

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS



INDUCCION AL DESOVE, ROMPIMIENTO DE VESICULA GERMINAL Y
CAMBIOS EN LA RESISTENCIA DE LA MEMBRANA POR ACCION DE SERO
TONINA, EN OVOCITOS DE LA ALMEJA PISMO Tivela stultorum.

TESIS PROFESIONAL QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA

RAMON ALVARADO ALVAREZ

Ensenada, B.C.

Octubre de 1988

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS

INDUCCION AL DESOVE, ROMPIMIENTO DE VESICULA GERMINAL
Y CAMBIOS EN LA RESISTENCIA DE LA MEMBRANA POR ACCION
DE SEROTONINA, EN OVOCITOS DE LA ALMEJA PISMO Tivela
stultorum.

TESIS PROFESIONAL QUE PRESENTA :

RAMON ALVARADO ALVAREZ

APROBADO POR :

Meredith Gould

DRA. MEREDITH GOULD CHAMBERS
Presidente

Jose Luis Stephano H.

M.C. JOSE LUIS STEPHANO H.
1er. vocal

Alejandro Martinez R.

QUIM. ALEJANDRO MARTINEZ R.
2do. vocal

Olivia Tapia V.
BIOL. OLIVIA TAPIA V.
3er. vocal

Faustino Camarena R.

M.C. FAUSTINO CAMARENA R.
Secretario

CONTENIDO

	PAGINA
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS	18
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	40
LITERATURA CITADA	41

FE DE ERRATA

PAGINA	LINEA	DICE	DEBE DECIR
35	23	$2 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$
40	9	$2 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2 \times 10^{-5} \text{ M}$

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su paciencia y comprensión durante mis primeros 7 años de formación profesional.

A la Dra. Meredith Gould y al M.C. José Luis Stephano...por permitirme el acceso y uso a su laboratorio de Reproducción, así como por su asesoría para realizar mi tesis.

Al Sr. Héctor Jiménez.....por su patrocinio incondicional para la realización de mi tesis.

Al M.C. Vicente Hernández.....por sus valiosos puntos de vista y sugerencias durante la etapa experimental y redacción de esta tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California..... el apoyo brindado con una beca-tesis, para la realización del presente trabajo en el proyecto de investigación "Mecanismos de activación del ovocito por el espermatozoide", bajo el programa 0133 de la Escuela Superior de Ciencias.

RESUMEN

La serotonina (5-HT), parece tener una función importante en la reproducción de la almeja Pismo.

El presente trabajo trata acerca de los siguientes procesos en los que parece estar involucrada esta substancia, encontrando lo siguiente:

Uno de ellos nos revela que la dosis de 5-HT para inducir al desove a la almeja Pismo bajo condiciones de laboratorio fue de 0.4 ml de una solución 2×10^{-3} M., aplicada intragonadalmente. Las almejas respondieron a dicha dosis -- con movimientos del pie y de las valvas, expulsión brusca de agua por el sifón exhalante, y desovando en un tiempo -- entre 19 y 99 minutos.

Por otro lado, fue posible inducir a la maduración in vitro de ovocitos inmaduros sacados de la gónada, al ser sometidos en una solución de 5-HT a concentraciones entre 2×10^{-4} , y 2×10^{-6} M., tardando entre 20 y 30 minutos para consumarse el proceso.

Por último, relacionado con la maduración de estos ovocitos con 5-HT, ocurrió un incremento en la resistencia de entrada de la membrana, y una leve despolarización en su potencial de reposo.

Adicional a esto, algunos ovocitos maduros respondieron electricamente con potenciales de acción, y en ocasiones presentaron potenciales de acción espontáneos.

ABSTRACT

Serotonin (5-HT), seems to have an important function in the reproduction of the Pismo clam.

Spawning in the Pismo clam was induced under laboratory conditions by injecting 0.4 ml of $2 \times 10^{-3} M$ serotonin into -- the gonad.

Clams that responded to these doses, showed contractions in the foot, valvar movements, expelled water from their siphons, and spawned between 19-99 minutes.

The highest percentage of maturation was obtained with -- $2 \times 10^{-6} M$ 5-HT. Germinal vesicle breakdown occurred in most -- eggs within 20-30 minutes.

Electrophysiological measurements showed that oocyte ma-
turation was accompanied by an increase in input resistance and a small positive shift in resting potential.

Another characteristic of mature oocytes, was the capacity to respond to stimuli with action potentials; occasionally spontaneous action potentials occurred.

INTRODUCCION

En el proceso de liberación de gametos en muchas especies de moluscos, se ha sugerido la participación del sistema nervioso y endócrino, que tienen la capacidad de regularlo dependiendo de las condiciones ambientales (Smith, 1987).

En la mayoría de las especies de bivalvos estudiadas, se ha centrado más la atención en los factores externos que favorecen a la liberación de gametos y ruptura de la vesícula germinal, a lo que en ocasiones también se le llama maduración (Smith, 1987). En torno a esto, se han encontrado agentes capaces de inducir al desove bajo condiciones de laboratorio; por ejemplo, la elevación de temperatura, el amonio, la suspensión de espermatozoides macerados, el peróxido de hidrógeno, el agua de mar irradiada con U.V., la suspensión de macerados gonadales y de ganglios nerviosos, así como el uso de serotonina, entre otros (Matsutani y Nomura, 1982).

El mecanismo que se lleva a cabo en la gónada para la liberación de gametos y maduración de ovocitos, es aún motivo de investigación.

Un aspecto relativo a la maduración de los ovocitos, radica en las diferencias en resistencia eléctrica de membrana entre ovocitos inmaduros y ovocitos maduros. Esta resistencia varía en función del número de canales disponibles en la membrana para el paso de iones a través de ellos (Hagiwara y Jaffe, 1979).

En el presente trabajo se utilizó la almeja Pismo Tivela - stultorum como preparación debido a que se encontraba en su periodo reproductivo, y el objetivo general consistió en obtener información básica al inducir la liberación de gametos bajo condiciones de laboratorio, así como la inducción in vitro al rompimiento de la vesícula germinal del ovocito y los cambios de resistencia eléctrica de la membrana, tanto en ovocitos inmaduros como en ovocitos maduros.

ANTECEDENTES

En la zona de la Jolla, California (Estados Unidos), la almeja Pismo Tivela stultorum llega a ser sexualmente madura al cumplir su primer año de vida en invierno. Durante los meses de junio y julio, su gónada se incrementa en tamaño, y su primer periodo de liberación de gametos empieza a fines de julio, o a principios de agosto, terminando normalmente a fines de noviembre (Coe, 1947; Fitch, 1950). Fitch (1950), reporta que generalmente el macho libera sus gametos antes que la hembra, y comenta que de esta manera, la especie asegura un alto porcentaje de fecundación de sus óvulos. Sin embargo, esto último que se ha observado también en otras especies, carece de fundamentos consistentes, por lo que no debería considerarse concluyente.

Un aspecto notable resulta en que bajo condiciones de laboratorio, se han logrado fecundar ovocitos de la almeja Pismo desovados espontaneamente, y su desarrollo se ha obtenido con cierto éxito, mas no de ovocitos que son sacados de la gónada para después fecundarse (Coe, 1947).

Estudios sobre endocrinología reproductiva en gasterópodos, sugieren que la ovoposición se encuentra regulada por el sistema neuroendócrino. Utilizando técnicas de fluorescencia histoquímica, ha sido posible encontrar dopamina (DA), y serotonina (5-HT) en ganglios cerebral, visceral y pedal de varios moluscos (Dahl, et. al., 1966). En el pecten Patino--

-pecten yessoensis, fue realizado este estudio, encontrando 5-HT en el ganglio cerebral, DA en el ganglio pedal y visceral, y ambos neurotransmisores en el área gonadal, correspondiente al gonoducto y en algunos músculos que rodean a la gónada (Matsutani y Nomura, 1984).

En el mejillón Mytilus californianus, se midió la cantidad de DA y 5-HT en ganglios pedal, visceral y cerebral, antes y después de un desove inducido por microalgas, encontrando que después del desove, aumentaba la concentración de DA en el ganglio visceral, mientras que disminuía la concentración de 5-HT en el ganglio pedal, indicando que estos ganglios y estos neurotransmisores pueden estar participando en el mecanismo de liberación de gametos de esta especie (Smith, 1987).

DESOVE

La aplicación de 5-HT ha proporcionado resultados positivos para la liberación de gametos al aplicarse las siguientes dosis en varias especies, como los son: En el bivalvo sexualmente maduro Patinopecten yessoensis, y con longitud de concha promedio de 11.9 cm, se indujo la liberación de gametos en ambos sexos al aplicarse 0.4 ml de 5-HT $10^{-3}M$ intragonadalmente, respondiendo aproximadamente en 28 minutos (Matsutani y Nomura, 1982).

En la almeja Tridacna gigas, usando ejemplares sexualmente maduros, con longitud de concha entre 60 y 100 cm, se --

indujo a la liberación de gametos con 1-2 ml de 5-HT 10^{-3} M aplicado intragonadalmente (Crawford, et. al., 1986).

Gibbons y Castagna (1984), trabajaron con el pecten --- Argopecten irradians, el ostión americano Crassostrea vir-
ginica, la almeja Spisula solidissima, en Artica islandica,
el mejillón Geukensia demisa y la almeja Mercenaria merce-
naria. En este trabajo, se indujo a la liberación de game--
tos cuando se les aplicaba una dosis de 0.4 ml de 5-HT 10^{-3}
molar.

Otras sustancias como la dopamina, epinefrina, norepi--
nefrina, acetilcolina y el GABA, no mostraban efecto para -
el desove de bivalvos marinos (Matsutani y Nomura, 1982; --
Hirai, et. al., 1984).

