



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"I Z T A C A L A"

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA
ESPONTANEA EN NEURONAS SECRETORAS
DEL TALLO OCULAR DEL ACOCIL
Procambarus clarkii Girard (Crustacea, Decapoda)

T E S I S

ELABORADA PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A D A P O R

JAIME AURELIO BARRAL CABALLERO



Los Reyes iztacala, Tlalnepantla Estado
de México 1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado parcialmente con recursos aportados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dentro del Programa de Fortalecimiento al Posgrado Nacional. Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Plasticidad Cerebral, del Proyecto Neurociencias de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala de la U.N.A.M., bajo la dirección del M. en C. Javier Flores.

Desafiando a la naturaleza, destruyéndola y erigiendo un mundo artificial y ególatra no comprendo como la humanidad pueda conseguir paz libertad o felicidad; tengo fé en el futuro del hombre, confianza en las posibilidades del experimento humano; pero fé en el hombre como parte de la naturaleza...
...creo en el hombre compartiendo la naturaleza, no destruyéndola.

... A MIS PADRES

... Mirame madre y por tu amor no llores
si esclavo de mi edad y mis doctrinas
tu martir corazón llene de espinas
piensa que nacen entre espinas flores...

José Martí

... A MIS AMIGOS

... Mis amigos son unos malhechores
convictos de atrapar sueños al vuelo
que aplauden cuando el Sol se trepa al cielo
y que abren su corazón como las flores...

Joan Manuel Serrat

... A MARGARITA

Si los crustáceos fueran mis amigos
les pediría un gran favor
que te miraran como a un niño
que te quisieran como a un Sol
que te escondieran en su guarida
y te enseñaran a jugar
el juego mágico
que no está en los libros
el de las mentiras y la verdad
son unos bichos que no saben apreciar
el dulce nectar que hay
en los lirios de la amistad
entendiendo sin palabras
la versión de dar amor
ya sean crustáceos magos o niños
estamos todos tu y yo.

Silvia Lara

AGRADECIMIENTOS

Ante todo quisiera hacer patente mi gratitud a Javier por el entusiasmo y el apoyo que me brindo durante el desarrollo de la tesis, dejando una huella importante tanto en los terrenos académicos como en aquellos que son personales.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, que siempre tienen una sonrisa en la boca y que dan lo mejor de cada uno para que los proyectos se hagan realidad: Pílld, Pilar, Nosmita, Bom-bom, Bolita, Juan Carlos, Tico y por supuesto al Exín.

A mis maestros que han tenido la ingrata tarea de revisar y criticar este trabajo, ya que sin sus valiosos consejos la tesis hubiera quedado incompleta: Thalia, Arturo, Jorge.

A mis compañeros y amigos del área de Zoología, que incondicionalmente apoyaron este trabajo: Jorge, José Luis, Sergio, Juan Pablo, Guillermo, Atahualpa y Tizoc.

A mis alumnos, que han sido un gran estímulo en mi formación.

A los acociles, que cada vez que me ven pasar corren a ocultarse.

Finalmente quiero dedicar este trabajo a ERNESTO PARDO, que siempre colaboró en la parte experimental y estadística, sin él esta tesis jamás se hubiera realizado; además de él he recibido siempre el apoyo y la estimación que sólo puede ofrecerse en la amistad, sea pues para mi mejor amigo, el agradecimiento más especial que emana de este trabajo.

Jaime

I N D I C E

1.0 INTRODUCCION	1
1.1 El Sistema Neurosecretor de los Crustáceos	1
1.1.1 Los Organos Pericárdicos	6
1.1.2 Los Organos Postcomisurales	9
1.1.3 El Sistema Organo N-Glándula Sinusal	12
1.1.3.1 Características Morfológicas de la GS	15
1.1.3.2 Características Neuroquímicas	19
1.1.3.3 Características Electrofisiológicas	22
2.0 OBJETIVOS	28
3.0 MATERIAL Y METODOS	29
3.1 Organismos	29
3.2 Obtencion de la Preparación	29
3.3 Sistema de Registro	31
4.0 RESULTADOS	35
4.1 La Actividad Eléctrica Espontánea de la Glándula Sinusal	35
4.1.1 Algunas Características de la Actividad Eléctrica Espontánea	37
4.1.2 Influencia del Sistema de Perfusión	37
4.1.3 Actividad Eléctrica en Diferentes Especies de Crustáceos	40

4.1.4	Trenes de Actividad	42
4.1.5	Influencia del Calcio Sobre la Actividad	
Espontánea	44	
4.2	Parámetros Estudiados	47
4.2.1	Análisis de la Forma de Onda	48
4.2.2	Análisis de la Amplitud	52
4.2.3	Análisis de la Duración	54
4.2.4	Análisis de la Frecuencia	56
4.3	Actividad Eléctrica de la GS en Periodos de	
24 Horas.....	57	
4.3.1	Actividad Global	59
4.3.2	Actividad de los Potenciales Individuales	59
4.3.3	¿Ritmicidad Circadiana y ultradiana	
en la Actividad Eléctrica de la GS?	64	
4.4	Exploración Inicial de la Posible Modulación de	
la Actividad Eléctrica Espontánea	66	
4.4.2	Efecto de la Serotonina	66
4.4.3	Efecto de la Leucina-Encefalina	70
5.0	DISCUSION	75
BIBLIOGRAFIA	87	

1.0 INTRODUCCION

La organización general del sistema nervioso (SN) en los invertebrados se ha considerado como relativamente simple si se le compara con el de los vertebrados. No obstante, la complejidad del SN en los primeros es tal, que aún se está muy lejos de tener una comprensión cabal de sus aspectos estructurales y funcionales. En el caso de los artrópodos, el SN sigue el mismo plan general que se presenta en los anélidos (fig.1), por lo que se ha postulado que los artrópodos se originaron a partir de aquellos (Tiegs y Manton, 1958); en la actualidad, trabajos recientes sobre la evolución y el origen de los artrópodos, y en particular de los crustáceos, muestran que las afinidades con los anélidos distan mucho de ser las que se suponían originalmente (Cisne, 1982). En los artrópodos (fig.1) se trata de un sistema de tipo ganglionar escaleriforme, con una masa anterior formando el cerebro propiamente dicho, y una cadena ganglionar doble con un par de ganglios por cada segmento. La ubicación de las diversas regiones del SN de los artrópodos pueden reconocerse en la figura 2.

1.1 EL SISTEMA NEUROSECRETOR DE LOS CRUSTACEOS

El fenómeno de neurosecreción se conoce casi desde principios de siglo. Speidel en 1919, reportó la presencia de neuronas con apariencia secretora en la médula espinal de los elasmobranquios (citado por Bern y Hagadorn, 1965), entre los metazoarios es posible encontrar células nerviosas con actividad

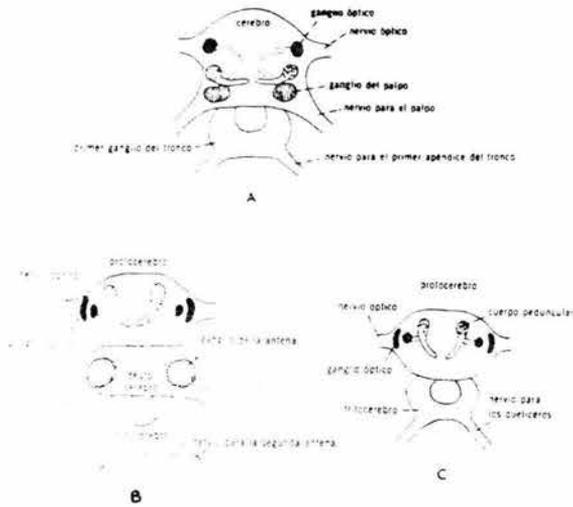


Figura 1. Representación esquemática del cerebro en: a) Gusano poliqueto (Annelida, Polichaeta); b) Crustáceo (Arthropoda, Crustacea); y c) Araña (Arthropoda, Chelicerata). (Tomado de Barnes, 1983).

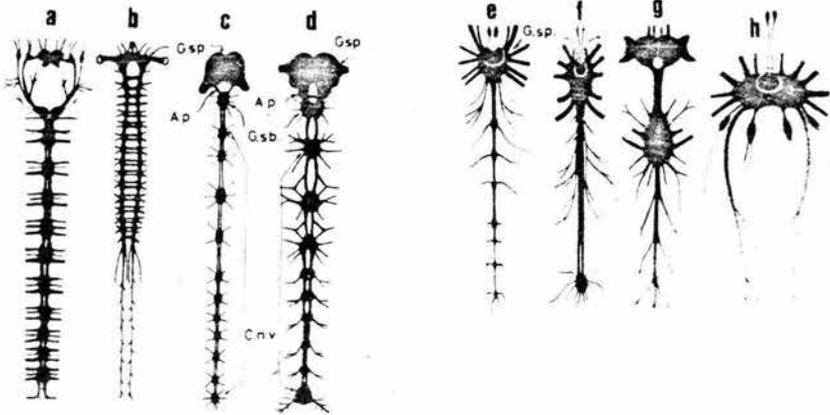


Figura 2. El sistema nervioso central en diferentes grupos: a) *Nereis* (Annelida, Polichaeta); b) Anostraco (Crustacea, Branchiopoda); c) *Japix* (Insecta, Apterigota); d) *Blatta* (Insecta, Blattoidea); e) Alacrán (Arachnida, Scorpionida); f) *Mastigoproctes* (Arachnida, Uropigida); g) Mosca (Insecta, Diptera); y h) Opiliónido (Arachnida, Opilionida). A.p. Anillo Periesofágico, C.n.v. Corden Nervioso Ventral, G.s.b. Ganglio Subesofágico, G.s.p. Ganglio Supraesofágico.

(Tomado de Vázquez y Villalobos, 1977).

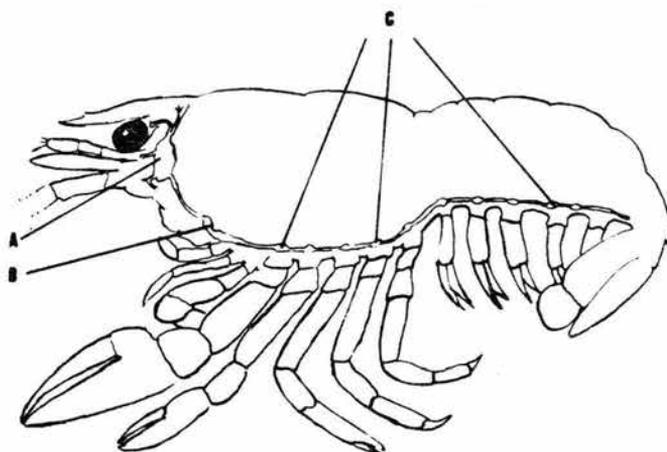


Figura 3. Principales estructuras nerviosas de los artrópodos, tal como se presenta en los acóclitos (Crustacea, Astacidea). a) Ganglio Supraesofágico, b) Ganglio Subesofágico, y c) Cordón nervioso central. (Modificado de McLaughlin, 1980).

secretora (Bern y Hagadorn, 1965). En el caso de los crustáceos, este fenómeno se encuentra bien documentado, particularmente a partir de los trabajos de Hanström en la década de los 30's (citado por Bern y Hagadorn, 1965).

En los metazoarios en general, el sistema neurosecretor, está formado por grupos celulares que sintetizan sustancias con actividad biológica, por sus axones las transportan a las terminales donde son liberadas a la hemolinfa, formando órganos neurohemales (Carlisle y Knowless, 1953). Los criterios para establecer el carácter secretor de estas células, se basa principalmente en métodos histológicos, por medio de éstos se observan neuronas con gránulos y propiedades tintoriales más o menos específicas, que sugieren la presencia de sustancias que han recibido la denominación genérica de neurohormonas o neurosecreciones.

Para determinar si una sustancia presenta actividad biológica, esto es, si efectivamente se trata de una neurohormona, se requiere aplicar diversos criterios para responder preguntas como, a) ¿Cuál es la naturaleza química de la supuesta hormona?, b) ¿Dónde están los sitios de síntesis y liberación?, c) ¿Qué procesos son controlados por estas secreciones?, d) ¿Existen receptores celulares especializados para estas hormonas?, y e) ¿De que manera se ejerce su efecto a nivel bioquímico? (Jegla, 1985), entre otras.

En cuanto a las características de estas neurosecreciones, se ha observado que no existen grandes diferencias entre los vertebrados y los invertebrados. Así por ejemplo, los axones y somas del Organó X (OX) de Sesarma (Crustacea, Decapoda), presenta inclusiones de 7 μm de ancho y 13 μm de longitud, compuestos de gránulos esféricos de 2 a 4 μm de diámetro, los que a su vez, están formados por gránulos de 0.3 μm de diámetro (Passano, 1954). Utilizando microscopía electrónica, es posible detectar gránulos de 100 nm de diámetro (Bern y Hagadorn, 1965). En otros grupos animales se pueden encontrar disposiciones similares del material neurosecretor. En algunas áreas neurohemales, se pueden distinguir al menos dos tipos de terminales, las que contienen gránulos pequeños (50 a 100 nm de diámetro), y aquellos en los que los gránulos son mayores (de 150 a 200 nm de diámetro), como se ha reportado en el pasado para el caso de la glándula sinusal (Hodge y Chapman, 1958), la neurohipófisis (Duncan, 1956), la urohipófisis (Holgreen y Chapman, 1960), así como en corpora cardiaca, pero con diámetros de 150 a 300 nm (Wiley y Chapman, 1960).

De diversos estudios, realizados en el sistema neurosecretor de los crustáceos, se observa que para el caso de los entomostráceos como cirripedios (Barnes y Gonor, 1958), cladoceros (Sterba, 1957), anostracos (Lochhead y Resnes, 1958), ostrácodos (Wey-Goldt, 1961) y copépodos (Carlisle y Pitman, 1961), se han reportado células neurosecretoras en los ganglios supra y subesofágicos (Bern y Hagadorn, 1965). Cabe mencionar

que en el caso de los anostracos los ojos compuestos pedunculados carecen de células neurosecretoras como las que se presentan en los decápodos. Para el caso de los malacostracos, los estudios de neurosecreción se han centrado en los decápodos, y en menor grado en los hoplocáridos e isópodos, en estos (isópodos) o aquellos (decápodos) se ha establecido como uno de los principales centros de almacenamiento y liberación de neurosecreciones al sistema Organo X-Glándula sinusal localizado en los tallos oculares (Bern y Hagadorn, 1965; Cooke y Sullivan, 1982). Otros sitios de liberación son los órganos pericárdicos, el sistema de órganos postcomisurales, y en menor grado, el ganglio supraesofágico y los ganglios torácicos (Carlisle y Knowless, 1953), aunque estos últimos han sido relacionados como una porción de los órganos pericárdicos (Cooke y Sullivan, 1982).

1.1.1 Los Organos Pericárdicos

Los órganos pericárdicos se describieron en 1893 por Johlet y Viallañes (Cooke y Sullivan, 1982), sin embargo, Alejandrowicz desde 1929 y durante la década de los 50's (Citado por Bern y Hagadorn, 1965), estableció la naturaleza de estas estructuras. Están formados por finas ramificaciones de fibras nerviosas que rodean a la cavidad pericárdica, o bien provienen de los plexos de las membranas que llegan a dicha cavidad; ambos tipos se pueden encontrar en un mismo organismo (fig.4). Estas

estructuras son bañadas por la hemolinfa que viene de las branquias al corazón. Se les ha localizado en hoplocáridos, decápodos y anfípodos, y también en isópodos (Cooke y Sullivan, 1982).

Los axones de la segunda raíz del ganglio torácico, provienen de somas de células neurosecretoras que se ramifican en el interior de la cavidad pericárdica, como los órganos pericárdicos propiamente dichos. Estos nervios segmentarios de la segunda raíz son además portadores de nervios excitadores e inhibidores del corazón, así como de los axones motores de los músculos dorsales (Cooke y Sullivan, 1982).

A la fecha se han descrito siete tipos de terminales neurosecretoras en los órganos pericárdicos, basados en el tamaño y número de las vesículas, su densidad electrónica, así como por la forma y tamaño de los gránulos de secreción; en algunos de ellos ha sido posible establecer la naturaleza de las sustancias liberadas (Cooke y Sullivan, 1982). Se ha observado que las secreciones de estas estructuras modifican la frecuencia y amplitud de los latidos del corazón (Alejandrowicz y Carlisle, 1953). Por la localización de estos órganos y la actividad fisiológica observada resulta claro que la principal función de estos órganos es la de regular la frecuencia cardiaca (Bern y Hagadorn, 1965). Pero además, las ramificaciones anteriores descargan sus secreciones a las venas que transportan la hemolinfa del corazón a las branquias y músculos respiratorios,

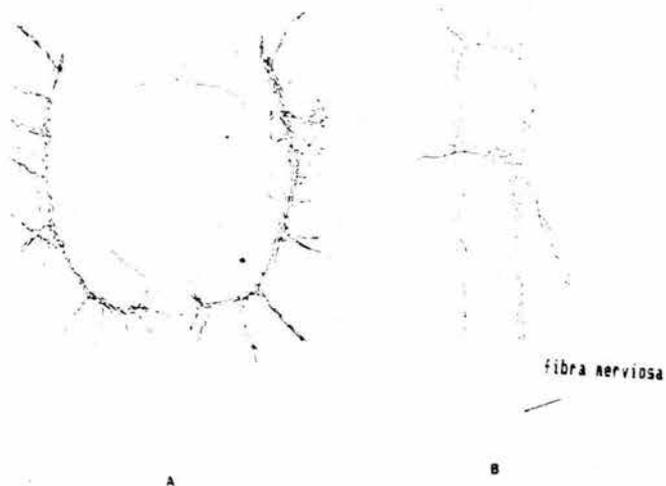


Figura 4. Representación esquemática de los órganos pericárdicos en a) Cangrejo Ermitaño y b) Cangrejo Braquiuro. (Tomado de Bern y Hagadora, 1965).

por lo que es posible que también la actividad respiratoria sea regulada por estos órganos, o bien que la regulación esté dada para facilitar el funcionamiento de las estructuras respiratorias y cardíacas a manera de una sola unidad funcional (Cooke y Sullivan, 1982). Los órganos pericárdicos, parecen ser estructuras neurohemales especializadas en la producción de catecolaminas, fenolaminas y péptidos que son liberadas al torrente sanguíneo como neurohormonas (Cooke y Sullivan, 1982).

