amador comunicación personal. IIO /UABC).

Con la evidencia inicial de la participación de la ruta de transducción que involucra a la PKC, se puede intentar en trabajos posteriores, buscar evidencia bioquímica y molecular de la activación de esta quinasa, de manera que se pueda afirmar, con evidencia más directa, la participación de la PKC durante la metamorfosis en el erizo de mar.

Los resultados de este trabajo contribuyen en la búsqueda de la participación de varias rutas de transducción durante la metamorfosis en el erizo, ya que como se mencionó anteriormente, diversas rutas han sido involucradas. La compleja respuesta de la metamorfosis de la larva de erizo de mar, tanto espacial como temporalmente pronostican interacciones moleculares todavía por aclarar.

7.- CONCLUSIONES

- Las larvas de *S. purpuratus* y *S. franciscanus* respondieron a los inductores de PKC y proteínas G.
- Se sugiere la participación del sistema del inositol trisfosfato/ diacylglycerol /PKC (InP3/ DAG/ PKC), así como de receptores asociados a proteínas G en la inducción a la metamorfosis de los erizos de mar *S. purpuratus* y *S. franciscanus*.
- Se observó una respuesta diferencial entre las especies de erizo de mar analizadas al inhibidor de proteínas G Guanosine.
- Los resultados de este trabajo contribuyen en la búsqueda de la participación de varias rutas de transducción durante la metamorfosis en las especies de erizo de mar estudiadas.

8. REFERENCIAS

- 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. 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.
- Bishop, C. y B. P. Brandhorst. 2001.** NO/ cGMP Signaling and HSP90 Activity Represses Metamorphosis in the Sea Urchin *Lythecymus pictus*. *Biol. Bull.* **201**: 394-404.
- Burke R. D. 1983.** The induction of metamorphosis of marine invertebrate larvae: stimulus and response. *Can. J. Zool.* **61**: 1701-1719.
- 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 of metamorphosis in sea urchin, description and analysis. *J. Morph.*, **157**: 21- 32.

- Cameron, R. A. y S. C. Schroeter. 1980.** Sea Urchin recruitment: effect of substrate selection on juvenile distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **3**: 243-247.
- 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. A. Salas-Garza, G. Parés-Sierra. 2002.** Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchin and its implications in the production of juveniles. *Ciencias Marinas.* **28** (2): 157-166.
- Chase. D. G. 1967.** Inhibition of the cortical reaction with high hydrostatic pressure and its effects on the fertilization and early development of sea urchin eggs. Ph. D. Diss. Univ. of Washington, Seattle.
- Clare, A. S. 1996.** Signal transduction barnacle settlement: calcium revisited. *Biofouling* **10**: 141-159
- Clare, A. S., R. F. Thomas y D. Rittchhof. 1995.** Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of barnacle settlement. *J. Exp. Biol.* **198**: 655-664.
- Epel, D. 1978.** Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Curr. Topics Dev. Biol.* **12**: 185-246

- Féger, J., S. Gil-Falgon y C. Lamaze. 1994.** Cell receptors: definition, mechanisms and regulation of receptor-mediated endocytosis. *Cell Mol biol* **40**: 1039-1061.
- Fleck J. y A. Bischoff. 1992.** Protein Kinase C is Possibly Involved in Chemical Induction of Metamorphosis in *Cassiopea* Spp. (Cnidaria: Scyphozoa). *Coral Reef Symposium Vol 1*.
- Freeman G. 1993.** Metamorphosis in the Brachiopod *Terebratalia*: Evidence for a Role of Calcium Channel Function and the Dissociation of 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 *Hidrozoan planulae*. *Roux' s Arch. Dev. Biol.* **199**:63-79.
- Hadfield, M. G. 1998.** Research on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae: past, present and future. *Biofouling*, **12**: 9-29.
- 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.
- Highsmith, R. C. 1982.** Induced settlement and metamorphosis of the sand dollar (*Dendraster excentricus*) larvae in predator free sites: adult sand dollar beds. *Ecology*. **63**: 329- 337.

- 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, D. E. Morse. 1993.** Calcium control of metamorphosis in Polychaete larvae. *J Exp Zool.* **267**: 423- 430.
- Leitz, T. 1997.** Induction of settlement and metamorphosis of cnidarian larvae: signal and signal transduction. *Invertebr. Reprod. Dev.* **31**: 109-122.
- Leitz T. 1998.** Induction of Metamorphosis of the Marin Hydrozoan *Hydractinia echinata* Fleming, 1828. *Biofouling.* **12** (1-3) 173-187
- Leitz, T. y G. Klingmann. 1990.** Metamorphosis in Hydractinia: studies with activators and inhibitors aiming at protein Kinase C and potassium channels. *Roux' Arch. Dev. Biol.* **199**: 107- 113.
- Morse D. E. 1992.** Molecular mechanism controlling metamorphosis and recruitment in abalone larvae. In Sheperd S A, Tegner M J, Guzenan S A (eds) *Abalones of the world*. Blackwell, Oxford, pp 107-119.
- Pawlik, J. R. 1990.** Natural and artificial induction of metamorphosis of *Phragmatopoma lapidosa californica* (Polychaeta: sabellaridae), with a critical look at the effects of bioactive compounds on marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.*, **46**: 512-536.