MADURACION DEL OVOCITO

En lo concerniente a la maduración de ovocitos, se han -
realizado trabajos en varias especies utilizando substan---
cias que favorecen dicho proceso. Por ejemplo, en ovocitos
de la estrella de mar Asterina pectinifera, se indujo al --
rompimiento de la vesícula germinal con 1-Metiladenina 10^{-6}
molar. En estos ovocitos, el proceso de ruptura tardaba en-
tre 40-60 minutos, después de aplicada dicha sustancia --
(Miyazaki e Hirai, 1979).

En ovocitos de la almeja Spisula solidissima, se encon--
tró que sustancias como el amonio o la procaína, inducen -
al rompimiento de la vesícula germinal cuando la concentra-

ción de las soluciones es de aproximadamente 10 mM (Finkel y Wolf, 1980).

También en ovocitos de S. solidissima, se encontró que cuando se trataban con 5-HT 10-100 micromolar, en agua de mar, rompían su vesícula germinal y formaban cuerpos polares. Otras sustancias como la dopamina, epinefrina, norepinefrina, acetilcolina y el GABA, no mostraban efecto sobre la maduración de ovocitos de bivalvos marinos (Hirai, et. al., 1984).

PARAMETROS ELECTROFISIOLÓGICOS

Después de establecida la técnica de registro intracelular por Ling y Gerard en 1949, Tyler y cols. en 1956, la usaron para mostrar la negatividad del PR (potencial de reposo) en ovocitos de la estrella de mar Leptasterias hexactis (Hagiwara, 1983).

Los siguientes ejemplos proporcionan una idea acerca del PR normal, presente en la mayoría de los ovocitos ya estudiados.

En el gusano nemertino Cerebratulus lacteus, el PR reportado para el ovocito maduro está en el rango de -67 ± 12 mV (Jaffe, et. al., 1986), comparable con el valor reportado para ovocitos del erizo Lytechinus variegatus, cuyo PR oscila entre -60 y -80 mV (Chambers y de Armendi, 1979).

Finkel y Wolf (1980), reportaron los valores normales del PR en ovocitos de la almeja Spisula solidissima, encon-

trando un PR en el rango de -18 ± 7 mV. En este trabajo el PR pudo deberse a un daño ocasionado en la membrana de dichos ovocitos por causa del microelectrodo.

Comparando los potenciales de membrana entre ovocitos inmaduros y maduros, podemos citar los siguientes ejemplos: Schlichter y Elinsøn (1981), trabajando con ovocitos de la rana Rana pipiens, encontraron que sus ovocitos inmaduros presentaban un PR normal de -25 ± 1 mV, mientras que sus ovocitos maduros pueden alcanzar valores hasta de -29.8 ± 1.4 mV.

En el gusano marino Urechis caupo, el PR de ovocitos inmaduros fue de -65 ± 14 mV (Holland y Gould, 1981), mientras en los ovocitos maduros el PR fue de -33 ± 6 mV (Jaffe et al., 1979).

Para los ovocitos de la estrella de mar Asterina pectinifera, se reporta un PR de -73 ± 4 mV, para los ovocitos inmaduros, mientras que sus ovocitos maduros lo pueden presentar de -31.1 ± 20.1 mV. En esta especie, el cambio en el PR está justificado por una disminución en la permeabilidad de la membrana a los iones de potasio, ya que se observaron cambios en la conductancia a este ion durante la maduración cuando se induce por la hormona 1-Metiladenina (Miyazaki, et al., 1975; citado en Miyazaki, 1979).

RESISTENCIA DE MEMBRANA (Rm)

En cuanto a este parámetro, podemos citar el caso del erizo de mar Lytechinus variegatus, en donde se encontraron

valores de R_m en el rango de 57 a 146 $K\Omega \text{ cm}^2$, para ovocitos inmaduros, mientras que sus ovocitos maduros llegaban a alcanzar valores entre 47 a 228 $K\Omega \text{ cm}^2$, observando una -- tendencia a incrementarse la R_m después de la maduración -- (Chambers y de Armendi, 1979).

Holland y Gould (1981), reportaron para ovocitos inmaduros del gusano marino Urechis caupo, una resistencia de entrada en el rango de $99 \pm 62 \text{ M}\Omega$, valor que se incrementó al madurar los ovocitos hasta valores en el rango de $416 \pm 134 \text{ M}\Omega$ de resistencia de entrada.

Un ejemplo más, lo tenemos en la estrella de mar Asterina pectinifera, en la cual sus ovocitos inmaduros presentaban una membrana con resistencia de entrada del orden de -- $21.9 \text{ M}\Omega$, mientras que en los ovocitos maduros, este valor se incrementaba hasta aproximadamente $109.9 \text{ M}\Omega$. Este fenómeno, al igual que el cambio en PR en esta especie al suceder la maduración, se justificó por la posible caída en la conductancia al potasio (G_k), al ser inducida la maduración con la hormona 1-Metiladenina (Miyazaki, et.al., 1975; citado en Miyazaki, 1979).

En ovocitos de la estrella de mar Leptastenas hexactis, se encontró que después de la maduración inducida por la -- hormona monometiladenina $4 \times 10^{-5} \text{ M}$, ocurrían cambios en un -- lapso de 75 a 90 minutos de ser aplicada, en la conductancia de la membrana (G_m), la cual provocaba un incremento en la corriente entrante de calcio, mientras que decrecía la --

corriente de potasio (Moody y Lansman, 1983; citado en Hagiwara, 1983).

En un trabajo preliminar, Kusano (1978), reportó la posible existencia de receptores asociados a los canales iónicos en ovocitos de la galleta de mar Echinarachius parma, el calamar Loligo pealii, la estrella de mar Ophioderma brevispina, y el pez Fundulus heteroclitus. Esto se dedujo después de monitorear los cambios eléctricos de la membrana (PR, Gm, y flujo de corriente), al aplicar 1-2 ml de acetilcolina, dopamina, L-epinefrina y serotonina, a concentraciones de $5 \times 10^{-5} M$. La única sustancia que respondió en todas las especies probadas, fue la 5-HT, manifestándose con una leve despolarización.

Por otro lado, en neuronas de la vaca de mar Aplysia californica, se encontró un canal de potasio sensible a la 5-HT, activo a nivel de PR, en el cual, esta sustancia ocasiona el cierre completo y prolongado de dicho canal, y como resultado, la 5-HT parece reducir el número efectivo de canales activos en la membrana durante el PR (Siegelbaum, et.al., 1982).

En otros estudios hechos con neuronas de la vaca de mar Aplysia californica, y el caracol Helix pomata, se encontraron seis tipos diferentes de respuestas a la aplicación iontoforética de 5-HT (tres excitatorias, y tres inhibitorias). Cuatro de ellas provocaban un incremento en Gm (dos corrientes de sodio, una de potasio y una de cloruro), mientras --

que las otras dos causaban un decremento en G_m (una corriente de potasio y otra de sodio y potasio), (Gershenfeld y Paurdin-Tritsh, 1974).

En sí, estos son algunos de los antecedentes que sugieren que la 5-HT, participa de alguna manera en el desove de bivalvos marinos, además que favorece al rompimiento de la vesícula germinal del ovocito, y puede provocar cambios en la resistencia eléctrica de la membrana. Por lo cual, en este trabajo, se conjuntaron los tres procesos (desove, ruptura de vesícula germinal, y cambios en R_m) al ser utilizada la 5-HT para inducirlos en una especie de bivalvo de la región.

OBJETIVOS

- a) Probar si la serotonina induce a la liberación de gametos en la almeja Pismo bajo condiciones de laboratorio.
- b) Determinar si la serotonina participa en la ruptura de la vesícula germinal del ovocito de la almeja Pismo.
- c) Determinar si la serotonina provoca cambios en la resistencia eléctrica de la membrana de dichos ovocitos.

MATERIALES Y METODOS

La parte experimental del presente trabajo fue realizada entre los meses de agosto y noviembre de 1987, ya que durante estos meses se reporta la temporada reproductiva para la almeja Pismo (Coe, 1947; Fitch, 1950).

Las almejas utilizadas provinieron de la zona cercana a San Quintín, B.C., de donde fueron transportadas al laboratorio de reproducción de la Escuela Superior de Ciencias -- (U.A.B.C.), y fueron mantenidas en acuarios con agua de mar aireada y con filtro biológico.

PRUEBAS PARA LIBERACION DE GAMETOS

Se utilizaron un total de 58 almejas sexualmente maduras las cuales fueron puestas individualmente en recipientes de plástico, conteniendo 1.5 lt de agua de mar filtrada a temperatura entre 16 y 18°C. Después de esperar como mínimo -- una hora para eliminar la posibilidad de algún desove espontáneo durante los experimentos, se inyectaron intragonadalmente (ver figura 1 para ubicación de la gónada) 33 almejas con 0.4 ml (en base a los antecedentes) de una solución de 5-HT 10^{-3} M en agua de mar amortiguada a pH 8 con solución - Tris de HCl 1M (5 microlitros por cada ml de 5-HT 10^{-2} M). - Como controles, fueron utilizadas 25 almejas, a las cuales se les inyectó agua de mar de la misma manera que las dosis con 5-HT.