Entre las neurohormonas reportadas para estos órganos, se encuentran, la serotonina, la dopamina, la octopamina y algunos péptidos cardioexcitadores; estos últimos dependen para su liberación del calcio iónico extracelular (Cooke y Sullivan, 1982).

1.1.2 Los Organos Postcomisurales

La presencia de los órganos postcomisurales se estableció en la década de los 30's, con el descubrimiento de las cromatoforotropinas en los crustáceos, las cuales se podían obtener en porciones del SNC, a excepción de los tallos oculares (Knowless, 1959) particularmente la región de la comisura tritocerebral, parecía ser una fuente importante de esas hormonas, por lo que Carlisle y Knowless en 1953, establecieron su función como órgano neurohemal. Cooke y Sullivan (1982) señalan que los órganos postcomisurales presentan la morfología típica de un órgano neurohemal, un epineuro y un seno sanguíneo,

a los cuales llegan axones con terminales neurosecretoras abultadas; también poseen la iridiscencia azulosa característica de los órganos neurohemales (fig.5). Los órganos postcomisurales se han descrito en Penaeus brasiliensis, Palaemon serratus (Carlisle y Knowless, 1953), y en Pachigrapsus crasipes (Maynard y Maynard, 1962) dentro de los decápodos; así como en Squilla mantis (Carlisle y Knowless, 1959).

La única actividad asociada a los órganos postcomisurales, en peneidos y carideos, es un factor que induce la concentración de los pigmentos en los cromatóforos blancos; otros factores, como el factor de la dispersión del pigmento rojo, se ha localizado en la región en que se encuentran los órganos postcomisurales.

Es relativamente poco lo que se conoce acerca de las células secretoras del GSpE. Se han descrito tres tipos celulares para los braquiuros (Bliss y Welsh, 1954), solamente dos tipos para el acocil (Durand, 1956). Los sitios de liberación han sido parcialmente elucidados, ya que se han sugerido axones que van al sistema OX-GS y a los órganos pericárdicos (Bliss y Welsh, 1954; Carlisle y Knowless, 1959; McLaughlin, 1982).

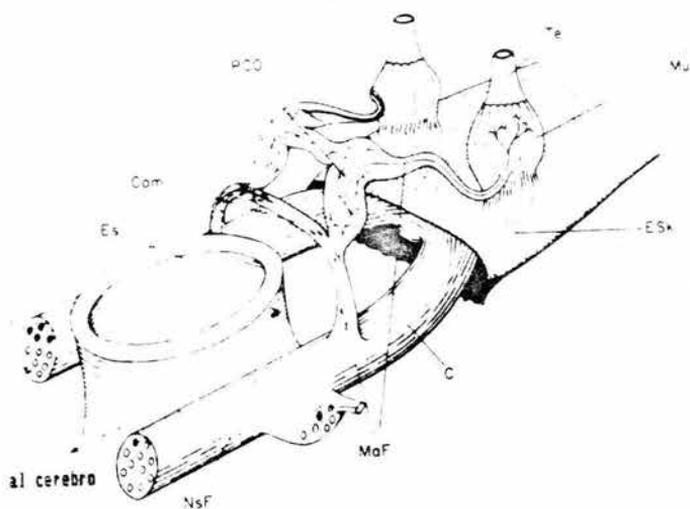


Figura 5. Esquema que muestra a los órganos postcomisurales tal como se observan en Palaemon serratus. NsF, fibra neurosecretora; MaF, fibra motora; C, conexión circunoesofágica; Com, comisura; PCO, órgano postcomisural; Es, esfago; Mu, músculo, Te, tendón, ESK, esqueleto endofraqueal.
(Tomado de Cooke y Sullivan, 1982).

1.1.3 El Sistema Organo X-Glándula Sinusal (GS)

El tallo ocular (TO) (fig.6) de los crustáceos, es un órgano complejo que contiene a las estructuras visuales, así como a otras que se han asociado con funciones olfativas (Horridge, 1965), mecanorreceptoras (Kaestner, 1970) y neurosecretoras (Carlisle y Knowless, 1953).

El TO de los crustáceos con ojos compuestos pedunculados, presenta neuropilos bien definidos, de él se pueden identificar a la Lámina Ganglionar, la Médula externa, la Médula Interna, la Médula Terminal y el Cuerpo Hemielipsoide. Por lo general, entre la médula externa y la interna, es posible encontrar a la GS (Hanström, 1933; citado por Bern y Hagadorn, 1965), esta estructura está formada por terminales nerviosas que provienen del organo-X ganglionar de la médula terminal (Horridge, 1965; Andrew y Saleudin, 1978).

Hanström en 1933, describió una estructura con aspecto semejante al del tejido endócrino, profusamente irrigada a la que denominó Glándula Sanguínea o Glándula Sinusal; actualmente se sabe que está formada por terminales nerviosas, encargadas del almacenamiento y liberación de neurohormonas, así como por células gliales, cuya función específica aún se desconoce.

La GS, probablemente sea homóloga a otras vías neurosecretoras protocefálicas presentes en otros grupos de artrópodos (Cooke y Sullivan, 1982), siendo el principal centro

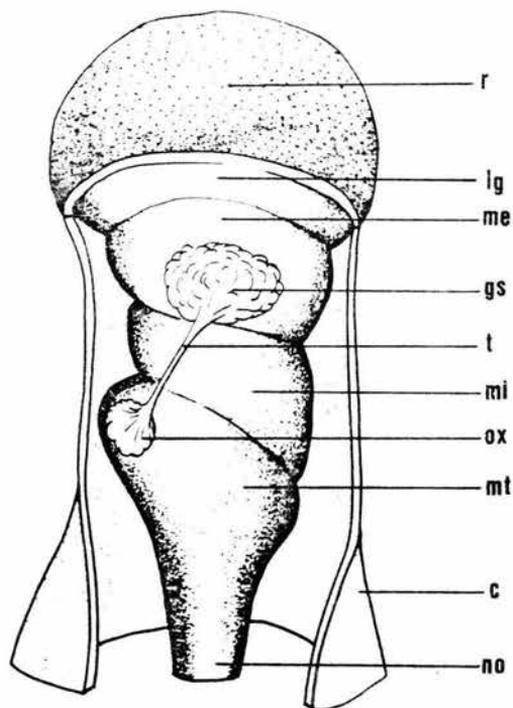


Figura 6. Esquema de tallo ocular aislado, como se observa en *Procambarus clarkii*. c, cutícula; gs, glándula sinusal; lg, lignina ganglionar; me, médula externa; mi, médula interna; mt, médula terminal; no, nervio óptico; ox, Órgano X; r, retina; t, tracto OX-GS.
(En colaboración con Vélez, C.).

de almacenamiento y liberación de hormonas en los malacostracos. Se ha observado que interviene en los procesos de muda, crecimiento, madurez sexual y regulación del metabolismo, así como en las adaptaciones de las funciones metabólicas como respuesta a estímulos medioambientales, como la regulación de los niveles de glucosa en la hemolinfa, o bien, participando en cambios miméticos, también interviene en la regulación de la ritmicidad circadiana del animal (Aréchiga, 1977).

La GS se ha observado únicamente en los malacostracos por Hanström, excepto en Leptostraca, Syncarida y Cumacea desde 1948 (Citado por Bern y Hagadorn, 1965). En su forma más simple, la GS es un delgado disco sobre el neurilema de la médula terminal, bordeando a un seno sanguíneo, del cual está separado por una delgada membrana. En las formas superiores (Decapoda), esta estructura es más elaborada, como resultado de las invaginaciones a manera de copas y sus ramificaciones a lo largo de canales sanguíneos. Hanström en 1948 reporta que el sistema que presentan los Astacura es el más complejo (Citado por Horridge, 1965). Curiosamente la GS está ausente en los isópodos parásitos (Oguro, 1961). En la mayoría de los grupos estudiados se presentan un par de glándulas, siempre en estrecha asociación con los centros ópticos. La relación funcional entre los sistemas secretor y visual de cada ojo, es motivo en la actualidad de diversos estudios (Blázquez y cols., 1986).

1.1.3.1 Características Morfológicas de la GS

En su forma más general, la GS es un agregado de terminales axónicas de células neurosecretoras del TO y probablemente de sus alrededores (Bliss y Welsh, 1954). A través de diversos estudios mediante microscopía de luz y electrónica, así como por técnicas histoquímicas, ha sido posible averiguar algunas de sus características.

La GS está constituida por terminales neurosecretoras provenientes, en su mayoría, de somas localizados principalmente en la médula terminal (Andrew, Orchard y Saleudin, 1978) formando el Organo X Ganglionar de la Médula Terminal (OXGMT). Sin embargo, se ha postulado desde el pasado la posibilidad de que la GS reciba vías neurosecretoras del cerebro, ganglios conectivos y torácicos y de otros centros ópticos (Bern y Hagadorn, 1965); de estas vías, algunas identificadas en años recientes, solamente las provenientes del OXGMT poseen gránulos de secreción (Strolenberg y cols., 1977).

Se ha propuesto también que las terminales nerviosas tienden a estar agrupadas, al menos para algunas especies, por su tipo celular y posiblemente por su función (Bern y Hagadorn, 1965), como ha sido demostrado parcialmente por técnicas histoquímicas para el caso de la muda (Rehm, 1959). Potter (1958) relaciona seis tipos de axones con seis tipos de células neurosecretoras, que ocupan posiciones características en el OXGMT. La hipótesis de que cada tipo celular produce una

secreción específica se ve apoyada por la microscopía electrónica, por la que se pueden separar las diferentes estirpes celulares a través de las características de los gránulos de secreción, ya que cada axón tiende a contener gránulos de un sólo tipo (Hodge y Chapman, 1958). Aunque algunos estudios muestran gránulos de distinta naturaleza cuando son tratados por técnicas inmunohistoquímicas (Jaros, 1985). Así, aún no ha sido posible establecer la relación entre el tipo de gránulo y la naturaleza de la neurosecreción.

El examen de las granulaciones presentes en las diversas terminales, sugiere que su número varía de acuerdo al sexo y a la especie de que se trate (Tabla I), aún cuando sobre lo anterior no hay un acuerdo unánime (Strolenberg y cols., 1977). El contenido de las granulaciones es liberado por excitación, lo que ha sido demostrado por criofractura (Shivers, 1976). En cada terminal el número de éstas disminuye, además pueden observarse miofibrillas en la porción preterminal del axón (Hodge y Chapman, 1958), lo que puede estar relacionado con un transporte axoplásmico de estas sustancias (García, 1982). Las células de la glía se encuentran distribuidas irregularmente y su influencia sobre la actividad secretora se desconoce (Strolenberg y cols., 1977).

Existen en el TO diversas estructuras designadas con el nombre genérico de "Órgano X". Esencialmente son dos tipos de células, aquellos que corresponden a los llamados órganos-X

Tabla I

NUMERO DE GRANULOS IDENTIFICADOS EN LA GLANDULA SINUSAL
DE ALGUNOS MALACOSTRACOS

ESPECIE	GRANULOS	AUTOR
<u>Gecarcinus lateralis</u>	2	Hodge y Chapman, 1958
<u>Gecarcinus lateralis</u>	2	Wietzman, 1969
<u>Squilla mantis</u>	2	Knowles, 1959
<u>Cambarellus shufledi</u>	3	Fingerman y Aoto, 1959
<u>Ortconectes nais</u>	3	Shivers, 1957
<u>Carcinus maenas</u>	3	Meusy, 1958
<u>Porcellio dilatatus</u>	3	Martin, 1972
<u>Pachigrapsus marmoratus</u>	4	Bresac, 1976
<u>Palaemon pansidens</u>	4	Hissano, 1976
<u>Procambarus clarkii</u>	5	Bunt y Ashby, 1967
<u>Carcinus maenas</u>	5	Smith, 1974
<u>Uca pugnax</u>	5	Silversthorh, 1975
<u>Astacus leptodactylus</u>	5	Strolenberg y cols., 1977
<u>Callinectes sapidus</u>	7	Andrew y Saleudin, 1977

Tomado de Strolenberg y cols., 1977

ganglionares (OXG), y aquellos que forman al órgano-X del poro sensorial (OXPS), también llamado Papila Sensorial del Órgano-X (Carlisle y Passano, 1953). Estas dos estructuras pueden encontrarse unidas sobre la médula terminal, lo cual es común en Astacura, Palinura, Thalassinoida y Anomura; pero especialmente en los Brachyura, en los que la papila sensorial está reducida o ausente. En algunos malacostracos (Stomatopoda, Penaeida, Caridea y Stenopodidea) la papila sensorial está separada del órgano-X ganglionar.

El OXG está compuesto totalmente por células neurosecretoras, el más prominente de ellos es el OXGMT, y se presenta consistentemente en los diversos grupos estudiados, también se ha descrito al Órgano-X Ganglionar de la Médula Interna (OXGMI) y el de la Médula Externa (OXGME); también se presentan células neurosecretoras solitarias esparcidas en el lóbulo óptico (Bern y Hagadorn, 1965). En Callinectes y Carcinides, la mayoría de las células neurosecretoras están en el OXGMT, de los que se pueden distinguir seis tipos celulares por sus características tintoriales. En Pandalus, donde se puede encontrar al OXGMI y al OXGME se presentan dos estirpes celulares en el primero, otras dos en el segundo y tres en el OXGMT (Bern y Hagadorn, 1965). Como ya se mencionó, son los axones del OXGMT los que contribuyen principalmente a formar el tracto OX-GS. El OXGMT también manda axones al OXPS, cuando éste se encuentra presente (Bern y Hagadorn, 1965); así como fibras que muy probablemente van al lóbulo óptico en el cerebro (Jaros,

1978) en tanto que el OXGMI y el OXGME, cuando están presentes exclusivamente mandan sus axones a la GS.

En el acocil Orconectes virilis, el OXGMT está constituido por alrededor de 115 cuerpos celulares (Andrew, Orchard y Saleudin, 1978). En general, se han descrito de tres a seis tipos celulares en el OXGMT (Tabla II); en cuanto a los gránulos secretores, éstos son evidentes tanto en el OXGMT, como en el tracto OX-GS y en la GS para cada célula, lo que parece indicar, que por lo menos algunas de las sustancias contenidas en los gránulos son producidas en el mismo OXGMT y transportadas a la GS donde son almacenadas y liberadas, dicho transporte axoplásmico es al parecer de tipo rápido (García, 1982).

1.1.3.2 Características Neuroquímicas

El sistema OXMT-GS es uno de los principales centros de control neuroendócrino del animal. Las hormonas, de naturaleza péptidica, son liberadas de la GS a la circulación actuando sobre diversas estructuras, aunque es probable que existan otros sitios de liberación.

Hasta el momento se han caracterizado las siguientes hormonas: a) Hormona Hiperglucemiante (HG). Es un péptido no dializable, de PM 6400-7400, es inactivado por quimiotripsina, pepsina y pronasa. La administración de extractos de TO produce, en animales normales, la hiperglucemia y la glucogenolisis en

TABLA II

CUERPOS CELULARES NEUROSECRETORES EN EL
TALLO OCULAR DE ALGUNOS DECAPODOS

ESPECIE	CANTIDAD	AUTOR
<u>Sesarma dehaani</u>	3	Enami, 1951
<u>Sesarma dehaani</u>	3	Carlisle y Pasano, 1953
<u>Sesarma dehaani</u>	5	Bliss, Durand y Welsh, 1954
<u>Ortognectes virilis</u>	4	Durand, 1956
<u>Chionectes opilio</u>	5	Matsumoto, 1958
<u>Carcinus maenas</u>	6	

(Citado por Flores, 1981)

músculo y gónada, e inhibe la transglucosilasa de uridín difosfato (UDPG-GT) (Tomado de Aréchiga, 1977).

b) Hormona Estimulante de la adaptación a la Luz del Pigmento Retiniano Distal (HPDL). Aislada, purificada y descrita por Fernlund en 1971, su estructura es: Asn-Ser-Gli-Met-Ile-Asn-Ser-Ile-Leu-Gli-Ile-Pro-Arg-Val-Met-Thr-Glu-Ala-NH₂; se inactiva con pepsina y quimiotripsina, pero no por papaina ni por tripsina. Los extractos de TO promueven la migración del pigmento retiniano distal a la posición de adaptación a la luz en condiciones de adaptación a la obscuridad (Kleinholz, 1976).

c) Hormona Concentradora de Eritróforos (HCE). Ha sido descrita y caracterizada por Fernlund en 1974 (a y b). Es un octapéptido, termoestable con un PM de aproximadamente 1000 su estructura es: pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gli-Trp-NH₂, es inactivado por pepsina, papaina y quimiotripsina. Los extractos de TO promueven la concentración de los pigmentos contenidos en los eritróforos tegumentarios, la supresión del riego sanguíneo o la extirpación de los TO's anulan la respuesta fotomotora (Josefsson y Kleinholz, 1964).

d) Hormona Neurodepresora (HND). Es un péptido dializable y termoestable, inactivado por tripsina, con un PM de aproximadamente 1500, está compuesta por los siguientes aminoácidos: Asp, Ser, Pro, Gli, Ala, Val, Leu, Thr, Ile y Arg. La Extirpación de los TO's producen hiperactividad locomotora, la inyección de extractos de TO la inhiben, la estimulación de la GS libera una substancia que reproduce los mismos efectos del

extracto crudo, esta misma substancia se encuentra presente en la hemolinfa (Aréchiga, 1977; Aréchiga, Huberman y Mtz-Palomo, 1977; Aréchiga, García y Rodríguez-Sosa, 1985).