- Pearce, C. M. y R. E. Scheibling. 1994.** Induction of metamorphosis of larval echinoids (*Strongylocentrotus droebachiensis* and *Echinarachnius parma*) by potassium chloride (KCl). *Inverteb. Reprod. Dev.* **26**: 213-220
- Scheltema, R. S. 1974.** Biological interactions determining larval settlement of marine invertebrates. *Thalassia Jugos.* **10**: 263- 296.
- Schneider, T. y T. Leitz. 1994.** Protein Kinase C in hidrozoans: involvement in metamorphosis of *Hydractinia* and in pattern formation in *Hydra*. *Roux 's Arch Dev Biol* **203**: 422-428.
- Strathmann, M. F. 1987.** Phylum Echinodermata, Class Echinoidea pp. 511-534 en: M.F. Strathmann, (ed.), *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast*. University of Washington Press, Seattle, Washington,
- Todd C. D., M. G. Bentley y J. N. Havenhand 1991.** Larval Metamorphosis of the Opisthobranch Mollusc *Adalaria proxima* (Gastropoda: Nudibranchia): The Effects of Choline and Elevated Potassium Ion Concentration. *J. Mar. Biol.* **71**: 53-72.

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.

9.- ANEXO

Tabla III.- Prueba de contrastes de Tukey del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con el fármaco TPA a diferentes concentraciones(10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
10^{-9} Vs AME	S
10^{-9} Vs DMSO	S
10^{-9} Vs 10^{-6}	NS
10^{-9} Vs 10^{-8}	NS
10^{-9} Vs 10^{-7}	NS
10^{-9} Vs KCl	NS
KCl Vs AME	S
KCl Vs DMSO	S
KCl Vs 10^{-6}	NS
KCl Vs 10^{-8}	NS
KCl Vs 10^{-7}	NS
10^{-7} Vs AME	S
10^{-7} Vs DMSO	S
10^{-7} Vs 10^{-6}	NS
10^{-7} Vs 10^{-8}	NS
10^{-8} Vs AME	S
10^{-8} Vs DMSO	S

Tabla IV.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Indolactam V a diferentes concentraciones (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
KCl Vs DMSO	S
KCl Vs 10^{-7}	NS
KCl Vs 10^{-8}	NS
KCl Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs AME	S
10^{-9} Vs DMSO	S
10^{-9} Vs 10^{-7}	NS
10^{-9} Vs 10^{-8}	NS
10^{-8} Vs AME	S
10^{-8} Vs DMSO	S
10^{-8} Vs 10^{-7}	NS
10^{-7} Vs AME	S
10^{-7} Vs DMSO	S
DMSO Vs AME	NS

Tabla V.- Prueba de contrastes de Dunn's, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Didecanoyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs DMSO	S
KCl Vs AME	S
10^{-9} Vs KCl	S
10^{-5} Vs KCl	S
10^{-7} Vs KCl	S
10^{-3} Vs KCl	S
10^{-3} Vs DMSO	NS
10^{-3} Vs AME	NS
10^{-3} Vs 10^{-9}	NS
10^{-3} Vs 10^{-5}	NS
10^{-3} Vs 10^{-7}	NS
10^{-7} Vs DMSO	NS
10^{-7} Vs AME	NS
10^{-7} Vs 10^{-9}	NS
10^{-7} Vs 10^{-5}	NS
10^{-5} Vs DMSO	NS

Tabla VI.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Didecanoyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs DMSO	S
10^{-7} Vs KCl	S
KCl Vs AME	S
10^{-5} Vs KCl	S
10^{-9} Vs KCl	S
10^{-3} Vs KCl	S
10^{-3} Vs DMSO	NS
10^{-3} Vs 10^{-7}	NS
10^{-3} Vs AME	NS
10^{-3} Vs 10^{-5}	NS
10^{-3} Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs DMSO	NS
10^{-7} Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs AME	NS
10^{-9} Vs 10^{-5}	NS
10^{-5} Vs DMSO	NS
10^{-5} Vs 10^{-7}	

Tabla VII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con K 252a a diferentes concentraciones (10^{-8} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
KCl Vs DMSO	S
10^{-8} Vs KCl	NS
10^{-9} Vs KCl	NS
10^{-8} Vs DMSO	S
10^{-8} Vs AME	S
10^{-8} Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs AME	S
10^{-9} Vs DMSO	S
AME Vs DMSO	NS