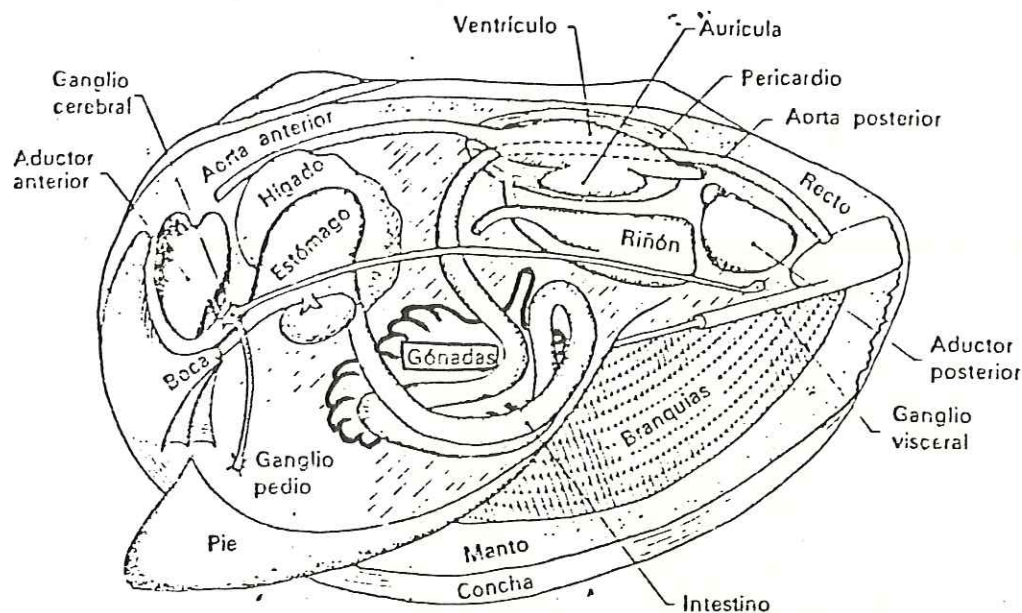


Figura 1

Localización de la gónada en la almeja. Vista lateral izquierda de la estructura interna, con la valva y -- el manto izquierdo removidos (Hoar, 1978).

PRUEBAS PARA RUPTURA DE LA VESICULA GERMINAL

La obtención de gametos se hizo directamente de la gónada (ver -- figura 1, para ubicación de la gónada). Para esta obtención, se a--- brió ligeramente la almeja, y se cortaron los músculos aductores an terior y posterior de una de las valvas. Con ayuda de un bisturí, -- se insicionó la gónada y se obtuvieron fragmentos de ella, los cua- les se analizaron para determinar el sexo (esto se hizo rápidamente para evitar la exposición prolongada de los gametos con el líquido y material gonadal).

En el caso de ser hembra, los ovocitos fueron lavados y puestos en tubos de ensayo con agua de mar (1500 ovocitos/ml de agua de mar). Para determinar la concentración óptima de serotonina para obtener el mayor porcentaje de ruptura de vesícula germinal, fue sometido cada lote de ovocitos en diferente concentración de serotonina (control, $2 \times 10^{-3} M$, $2 \times 10^{-4} M$, $2 \times 10^{-5} M$, ... $2 \times 10^{-9} M$). La temperatura de estos experimentos fue de $16^{\circ}C$. La mayoría de los ovocitos presentaban diámetro de aproximadamente $70 \mu m$, los cuales fueron utilizados en el conteo. Sin embargo, se llegaron a encontrar ovocitos con un diámetro cercano a $40 \mu m$, los cuales fueron descartados por considerarse diferentes del resto.

Para apreciar cambios en el porcentaje de ruptura de vesícula germinal durante los experimentos fueron tomadas muestras de ≥ 100 ovocitos de cada lote a un tiempo arbitrario de 0, 20 y 60 minutos.

Como complemento a estos experimentos, se probó la influencia de la capa vitelina para la maduración de los ovocitos, debido a que en las pruebas electrofisiológicas fueron utilizados ovocitos sin capa; para lo cual se abrió ligeramente la almeja, y se cortaron los músculos aductores anterior y posterior de una de las valvas. Con ayuda de un bisturí, se insicionó la gónada y se obtuvieron fragmentos de ella, los cuales fueron analizados para determinar el sexo. (esto se hizo rápidamente para evitar la exposición -

prolongada de los gametos con el material gonadal). En caso de ser hembra, los ovocitos se lavaron y se pusieron en tubos de ensayo con agua de mar (1500 ovocitos/ml de agua de mar). Posteriormente fue removida la capa al pasarlos vigorosamente a través de un filtro de nylon de 120 μ m de poro utilizando una pipeta Pasteur, repitiendo unas cinco veces y lavando con agua de mar entre cada filtrado.

Las muestras tomadas fueron fijadas en solución de formal al 15% en agua de mar, para su posterior observación.

PRUEBAS PARA MEDIR CAMBIOS EN RESISTENCIA DE ENTRADA Y EN POTENCIAL DE REPOSO POR ACCION DE SEROTONINA

Para estas pruebas, primeramente se obtuvieron los ovocitos de la misma manera que para las pruebas de maduración in vitro, solamente que una vez ya lavados, fue necesario remover la capa vitelina, ya que esta dificultaba la penetración del ovocito por el microelectrodo, por lo que se hicieron pasar vigorosamente los ovocitos a través de un filtro de nylon de 120 μ m de poro utilizando una pipeta Pasteur, repitiendo cinco veces y lavando por centrifugación entre cada filtrado. Posteriormente se guardaron los ovocitos en un recipiente con agua de mar a 16°C.

Para las mediciones electrofisiológicas, fueron colocados los ovocitos en una caja de Petri de 3 cm de diámetro y 1 cm de altura, a la que se le hicieron rayaduras en --

forma de "X" en el fondo para inmovilizar a los ovocitos - que fueron penetrados por el microelectrodo. En dicha caja se agregaron 3 ml de agua de mar filtrada con aproximadamente 4000 ovocitos. Su observación fue realizada a 100 aumentos por medio de un estereoscopio WILD. La temperatura se mantuvo constante mediante un enfriador de agua con reflujo.

El baño con los ovocitos fue conectado a tierra utilizando un puente de agar, a su vez conectado a un baño aterrizado mediante un alambre de plata clorurada (figura 2). Esto fue con el fin de evitar un posible contacto de iones de plata con los ovocitos, pues ha sido reportado por Jaffe et. al., (1979) que este ion puede activar a ovocitos.

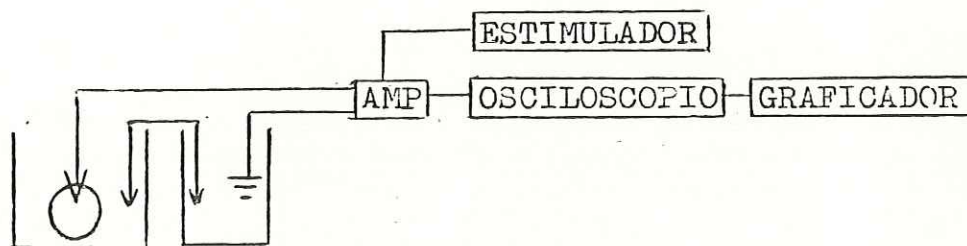


Figura 2. Modelo del sistema de registro.

Los registros intracelulares se hicieron utilizando microelectrodos de vidrio llenos con KCl 3M con resistencia de punta entre 30 y 60 M Ω , los cuales fueron dirigidos mediante un micromanipulador marca NARISHIGE.

La penetración del microelectrodo para medir el potencial de membrana se hizo colocando la punta del electrodo

de manera que ocasionara una leve depresión en la superficie del ovocito, y entonces fue penetrado oscilando la punta del microelectrodo aplicando capacitancia negativa proveniente del amplificador. Una vez finalizado el sellado eléctrico fue medido el potencial de reposo normal (PR). Para inyectar corriente entrante y saliente, y registrar voltaje por el mismo electrodo se utilizó un amplificador de alta impedancia de entrada BIO-DYNE, modelo AM-1. Fue necesario balancear el puente del amplificador antes de mandar los pulsos de corriente. Para la estimulación fue utilizado un estimulador GRASS SD9. Un osciloscopio TEKTRONIX fue utilizado como sistema de registro, conectado a un graficador de papel marca GOULD BRUSH Recorder 220.

Para determinar la influencia de la 5-HT sobre el PR y la resistencia de entrada de la membrana después de la maduración del ovocito, primero se midió el PR y resistencia de entrada del ovocito inmaduro; posteriormente se sometió al ovocito a una solución de 5-HT a la misma concentración que la obtenida con el mayor porcentaje en las pruebas de maduración (30 μ l de 5-HT a los 3 ml de agua de mar contenidos en el baño para una concentración final de 2×10^{-6} M), y se midió el cambio ocurrido en la resistencia de entrada y en el PR, recabando los datos en tablas y gráficas I-V.

Como control se utilizó agua de mar.

RESULTADOS

De las 33 almejas tratadas con 5-HT, 13 respondieron con liberación de gametos en un tiempo entre 19 y 99 minutos ($\bar{x}=36$), mientras que de los 25 controles uno desovó, tardando aproximadamente 100 minutos.

Respecto al comportamiento de las almejas durante las pruebas, se observó que respondieron sin distinción del sexo aproximadamente 15 minutos después de aplicada la dosis de 5-HT, con movimientos lentos hacia fuera y hacia dentro de su concha, así como con expulsión brusca y esporádica de chorros de agua a través del sifón exhalante, lo cual se observó acompañado por apertura y cierre de sus valvas. Posteriormente a esto sobrevino la liberación de gametos.

Sin embargo, hubieron almejas que no respondieron a la 5-HT; estas no mostraron el comportamiento antes mencionado. Tampoco lo mostraron las almejas que fueron tratadas con agua de mar a excepción de la que desovó.

Al salir los gametos, estos iban depositándose en el fondo de la charola. En el caso de los espermatozoides, estos adquirieron movilidad a los pocos segundos de ser expulsados; en el caso de hembras, se observaron ovocitos bajo el microscopio, encontrando que un alto porcentaje ya había madurado, mientras que unos cuantos estaban en proceso de maduración.