Existen otros efectos inducidos por la extirpación de los TO's, o por inyección de extractos de los mismos, entre éstos encontramos: La inhibición de la muda (Pasanno, 1960; Cooke y Sullivan, 1982); la dispersión y concentración de leucóforos tegumentarios; dispersión de melanóforos y eritróforos; la adaptación a la obscuridad del pigmento retiniano distal; la depresión de la síntesis de lípidos; la hipernatremia; la depresión y estimulación de la respiración (Aréchiga, 1977); así como la regulación del metabolismo de las proteínas y carbohidratos, regulación hidromineral, inhibición gonadal, control de crecimiento de apéndices, etc. (Cooke y Sullivan, 1982).

1.1.3.3 Características eletrofisiológicas

El sistema neurosecretor se encuentra formado por células nerviosas especializadas; estas células conservan las propiedades generales de toda neurona, sin embargo, presentan algunas diferencias eletrofisiológicas con las neuronas no secretoras, entre ellos la base iónica de sus potenciales y la duración de los mismos (Iwasaki y Satow, 1969; 1970; 1971; Iwasaki y cols., 1973; Cooke, 1977; Cooke y cols., 1977). Algunas de estas diferencias se encuentran relacionadas probablemente con el fenómeno de secreción.

En la GS de diversas especies de crustáceos, se ha documentado la presencia de actividad eléctrica espontánea; esta actividad ha sido estudiada empleando para ello tanto el registro intracelular (Iwasaki y Satow, 1969; Cooke y cols., 1977), como el extracelular (Flores, 1981). En el acocil Procambarus clarkii la amplitud de estas señales es de entre 40 y 75 mV, cuando se emplean microelectrodos, y de entre 50 y 400 uV con el registro extracelular. Se han descrito potenciales rápidos seguidos de uno o varios potenciales lentos, lo que se ha interpretado como potenciales de acción de origen axónico dependientes de la activación de canales de sodio que provocan la aparición de potenciales lentos en las terminales dependientes de canales de calcio (Cooke, 1977).

Se ha documentado además una correlación entre la depolarización de las terminales y la liberación de algunas hormonas, tal es el caso de la liberación inducida por la aplicación de pulsos de corriente o por incubación en un medio con potasio para la HCE (Cooke, 1977), y la HND (Aréchiga, Huberman y Martínez-Palomo, 1977). Adicionalmente se ha establecido esta relación para la actividad eléctrica espontánea y la liberación de HND (Flores, 1981).

En la GS de los cangrejos, la frecuencia de la actividad eléctrica se ve afectada por la disminución del calcio extracelular (Cooke, 1977), lo que ha servido como elemento para postular su dependencia a este ión, en los trabajos de este

autor, se observa que la actividad eléctrica se ve notablemente afectada por la ausencia de calcio extracelular.

La actividad eléctrica en la GS del acocil, se origina fuera de las terminales, ya que es abolida por el empleo de soluciones en las que se substituye el sodio por cloruro de colina, o por la sección del tracto OX-GS; postulandose que probablemente esta actividad se origina en un área cercana al soma neuronal (Flores, 1981). Asimismo, existen evidencias empleando técnicas de criofractura y tinciones con amarillo lucifer, de uniones comunicantes tanto en el OX como en la GS, (Aréchiga, Chavez y Glantz, 1985). Por otro lado, existen evidencias de posibles acoples entre las GS's de ambos TO's (Chiang y Steel, 1985).

Se han descrito diferentes tipos de potenciales de acción en la GS del acocil, los cuales pueden ser agrupados en poblaciones, con base a los criterios de amplitud, forma de onda, duración y frecuencia de disparo. A partir de estos datos se han descrito, en principio, seis poblaciones de potenciales de acción, obtenidos con el registro extracelular (Flores, 1981). Se ha observado, además, que la frecuencia de disparo de la actividad eléctrica de la GS se ve modificada por la temperatura, lo que sugiere que este fenómeno es dependiente del metabolismo celular; siendo de entre 16°C y 20°C la temperatura para obtener una frecuencia de disparo óptima (Flores, 1981).

Las características de las sustancias liberadas y los propios patrones de liberación, sugieren que deben existir mecanismos integrativos de gran complejidad dentro del SNC que asumen el control de la liberación de estas neurosecreciones. Para ello se han propuesto mecanismos de control sináptico y no sináptico que gobiernan la actividad de estas neuronas. En el primer caso, hay evidencias de que los potenciales de acción de neuronas secretoras inducen la liberación de las hormonas contenidas en sus terminales. Morfológicamente, se conoce la existencia de fibras colaterales en los axones que forman el tracto OX-GS de algunos astácidos (Andrew, Orchard y Saleudin, 1978). La presencia de estas fibras, sugiere que pudieran ser una de las vías de control sináptico de las células neurosecretoras del TO (Cooke y Sullivan, 1982). Cabe mencionar que hay evidencias de potenciales sinápticos en células del OXGMT-GS (Iwasaki y Satow, 1970; 1971), estos autores muestran que mediante la estimulación del nervio óptico es posible registrar potenciales postsinápticos inhibitorios. por otro lado, se han observado algunas células del órgano X que son inexcitables y eléctricamente silentes (Cooke y Sullivan, 1982), así como neuronas que responden con potenciales en forma de ráfagas (Iwasaki y Satow, 1969).

La activación sináptica de células secretoras implica la presencia de receptores postsinápticos específicos que respondan a neurotransmisores. En preparaciones aisladas de OX-GS de cangrejo se ha evaluado la sensibilidad a algunos agentes (Cooke

y Sullivan, 1982), entre los que sobresalen los efectos de la serotonina (5-HT) y el ácido gama-amino-butírico (GABA). La 5-HT aplicada a los somas, inhibe potenciales de acción espontáneos, utilizando el registro intracelular en Cardisoma y Podophtalmus; cuando se aplica a las terminales, el efecto de la 5-HT, en Cardisoma inhibe potenciales de acción, con un efecto similar al GABA (1×10^{-3}), sin embargo en Podophtalmus se incrementa la actividad eléctrica espontánea. Los sitios farmacológicamente activos pueden los axones colaterales del tracto OX-GS (Cooke y Sullivan, 1982) además, es factible que debido a las diferentes hormonas liberadas, pudieran existir diferentes conexiones sinápticas mediadas por transmisores diversos (Cooke y Sullivan, 1982). Además, puede ser que estos posibles transmisores estén involucrados en otras actividades, como para el caso de las encefalinas la modificación de la velocidad de adaptación a la obscuridad del electroretinograma (Freijo, 1986); esto sugiere la posibilidad en los crustáceos de sistemas peptidérgicos que controlen la secreción de péptidos como se ha observado en algunos vertebrados (Aréchiga, García y Rodríguez-Sosa, 1985)

Entre las evidencias de control no-sináptico de la neurosecreción, se ha propuesto que las células secretoras pueden regularse a si mismas, constituyendose como su propio receptor, integrador e iniciador de la actividad (Cooke y Sullivan, 1982). Por ejemplo, se desconoce el mecanismo por medio del cual se regulan los niveles de glucosa en la hemolinfa, por lo que la autorregulación de estas células podría

ser postulado (Cooke y Sullivan, 1982). Asimismo, algunas observaciones directas e indirectas sugieren que estímulos externos como la luz, disparan los mecanismos de control hormonal (Glantz, Kirk y Aréchiga, 1983), como ha sido demostrado para la HPDL durante el ciclo nictameral en Procambarus bouvieri (Aréchiga y Mena, 1975); así pues, es factible suponer la existencia de mecanismos de liberación en los que el estímulo externo sea la ausencia de luz (obscuridad) para péptidos, como la HCE, que son liberados durante el periodo de obscuridad (Aréchiga, García y Rodríguez-Sosa, 1985).

Por otro lado, la actividad de las células neurosecretoras en el TO puede ser modulada trans-sinápticamente por dos vías: a) El sistema visual intrínseco del TO, y b) Por otras influencias aferentes que convergen por canales multisensoriales representados por el vasto número de células eferentes del nervio óptico, asimismo, se ha postulado que influencias extrarretinales pueden modular liberación de neurohormonas del TO (Aréchiga, García y Rodríguez-Sosa, 1985).

2. OBJETIVOS

El estudio de las propiedades electrofisiológicas de la GS, podría contribuir a la comprensión de algunos de los fenómenos de la actividad secretora. El sistema OX-GS regula una parte importante de las funciones endócrinas en los crustáceos decápodos, sin embargo, aún existen serias dudas sobre las características y el papel que la actividad eléctrica tiene en este sistema.

Los objetivos que se persiguen en la presente tesis son los siguientes:

1.- Proseguir con la caracterización de la actividad eléctrica espontánea de la GS del acocil Procambarus clarkii en preparaciones aisladas, empleando el sistema de registro extracelular.

2.- Analizar los patrones de actividad de las diversas poblaciones de potenciales de acción, mediante registros de 24 horas.

3.- Evaluar de manera preliminar el posible efecto de neurotransmisores sobre esta actividad espontánea.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Organismos

Los experimentos se realizaron en acociles de la especie Procambarus clarkii Girard (Crustacea, Decapoda) (fig.7), colectados a lo largo de todo el año en el Río Conchos, en el estado de Chihuahua. Se utilizaron organismos adultos, sin distinción de sexo y en etapas C o D del ciclo de intermuda de acuerdo al modelo propuesto por Drach en 1939 (Drach y Tchernigovtzeff, 1967). Los animales fueron sometidos a las condiciones de laboratorio, para lo cual fueron depositados en estanques de plástico transparente de 50 X 30 cm, a temperatura ambiente y con ciclos naturales de luz y oscuridad. Este proceso de aclimatación tuvo una duración mínima de siete días previos a la manipulación experimental.

3.2 Obtención de la Preparación

Mediante la sección con tijeras finas se obtuvieron los pedúnculos oculares. Después de lo cual y a lo largo de todo el experimento, fueron sumergidos en solución salina isotónica para crustáceos dulceacuícolas (Van Harreveld, 1936). A continuación se produjo la fractura del exoesqueleto, seccionándose las inserciones musculares con la cutícula. Se eliminaron las fibras musculares, capas pigmentarias y tejido conjuntivo. Utilizando pinzas de relojero y bisturí, se dejó al descubierto a la GS, que se encuentra rodeada por capas de tejido conjuntivo

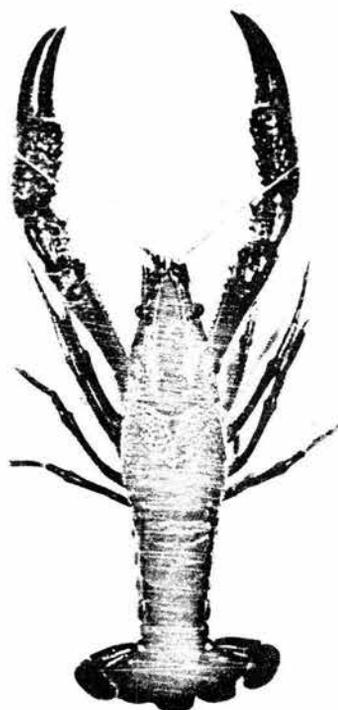


Figura 7. Acocil Procambarus clarkii Girard (Crustacea, Decapoda), colectado en el Rfo Conchos en el Estado de Chihuahua.

esponjoso (Cooke y Sullivan, 1982). La GS es muy evidente debido a su aspecto blanco iridiscente, relacionado probablemente con el material neurosecretor contenido en el interior de las terminales (Cooke, 1977) (fig.8). Posteriormente, las preparaciones se mantuvieron a 16°C y en oscuridad constante durante 30 minutos. Pasado este período, la preparación se colocó en una cámara de lucita con fondo de silgard, a la cual se le hizo pasar un flujo constante de solución Van Harreveld. El TO se fijó a la cámara con ayuda de alfileres entomológicos de acero inoxidable del número 00. Posteriormente se colocó un electrodo de aspiración fabricado a partir de tubos capilares de vidrio, no heparinizados, estirados por calentamiento y con un diámetro en la punta de aproximadamente 100 μm , con una resistencia de entrada despreciable respecto a la de los amplificadores; la preparación se mantuvo con el flujo cerrado en los primeros 30 minutos después de colocado el electrodo con el fin de obtener un buen sello entre éste y las terminales nerviosas.

El tiempo desde que se realizó la ablación de los pedúnculos oculares hasta la aplicación del electrodo fue de aproximadamente 45 a 60 minutos. Las disecciones se llevaron a cabo generalmente, entre las 12:00 y las 13:00 hrs.

3.3 Sistema de Registro

Las señales eléctricas fueron obtenidas mediante sistemas de amplificación y registro convencionales (fig.9). Se utilizó,

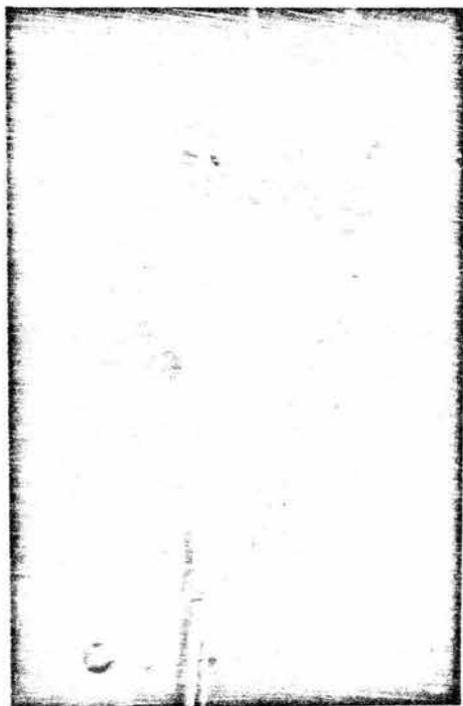


Figura 8. Fotografía del tallo ocular aislado tal como se observa después de aplicar el electrodo de aspiración. Se aprecia claramente la forma y disposición de la glándula sialusal.

un osciloscopio de rayos catódicos con una impedancia de 1 megaohm (Tektronix 5223), amplificadores de fisiógrafo (Narco-Biosystems 7070), acopladores de alta ganancia ($z = 10$ megaohm) Narco-Biosystems 7171 y un fisiógrafo (Narco-Biosystems Desk DMP-4b), así como una grabadora de registro fisiológico (Vetter, 4d).

Las señales registradas se capturaron al azar, determinando los siguientes parámetros: duración, amplitud, forma de onda y frecuencia de los potenciales espontáneos (fig. 10). Además para su análisis, los datos fueron almacenados en papel, cinta magnética y registro fotográfico.

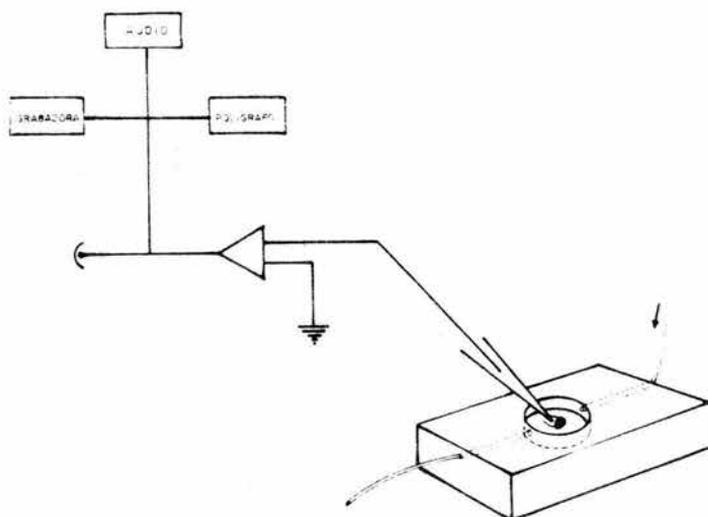


Figura 9. Diagrama que muestra la disposición del sistema de registro empleado, las flechas indican la dirección del flujo de la solución salina.

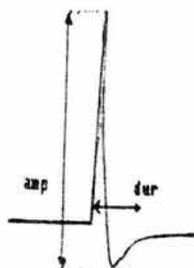


Figura 10. Fotografía en la que se muestra como se determinaron los parámetros de duración y amplitud. Amp = Amplitud; Dur = Duración.

4. RESULTADOS

4.1 LA ACTIVIDAD ELECTRICA ESPONTANEA DE LA GLANDULA SINUSAL

Uno de los aspectos cuyo esclarecimiento era obligatorio, fue demostrar que lo que se estaba registrando eran efectivamente señales biológicas y no artefactos o ruido provenientes del sistema de registro. En la figura 11 se muestran, en la porción de la izquierda, registros en los que se colocó el electrodo en el baño, y a la derecha, se presenta el registro tomado inmediatamente después de colocar el electrodo en la porción central de la GS.

Se observa, en primer término, que al colocar el electrodo en el baño, se obtiene un registro muy estable de la banda de ruido, con una amplitud de 40 uV. Al colocar el electrodo en la GS, de inmediato se observa la aparición de una serie de espigas que muestran diferentes amplitudes y duraciones, y que son claramente diferenciables de la banda de ruido; asimismo, se observa que la amplitud de la banda de ruido en algunos casos cambia. Además aparecen trenes de actividad caracterizados por ráfagas de potenciales, como se verá más adelante (fig.15).