Tabla VIII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Bisindolymaleimide a diferentes concentraciones (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M. AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
10^{-6} Vs AME	S
10^{-6} Vs DMSO	S
10^{-6} Vs 10^{-10}	NS
10^{-6} Vs 10^{-9}	NS
10^{-6} Vs 10^{-7}	NS
10^{-6} Vs 10^{-8}	NS
10^{-6} Vs KCl	NS
KCl Vs AME	S
KCl Vs DMSO	S
KCl Vs 10^{-10}	NS
KCl Vs 10^{-9}	NS
KCl Vs 10^{-7}	NS
KCl Vs 10^{-8}	NS
10^{-8} Vs AME	S
10^{-8} Vs DMSO	S

Tabla IX.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Mastoparan a diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} M). AME =agua de mar esterilizada. AD =agua desionizada, solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
KCl Vs AD	S
KCl Vs 10^{-8}	S
KCl Vs 10^{-6}	S
10^{-10} Vs KCl	S
10^{-5} Vs KCl	S
10^{-5} Vs AME	S
10^{-5} Vs AD	NS
10^{-5} Vs 10^{-8}	NS
10^{-5} Vs 10^{-6}	NS
10^{-5} Vs 10^{-10}	NS
10^{-10} Vs AME	NS
10^{-10} Vs AD	NS
10^{-10} Vs 10^{-8}	NS
10^{-10} Vs 10^{-6}	NS
10^{-6} Vs AME	NS
10^{-6} Vs AD	NS

Tabla X.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Guanilyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M). AME =agua de mar esterilizada. AD =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
KCl Vs 10^{-6}	S
KCl Vs 10^{-3}	S
KCl Vs AD	S
10^{-5} Vs KCl	S
10^{-4} Vs KCl	S
10^{-4} Vs AME	NS
10^{-4} Vs 10^{-6}	NS
10^{-4} Vs 10^{-3}	NS
10^{-4} Vs AD	NS
10^{-4} Vs 10^{-5}	NS
10^{-5} Vs AME	NS
10^{-5} Vs 10^{-6}	NS
10^{-5} Vs 10^{-3}	NS
10^{-5} Vs AD	NS
AD Vs AME	NS
AD Vs 10^{-6}	NS

Tabla XI.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Guanilyl a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} M). AME =agua de mar esterilizada. AD = agua desionizada, solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M, S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AD	S
10^{-4} Vs KCl	S
KCl Vs 10^{-3}	S
KCl Vs 10^{-6}	S
KCl Vs AME	S
10^{-5} Vs KCl	S
10^{-5} Vs AD	NS
10^{-5} Vs 10^{-4}	NS
10^{-5} Vs 10^{-3}	NS
10^{-5} Vs 10^{-6}	NS
10^{-5} Vs AME	NS
AME Vs AD	NS
AME Vs 10^{-4}	NS
AME Vs 10^{-3}	NS
AME Vs 10^{-6}	NS
10^{-6} Vs AD	NS
10^{-6} Vs 10^{-4}	NS

Tabla XII.- Prueba de contrastes de Dunn's, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Suramin a diferentes concentraciones (10^{-4} , 10^{-7} , 5×10^{-5} , 10^{-5} , 10^{-6} M). AME =agua de mar esterilizada. DMSO =solvente del fármaco. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
5×10^{-5} Vs KCl	NS
10^{-4} Vs KCl	NS
10^{-5} Vs KCl	NS
10^{-6} Vs KCl	NS
10^{-6} Vs AME	S
10^{-6} Vs 5×10^{-5}	NS
10^{-6} Vs 10^{-4}	NS
10^{-6} Vs 10^{-5}	NS
10^{-5} Vs AME	S
10^{-5} Vs 5×10^{-5}	NS
10^{-5} Vs 10^{-4}	NS
10^{-4} Vs AME	S
10^{-4} Vs 5×10^{-5}	NS
5×10^{-5} Vs AME	S

Tabla XIII.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo morado con Guanosine a diferentes concentraciones (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
KCl Vs AME	S
KCl Vs 10^{-9}	S
10^{-7} Vs KCl	NS
10^{-5} Vs KCl	NS
10^{-3} Vs KCl	NS
10^{-3} Vs AME	S
10^{-3} Vs 10^{-9}	NS
10^{-3} Vs 10^{-7}	NS
10^{-3} Vs 10^{-5}	NS
AME Vs 10^{-5}	S
10^{-5} Vs 10^{-9}	NS
10^{-5} Vs 10^{-7}	NS
10^{-7} Vs AME	S
10^{-7} Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs AME	S

Tabla XIV.- Prueba de contrastes de Tukey, del experimento de inducción a la metamorfosis del erizo rojo con Guanosine a diferentes concentraciones (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} M). AME =agua de mar esterilizada. KCl = solución cloruro de potasio 0.1 M. S =significativo. NS =no significativo.

TUKEY	P<0.05
10^{-7} Vs AME	S
10^{-7} Vs 10^{-5}	NS
10^{-7} Vs KCl	NS
10^{-7} Vs 10^{-9}	NS
10^{-9} Vs AME	S
10^{-9} Vs 10^{-5}	NS
10^{-9} Vs KCl	NS
KCl Vs AME	S
10^{-5} Vs KCl	NS
10^{-5} Vs AME	S