En cuanto al número de ovocitos liberados, se sabe que una almeja hembra durante su etapa reproductiva, puede expulsar hasta 15 millones de ovocitos en cada desove que realice (Fitch, 1950). En el caso de las pruebas de desove realizadas, se asumió que cada hembra desovó un número similar de ovocitos al reportado anteriormente.

Después del desove, se realizó una disección de la gónada, encontrando algunos ovocitos residuales inmaduros.

A continuación, los datos del número de almejas tratadas en cada caso y su respuesta son vaciadas en la tabla I.

TABLA I

TABLA DE COMPARACION ENTRE TRATAMIENTO CON 5-HT Y EL CONTROL EN LA INDUCCION AL DESOVE

	DESOVE	NO DESOVE	TOTAL*
5-HT	13	20	33
CONTROL	1	24	25

TOTALES*	14	44	58

* Los totales indican el número de almejas que respondieron con desove o no desove en cada caso (explicación en el texto).

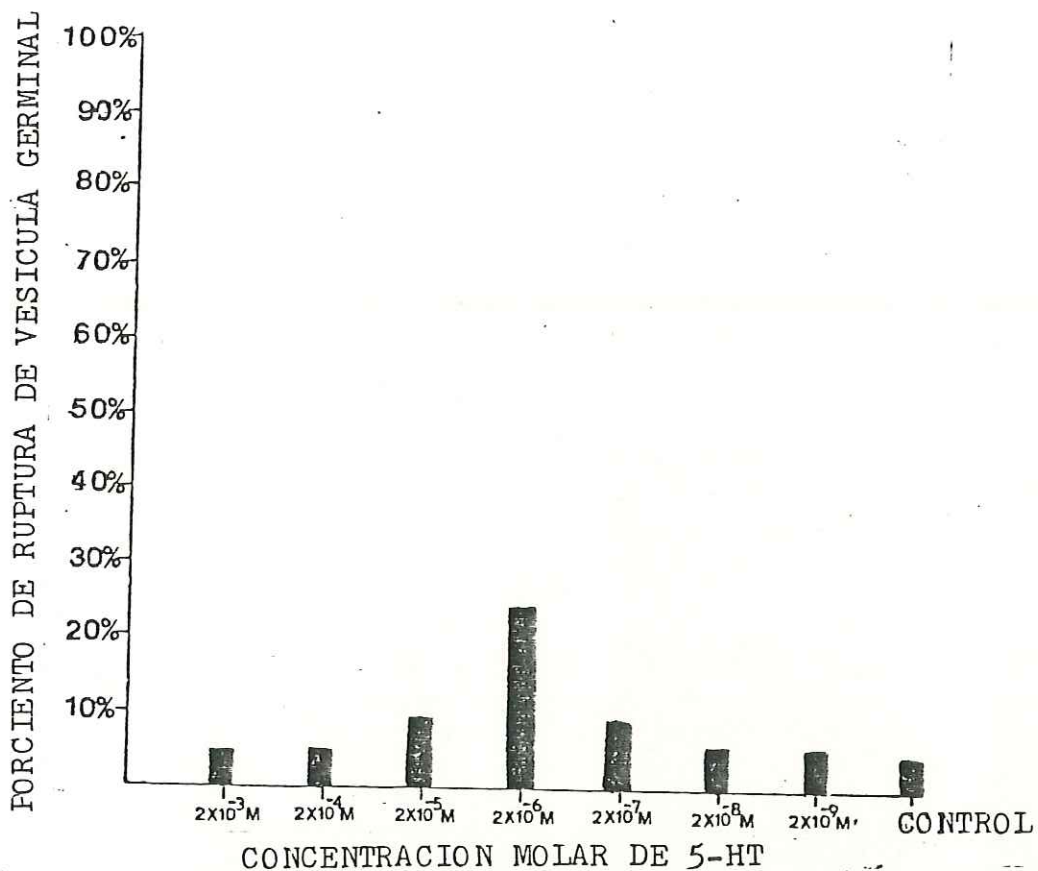
PRUEBAS PARA MADURACION

Se realizaron un total de 16 experimentos para encontrar la concentración óptima de 5-HT, a la cual se obtiene el mayor porcentaje de ruptura de la vesícula germinal bajo condiciones de laboratorio.

Se asume que los ovocitos inmaduros utilizados, se encontraban en profase I de meiosis, los cuales presentaban un diámetro aproximado de $70 \mu\text{m}$, valor similar al reportado -- por Fitch (1950).

Al momento de ser extraídos de la gónada, presentaban una clásica forma de pera, y una evidente vesícula germinal (núcleo), la cual es una de las características del estado de inmadurez en los ovocitos de esta especie.

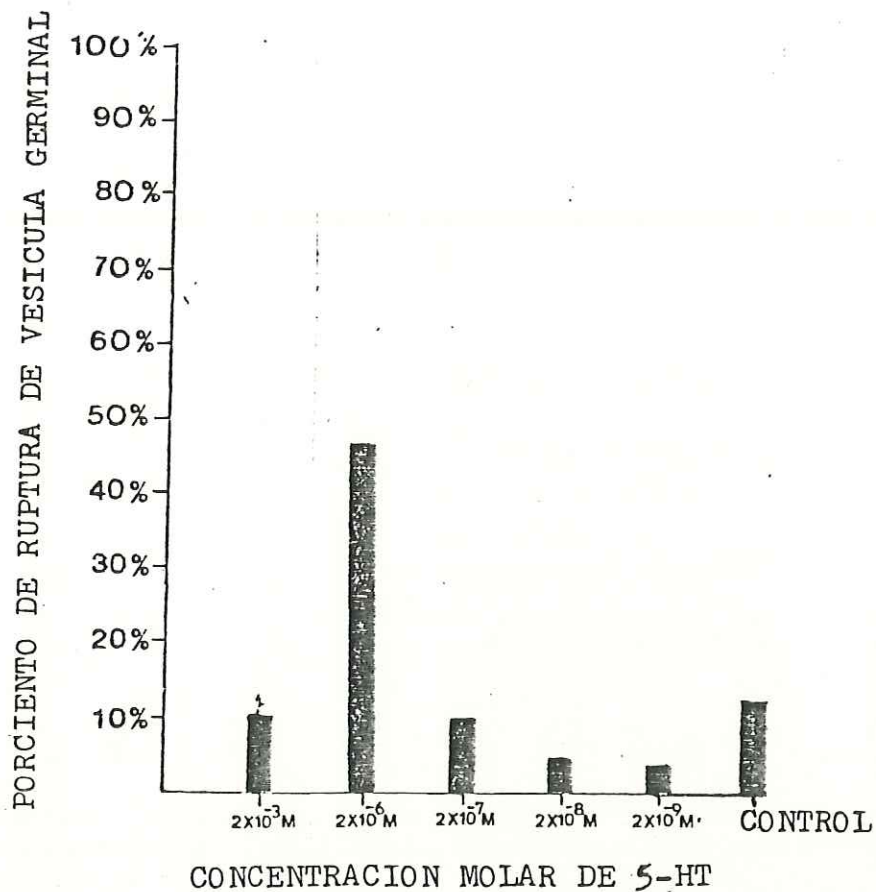
Cerca del 6% ($n=16$) de los ovocitos sacados de la gónada se encontraron sin vesícula germinal al momento de iniciar las pruebas de maduración (ver control en gráfica 1). A este tiempo inicial se observó una reacción rápida de algunos ovocitos, principalmente a una concentración de $2 \times 10^{-6} \text{M}$, -- donde aproximadamente el 23 % ($n=16$) del total, rompieron su vesícula germinal.



Grafica 1.- Porciento de ruptura de vesícula germinal contra concentración molar de 5-HT, para un tiempo teórico de 0 min. (n=16), y su comparación con el control.

En la gráfica 2 ($t=20$ min), se empieza a notar la tendencia al mayor porcentaje de ruptura cuando la concentración de 5-HT era de $2 \times 10^{-6} \text{ M}$, donde se alcanzó un máximo de ruptura de vesícula germinal de 47% (n=16). En esta gráfica se decidió omitir los resultados obtenidos a $2 \times 10^{-4} \text{ M}$, y $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, debido a que solo se colectaron los datos de dos experi-

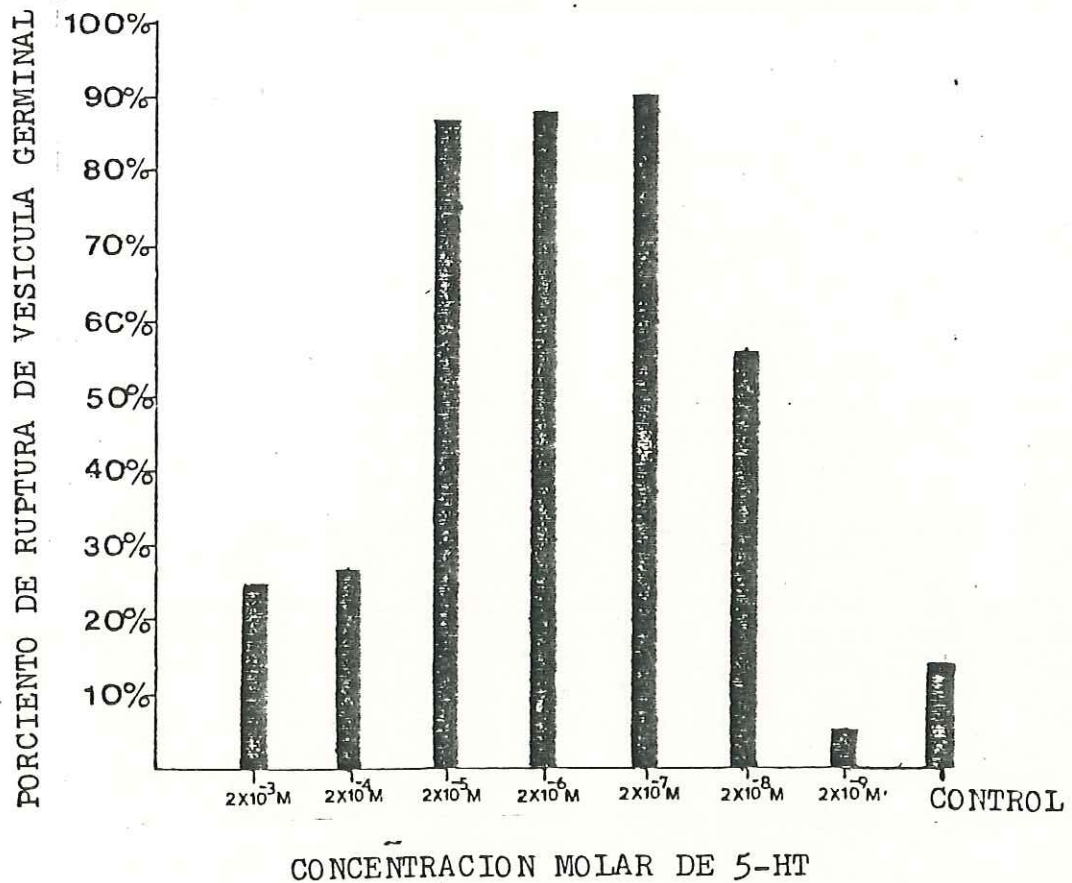
mentos.