Los experimentos colocando en forma alternada el electrodo en el baño y en la GS, muestran que las señales registradas no son artefactos provenientes del sistema de registro, sino

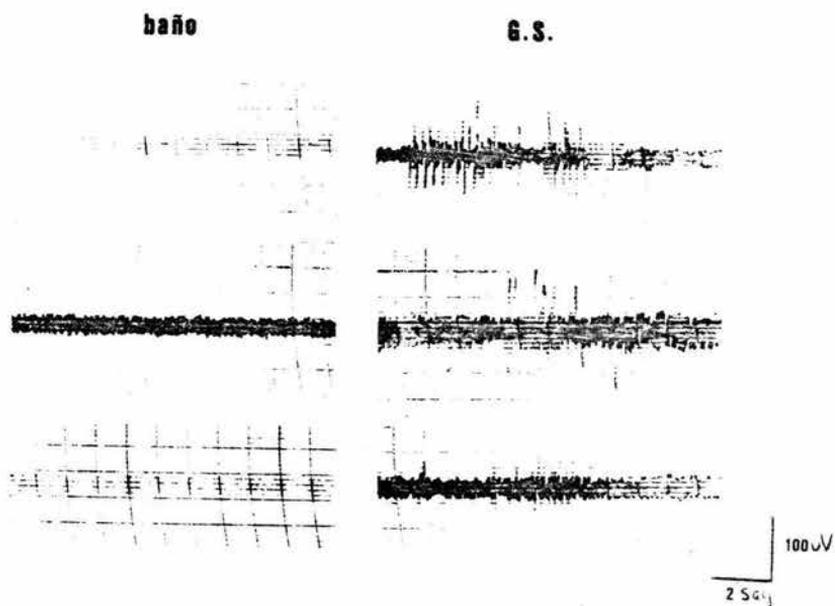


Figura 11. Diferentes registros en papel de la actividad eléctrica espontánea de la GS del acocil cuando se coloca el electrodo en el baño (izquierda) y cuando se coloca en la glándula sinusal (derecha), en este caso se aprecian claramente los potenciales de acción.

potenciales de acción resultado de la actividad eléctrica espontánea de la GS.

4.1.1 Algunas características de la Actividad Eléctrica Espontánea

En la figura 12 se muestran diferentes registros de la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal del acocil obtenidos mediante técnicas extracelulares. En el trazo superior se presenta el tipo de registros tomados de un osciloscopio de rayos catódicos (ORC), y en el trazo inferior se muestra la fotografía de un registro en papel de un fisiógrafo. En ambos casos, resulta evidente la existencia de señales que sobresalen de la banda de ruido; por otro lado, se puede apreciar que estas señales no son similares entre sí, sino que es posible separar unas de otras a partir de criterios como la forma de onda, la amplitud, la frecuencia y la duración. En el registro tomado del ORC se observan con mayor claridad las señales puesto que el poder de resolución en voltaje y en tiempo de este aparato es mayor que el del fisiógrafo, ya que la propia inercia de la plumilla puede provocar distorsiones en la morfología de las señales.

4.1.2 Influencia del sistema de perfusión

En la figura 13 se muestra el efecto mecánico provocado al realizar cambios en el flujo, los experimentos consistieron en tomar registros de la actividad eléctrica de la glándula sinusal

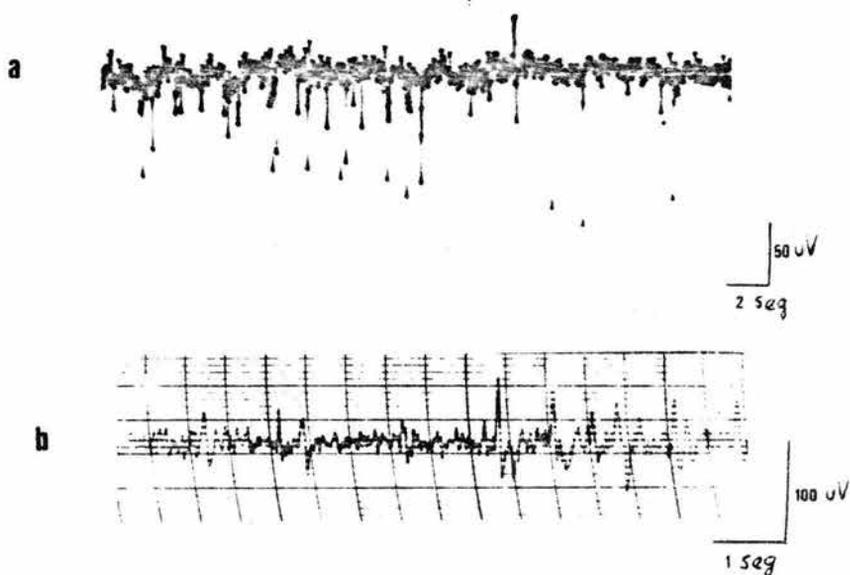


Figura 12. Registros extracelulares de la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal del acocil, obtenidos en a) el Osciloscopio de rayos catódicos, y b) en el fisiógrafo.

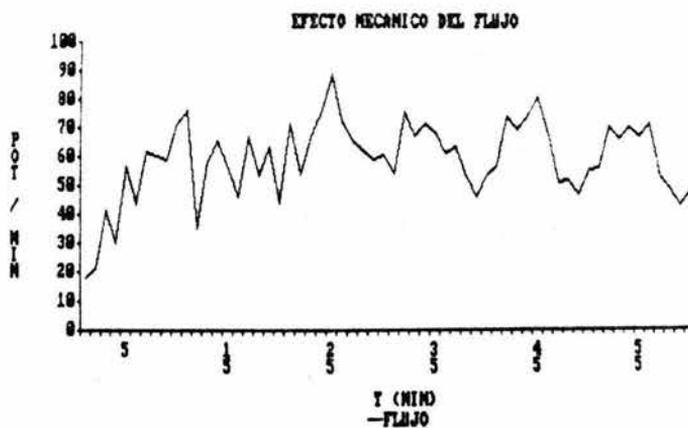


Figura 13. Modificaciones en la actividad eléctrica espontánea por efecto mecánico del flujo de perfusión (Absisas, tiempo en minutos; Ordenadas potenciales por minuto).

en condiciones en las que modifica el flujo del sistema de perfusión, y observar las posibles modificaciones en el registro de la actividad espontánea.

En la figura, se grafica, el número de potenciales aparecidos por minuto, cuantificado durante 60 minutos manteniendo el flujo abierto.

En la mayoría de los experimentos, el dispositivo del sistema de perfusión dependió de la acción de la gravedad para vaciar continuamente la cámara para órgano aislado, por lo que el volumen de la misma, no permaneció constante durante todo el experimento, sino que presentó algunas oscilaciones, y por lo tanto el registro extracelular resulta relativamente afectado, como se aprecia en la figura. En el resto de los experimentos se acopló un sistema de succión por vacío a la cámara con la finalidad de que se mantuviera un volumen constante en la misma.

4.1.3 Actividad Eléctrica en Diferentes Especies de Crustáceos

En la figura 14 se ilustran los registros obtenidos en dos especies de crustáceos dulceacuicolas. Uno de ellos corresponde a Procambarus clarkii y la otra a una especie no identificada de la familia Astacidae, ambos fueron colectados en el Río Conchos. Además la actividad fue detectada en Procambarus bouvieri, de Uruapan, Mich.; y dos especies de decápodos marinos que corresponden al camarón Penaeus setiferus y al cangrejo Ocypode albicans, colectados en las costas de Veracruz. Lo anterior pone

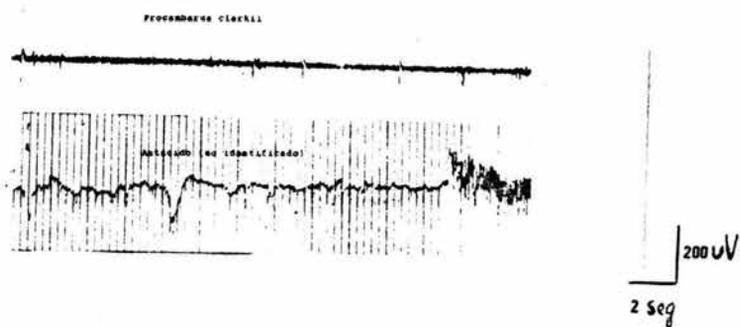


Figura 14. Registro extracelular tomado del fisiógrafo que muestra la actividad eléctrica espontánea de dos diferentes especies de crustáceos decápodos.

de manifiesto que la actividad estudiada se presenta en una amplia gama de crustáceos y valida la técnica de registro empleado, ya que esta actividad es similar a la reportada por otros autores.

4.1.4 Trenes de Actividad

A lo largo de los diferentes experimentos, en algunos casos se observó la aparición de trenes de actividad para los diferentes potenciales. Esta actividad se puede presentar a manera de trenes de pequeños grupos de potenciales, o bien, de una manera sostenida por períodos largos de tiempo. Asimismo, el efecto de algunas substancias puede provocar la aparición de este tipo de actividad.

En la figura 15 se presentan fragmentos de la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal tomados de los diferentes experimentos en los que se observó esta actividad. En los trazos superiores se muestran trenes de actividad espontáneos obtenidos de preparaciones en las que no se realizaron maniobras experimentales; se puede observar que en la mayoría de los casos, estos trenes están formados por un solo tipo de potencial, en otros es posible observar dos o más tipos de señales (Ver sección 4.2); estos potenciales no son idénticos entre sí, sino que se observan pequeñas variaciones en la amplitud y en la forma de onda.

trenes

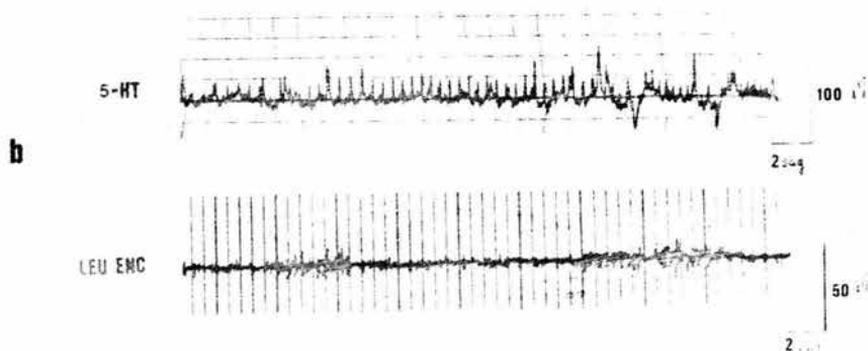
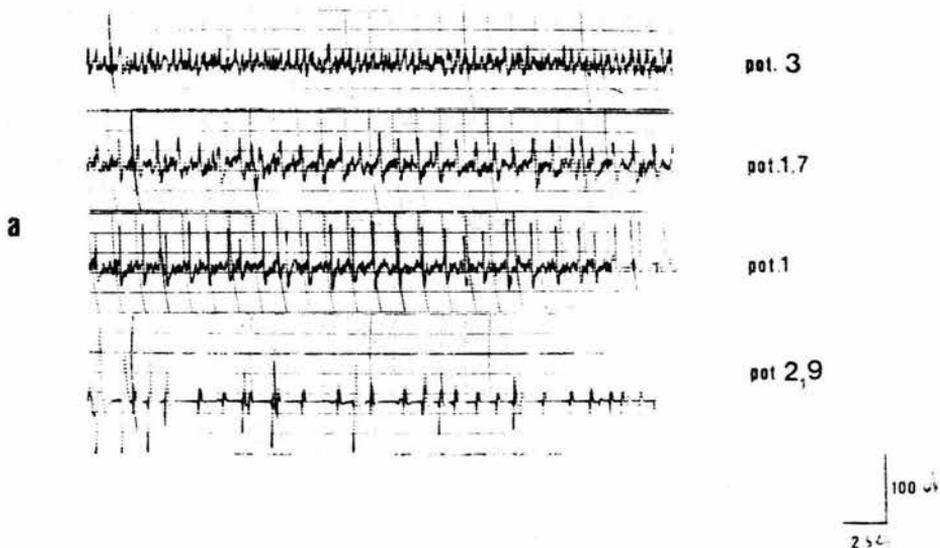


Figura 15. Trenes de actividad espontánea de la glándula sinusal registrados en el fisiógrafo para diferentes señales. a) Sin manipulación experimental; b) Después de la aplicación de serotonina y leucina encefalina 10^{-6} .

En los trazos inferiores se aprecian trenes inducidos por la aplicación de diferentes sustancias como es el caso de la serotonina y de la leucina encefalina, se pueden observar trenes de potenciales tipo 3, cuando se aplica serotonina y potenciales tipo 6 y 9 al aplicar leucina encefalina.

4.1.5 Influencia del Calcio sobre la Actividad Espontánea

Las señales bioeléctricas se caracterizan por la posibilidad de modificarse cuando se alteran las concentraciones de los iones en el medio extracelular. En el caso de las células neurosecretoras, se ha reportado que uno de los iones más importantes es el calcio (Cooke, 1977), que ha sido relacionado con el fenómeno secretor.

En la figura 16 se muestra la modificación en la frecuencia de disparo espontáneo de las terminales que forman a la glándula sinusal, al realizar alteraciones en la concentración del calcio extracelular; para ello se substituyó el calcio externo por cobalto, conservando la molaridad. Para este experimento (120 minutos de duración) se comparó la frecuencia de aparición de los diferentes potenciales de acción en un minuto de registro con solución Van Harreveld, en relación a la que contenía cobalto, determinándose la frecuencia de aparición observada en cada cinco minutos, durante un tiempo total de 35 minutos.

Observando la gráfica de la actividad global, se aprecia que el efecto inicial del cambio de solución es un pequeño

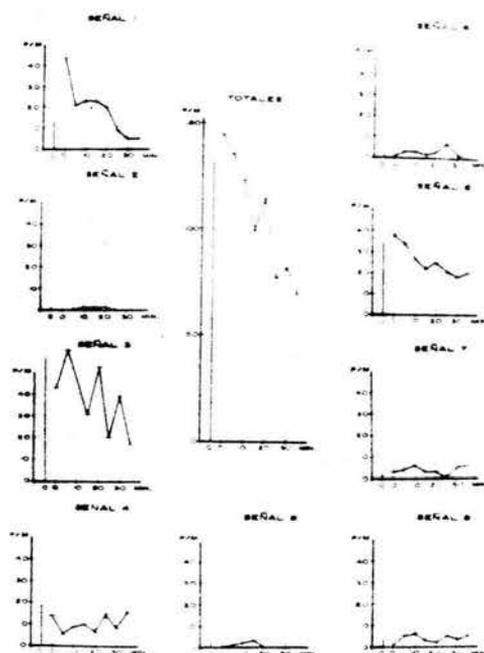


Figura 16. Gráficas que representan la respuesta de la glándula sinusal al substituir el calcio extracelular por cobalto, las señales que constituyen esta figura corresponden a un solo experimento. En cada gráfica está representado el control (c). Ordenadas: potenciales por minuto (P/M), Abcisas: Tiempo (min).

incremento en la frecuencia de disparo de las terminales de la GS; este aumento en la frecuencia desaparece a los pocos minutos, observándose una disminución gradual de la actividad espontánea, este comportamiento es similar al reportado por Cooke, Haylet y Weatherby (1977) debido a la dependencia de la actividad a la presencia de calcio extracelular. Sin embargo, se pueden observar dos picos de actividad en los que se aprecia un aumento transitorio en la frecuencia, aunque no alcanzan los valores iniciales, estos picos se observaron a los 20 y 30 minutos. Al analizar por separado la actividad de cada una de las señales designadas arbitrariamente (ver sección 4.2), se observa que los potenciales 1 y 6 aumentaron su frecuencia como resultado del cambio de soluciones. Los potenciales 3, 4, 8 y 9 presentaron una disminución inicial en su frecuencia. En el caso de los potenciales 2 y 5 no se pueden establecer comparaciones ya que en el testigo no se observaron potenciales de este tipo. En el tiempo cero no se observaron potenciales 2 ni 9.

El comportamiento inicial de cada uno de los potenciales es muy variado; para las señales 1, 4 y 6, la tendencia inicial es una disminución de la frecuencia de disparo en los primeros minutos, en cambio, para las señales tipo 3 y 7 presentan algunos aumentos de su frecuencia desde el tiempo inicial (minuto 0) hasta los primeros 5 minutos o más. Cabe hacer notar que las señales que tuvieron una frecuencia inicial mayor a la del control, son las que mostraron la tendencia, en los primeros minutos, a disminuir la frecuencia de disparo. Lo contrario se

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

incremento en la frecuencia de disparo de las terminales de la GS; este aumento en la frecuencia desaparece a los pocos minutos, observándose una disminución gradual de la actividad espontánea, este comportamiento es similar al reportado por Cooke, Haylet y Weatherby (1977) debido a la dependencia de la actividad a la presencia de calcio extracelular. Sin embargo, se pueden observar dos picos de actividad en los que se aprecia un aumento transitorio en la frecuencia, aunque no alcanzan los valores iniciales, estos picos se observaron a los 20 y 30 minutos. Al analizar por separado la actividad de cada una de las señales designadas arbitrariamente (ver sección 4.2), se observa que los potenciales 1 y 6 aumentaron su frecuencia como resultado del cambio de soluciones. Los potenciales 3, 4, 8 y 9 presentaron una disminución inicial en su frecuencia. En el caso de los potenciales 2 y 5 no se pueden establecer comparaciones ya que en el testigo no se observaron potenciales de este tipo. En el tiempo cero no se observaron potenciales 2 ni 9.

El comportamiento inicial de cada uno de los potenciales es muy variado; para las señales 1, 4 y 6, la tendencia inicial es una disminución de la frecuencia de disparo en los primeros minutos, en cambio, para las señales tipo 3 y 7 presentan algunos aumentos de su frecuencia desde el tiempo inicial (minuto 0) hasta los primeros 5 minutos o más. Cabe hacer notar que las señales que tuvieron una frecuencia inicial mayor a la del control, son las que mostraron la tendencia, en los primeros minutos, a disminuir la frecuencia de disparo. Lo contrario se

observa en las señales que tuvieron una frecuencia inicial menor a la del testigo, ya que éstas tuvieron la tendencia a aumentar su frecuencia de disparo.

De la gráfica de actividad global de la figura 16 se puede apreciar que los picos de actividad ocurridos a los 20 y 30 minutos parece deberse, en el primer caso, al incremento de la frecuencia de los potenciales 3 y 6 principalmente, y en el segundo caso a los potenciales 3 y 7.

De las gráficas de cada una de las señales, se pueden observar potenciales que muestran claramente una disminución de la frecuencia de disparo conforme transcurre el tiempo de exposición al cobalto (potenciales 1, 3 y 6), además se observan otros potenciales que no muestran modificaciones importantes en su frecuencia de disparo (potenciales 4, 5, 7 y 8).

4.2 Parámetros Estudiados.

En esta sección se discutirán algunos datos relacionados con la amplitud, duración y frecuencia de los potenciales registrados. Con este fin, se realizaron experimentos cuyo objetivo fue establecer con precisión los parámetros de cada uno de los potenciales estudiados.

De la observación de los registros, tanto en los trazos del ORC como en los correspondientes al fisiógrafo, se pueden diferenciar varias señales tomando como criterio inicial a la forma de onda que presentan. A cada una de estas señales se les

ha asignado arbitrariamente un número para diferenciarlas de las demás (fig.17), esta asignación fue realizada al azar.

El protocolo experimental fue el siguiente: Una vez obtenidos los registros de la actividad eléctrica espontánea, se tomaron lecturas en la pantalla del osciloscopio utilizando barridos de 50 mseg de duración, producidas de manera aleatoria (fig.17). En cada lectura se determinó el tipo de potencial de acuerdo a la forma de onda; la amplitud de pico a pico, en microvoltios (μV); duración medida desde la línea basal, en milisegundos (mseg), y el número de potenciales que aparecieron por barrido en el ORC, así como el número total de barridos por experimento, para calcular la frecuencia.

Hay que resaltar que el número de potenciales registrados es muy diferente para cada una de las señales, por ejemplo, del potencial 7 se obtuvo en los experimentos realizados una $n = 1185$, mientras que del potencial 9 la n fue de 25, y para la señal 2 fue de 11.

4.2.1 Análisis de la Forma de Onda

En este trabajo hemos decidido utilizar el criterio de forma de onda, entre otros, para identificar a cada una de las señales registradas, en la figura 17 se pueden observar algunos de los potenciales observados en el ORC; los potenciales 2 y 9 se tomaron de registros del fisiógrafo.

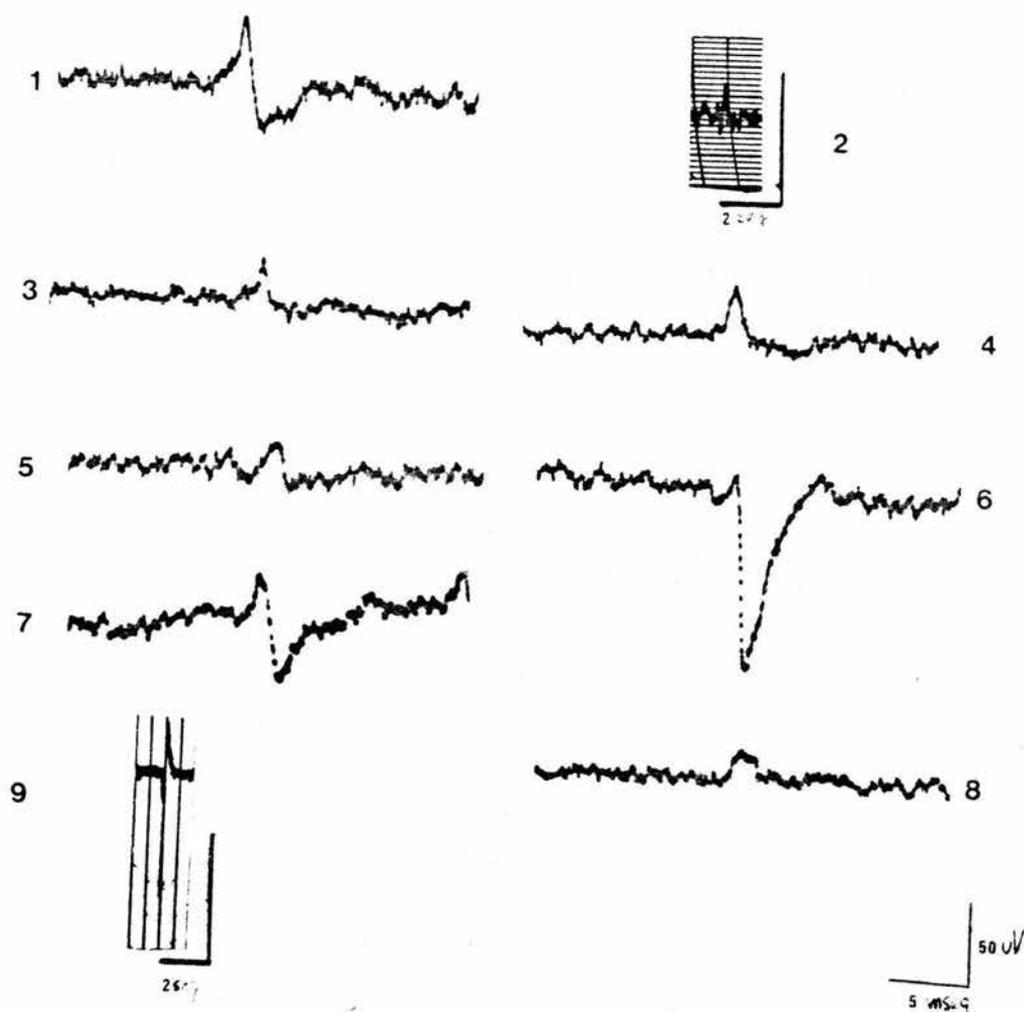


Figura 17. Registros extracelulares de la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal del acocil, en la que se muestran las diferentes señales observadas de acuerdo al criterio de forma de onda, correspondiendo a fotografías directas del osciloscopio, a excepción de las señales 2 y 9, que corresponden a registro en papel.

La señal de tipo 1, se caracteriza por ser una señal bifásica con una deflexión inicial positiva de gran magnitud y de una parte negativa de menor amplitud (en promedio de cerca de la tercera parte del valor del pico positivo).

La señal 2, se caracteriza por ser también bifásica; en este caso se observa una parte inicial negativa seguida de una porción positiva en promedio de magnitud semejante. Esta señal fue una de las más difíciles de observar, ya que su frecuencia de aparición fue una de las más bajas en todos los experimentos.

En contraste, la señal 3 fue una de las más frecuentes en los experimentos, se caracteriza por ser monofásica muy rápida siendo de poca amplitud. La morfología de esta señal es muy similar a la presentada por la señal 4, siendo la única diferencia la duración de las mismas, ya que para esta última la duración promedio es mayor.

La señal 5 es monofásica positiva, siendo más lenta y generalmente de menor amplitud que las señales precedentes.

En el caso de la señal 6, se consideraron a todas aquellas que fueron monofásicas negativas. Si bien en los diferentes experimentos se presenta la misma forma de onda para esta señal, en algunos casos se presenta con pequeñas deflexiones positivas iniciales; además, por las diferencias de amplitud y duración en los diferentes experimentos, no se excluye la posibilidad de que

en este caso se trate de diferentes poblaciones de señales muy similares entre si.

La señal 7 se caracteriza por ser bifásica, teniendo en promedio amplitudes similares en las deflexiones positiva y la negativa. A diferencia de la señal 2, se observa la aparición de la porción positiva previa a la negativa; encontrándose algunas variaciones en los parámetros mencionados para los diferentes experimentos.

La señal 8 es una de las que se pueden diferenciar más fácilmente, esta señal es característica, ya que a primera vista parece ser un pulso cuadrado de poca amplitud y gran rapidez. En algunos casos esta señal es muy similar a la señal 5, siendo el criterio de forma de onda el más efectivo para diferenciarlas.

La señal 9 es quizás la más difícil de observar, ya que no se presentó consistentemente en todos los experimentos. Es una señal bifásica con un componente inicial negativo muy rápido de gran amplitud, seguido de un componente positivo lento de amplitud menor. En algunos experimentos realizados a velocidades de barrido mayores en el ORC, se puede observar entre las dos porciones del potencial, un punto de inflexión, que podría corresponder a dos señales diferentes (tipo 6 y tipo 5), sin embargo, en la mayoría de los casos esta característica no se observó por lo que se le consideró como una señal individual.

El potencial 9 fue el que presentó la mayor amplitud observada, seguido de los potenciales 1, el potencial 7 y el potencial 6. De los potenciales que presentaron amplitudes menores, se observa el potencial 4, el potencial 5, el potencial 3 y el potencial 8; siendo esta última la señal de menor amplitud registrada. El potencial 2 solamente se observó en un experimento de esta serie, presentando una amplitud de 29.10 uV.

En lo que respecta a la duración, los potenciales que presentaron al mayor duración fueron el potencial 9, el potencial 1 y el potencial 2. Las señales restantes se pueden agrupar dentro de un rango que va desde 2.02 mseg a 3.14 mseg. A excepción de la señal 3 que presentó la menor duración (1.92 mseg).

4.2.2 Análisis de la Amplitud

Como se aprecia en la figura 18, se puede observar que el potencial 7 tuvo una amplitud promedio de $54.04 \text{ uV} \pm 0.44 \text{ EE}$ siendo, conjuntamente con el potencial 1 ($50.27 \text{ uV} \pm 1.24 \text{ EE}$), el potencial 6 ($41 \text{ uV} \pm 0.76 \text{ EE}$) y el potencial 9 ($77.60 \text{ uV} \pm 9.28 \text{ EE}$) las señales que presentaron la mayor amplitud. Entre los potenciales que presentaron amplitudes menores se cuentan el potencial 4, con $24.35 \text{ uV} \pm 1.67 \text{ EE}$; el potencial 8, con $21.67 \text{ uV} \pm 0.68 \text{ EE}$; el potencial 3, con $21.87 \text{ uV} \pm 0.78 \text{ EE}$; y el potencial 5, con $21.75 \text{ uV} \pm 0.26 \text{ EE}$, siendo esta última donde se registraron las menores amplitudes; el potencial 2 solo se

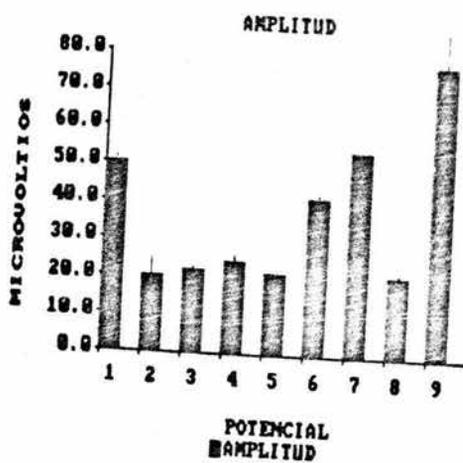


Figura 18. Gráfica en la que se muestran los promedios de las amplitudes alcanzadas por las diferentes señales registradas, con su error estándar.

observó en un experimento de esta serie y presentó una amplitud de $20.09 \mu V \pm 5.13 EE$.

Después de aplicar la prueba t de Student se observó que las señales fueron significativamente diferentes entre sí ($p < 0.005$) a excepción de las relaciones observadas entre los potenciales 1 y 7, potenciales 2 y 3, potenciales 2 y 4, potenciales 2 y 5, potenciales 2 y 8, potenciales 3 y 4, potenciales 3 y 5, potenciales 3 y 8, potenciales 4 y 8 y los potenciales 5 y 8.

4.2.3 Análisis de la Duración

En la gráfica que se presenta en la figura 19 se muestran los promedios de los siete experimentos realizados, en los que se mantuvo la velocidad de barrido constante (50 mseg a lo largo de la pantalla) donde se observa que la duración de las señales va desde 1.92 mseg (potencial 3) hasta 5.88 mseg (potencial 9). Analizando cada una de las señales encontramos que, al igual que para la amplitud, la duración presenta variaciones para la mayor parte de las señales de un experimento a otro. Las que presentaron variaciones mayores, que corresponden a los potenciales 1, 2, 3, 4 y particularmente el potencial 9; las señales que presentaron pocas variaciones fueron los potenciales 5 y 8; y en el caso de los potenciales 6 y 7 casi no se observaron variaciones.

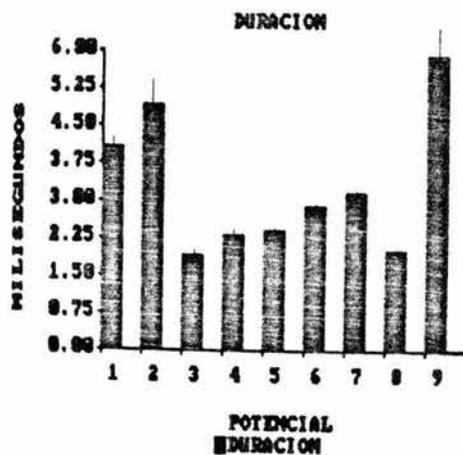


Figura 19. Gráfica en la que se muestra el promedio de la duración con su error estándar de las diferentes señales registradas.

El potencial 1 presentó una duración que osciló entre 2.3 hasta 6 mseg con un valor promedio de 4.06 mseg, aunque esta última duración solo se observó en un experimento de esta serie. El potencial 2, como ya se mencionó, solo se presentó en un experimento, con una duración promedio de 4.9 mseg. En el caso del potencial 3, se obtuvo una duración mínima de 1.0 mseg y un máximo de 4.0 mseg con valor promedio de 1.92 mseg, siendo la mayoría de las señales menores a los 2.5 mseg. El potencial 4 generalmente presentó una duración relativa mayor que la observada para la señal anterior, sin embargo, al observar los valores promedio, se aprecia que el valor de la duración de esta señal es muy cercano al que se observa para el potencial 3, pero al analizar los valores obtenidos en cada uno de los experimentos se aprecia que la duración del potencial 4 es mayor que la del potencial 3, siendo esta característica el principal parámetro para diferenciarlas entre si. En este potencial (4) se observó una duración de 2.0 a 2.5 mseg, con un valor promedio de 2.33 mseg. El potencial 5 tuvo una duración mínima de 1.7 mseg y una máxima de 3.0 mseg, con un valor promedio de 2.39 mseg. La duración del potencial 6 osciló desde 2.2 a 3.5 mseg, sin embargo, la mayoría de las señales se puede agrupar en un rango que va desde 2.5 a 3.3 mseg, con un valor promedio de 2.90 mseg. Para el potencial 7 se observaron los valores de 3.0 mseg para la duración mínima y 4.5 mseg para la máxima, con promedio de 3.14 mseg. El potencial 8 presentó pocas variaciones observándose desde 1.3 hasta 2.2 mseg, con promedio de

2.02 mseg. Quizás la señal que presentó las mayores variaciones fue el potencial 9, ya que se registraron duraciones promedio de 4.0, 4.95, 5.85, y 13.5 mseg.

Los datos mencionados anteriormente fueron significativos con una $p < 0.005$ con la prueba de t de Student, a excepción de las relaciones observadas entre los potenciales 1 y 2 ($p < 0.6720$), potenciales 2 y 9 ($p < 0.3098$), potenciales 3 y 8 ($p < 0.5454$) y los potenciales 4 y 5 ($p < 0.5422$).

4.2.4 Análisis de la Frecuencia

La frecuencia, al igual que los parámetros anteriores, también presentó variaciones en los diferentes experimentos, el mínimo de señales evaluadas fue, sin embargo, diferente en cada uno de ellos. De seis experimentos realizados en tales condiciones se observó que para el primero de ellos se obtuvieron 1,081 potenciales; para el segundo experimento, 159 potenciales; 43 potenciales para el tercero; 200 potenciales en el cuarto experimento; para el quinto se observaron 287 potenciales; y 876 potenciales para el último experimento.

En la actividad global, es decir la sumatoria de la actividad de cada una de las señales, se puede observar que la mayor frecuencia de aparición la presentó el potencial 7, con el 38.67 % del total de señales observadas, siguiendo los potenciales 6 y 5 con el 27.64 % y 15.24 % respectivamente; el

resto de las señales (potenciales 1, 2, 3, 4, 8 y 9) representó el 18.4 %.

En la figura 20 se muestran algunos datos de la frecuencia de los potenciales de acción espontáneos de cuatro experimentos realizados, en la gráfica se observa la frecuencia de aparición (en pot/seg) de cada uno de los potenciales con respecto al total de señales observadas.

Entre las frecuencias observadas del total de barridos del ORC, se realizó el análisis solamente de cuatro experimentos en los que se determinó con precisión el tiempo de muestreo, de ellos se puede observar que el potencial 6 tuvo una frecuencia promedio de 2.43 pot/seg seguido por los potenciales 5 (1.86 pot/seg) y 7 (1.04 pot/seg); el resto de las señales presentó una frecuencia de entre 0.04 pot/seg y 0.64 pot/seg.