Gráfica 2:- Porcentaje de ruptura de vesícula germinal contra concentración molar de 5-HT, para un tiempo de 20 minutos de exposición (n=16), y su control con agua de mar.

Después de un lapso de aproximadamente 60 minutos de exposición a la 5-HT, se encontró un marcado aumento en el porcentaje de ruptura de vesícula, donde a concentraciones de $2 \times 10^{-5} \text{M}$ se encontró 87%; a $2 \times 10^{-6} \text{M}$, era de 88%; y a $2 \times 10^{-7} \text{M}$ era del 90%. Por otro lado, a concentraciones extre

mas el porcentaje de ruptura fue substancialmente bajo, pues a $2 \times 10^{-3} \text{M}$ era de 25%, a $2 \times 10^{-4} \text{M}$ de 26% y a $2 \times 10^{-9} \text{M}$ el porcentaje de ruptura de vesícula era del 10%. El control se mantuvo aproximadamente en 17% (gráfica 3).



Gráfica 3.- Porcentaje de ruptura de vesícula germinal contra concentración molar de 5-HT, para un tiempo de 60 minutos de exposición (n=16), y su control con agua de mar.

La ruptura de la vesícula germinal se observó como un proceso paulatino. Primero sucedió una lenta disgregación de -

la membrana nuclear después de aproximadamente 10 minutos - de iniciado el experimento; posteriormente el material nuclear iba homogenizándose en el citoplasma, adquiriendo el ovocito un color café oscuro levemente granuloso.

Se obtuvieron resultados similares de las pruebas realizadas con capa y sin capa vitelina (Tabla II).

	CONTROL (%)	5-HT (%)		CONTROL (%)	5-HT (%)
+CV	4	75	+CV	13	84
-CV	10	70	-CV	11	85
a			b		
	CONTROL (%)	5-HT (%)		CONTROL (%)	5-HT (%)
+CV	6	96	+CV	3	75
-CV	32	95	-CV	8	100
c			d		

TABLA II . Porcentaje de ruptura de vesícula germinal en ovocitos de la almeja Pismo tomados a 2 horas (a), 24 horas (b), 20 minutos (c), y 20 minutos (d), después de la aplicación de 5-HT ($2 \times 10^{-6}M$). +CV = con capa vitelina; -CV = sin capa vitelina.

El tiempo aproximado que requirieron los ovocitos para llevar a cabo la ruptura de su vesícula germinal fue entre 20 y 30 minutos.

POTENCIAL DE MEMBRANA Y RELACION CORRIENTE-VOLTAJE EN OVOCITOS INMADUROS Y MADUROS.

Después de la penetración del microelectrodo dentro del ovocito inmaduro, se registró un PR generalmente menor que el normal. Esto fue debido a la lesión en la membrana provocada por el microelectrodo. Dicho potencial se recuperó al transcurrir aproximadamente 20 minutos después de la penetración (figura 3).

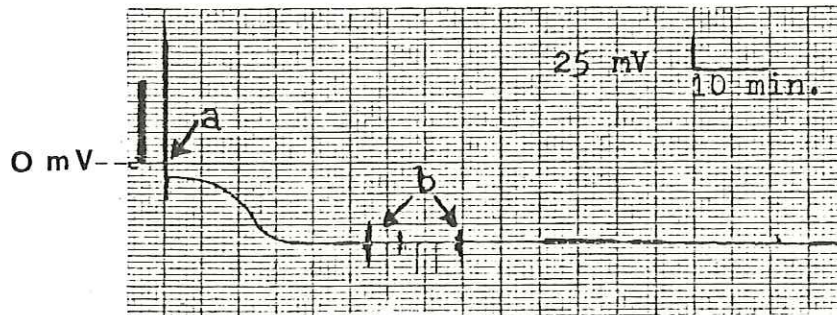


Figura 3. Potencial de membrana normal registrado en un ovocito inmaduro. La flecha a, indica el momento de la aplicación de corriente oscilante para la penetración del microelectrodo. La flecha b, indica el balance en el puente del amplificador. El potencial de membrana registrado en este ovocito fue cercano a -68 mV (sensibilidad de 5 mV/DIV. Velocidad del papel 1 mm/min).

Los ovocitos que mantuvieron un PR entre -10 y -40 mV aproximadamente, fueron descartados, ya que se consideraron en mal estado, ya sea por su propio desarrollo, o por estar dañados de alguna manera.

Estos ovocitos inmaduros respondieron a la corriente sa--

-liente y entrante unicamente con potenciales pasivos (figura 4), presentando una resistencia de entrada desde aproximadamente $1.4 \text{ M}\Omega$, hasta cerca de $24 \text{ M}\Omega$ (tabla IV). De momento no se tienen suficientes evidencias para justificar este amplio rango en la resistencia de entrada de la membrana.

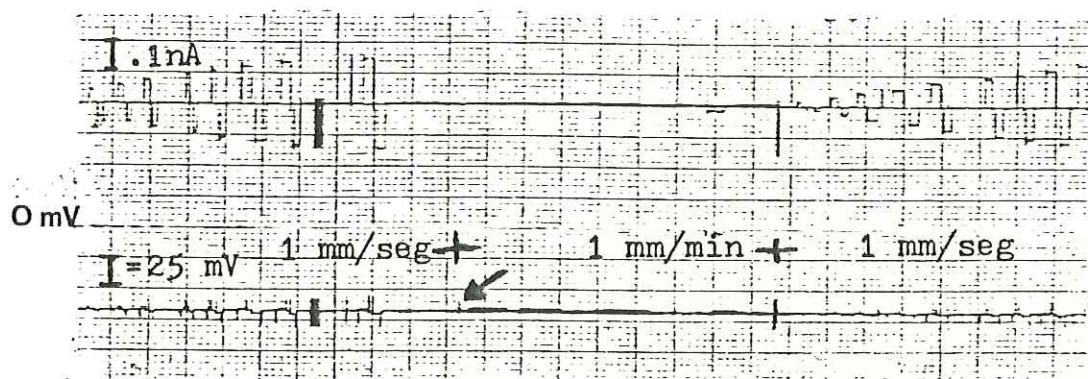


Figura 4. Registro intracelular de un ovocito inmaduro para mostrar la respuesta a pulsos de corriente entrante y saliente, antes y después de la aplicación de agua de mar utilizada como control (flecha). Nótese el cambio en la velocidad del papel de 1 mm/min a 1 mm/seg .

Al ser sometidos en una solución de $5\text{-HT } 2 \times 10^{-6} \text{ M}$, se encontró que, acompañando al proceso de ruptura de la vesícula germinal, después de aproximadamente 20 a 30 minutos, generalmente se presentaba una despolarización de unos 10 a 15 mV, ya que después de madurar un ovocito que presentaba PR de -80 mV , podía alcanzar valores de -70 mV , y un ovocito inmaduro de -55 mV de PR, alcanzaba hasta -40 mV una vez madurado (figura 5; tabla III). También hubieron ovocitos (4/9) que no presentaron este cambio en PR (tabla III). En contraste con unicamente 1 de los 7 ovocitos tratados con agua de mar donde se observó despolarización; en la mayoría el