4.3 ACTIVIDAD ELECTRICA DE LA GS EN PERIODOS DE 24 HORAS

En los crustáceos decápodos se han reportado múltiples funciones que presentan variaciones periódicas cercanas a las 24 horas en las que interviene el sistema OX-GS (Aréchiga, 1977; Aréchiga y Mena, 1975; Aréchiga y Huberman, 1980; Hamann, 1974). La presente serie de experimentos tuvo como finalidad explorar las posibles modificaciones en la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal a lo largo del ciclo nictameral. En la figura 21 se muestra la actividad global registrada en cuatro

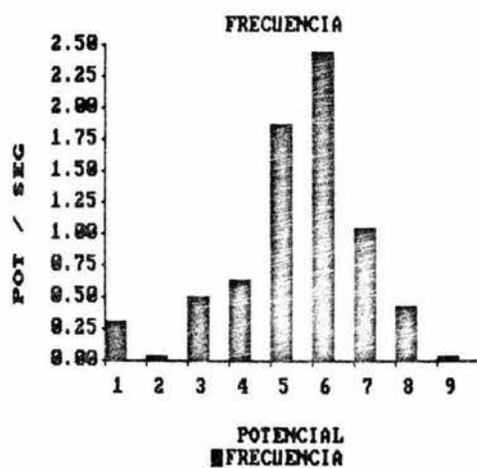


Figura 20. Gráfica en la que se muestran las frecuencias alcanzadas por las diferentes señales registradas.

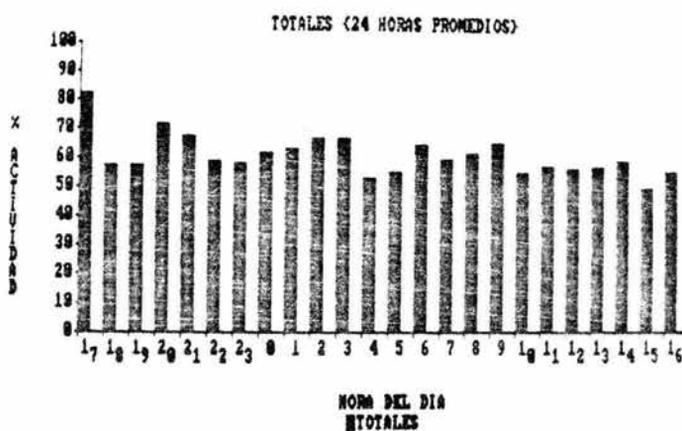


Figura 21. Gráfica en la que se muestra el promedio en porcentaje de la actividad eléctrica espontánea global de la glándula sinusal en el periodo de 24 horas en cuatro experimentos. (Absisas, hora del día, de las 17:00 hrs a las 16:00 del día siguiente; Ordenadas, % de actividad).

experimentos durante un periodo de 24 horas, evaluando la frecuencia de actividad espontánea, durante diez minutos cada hora, graficando en las ordenadas el porcentaje de la actividad registrada para cada hora, tomando como 100 % la hora en la que se registró la mayor actividad para cada uno de los experimentos. En las abcisas, se representan las horas del día a las que fue obtenido el registro.

4.3.1 Actividad Global

Como se observa en la figura 21, la actividad global de la glándula sinusal a lo largo del periodo de 24 horas presenta múltiples variaciones, una máxima actividad a las 17:00, 20:00, 2:00, 6:00, 9:00 y 14:00 hrs. El tiempo en el que se observó la mínima actividad, correspondió a las 18:00, 23:00, 3:00 y 15:00 hrs. El periodo que presentó la máxima frecuencia correspondió a las 17:00 con un 83.5 % de actividad, y una mínima de 50.25 %. Las variaciones de la actividad a lo largo del ciclo de 24 horas oscilan entre el 52 % y el 67 %.

4.3.2 Actividad de los Potenciales Individuales

En la figura 22 se muestran las gráficas que corresponden a la actividad eléctrica espontánea de cada uno de los potenciales en el periodo de 24 horas. Al igual que la figura anterior, se graficó en las ordenadas el porcentaje de actividad, y en las abcisas la hora del día en que se realizó el registro.

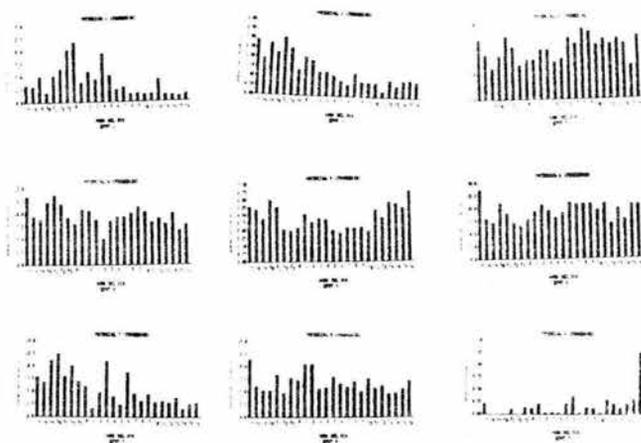


Figura 22. Gráficas en la que se muestra el promedio en porcentaje de la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal en un periodo de 24 horas, para cada una de las señales. (Absisas, hora del día, de las 17:00 hrs a las 16:00 del día siguiente; Ordenadas, % de actividad).

Para las señales de tipo 1 se observan dos picos de máxima actividad, que representan el 11.6 %, a las 0:00 hrs; y el 9.45 % a las 4:00 hrs. Los tiempos de mínima actividad para este potencial fueron las 14:00 y 15:00 hrs, tiempos en los que la actividad representó menos del 1.0 % del total. En general las horas de mínima actividad se registraron durante el día, desde las 6:00 hrs hasta las 12:00 hrs, en que la actividad fluctuó entre 1.5 y 1.7 %. A las 12:00 hrs, la frecuencia aumenta hasta un poco más de 4.0 %, y desde las 13:00 hrs se observa un retorno a los valores de 1.5 %, con excepción de las 14:00 y 15:00 hrs, en las que la actividad fue mínima. Estos resultados sugieren que la actividad de esta señal presenta a una acrofase nocturna con el pico de máxima actividad cercano a la medianoche.

La señal 2 presentó su máxima actividad a las 21:00 hrs, con 3.04 % del total, desde esa hora, la actividad de este potencial fue decayendo hasta llegar a un mínimo a las 11:00 hrs con un 0.3 %. La actividad de este potencial fue en general, muy baja, observándose grandes oscilaciones en su frecuencia de disparo. En los resultados mostrados en la gráfica, se aprecia que la actividad de este potencial corresponde muy probablemente a una acrofase nocturna, con los picos de máxima actividad cercanos a la hora del crepúsculo vespertino.

La señal 3 fue una de las que presentaron una mayor frecuencia de aparición en los diferentes experimentos; sin

embargo, también fue una de las que presentó un mayor número de oscilaciones. Por otra parte las horas en que se observó la mínima actividad fueron las 19:00 hrs, con 6.30 %, a las 23:00 hrs con 6.7 %, y las 15:00 hrs con 6.6 % de la actividad. Las horas en que se presentó la máxima actividad, fueron las 17:00 hrs, con 11.85 %, las 21:00 hrs con 12.13 %, las 6:00 hrs, con 12.00 %, las 8:00 hrs y 9:00 hrs, con 13.8 y 13.2 % respectivamente, y a las 16:00 hrs con 12.35 %. Los resultados sugieren que esta señal presenta una acrofase diurna con los picos de máxima actividad en las primeras horas del crepúsculo vespertino.

La señal de tipo 4 también fue una de las que presentó una frecuencia alta. Para esta señal, se pueden distinguir dos periodos de actividad, el primero de ellos principia a las 19:00 hrs, con un 8.75 % de frecuencia, este periodo termina a las 4:00 hrs, tiempo que correspondió a la mínima frecuencia, con 5.05 % de la actividad. El segundo periodo, comienza a partir de esta hora y termina a las 15:00 horas, con una frecuencia del 6.8 %. Las horas en las que se observó la máxima actividad, fueron las 17:00 hrs, con una frecuencia de 13.4 %; las 21:00 hrs con la máxima frecuencia de esta señal (13.6 %); las 9:00 hrs, en que se observó una frecuencia de 11.25 %.

En el potencial 5 se observa que la mayor frecuencia de actividad se presentó entre las 10:00 y las 21:00 hrs, lo que sugiere la presencia de una acrofase diurna. La máxima

frecuencia observada fue a las 16:00 hrs con una frecuencia de 6.7 %, y la mínima frecuencia de actividad se presentó a las 6:00 hrs con 2.7 %.

El potencial 6 fue la señal que presentó el mayor porcentaje de frecuencia de todos los experimentos de esta serie, observándose un máximo a las 17:00 hrs con un 27.2 %, y un mínimo de 13.0 % a las 23:00 hrs, sin embargo, la variabilidad de esta señal fue muy marcada a lo largo de todo el ciclo nictameral; sólo en el periodo que correspondió entre las 6:00 y las 11:00 hrs se observó una frecuencia que osciló entre 18.9 % y 22.0 %.

En la gráfica que corresponde a la señal 7 se aprecia claramente una acrofase nocturna que da comienzo a las 18:00 hrs y que termina a la 1:00 hrs, donde se observa la mínima frecuencia de esta señal con 1.7 %; con excepción de los casos extremos (3:00 hrs y 6:00 hrs), en el resto del experimento la frecuencia fue baja, oscilando entre 1.7 % y 4.7 % de actividad. Las máximas frecuencias observadas para esta señal fueron a las 20:00 hrs, con una frecuencia de 12.4 % y a las 3:00 hrs con 10.9 %.

Para el potencial 8 se observó una frecuencia de 11.45 % a las 17:00 hrs, siendo la máxima frecuencia observada. La menor frecuencia se observó a las 13:00 hrs con 4.6 %; esta señal, además, presentó un pico de máxima actividad a la 1:00 y 2:00 hrs con 10.4 % y 10.35 %. En general, se puede decir que la

actividad mostrada por esta señal osciló entre un porcentaje de frecuencia de 4.6 % a 8.3 %.

El potencial 9 fue la señal que presentó la menor frecuencia de aparición en todos los experimentos de esta serie, presentando una frecuencia máxima de 1.37 % a las 16:00 hrs, en general la frecuencia osciló entre 0.04 % y 0.30 %

4.3.3 ¿Ritmicidad Circadiana o Ultradiana en la Actividad Eléctrica de la Glándula Sinusal?

Del análisis de la actividad de cada uno de los potenciales de acción espontáneos de la glándula sinusal, se puede observar que algunos de éstos, parecen ajustarse a patrones de comportamiento de tipo circadiano. En la figura 23 se muestran a manera de ejemplo las gráficas que corresponden a un solo experimento; en ellas se observa que para el potencial 7 se puede apreciar una mayor frecuencia de actividad durante la noche, observándose una acrofase a las 20:00 hrs, con 41.33 %. El potencial 2 presentó una mayor frecuencia de descarga durante la noche, sin embargo, se observa una acrofase a la hora crepuscular (19:00 hrs, 7.0 potenciales por minuto). En ese mismo experimento las variaciones cíclicas para el potencial 3 son escasas, sin embargo, se observan acrofases nocturnas entre las 21:00 y 22:00 hrs (21.67 y 21.33 potenciales por minuto). Otras señales mostraron comportamientos diurnos, como es el caso de las señales 4, 5 y 6, en el caso de las dos primeras, se aprecian además picos de actividad que sugieren la presencia de



Figura 23. Presencia de diferentes comportamientos en la actividad eléctrica, encontrada en uno de los experimentos de 24 horas. En las abscisas, hora del día; ordenadas, potenciales por minuto.

algun tipo de ritmicidad ultradiana con los picos de mínima actividad hacia las horas crepusculares, en el caso del potencial I se puede apreciar también un comportamiento de tipo ultradiano, aunque en este caso se observa una acrofase nocturna predominante.

Cabe aclarar, que los resultados mostrados no son concluyentes para establecer si la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal del acocil presenta un comportamiento de tipo circadiano o ultradiano, o bien si alguno de los potenciales reportados se puede enmarcar dentro de estos criterios, nuestros resultados muestran, sin embargo, que esta posibilidad no se debe descartar, y que amerita una exploración más detallada en el futuro.

4.4 EXPLORACION INICIAL DE LA POSIBLE MODULACION DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA ESPONTANEA

4.4.1 Efecto de la Serotonina

La actividad eléctrica espontánea de la GS es susceptible de modificarse por la acción de sustancias provenientes del medio interno, como ocurre con algunos neurotransmisores y neuromoduladores, tal es el caso de la serotonina (5-HT) presente en el TO (Laxnyr, 1984), la cual modifica la amplitud del electrorretinograma (Bañuelos, 1983). Además se ha relacionado como modulador de la frecuencia cardiaca en otros crustáceos decápodos (Cooke y Sullivan, 1982). En el presente

trabajo se inicio el estudio del efecto de algunas sustancias sobre la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal con el fin de evaluar las condiciones experimentales más apropiadas para este tipo de estudio farmacológico. Para ello se empleó la 5-HT de acuerdo al siguiente protocolo experimental. Del registro obtenido se determinó, durante diez minutos, la frecuencia de disparo de la GS con el flujo abierto, pasado este tiempo, se cerró el flujo y se realizaron mediciones durante diez minutos de registro, que fueron tomados como testigos. Inmediatamente después, se agregó un mililitro de la solución de prueba con ayuda de una jeringa desechable, a la vez que se extrajo el mismo volumen de solución salina del baño, conauxilio de otra jeringa, y se tomaron otros diez minutos de registro, pasado este tiempo, se reestableció el flujo y se midieron otros diez minutos de registro, tomándolo como un criterio de la recuperación. Para la parte experimental, se midió en cada experimento, en primer lugar, el efecto provocado por el cambio de soluciones, substituyendo el mililitro de solución del baño, que contenfa también solución salina, posteriormente se probó el efecto de la 5-HT, introduciendo en todos los casos primero a las concentraciones menores y al final las mayores (para el caso de la 5-HT se probaron concentraciones de 1×10^{-8} a 1×10^{-3} M).

Los resultados preliminares, producto de dos experimentos (fig.24), se muestran en grupos de tres barras correspondientes a la frecuencia, en potenciales por minuto, testigo, la

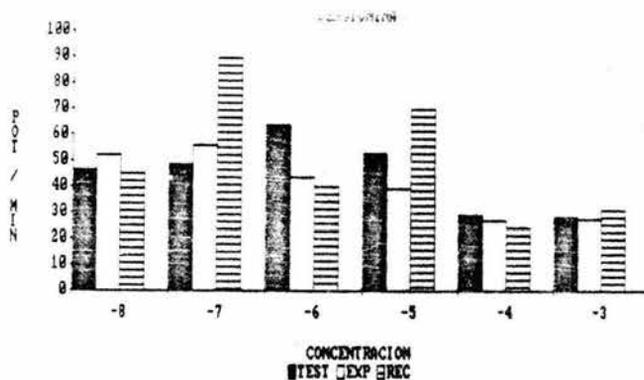


Figura 24. Modificaciones en la actividad eléctrica espontánea de la GS por efecto de la serotonina, promedio de dos experimentos, cada concentración presenta tres barras que consisten en el testigo, experimental y recuperación en cada caso (Absisas, concentración de la 5-HT desde 10^{-8} hasta 10^{-3} ; Ordenadas, potenciales por minuto).

experimental y la recuperación para cada una de las concentraciones. En las ordenadas se graficó la frecuencia, y en las absisas, están representadas las concentraciones de 5-HT probadas.

Al aplicar a la glándula sinusal aislada la 5-HT a una concentración de 1×10^{-8} M se aprecia un pequeño incremento de 5.5 potenciales por minuto en la frecuencia de disparo, al compararlo con el testigo para esa concentración, tampoco aprecian diferencias importantes con la recuperación. Para la concentración de 1×10^{-7} , existen pocas diferencias entre la parte experimental y la parte testigo. Para la concentración de 1×10^{-6} se observa una disminución considerable de la actividad eléctrica espontánea (de 63.75 potenciales por minuto, para el testigo a 43.75 potenciales por minuto, en la experimental) sin embargo, al compararlo con la recuperación (40.5 potenciales por minuto) se puede observar que estas diferencias no son grandes; es importante hacer notar que para esta concentración el valor del testigo es considerablemente mayor que en casos anteriores. Para la siguiente concentración se observa también que entre la parte testigo y la experimental esta última tuvo una frecuencia menor, sin embargo la recuperación presentó un incremento en su frecuencia mayor que la presentada por las partes testigo y experimental. En las concentraciones de 1×10^{-4} y 1×10^{-3} , se aprecia claramente que la actividad eléctrica espontánea decae probablemente por efecto del incremento de la concentración apreciándose una

disminución de aproximadamente un 50 % de la actividad al compararla con las concentraciones previas. Todas las concentraciones mostraron resultados significativos ($p < 0.005$), evaluados con la prueba de chi-cuadrada, al comparar testigos contra experimentales, experimentales contra recuperaciones testigo recuperaciones, a excepción de lo observado en la concentración de 1×10^{-6} , al comparar el testigo contra la experimental, experimental contra recuperación y las tres comparaciones en la concentración de 1×10^{-3} .

De lo anterior se observa que a concentraciones bajas (1×10^{-8} a 1×10^{-6}), la actividad eléctrica espontánea es muy variable, por lo que se requeriría de un mayor número de experimentos para poder postular de que manera se modifica la actividad eléctrica por la acción de esta sustancia. Para concentraciones farmacológicas (1×10^{-4} M a 1×10^{-3} M) se observa que la frecuencia disminuye de manera significativa. Quizás el efecto más claro obtenido en estos experimentos es el que se observa al analizar las señales individuales: La 5-HT induce la aparición de trenes de actividad correspondientes a potenciales de tipo 1 y 7 y en las concentraciones farmacológicas, potenciales tipo 3 en concentraciones de 1×10^{-6} (fig. 15b).

4.4.2 Efecto de la Leucina-Encefalina

Dentro de esta exploración inicial de orden metodológico, se examinó el posible efecto de la Leucina-Encefalina (Leu-Enc)

sobre la actividad eléctrica de la glándula sinusal (fig. 25); esta sustancia ha sido reportada en el TO de diferentes especies de crustáceos (Mancillas y cols., 1981; Quackerbush y Fingerman, 1984; Jaros y cols., 1985). Al parecer influye en el desplazamiento de los pigmentos tegumentarios (Quackerbush y Fingerman, 1984); en la adaptación a la obscuridad del electroretinograma (Freijo y cols., 1985; Freijo 1986) y en la actividad de algunas motoneuronas identificadas (Anaya y cols., 1984; Anaya y Aréchiga, 1986). El protocolo experimental utilizado en estos experimentos, fue similar al empleado en los experimentos con serotonina, en este caso se utilizaron concentraciones de 1×10^{-7} a 1×10^{-4} M.

En la figura 25 se muestran los promedios de dos experimentos en gráficas de tres barras, que corresponden a la frecuencia del testigo, la experimental y la recuperación; para cada una de las concentraciones. En las ordenadas se graficó la frecuencia en potenciales por minuto de dos experimentos, y en las abcisas están representadas las diferentes concentraciones de Leu-Enc probadas. Todos las concentraciones mostraron resultados significativos ($p < 0.005$), evaluados con la prueba de chi-cuadrada, al comparar testigos contra experimentales, experimentales contra recuperaciones testigo recuperaciones, a excepción de lo observado en la concentración de 1×10^{-6} , al comparar el testigo contra la experimental.

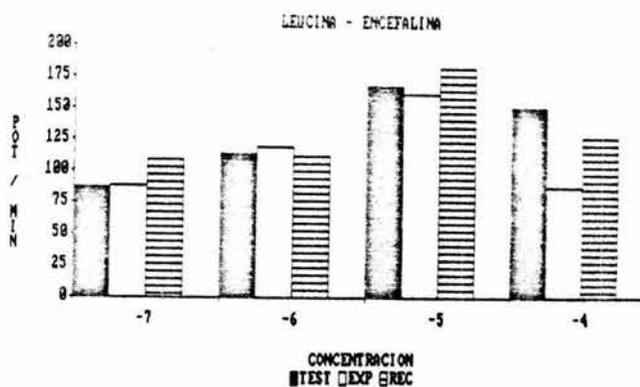


Figura 25. Modificaciones en la actividad eléctrica espontánea por efecto de la leucina-encefalina, cada concentración presenta tres barras que consisten en el testigo, experimental y recuperación en cada caso (Absisas, concentración de la leu-enc desde 10^{-7} hasta 10^{-4} ; Ordenadas, potenciales por minuto).

En la gráfica de actividad global, a una concentración de 1×10^{-7} para el grupo experimental, existe una frecuencia de 89 potenciales por minuto, incrementándose hasta 119.5 potenciales por minuto para la siguiente concentración (1×10^{-6}), mientras que para una concentración de 1×10^{-5} , se observa un importante incremento en la actividad eléctrica, hasta alcanzar 162.5 potenciales por minuto; al aplicar una concentración mayor, 1×10^{-4} M, se aprecia claramente una disminución en la frecuencia de disparo, llegando a alcanzar 89.5 potenciales por minuto.

Al observar en la gráfica las barras correspondientes a los valores testigo, se puede observar que la actividad eléctrica espontánea en concentraciones de 1×10^{-7} a 1×10^{-5} M muestra un creciente aumento en la frecuencia de disparo, lo que sugiere que la acción de la Leu-Enc puede ser de tipo acumulativo, sin embargo, en concentraciones de 1×10^{-4} M se observa en el control una disminución de la actividad eléctrica presentando una frecuencia mayor que la que se obtuvo para el grupo experimental (152 potenciales por minuto).

Al observar en la gráfica los valores correspondientes a la recuperación, se aprecia que la actividad eléctrica espontánea de la glándula sinusal disminuye notablemente al compararlo con los casos anteriores, observándose que a concentraciones de 1×10^{-7} a 1×10^{-5} la frecuencia de disparo generalmente es mayor que la del grupo experimental. Al

comparar estos resultados con los del grupo testigo, se observa que la recuperación de la preparación es parcial.

De estos experimentos iniciales se aprecia, para el caso de las señales individuales que el comportamiento de cada uno de los potenciales es muy variado, siendo posible distinguir en esta exploración inicial diferentes efectos, así el potencial 3 no parece ser afectado por la presencia de la Leu-Enc mientras que la señal 4 incrementa su frecuencia de disparo en concentraciones de 1×10^{-7} a 1×10^{-5} , asimismo el potencial 1 presentó generalmente frecuencias menores que las del testigo mientras que el potencial 7 las tuvo mayores.

5.0 DISCUSION

La actividad eléctrica espontánea en las terminales que forman a la glándula sinusal se estudió empleando técnicas de registro extracelular. Así, fue necesario demostrar inicialmente que la actividad registrada se generaba efectivamente en esta estructura. Nuestros resultados muestran que la GS presenta una actividad que es claramente distinguible de la banda de ruido, como se demostró al colocar alternadamente los electrodos en la GS y en el baño. Este tipo de señales también se han observado en diversas especies de crustáceos, como las que se muestran en este trabajo, presentando características semejantes a la actividad reportada por otros autores mediante el empleo de técnicas de registro diferentes (Iwasaki y Satow, 1969; Stuenkel, 1985; entre otros). Asimismo los potenciales, se pueden presentar a manera de trenes, que también pueden ser inducidos por algunas sustancias presentes en estos organismos, tal es el caso de algunos neurotransmisores y neuromoduladores. Nuestros resultados muestran que la actividad espontánea observada es de origen biológico ya que depende de la presencia del calcio extracelular, lo que también concuerda con lo reportado por otros autores (Cooke, 1977; Flores, 1981). Los registros obtenidos son, en consecuencia representativos de una actividad de origen biológico.

Los experimentos muestran que las distintas señales recogidas en la GS presentan múltiples variaciones en parámetros

como la forma de onda, la amplitud, la duración y la frecuencia. Por lo que el siguiente aspecto a tratar fue el de cuantificarlos con precisión. Dentro de la evaluación metodológica que se persigue en la presente tesis se observó que el registro extracelular presenta diversas dificultades para su correcta interpretación debido a la relación espacial entre los electrodos de registro y las propias terminales nerviosas. Por otro lado, la resistencia externa, determinada por el sello formado entre el electrodo y la GS, así como el volumen de solución salina en la cámara de perfusión, influyen al parecer en el registro de la actividad eléctrica, sin embargo, esta técnica ha sido empleada por otros autores para la clasificación de señales eléctricas, como es el caso del órgano pericardico (Cooke, 1964).

De los parámetros señalados se decidió utilizar a la forma de onda como el criterio más evidente para diferenciar a las poblaciones de potenciales observados. Por este criterio se seleccionaron inicialmente nueve señales, mismas que se pueden agrupar al analizar cada uno de los parámetros aisladamente (Tabla III). Si se utiliza el criterio de la amplitud, se pueden formar tres grupos; el primero de ellos, de 15 a 30 μV , al que corresponden las señales 2, 3, 4, 5 y 8; el segundo grupo con amplitudes de 40 a 55 μV , correspondiente a los potenciales 1, 6 y 7; y el último grupo correspondió a la señal 9 que presentó amplitudes mayores a los 60 μV . Asimismo, utilizando como criterio la duración, también es posible separar a las señales

T A B L A I I I

 =====
 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LOS POTENCIALES ESPONTANEOS
 =====

Pot	n	AMPLITUD			DURACION			FRECUENCIA	COBALTO	ACTIVIDAD
		microvoltios			milisegundos			pot/seg		
		PROM	SDEV	SERR	PROM	SDEV	SERR	24 HORAS		
1	87	50.27	11.53	1.24	4.06	1.44	.15	.31	+	noct
2	11	20.09	17.00	5.13	4.91	1.58	.48	.04	?	crep vesp
3	130	21.87	8.86	.78	1.92	1.53	.13	.51	+	crep mat
4	109	24.35	17.47	1.67	2.33	1.03	.10	.64	-	ultra
5	467	21.75	5.69	.26	2.39	.80	.04	1.86	-	diur
6	847	41.52	22.16	.76	2.90	.94	.03	2.43	+	arrit
7	1185	54.04	15.15	.44	3.14	.84	.02	1.04	-	noct
8	113	21.67	7.21	.68	2.02	.60	.06	.44	-	arrit
9	25	77.60	46.39	9.28	5.88	2.92	.58	.05	?	crep vesp?
TOT		333.15			29.55			7.33		

 =====
 From: Promedios; Sdev: Desviación estandar; Serr: Error Estandar; +: Incremento
 en la frecuencia; -: Decremento en la frecuencia; ?: Indeterminado.
 =====

observadas en tres grupos; el primero con duraciones de 1.8 a 2.5 mseg, potenciales 3, 4, 5, y 8; el segundo con duraciones de 2.5 a 4.3 mseg, señales 1, 6 y 7; y el tercero con duraciones mayores a los 4.3 mseg, señales 2 y 9. De los potenciales observados los más frecuentes fueron las señales 6 con 2.43 pot/seg, 5 con 1.86 pot/seg, y 7 con 1.04 pot/seg; el resto de las señales se observaron con frecuencias entre 0.04 y 0.64 pot/seg; sin embargo, se reconocen por su comportamiento tres grupos de potenciales, aquellos que fueron muy frecuentes (> 1.0 pot/seg), señales 5, 6 y 7; los que fueron relativamente frecuentes (de 0.3 a 0.7 pot/seg), señales 1, 3, 4 y 8 y potenciales ocasionales (< 0.1 pot/seg), señales 2 y 9.

Al comparar simultáneamente la forma de onda observada con los otros tres parámetros, se pueden identificar seis comportamientos para estas señales (fig 26):

- a) Con amplitud de 15 a 30 μV , duración de 1.8 a 2.5 mseg y con frecuencias mayores a 1.0 potencial por segundo, potencial 5.
- b) Con amplitud de 15 a 30 μV , duración de 1.8 a 2.5 mseg y con frecuencias de entre 0.3 y 0.7 pot/seg, potenciales 3, 4 y 8.
- c) Con amplitud de 15 a 30 μV , duración mayor a 4.3 mseg y con frecuencia menor a 0.1 pot/seg, potencial 2.
- d) Con amplitud de 40 a 55 μV , duración de 2.5 a 4.3 mseg y con frecuencia mayor a 1.0 pot/seg, potenciales 6 y 7.

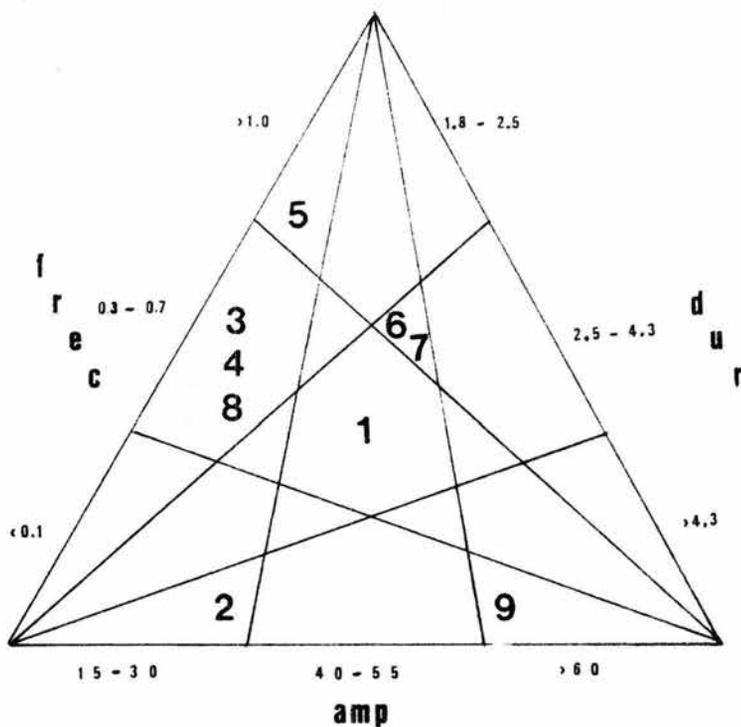


Figura 26. Diagrama en el que se muestran las relaciones que existen entre los parámetros registrados, para las diferentes señales.

e) Con amplitud de 45 a 55 uV, duración de 2.5 a 4.3 mseg y con frecuencias de entre 0.3 y 0.7 pot/seg, potencial 1.

f) Con amplitud mayor a 60 uV, duración mayor a 4.3 mseg y con frecuencia menor a 0.1 pot/seg, potencial 9.

De este análisis se desprende, además de otros resultados, que de las poblaciones mencionadas los potenciales 3 y 4 parecen corresponder a un solo tipo de señal ya que todos los parámetros, salvo el de la duración (1.92 ± 0.13 EE a 2.33 ± 0.10 EE), son similares entre si. Algo parecido ocurre con los potenciales 5 y 8 entre los que la única diferencia es la frecuencia de las señales. Además, se observa que existen otras señales de las que no es posible asegurar categóricamente su identidad como potenciales de acción, ya sea por su baja frecuencia de aparición, potencial 2, o porque además no aparentan ser potenciales unitarios, potencial 9.

Un aspecto que llama la atención es la diversidad entre los datos reportados por distintos autores en relación con las características de las señales que se estudian y la discrepancia existente entre nuestros resultados y los obtenidos por otros laboratorios, principalmente en la duración y la amplitud de las señales, puede observarse en la Tabla IV; esto puede deberse a diferencias en nuestro dispositivo de registro con los empleados por otros autores, ya que nosotros utilizamos amplificadores cuya constante de tiempo es diferente. Por otro lado, de acuerdo al análisis de la actividad eléctrica de la GS, realizado por

T A B L A I V

ESPECIE	DURACION (mseg)	AMPLITUD (μ V)	FRECUENCIA (Pot/Seg)	Registro	AUTOR
<u>Procambarus clarkii</u>	5.4 + 1.7	-----	-----	Intracelular	Iwasaki y Satow, 1971
<u>Cardisoma carnifex,</u>	> 10	aprox 500	-----	Extracelular	Cooke y cols., 1977
<u>Portunus sanguinolentus</u>					
<u>Procambarus clarkii,</u>	4-10	50-200	0.37 - 5.7	Extracelular	Flores, 1981
<u>Procambarus bouvieri.</u>					
<u>Cardisoma carnifex</u>	10.4 + 2.2	> 25	-----	Intracelular	Stuenkel, 1985
				Extracelular	
<u>Procambarus clarkii</u>	1.9 - 6	20 - 100	0.04 - 2.4	Extracelular	Este trabajo

Flores (1981), los potenciales aquí reportados corresponderían a los rangos de amplitud de los potenciales tipo I de este autor (< 100 uV), sin embargo, las duraciones reportadas por este autor son relativamente mayores que las encontradas en nuestros experimentos lo que apoya la idea de que estas diferencias pueden deberse al dispositivo de registro, y no a las diferencias en actividad biológica de las terminales.

En la GS el contenido de algunos péptidos con actividad biológica, presenta variaciones en el ciclo de 24 horas, como se ha documentado para la HPDL (Aréchiga y Mena, 1975), la HHG (Hamann, 1974), la HND (De la Vega y cols., 1980) y la HCE (De la Vega y cols., 1986). La liberación de péptidos en el sistema neurosecretor de los crustáceos, se ha asociado con la depolarización de las terminales que los contienen. En el sistema OXMT-GS se ha descrito esta relación para la liberación de la HCE (Cooke, Haylet y Weatherby, 1977) y la HND (Aréchiga, Huberman, y Martínez-Palomo, 1977). En este sistema, la actividad espontánea se ha asociado con la liberación in vitro de HND (Flores, 1981). Es posible entonces que el estudio de esta depolarización espontánea, traduzca diversos aspectos de la función secretora, por lo que será necesario en el futuro correlacionar los diversos aspectos estudiados en la actividad eléctrica con fenómenos como la síntesis, el transporte y la liberación de las hormonas que han sido identificadas.

En nuestros resultados se observaron, en periodos de 24 horas, pocas diferencias en la actividad global de la GS, sin embargo, al analizar las características de cada una de las señales, se observó que algunas de éstas presentan una actividad preferentemente nocturna (potenciales 1 y 7), otras mostraron actividad diurna (potencial 3 y 4) y otras señales no mostraron ninguna tendencia o comportamiento oscilatorio en el tiempo. Además, en algunos experimentos se pudieron apreciar comportamientos que probablemente son de tipo circadiano con marcadas acrofases, tanto nocturnas, como diurnas, así como variaciones probablemente de tipo ultradiano para las diferentes señales.

La presencia de variaciones nictamerales en la frecuencia de disparo de las terminales de la GS sugiere que la actividad eléctrica espontánea de este sistema podría intervenir en la liberación de algunas de las hormonas contenidas en su interior. Así por ejemplo, tomando las frecuencias observadas en nuestros experimentos, podríamos esperar que los potenciales 1 y 7 (máxima actividad desde las 17:00 hasta las 24:00 hrs) pudieran estar relacionados con los niveles de la HHG (máxima concentración desde las 19:00 hasta las 23:00 hrs), asimismo el potencial 3 debido a su actividad diurna (máxima actividad desde las 6:00 a las 21:00) podrían ser los candidatos para participar en la secreción de HND (máxima cantidad en el tallo ocular desde las 8:00 hasta las 23:00 hrs). Las señales restantes que no mostraron tendencias durante el ciclo nictameral podrían

intervenir en la liberación de otras sustancias. En este caso encontramos a las señales (6 y 8) que aparecieron durante todo el ciclo nictameral con algunas variaciones en la frecuencia; de acuerdo a su ciclo nictameral (potencial 5). Los cambios en el ciclo de 24 horas observados en las señales registradas, nos aportan más datos acerca de la identidad de cada una de ellas, así los potenciales 3 y 4 parecen corresponder a un sólo tipo de señal, así como los potenciales 2 y 9 que también se presentaron ocasionalmente.