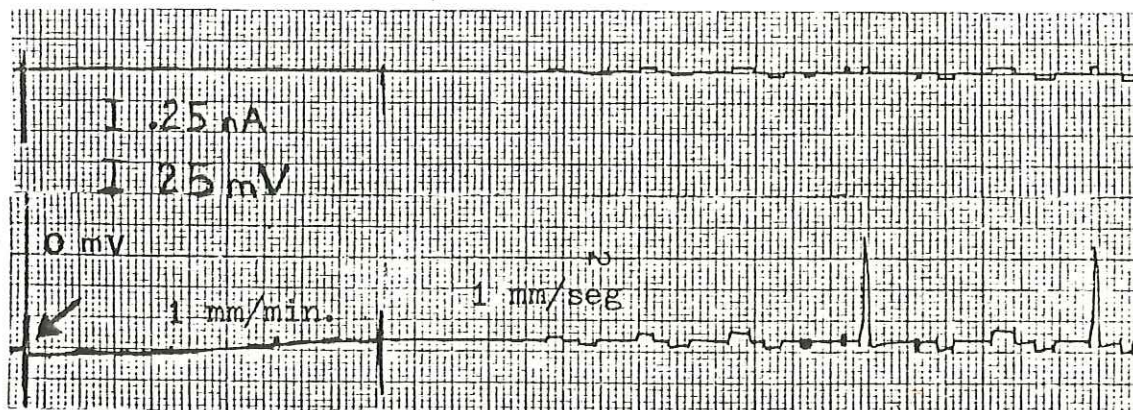
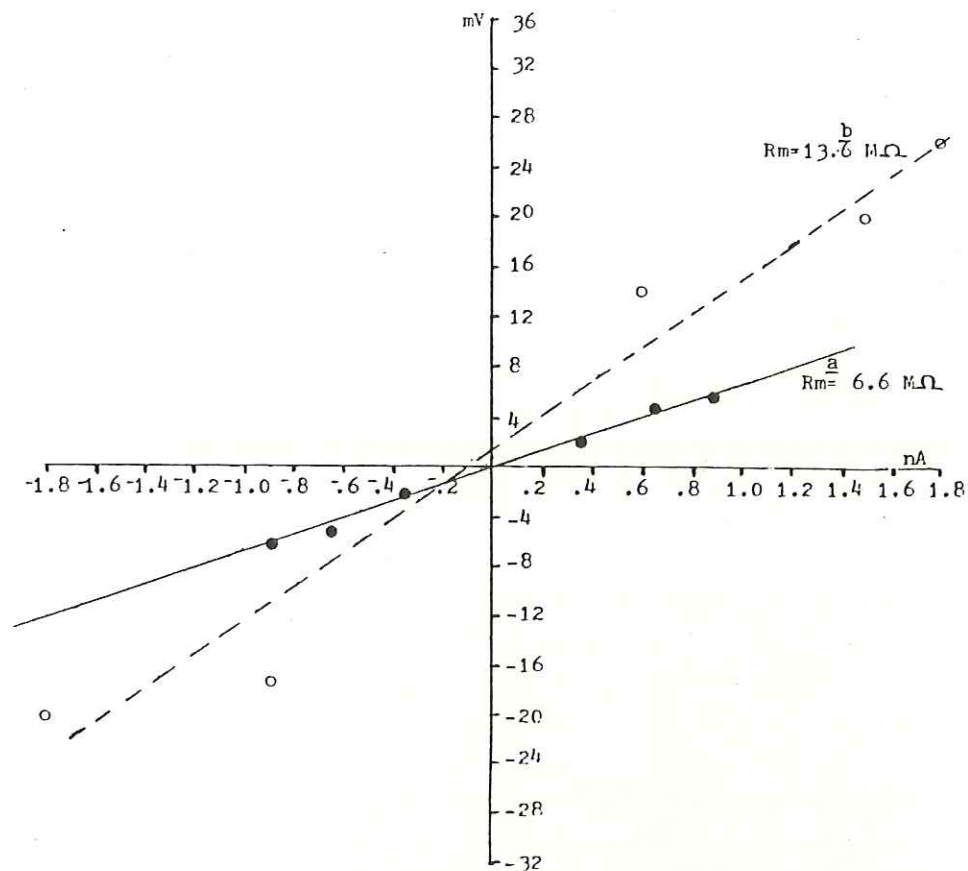


Figura 5. Registro intracelular de un ovocito después de la aplicación de 5-HT 2 micromolar (flecha), para mostrar la despolarización provocada por la 5-HT, y la respuesta a los pulsos de corriente. En este registro se pueden observar -- dos potenciales de acción estimulados. Nótese la escala en la velocidad del papel al inicio del barrido, y durante los pulsos de corriente. La flecha a la derecha indica el momento en que se aplicó la dosis de 5-HT.

PR fue aún más negativo después del tratamiento con agua de mar (tabla III).

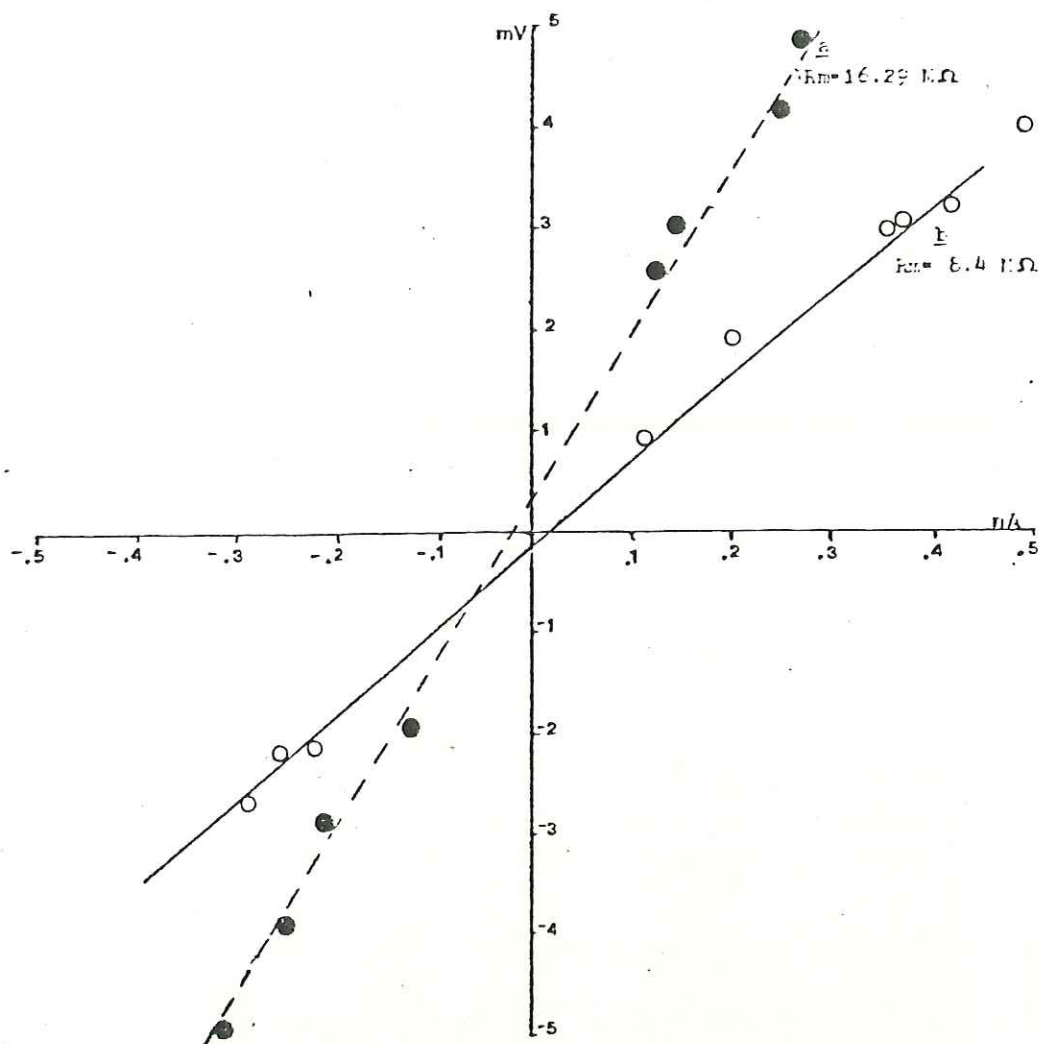
Por otra parte, al aplicar pulsos de corriente saliente, se encontró que los ovocitos maduros en ocasiones respondían con potenciales de acción estimulados (figura 5).

La resistencia de entrada también se mostró modificada por la 5-HT, variando ampliamente dependiendo del PR. Por ejemplo, en ovocitos inmaduros que presentaban PR de -84 mV su resistencia de entrada podía valer unos 6.6 M Ω , y después de aplicarse la 5-HT, el PR disminuía hasta unos -70 mV, y su resistencia de entrada alcanzaba valores cercanos a 13.6 M Ω (gráfica 4).



Gráfica 4. a.- Medida de la resistencia de entrada de un ovocito inmaduro (puntos oscuros), y b, una vez madurado después de la aplicación de 5-HT (puntos claros). Nótese el incremento en la resistencia de entrada, en este caso cerca del 100%.

Al utilizar agua de mar como control, se encontró que en general se tendía a disminuir la resistencia de entrada, lo cual descarta la posibilidad de que el efecto mecánico durante la aplicación de 5-HT influya de alguna manera en el incremento de la resistencia de entrada de estos ovocitos - (gráfica 5).



Gráfica 5. Medida de la resistencia de entrada de un ovocito inmaduro. La línea punteada a es el valor teórico en condiciones normales y sus valores experimentales (puntos negros). La línea continua b es el valor teórico del efecto que produce el agua de mar utilizada como control, y sus valores experimentales (puntos claros).

A continuación, se presentan los datos del PR en ovocitos inmaduros, maduros después de la aplicación de 5-HT, y su comparación utilizando agua de mar como control (tabla III). Se incluyen también los datos obtenidos en la resistencia de

entrada antes y después de la maduración inducida por 5-HT, y su comparación utilizando agua de mar como control (tabla IV).

TABLA III

POTENCIALES DE MEMBRANA EN OVOCITOS INMADUROS, MADURADOS POR 5-HT, Y EL CONTROL CON AGUA DE MAR.