Por otro lado, en diferentes estructuras del crustáceo en las que interviene el sistema neurosecretor, se ha observado el efecto de diversos neuromoduladores, como es el caso de las encefalinas y la serotonina. Los efectos hasta ahora reportados sobre diversas funciones en estos organismos bien podrían ser explicados por un efecto secundario sobre estos efectores, pues no es posible descartar que el órgano blanco de estas sustancias sea la propia GS, además de otras estructuras. Por ello, al iniciar en este trabajo la evaluación del efecto de opiáceos esperamos aportar datos que contribuyan a una mejor comprensión del efecto de estos neuromoduladores sobre la actividad espontánea, así como su posible influencia sobre la actividad secretora.

Nuestros resultados preliminares son sugerentes de que la serotonina y la leucina encefalina producen incrementos en la frecuencia de disparo de la GS dependientes de las

concentraciones utilizadas, así como la inducción de trenes de actividad. Sin embargo, el efecto parece ser diferente dependiendo de la sustancia que se utilice, ya que en el caso de la leucina encefalina el efecto parece ser de tipo acumulativo en tanto que para la serotonina esto no se observa. Otras sustancias como es el caso de de la D Serina 2 Leucina Encefalina Treonina no presentó un efecto claro sobre la actividad de la GS.

Por otro lado, el criterio farmacológico empleado nos permite distinguir algunas diferencias entre las poblaciones de potenciales de acción descritas, así se observó que al aplicar leucina encefalina es posible diferenciar a las poblaciones de potenciales 3 y 4 ya que la señal 3 incrementa su frecuencia y la señal 4 la disminuye o permanece sin modificaciones, algo similar se aprecia para las poblaciones 1 y 7 en que la señal 1 presenta frecuencias menores que el potencial 7

Estos resultados que deberán ser documentados con mayor detalle en el futuro, sugieren la existencia de un control sobre el sistema OX-GS, siendo éste altamente específico. El efecto de las sustancias probadas es al parecer sobre la frecuencia de descarga de estas neuronas, ya sea incrementando o aboliendo la actividad. Si esto es correcto, la regulación del sistema OX-GS estaría dado por diferentes estructuras del crustáceo, aún aquellas localizadas a distancia.

Ahora bien, si cada potencial de acción generado por la GS promueve la liberación de un solo tipo de péptido, entonces la actividad registrada podría ser indicativa de las diferentes hormonas liberadas; en este caso, el efecto observado por la acción de las sustancias probadas, provocaría variaciones en la liberación de péptidos específicos de la GS. La evaluación del efecto de sustancias presentes en el tallo ocular, realizado en este trabajo, revela la importancia de los aspectos metodológicos. Se ha documentado que la acción de sustancias neuroactivas en el tensorreceptor abdominal del acocil (Pineda y Flores, 1986) pueden conducir a resultados contradictorios dependiendo de la metodología empleada, por lo que será necesario precisar la estrategia experimental para los estudios farmacológicos de la GS.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alexandrowicz, J.S. y Carlisle, D.B., 1953, Some experiment on the function of the pericardical organs in crustacea. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 52:175-192.
- 2.-Anaya, V., De la Vega, T. y Aréchiga, H., 1984, Efectos diferenciales de las encefalinas sobre neuronas identificadas de acocil. Res. XXVII Congr. Nal. Cienc. Fisiol (42c). Morelia Mich. México.
- 3.- Anaya, V. y Aréchiga, 1986, Efectos diferenciales de péptidos neuroactivos sobre neuronas identificadas del acocil. Res. XXIX Congr. Nal. Cienc. Fisiol. (279). Guanajuato Gto. México.
- 4.- Andrew, R.A. y Saleudin, A.S.M., 1978, Structure and innervation of a crustacean neurosecretory cell. *Canad. J. Zool.* 56:423-430.
- 5.- Andrew, R.A., Orchard, I. y Saleudin, A.S.M., 1978, Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell. Tiss. Res.* 190:235-246.
- 6.- Aréchiga, H.,1977, La ritmicidad circádica de los crustáceos. Tesis Doctoral. CIEA-IPN, México.
- 7.- Aréchiga, H. y Mena, F, 1975, Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52a:581-584.
- 8.- Aréchiga, H., Chavez, B. Y Glantz, R.M., 1985, Dye coupling and gap junctions between crustaceans neurosecretory cells. *Brain Res.*, 326:183-187.
- 9.- Aréchiga, H. y Huberman, A., 1980, Hormonal modulation of circadian behavior in crustaceans. *Front Hormone Res.* 6:16-34.
- 10.-Aréchiga, H., Huberman, A. y Martínez-Palomo, A., 1977, Release of a neurodepressing hormone from a crustacean sinus gland. *Brain Research.* 128:93-108.

- 11.- Aréchiga, H., Garcia, U. y Rodríguez-Sosa, L., 1985, Neurosecretory role of crustacean eyestalk in the control of neural activity. En: Selverston A.I., 1985, "Model Neural Networks and Behavior". Plenum Press Corp. pp 361-379.
- 12.- Barnes, R., 1983, Zoología de los invertebrados. 4ta ed. Interamericana México.
- 13.- Barnes, H. y Gonor, J.J., 1958, Neurosecretory cells in the cirripede Pollicipes polimerus. J.B. Sowerby. J. Mar. Res. 17:81-102.
- 14.- Bañuelos, S.E., 1983, Modulación de la actividad eléctrica del fotorreceptor retiniano del acocil. Tesis de Licenciatura, E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., México.
- 15.- Bern, H.A. y Hagadorn, I.R., 1965, Neurosecretion. EN: Bullock, T.H. y Horridge, G.A., 1965, Structure and function of nervous system of invertebrates. W.H. Freeman and Co. San Francisco U.S.A.
- 16.- Blázquez, N., Flores, J., Marquez, I. y Pineda, J.C., 1986, Relaciones entre las funciones visual y secretora en el acocil Procambarus clarkii: evaluación de algunas características morfológicas y funcionales de la glándula sinusal en animales sometidos a distintas condiciones de iluminación. En Prensa.
- 17.- Bliss, D.E., Durand, J.B. y Welsh, J.H., 1954, Neurosecretory system in decapod crustacea. Z. Zellforschung. 39:520-536.
- 18.- Bliss, D.E. y Welsh, J.R., 1954, Neurosecretory system on brachiuran crustacea. Biol. Bull. (Woods Hole Mass) 103:157-169.
- 19.- Carlisle D.B. y Knowless, F.G., 1953, The Neurohaemals organs in crustaceans. Nature 172:144
- 20.- Carlisle, D.B. y Knowless, F.G., 1959, Endocrine control in crustaceans. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- 21.- Carlisle, D.B. y Passano, L.M., 1953 The X-organ of crustacea. Nature, London. 171:1070-1071.
- 22.- Carlisle, D.B. y Pitman, W.J., 1961, Diapause, neurosecretion and hormones in copepoda. Nature Lond. 190:827-828.
- 23.- Cisne, J.L., 1982, The origin of crustacea. EN: Bliss D.E. 1982 The Biology of Crustacea Vol. 4. Academic Press. N.Y.

- 24.- Cooke, I.M., 1964, Electrical activity and release of neurosecretory material in crab pericardial organs. *Comp. Biochem. Physiol.* 13:353-366.
- 24.- Cooke, I.M., 1977, Electrical activity of neurosecretory terminals and control of peptide hormone release. *En Peptides in Neurobiology*. H. Gainer (Ed), Plenum Press, New York.
- 25.- Cooke, I.M. y Sullivan, R.E., 1982, Hormones and neurosecretion. *EN: Bliss D.E. 1982 The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Academic Press. N.Y.
- 26.- Cooke, I.M., Haylet, B.A. y Weatherby, T.M., 1977, Electrical elicited neurosecretory and electrical responses of the isolated crab sinus gland in normal and reduced calcium salines. *J. Exp. Biol.* 70:125-149.
- 27.- De la Vega, T., Vergara, P. y Aréchiga, H., 1986, Ritmo circadiano de neurosecreción en el Organo X del acocil. *Res. XXIX Congr. Nal. Cienc. Fisiol.* (224). Guanajuato Gto. México.
- 28.- De la Vega, T., Anaya, V. y Aréchiga, H., 1980, Ritmo circadiano de actividad neurosecretora en el tallo ocular aislado del acocil Procambarus clarkii (Girard). *Res. XXIII Congr. Nal. Cienc. Fisiol.* p-70. México.
- 29.- Drach, P. y Tchernigovtzeff, C., 1967, Sur le méthode de détermination des estades du cycle d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et Millieu. Serie A: Biologie Marine.* 18(3a):595-610.
- 29.- Durand, J.B., 1956, Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish. *Biol. Bull. Woods Hole.* 111:62-76.
- 30.- Duncan, D., 1956, An electron microscope study of the neurohypophysis of a bird Gallus domesticus. *Anat. Rec.* 125:457-472.
- 31.- Ferlund, P., 1971, Chromactivacting hormones of Pandalus borealis, isolation and purification of light-adapting hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 237:519-529.
- 32.- Ferlund, P., 1974a, Structure of red-pigment-concentrating hormone of the shrimp Pandalus borealis. *Biochim. Biophys. Acta.* 371:304-311.
- 33.- Ferlund, P., 1974b, Syntesis of red-pigment-concentrating hormone of the shrimp Pandalus borealis. *Biochim. Biophys. Acta.* 371:312-322.

- 34.- Ferlund, P., 1976, Structure of light-adapting hormone from the shrimp Pandalus borealis. Biochim. Biophys. Acta. 439:17-25.
- 35.- Flores, J., 1981, Regulación de la secreción de la hormona neurodepresora en el tallo ocular del acocil. Tesis de Maestría. CIEA-IPN, México.
- 36.- Flores, J., Freijo, N.P., Marquez, I. y Blázquez, N., 1985, Effects of enkephalines on dark adaptation in isolated retina of crayfish. Abstr. 15th Annual Meeting, Society of Neurosciences. Dallas, Texas, U.S.A.
- 38.- Freijo, N.P., 1986, Influencia de las encefalinas sobre la función visual del acocil Procambarus clarkii. Tesis de Licenciatura. E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., México.
- 39.- Freijo, N.P., Marquez, I., Blázquez, N. y Flores, J., 1985, Influencia de las encefalinas sobre la función visual del acocil Procambarus clarkii. Res. XVIII Congr. Nal. Cienc. Fisiol.
- 40.- Garcia, H.U., 1982, Biosíntesis y transporte de la hormona neurodepresora de los crustáceos. Tesis de Maestría, CIEA-IPN, México.
- 41.- Glantz, R.M, Kirk, M.D. y Aréchiga, H, 1983, Light input neurosecretory cells. Brain Research. 265:307-311.
- 42.- Hamann, A., 1974, Die neuroendokrine Steuerung tagerrhythmischer Blutzuckerschwankungen durch die Sinusdrüse beim Flußkrebse. J. Comp. Physiol. 89:197-214.
- 43.- Hodge, M.H. y Chapman, G.B., 1958, Some observation on the fine structure of the sinus gland of a land crab Gecarcinus lateralis. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4:571-574.
- 44.- Holgreen, U. y Chapman, G.B., 1960, The fine structure of the urophysis spinalis of the teleost fish Fundulus heteroclitus L. J. Ultrastruct. Res. 4:15-25.
- 45.- Horridge, G.A., 1965, The Arthropoda, En: Bullock, T.H. y Horridge, G.A., 1965, Structure and function in the nervous system of invertebrates. W.H. Freeman and Co. Sn Francisco, U.S.A.
- 46.- Iwasaki, S. y Satow, Y., 1969, Spontaneous grouped discharge of secretory neuron soma of the X-organ of crayfish, Procambarus clarkii. J. Physiol. Soc. Japan. 31:629-630.
- 47.- Iwasaki, S. y Satow, Y., 1970, Spike initiation of neurosecretory neuron soma in Na- deficient or tetrodotoxin medium. J. Physiol. Soc. Japan. 32:37-38.

- 48.- Iwasaki, S. y Satow, Y., 1971, Sodium- and Calcium-dependent spike potentials in the secretory neuron soma of the X-organ of the crayfish. *J. Gen. Physiol.* 57:216-238.
- 49.- Iwasaki, S., Satow, Y. y Kuroda, T., 1973, Hyperpolarizing inactivation of the Calcium- dependent action potentials. *Proc. Jpn. Acad.* 49:564-568.
- 50.- Jaros, P.P., 1978, Tracing of neurosecretory neurons in crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis. *Cell. Tiss. Res.* 194:297-302.
- 51.- Jaros, P.P., Dircksen, H. y Keller, R., 1985, Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohaemal organ and other structures in the eyestalk of shore crab *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 241:111-117.
- 52.- Jegla, T.C., 1985, Introduction of the symposium honoring professors Dorothy Bliss and Lewis Kleinholz: Advances in crustacean endocrinology. *Amer. Zool.* 25:155-156.
- 53.- Joseffson, L. y Kleinholz, L.H., 1964, Isolation and purification of hormones of the crustacean eyestalk. *Nature (London)*. 201:301-302.
- 54.- Jull, C., 1982, Enkephalin increases the efficacy of dopaminergic transmission in *Helix pomatia*. *Neuropharmacology.* 21:1301-1303.
- 55.- Kaestner, A., 1969, *Invertebrate zoology Vol. II.* Wiley Interscience N.Y.
- 56.- Kaestner, A., 1970, *Invertebrate zoology Vol. III "Crustacea"*. Wiley Interscience N.Y.
- 57.- Kleinholz, L.H., 1976, Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Am. Zool.* 16:151-166.
- 58.- Knowless, F.G.W., 1959, Control of pigmentary effectors. *EN: Comparative endocrinology.* A Gorbman (Ed.), Wiley N.Y.
- 59.- Laxnyr, L., 1984, Biogenic amines and DOPA in the central nervous system of decapod crustacean. *Comp. Biochem. Physiol.* 77c:139-143.
- 60.- Lochhead, J.H. y Resner, R., 1958, Functions of the eyes and neurosecretion in crustacea Anostraca. *Int. Congr. Zool. Proc.* XV pp. 397-399.
- 61.- Mancillas, R.J., McGinty, E.J., Selverston, I.A., Karten, H. y Bloom E.F., 1981, Immunocytochemical localization of

enkephalin and substance P in the retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature*, 293:576-578.

62.- Maynard D.M., 1961, Thoracic neurosecretory structures in brachiura. III Microanatomy of peripheral structures. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2:12-28.

63.- McLaughlin, P.A., 1980, Comparative morphology of recent crustacea. W.H. Freeman, San Francisco U.S.A.

64.- McLaughlin, P.A., 1982, Internal anatomy. EN: Bliss D.E. 1982 *The Biology of Crustacea*. Vol. 5. Academic Press, N.Y.

65.- Oguro, C., 1961, On the neurosecretory system of two parasitic isopods, Argesia pugittensis Dana, and Athelges Japonicus Shiino. *Annot. Zool. Jap.* 34:43.

66.- Passano, L.M., 1954, Phase microscopic observation of the neurosecretory product of the crustaceans X-organs. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli.* 24(suppl):72-73.

67.- Passano, L.M., 1960 Moulting and its control. En: Waterman, T.H., 1960, *Physiology of Crustacea*. Vol. I. Academic Press.

68.- Pineda, J.C. y Flores, J., 1986, Efectos de la picrotoxina sobre la actividad del órgano tensorreceptor en crustáceos y sobre el efecto inhibitorio del ácido gama amino butírico. (*En Prensa*).

69.- Potter, D.D., 1958, Observations on the neurosecretory system of portunid crabs. *Proc. Int. Symp. Neurosecretion* 2nd. 1950., pp 113-118.

70.- Quackerbush, S. y Fingerman, M., 1984, Regulation of neurohormone release in the fiddler crab Uca Pugilator of Gamma-aminobutyric acid, Octopamine, Met-Enkephalin and Beta-Endorphin. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C:77-84.

71.- Rehm, M., 1959, Observations on the localisation and chemical constitution of neurosecretory material nerve terminals in Carcinus maenas. *Acta Histochem.* 2:88-106.

72.- Shivers, R.R., 1976, Exocytosis of neurosecretory granules from the crustacean sinus gland in freeze-fracture. *J. Morph.* 150:227-250.

73.- Sterba, G., 1957, Die Neurosekretorischen Zellgruppen Einiger Cladoceren (Daphnia pulex and D magna, Simicephalus vetulus). *Zool. J.B. (Anat)* 76:303-310.

- 74.- Strolenberg, G.E.C.M., Van Helden, H.P.M. y Van Herp, F., 1977, The ultrastructure of sinus gland of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordmann). Cell. Tiss. Res. 180:203-210.
- 75.- Stuenkel, E.L., 1985, Simultaneous monitoring of electrical and secretory activity in peptidergic neurosecretory terminals of the crab. J. Physiol., 349:163-187.
- 76.- Tiegs, O.W., y Manton, S.S., 1958, The evolution of arthropoda. Biological Reviews of the Cambridge philosophical Society, 33:291-318.
- 77.- Van Harreveld, A., 1936, A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 34:428-432.
- 78.- Vázquez, L. y Villalobos, A., 1977, Arthropoda (Parte I), Facultad de Ciencias U.N.A.M. México.
- 79.- Wey Goldt, P., 1961, Zur Kenntnis der Sekretion im Zentralnervensystem der Ostracoden Cypridella littoralis G.S. (Brady) (Podocopa, Cithoidae) und Cypris pubera (O.F.M.) (Podocopa, Cipridae) Neurosekretion und Sekretzellen im Perineurium. Zool. Anz. 166:69-79.
- 80.- Willey, R.E. y Chapman, G.B., 1960, The ultrastructure of certain components of corpora cardiaca in orthopteroid insects. J. Ultrastruct. Res. 4:1-14.