INMADURO (mV)	MADURO POR 5-HT (mV)	CONTROL CON AGUA DE MAR (mV)
-65	----	-67
-67	----	-60
-75	----	-75
-66	----	-68
-63	----	-76
-45	----	-45
-65	----	-70
-60	-60	----
-80	-70	----
-83	-70	----
-62	-75	----
-60	-60	----
-80	-65	----
-55	-40	----
-65	-65	----
-69	-65	----
-77	----	----
-62	----	----
-80	----	----
-83	----	----
-78	----	----
-63	----	----
-65	----	----
-----	-----	-----
$\bar{x} = -68.17$	$\bar{x} = -63.33$	$\bar{x} = -65.86$
$S(n-1) = 9.77$	$S(n-1) = 10$	$S(n-1) = 10.63$

TABLA IV

COMPARACION DE LA RESISTENCIA DE ENTRADA EN OVOCITOS INMADUROS Y MADUROS POR LA 5-HT, Y SU COMPARACION CON AGUA DE MAR UTILIZADA COMO CONTROL.

CONTROL (MΩ)	5-HT (MΩ)	AGUA DE MAR (MΩ)
15.8	84.1	-----
14.0	21.2	-----
9.4	14.7	-----
6.6	13.6	-----
1.4	14.4	-----
16.3	-----	8.5
14.6	-----	7.5
9.5	-----	3.0
4.9	-----	2.4
24.2	-----	-----
19.5	-----	-----

Como ya se mencionó anteriormente, una característica encontrada en algunos ovocitos madurados con 5-HT en este trabajo, fue la presencia de potenciales de acción estimulados. Estos se muestran en la figura 5. En la figura 6, se observa un potencial de acción a barrido rápido (25 mm/seg), donde se pueden observar someramente sus componentes morfológicos (umbral, sobre tiro, y fase de repolarización con su meseta, fundamentalmente).

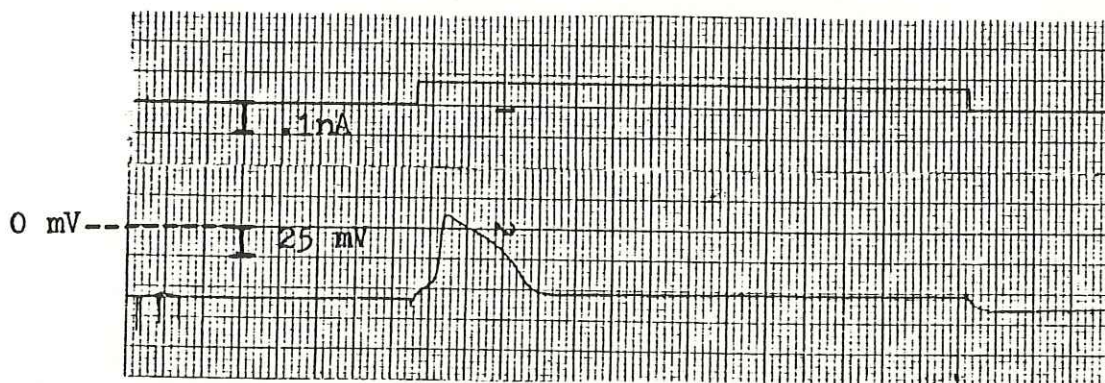


Figura 6. Potencial de acción estimulado de un ovocito maduro de la almeja Pismo tomado a 25 mm/seg. Nótese la escala del trazo de corriente y la de voltaje.

Además de estos potenciales de acción estimulados, fue posible registrar 52 potenciales de acción espontáneos en un experimento, los cuales fueron registrados durante casi 10 minutos, y son mostrados en las figuras 7 y 8.

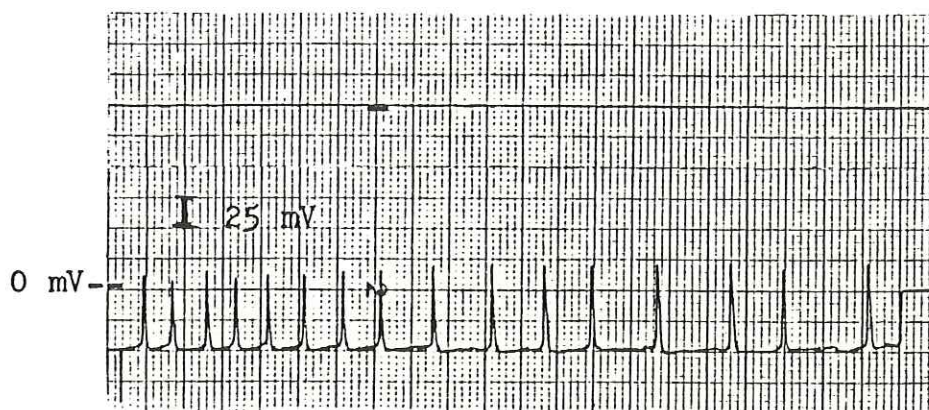


Figura 7. Potenciales de acción espontáneos registrados en un ovocito maduro. La velocidad del papel es de 25 mm/min. Nótese la escala del voltaje.

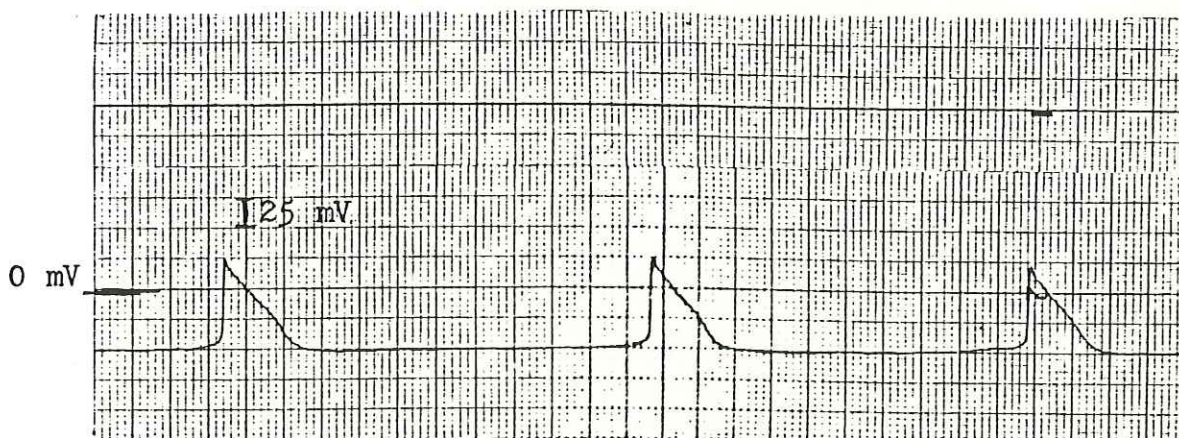


Figura 8. Potenciales de acción espontáneos registrados en el mismo ovocito maduro de la figura 7. En este caso la velocidad del papel es de 25 mm/seg.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas de liberación de gametos, nos revelan que la dosis para inducir al desove en la almeja Pismo (0.4 ml de 5-HT $2 \times 10^{-3} M$), y además el comportamiento de las almejas previo al desove, y el tiempo que tardaba para iniciarse este proceso (desde 19 hasta 99 minutos) concuerdan con los resultados reportados para el bivalvo Patinopecten yessoensis por Matsutani y Nomura (1982), y por Gibbons y Castagna (1984) para otras seis especies de bivalvos.

El hecho de que 15 de las 28 almejas tratadas con 5-HT no hayan respondido con desove, puede sugerir que tal vez ya lo hubieran hecho antes de ser llevadas al laboratorio, esto es, en su medio o durante su traslado, pues estuvieron expuestas al aire durante varias horas, y esto puede actuar como estímulo para el desove.

En cuanto a los controles, solo uno de los 23 sometidos a la inyección con agua de mar desovó, lo cual es significativamente diferente respecto a las pruebas con 5-HT.

El haber encontrado ovócitos inmaduros en la gónada después del desove, sugiere que el proceso de maduración puede estar llevando a cabo en el oviducto durante el trayecto de los ovocitos hacia el medio externo, después de haber sido activado inicialmente en la gónada.

Sin embargo, las pruebas son contundentes y podemos asegurar que con la aplicación intragonadal de 0.4 ml de 5-HT

10^{-3} M., sí es posible inducir a la liberación de gametos en la almeja Pismo utilizando la técnica mencionada en la metodología.

Los datos reportados por Coe (1947), y por Fitch (1950), respecto a la temporada reproductiva de esta almeja para la costa sureste de los Estados Unidos parece ser también válida para la zona costera de San Quintín, B.C., pues fue posible coincidir la etapa experimental de este trabajo con la temporada reproductiva reportada para la almeja Pismo por estos autores que la fijan desde principios de agosto, hasta fines de noviembre.

En el mismo trabajo, Coe (1947), comentó que no había sido posible fecundar ovocitos de la almeja Pismo sacados de la gónada; en el presente trabajo se encontró el mismo resultado encontrando que en este caso fue debido a que los ovocitos se encontraban inmaduros al momento de ser sacados de la gónada y que, a diferencia del control con agua de mar, el contacto de los ovocitos con la 5-HT activa su proceso de maduración.

Respecto a las pruebas de maduración, el tiempo estimado para realizarse este proceso, parece estar en el rango de 20 a 30 minutos, cuando la concentración de 5-HT en 3 ml de agua de mar está en el rango de 2×10^{-4} M, y 2×10^{-7} M, y se someten alrededor de 500 a 600 ovocitos en este volumen. Los resultados obtenidos también concuerdan con lo reportado --

por Hirai, et. al. (1984), con ovocitos de la almeja Spisula solidissima.

En la gráfica 1, correspondiente a las pruebas de maduración para un tiempo de cero minutos, se observó una respuesta temprana de algunos ovocitos a la 5-HT, lo cual sugiere que no se requiere demasiado tiempo de exposición a la 5-HT para ocurrir la maduración, y tal vez con la exposición de unos cuantos segundos y después lavándolos, el proceso de maduración pudiera llevarse a cabo de manera similar a la obtenida mediante estas pruebas, sin embargo, para afirmar esto, tienen que realizarse los experimentos.

En cuanto a las pruebas de maduración con capa y sin capa vitelina, estas apoyan los resultados de Rm y PR, -- pues estos experimentos fueron realizados sin capa vitelina y era necesario probar si su remoción afectaba en el rompimiento de la vesícula germinal.

En general, estos resultados refuerzan la hipótesis -- planteada, donde se propone que la 5-HT, además de inducir al desove, también participa en el proceso de ruptura de la vesícula germinal.

Otras pruebas que complementarían este trabajo, consisten en localizar esta sustancia en el sistema nervioso y reproductor de la almeja, utilizando técnicas histoquímicas, tal como lo reportan Dahl, et. al. (1966), y por Matsutani y Nomura (1984). Posteriormente a esto, se pueden -

medir los niveles de 5-HT antes y después de inducido el desove para observar si hay alguna variación en la concentración de esta sustancia y así proponer las estructuras u órganos que pueden estar participando en este mecanismo.

Por otro lado, resulta interesante probar si otras sustancias también favorecen al rompimiento de la vesícula -- germinal en esta especie, como la procaína, el amonio, la 1-Metiladenina, etc., ya que esto plantearía alternativas sobre el mecanismo que puede estar operando en el proceso de maduración, como por ejemplo, que no dependa de la serotonina como se sugiere en este trabajo, sino que esta sustancia pueda estar actuando como un intermediario dentro de una serie de reacciones necesarias para llevarse a cabo la maduración.

En lo que respecta a las pruebas para determinar el PR y la resistencia de entrada de los ovocitos inmaduros y -- las modificaciones que provoca la aplicación externa de -- 5-HT, es recomendable asegurarse principalmente de dos cosas. Por un lado, que el puente del amplificador esté bien balanceado, y por otro lado, que el microelectrodo esté -- bien empalado, y no esté tapado.

Es importante también que el portamicro esté lleno de -- KCl (en este caso) y sin burbujas, ya que esto impide el efectivo registro de la corriente y el voltaje.

En cuanto a las pruebas electrofisiológicas, estas nos

revelan resultados interesantes. Primeramente, el valor - del PR en ovocitos inmaduros, que en promedio fue de --- -68.17 ± 9.77 mV, coincide con el valor reportado para ovocitos maduros del erizo de mar Lytechinus variegatus, - cuyo PR oscila entre -60 y -80 mV (Chambers y de Armendi, 1979). También coincide con el valor reportado para ovocitos maduros del gusano nemertino Cerebratulus lacteus, que era de -67 ± 12 mV (Jaffe, et. al. ,1985).

Sin embargo difiere de lo reportado por Finkel y Wolf (1980), para ovocitos inmaduros de la almeja Spisula solidissima, los cuales presentaban PR de -18 ± 7 mV; al igual que con los ovocitos inmaduros de la rana Rana pipiens, los cuales presentaban PR de -25 ± 1 mV (Schlichter y Elinson, 1981). Una posibilidad para justificar e bajo potencial de reposo reportado para S. solidissima puede ser que durante las mediciones, el microelectrodo estaba mal empalado.

En cuanto a la despolarización presentada en los ovocitos de la almeja Tivela stultorum con 5-HT, coincide - con resultados reportados para la estrella de mar Asterina pectinifera, donde se indujo a la maduración del ovocito con 1-Metiladenina, y se encontró que se produce una despolarización entre 10 a 50 mV. Es posible que el aumento en la resistencia de entrada de estos ovocitos durante la maduración - presente el mismo mecanismo que en el caso de los ovocitos -

de la estrella de mar A. pectinifera, en los cuales también ocurre un incremento en la resistencia de entrada, y está - justificado por la caída en la conductancia al potasio (Miyazaki, et.al. 1975; citado en Miyazaki, 1979).

Por otro lado, sería útil conocer qué iones participan - de manera importante para el PR, tanto en ovocitos inmaduros, como en ovocitos maduros, lo cual puede hacerse, por - ejemplo utilizando la técnica de substitucion de iones.

Otro aspecto consistiría en probar si la 5-HT modifica - la corriente de potasio en la membrana de estos ovocitos - (si es que la hay), como lo sugiere Kusano (1978), o si ocurre el mismo mecanismo que en las neuronas de la vaca de - mar Aplysia californica, según lo reportan Siegelbaum, et.- al. (1982); o por Gershenfeld y Paupardin-Tritsh (1974), para neuronas de A. californica, y para neuronas del caracol Helix pomata. En estos casos se recurriría a técnicas más - sofisticadas como lo son la microinyección, y el patch clamp.

CONCLUSIONES

En la almeja Pismo Tivela stultorum, la inyección intragonadal de 0.4 ml de 5-HT 2×10^{-3} M., induce a la liberación de gametos en ambos sexos, tardando entre 19 y 99 minutos - para realizarse el proceso, durante su temporada reproductiva y bajo condiciones de laboratorio.

En ovocitos inmaduros tomados de la gónada, se obtiene - un alto porcentaje de ruptura de la vesícula germinal cuando se someten en una solución de 5-HT a concentraciones entre 2×10^{-4} , y 2×10^{-6} M., bajo condiciones de laboratorio, tardando entre 20 y 30 minutos para consumarse el proceso.

Una manifestación electrofisiológica del proceso de ruptura de la vesícula germinal mediante la aplicación externa de 5-HT, radica en un aumento en la resistencia de entrada de la membrana, además de una despolarización en el potencial de membrana de 5 a 10 mV.

Una característica más de los ovocitos maduros, es su capacidad para responder electricamente con potenciales de acción y en ocasiones presentan potenciales de acción espontáneos.

LITERATURA CITADA

- COE, W.R. 1947. Nutrition, growth and sex of Pismo clam. J. Exp. Zool. 104:1-24.
- CRAWFORD, C.M., W.J. Nash and J.S. Lucas. 1986. Spawning in duction and larval and juvenile rearing of the giant -- clam, *Tridacna gigas*. Aquaculture. 58:281-295.
- CHAMBERS, E.L. and J. de Armendi. 1979. Membrane potential, action potential and activation potential of eggs of -- the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Exp. Cell. Res. - 122:203-218.
- DAHL, E., B. Falk, C. Mecklenburg, H. Myhrberg and E. Rosen gren. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-Hy- droxytryptamine in some mollusca. Zeitschrift fur Zell- forschung. 71:489-498.
- FINKEL, T. and D.P. Wolf. 1980. Membrane potential, pH and the activation of surf clam oocytes. Gamete Research. - 3:299-304.
- FITCH, J.E. 1950. The Pismo clam. Calif. Fish and Game. 36: 285-312.
- GERSHENFELD, H.M. and Paupardin-Tritsh. 1974. Ionic mecha-- nisms and receptor properties underlying the responses of molluscan neurones to 5-Hydroxytryptamine. J. Phy--- siol. 243:427-456.
- GIBBONS, M.C. and M. Castagna. 1984. Serotonin as an indu-- cer of spawning in six bivalve species. Aquaculture. -

40:189-191.

- HAGIWARA, S. and L.A. Jaffe. 1979. Electrical properties of egg cell membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 8:385-416.
- HAGIWARA, S. 1983. Membrane potential-dependent ion channels in cell membrane. *Phylogenetic and developmental approaches*. Vol.3. Raven Press Books. New York. 118 p.p.
- HIRAI, S., T. Kishimoto., S.S. Koide., and H. Kanatani.1984. Serotonin induction of spawning and oocyte maturation in Spisula. *Biol. Bull.* 167:518.
- HOAR, W.S. y C.P. Hickman. 1978. Manual de laboratorio para fisiología general y comparada. 1^a ed. Omega Ed. 283p.p.
- HOLLAND, L.Z. and M. Gould-Somero. 1981. Electrophysiological response to insemination in oocytes of Urechis caupo. *Developmental Biology.* 83:90-100.
- JAFFE, L.A., M. Gould-Somero and L. Holland. 1979. Ionic mechanism of the fertilization potential of the marine worm Urechis caupo (Echiura). *J. Gen. Physiol.* 73:469 - 492.
- JAFFE, L.A., R.T. Kado and D. Kline. 1986. A calcium-activated sodium conductance produces a long-duration action potential in the egg of a nemertean worm. *J. of Physiology.* 381:263-278.
- KUSANO, K. 1978. Comparative electrophysiological study on the oocyte membrane neuro-receptors. *Biol. Bull.* 155-450.
- MATSUTANI, T. and T. Nomura. 1982. Induction of spawning by serotonin in the scallop, Patinopecten yessoensis (Jay).

Marine Biology Letters. 3:353-358.

- MATSUTANI, T. and T. Nomura. 1984. 1984. Localization of monoamines in central nervous system and gonad of the scallop Patinopecten yessoensis. Bull. of the Japanese Soc. of Sci. Fish. 50 (3):425-430.
- MIYAZAKI, S. 1979. Fast polyspermy block and activation potential. Electrophysiological bases for their changes during oocyte maturation of a star fish. Developmental Biology. 70:341-354.
- MIYAZAKI, S. and S. Hirai. 1979. Fast polyspermy block and activation potential. Correlated changes during oocyte maturation of a star fish. Developmental Biology. 70: 327-340.
- SMITH, J.R. 1987. The role of the nervous system in algae induced gamete release by Mytilus californianus. Comp. Biochem. Physiol. VOL. 86C. 1:215-218.
- SIEGELBAUM, S.A., J.S. Camardo & E.R. Kandel. 1982. Serotonin and cyclic AMP close single K^+ channels in Aplysia sensory neurones. Nature. 299:413-417.
- SCHLICHTER, L.C. and R.P. Elinson. 1981. Electrical responses of immature and mature Rana pipiens oocytes to sperm and other activating stimuli. Developmental Biology. 83:33-41.