

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

2 ej
96

**EL USO DE INVERTEBRADOS MARINOS
EN NEUROFISIOLOGIA**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

ERNESTINA TENTORI SANTA CRUZ

MEXICO, D. F.

6426

1970



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

	Pag.
I. Introducción	1
Cuadro Resumen	4
II. Phylum Coelenterata	9
a) Transmisión de impulsos nerviosos	12
b) Probable origen del sistema nervioso	13
c) Farmacología	19
III. Phylum Mollusca	26
a) Propiedades de membrana	26
b) Transmisión de impulsos nerviosos	33
c) Integración nerviosa	44
d) farmacología	45
IV. Phylum Arthropoda	52
a) Propiedades de membrana	52
b) Contracción muscular	53
c) Farmacología	56
V. Conclusiones	61
VI. Bibliografía	63

I. Introducción.

La investigación en neurofisiología ha sido realizada principalmente con objeto de ser aplicada a la medicina. Se ha obtenido información a partir de organismos marinos, aprovechando las ventajas que ofrece la simplicidad morfológica de algunos componentes de su sistema nervioso.

Entre las estructuras más importantes existe el axón gigante de calamar cuya utilización en estudios fisiológicos fue iniciada a finales de la década de 1930, por A.L. Hodgkin y ha hecho posible la explicación de propiedades de membrana y fenómenos como la generación y transmisión de impulsos nerviosos y la osmorregulación, entre otros.

Existen aún muchas interrogantes sobre fisiología evolutiva, adaptativa y comparativa, en la escala zoológica, que podrían resolverse, por medio de estudios en organismos marinos si tomamos en cuenta la diversidad animal que existe en los océanos.

Además, con el enfoque que ahora se ve al mar, como fuente de recursos naturales, se presentan problemas concretos de investigación en los seres marinos. El acercamiento a la solución de estos problemas se ve limitado básicamente por la falta de información y técnicas específicas. Generalmente se recurre a modificaciones de los métodos empleados o a la extrapolación de los datos obtenidos en estudios de vertebrados te

restres -frecuentemente mamíferos-, por lo que los resultados así obtenidos no son completamente confiables. Esta es la situación actual de algunas áreas de la Biología Marina.

Un ejemplo de esto se presenta en el reciente desarrollo de la Farmacología Marina, que tiene principalmente importancia médica.

La necesidad de conocer la forma de acción de las toxinas marinas se ve no sólo en el uso que se pueda hacer de ellas, sino en el tratamiento efectivo de los casos de intoxicación. Actualmente se cuenta con valiosas recopilaciones sobre este tema (Baslow, 1969; Halstead, 1965, 1967, 1978). En ellas los autores han optado por presentarlas en divisiones taxonómicas. Las propiedades tóxicas varían de una especie a otra y aún entre individuos de la misma especie, dependiendo entre otros factores, de la época del año y del medio en que se desarrollan. A esto es necesario agregar la falta de unificación de métodos de extracción, almacenamiento y bioensayo. Generalmente, las dosis aplicadas experimentalmente son mayores que las que llegan a la víctima por mecanismos naturales, este hecho debe considerarse también en los efectos que se registran. Probablemente exista un mismo mecanismo de acción a nivel celular, pero distinta respuesta de integración, en el organismo.

Para caracterizar en forma más natural a las sustancias biológicamente activas que se extraen de organismos marinos, es necesario conocer el efecto que éstas provocan en los seres vivos que normalmente interactúan con los productores de toxinas.

El objetivo del presente trabajo es analizar las líneas que ha seguido la utilización de organismos marinos en el estudio de la neurofisiología y conocer la perspectiva que ofrece la investigación en este campo, con interés especial en el terreno de la Farmacología.

Para llevar a cabo esta revisión sólo fueron seleccionados los trabajos que han representado aportaciones importantes, ya se trate de nueva información o de modificación de técnicas experimentales, en los phyla Coelenterata, Mollusca y Arthropoda.

A continuación se presenta un cuadro resumen y la revisión de cada uno de los tres phyla.

Phylum Coelenterata

Características de la red nerviosa

Organismo usado

Referencias

Medusa Aurelia

Eimer, 1874. Romanes, 1876. Be-
the, 1903. Mayer, 1906. Horrid-
ge, 1954.

Varias especies de medusas

Pantin, 1935. Bullock, 1943.

Transmisión de impulsos nerviosos

Varias especies de anémonas

Pantin, 1935a-d. Hall y Pantin,
1937.

Anémona Metridium senile

Ross, 1952.

Medusa Geryonia protosci-
dalis

Horridge, 1955.

Origen del sistema nervioso

Hidromedusa Sarsia, sifonó-
foro Hippopodius

Mackie, 1970.

Hydra littoralis, Comione-

Westfall, 1973.

mus vertens, Halicystis au-
ricula, Aurelia aurata, Gery-
saora quinquecirrha, Astrin-
gia lagollensis, Metridium
senile.

Sifonóforo Hippopodius

Mackie, 1976.

Farmacología

Anémona Calliactis parasitica

Ross y Pantin, 1940. Ross, 1945,
a, b.

Anémone Netridium senile

Rosa, 1952.

Medusas Aurelia, Cassiopea,

Horridge, 1958.

Chrysaora, Cyanea, Pelagia.

Anémone Aiptasia tagetes

Mettrick, 1965.

Phylum Mollusca

Propiedades de membrana

Organismo usado

Referencias

Calamar Loligo

Young, 1936.

Calamar Sepia officinalis

Hodgkin y Katz, 1949. Hodgkin y Keynes, 1953, 1955.

Calamar Loligo

Caldwell, Hodgkin, Keynes y Shaw, 1960. Keynes, 1963. Moore Narahashi y Scott, 1967. Caldwell y Lea, 1973, 1975, 1976.

Transmisión de impulsos

Calamar Loligo

Hodgkin, 1937. Hodgkin y Huxley 1939, 1942. Curtis y Cole, 1942. Hodgkin, Huxley y Katz, 1949, 1952. Huxley y Stampfli, 1950. Keynes, 1951.

Calamar Sepia

Keynes y Lewis, 1951.

Calamar Loligo

Hodgkin y Huxley, 1952 a-e, 1953 Frankenhaeuser y Hodgkin, 1957.

Gasterópodo Aplysia

Tauc, 1958, 1959.

Calamar Loligo vulgaris

Hagiwara y Tasaki, 1958.

Calamar Loligo pelaii

Baker y Shaw, 1961. Baker, Hodgkin y Shaw, 1962.

Calamar Dorytendy bleekeri

Hama, 1962.

Calamar Loligo

Falk y Fatt, 1964.

Almeja Mercenaria

Cottrell, 1967.

Calamar Loligo vulgaris

Miledi, 1966. Miledi y Slater, 1966. Katz y Miledi, 1966.

- Calamar Loligo vulgaris Keynes y Rojas, 1976.
- Integración nerviosa
- Gasterópodo Aplysia cali- Eccles, 1964.
fornica Kandel y Coggeshall, 1967.
- Farmacología
- Cefalópodo Octopus vulgaris Erspamer, 1953.
- Gasterópodo Aplysia Gerschenfeld y Tauc, 1961.
Dettbarn y Rossenberg, 1962.
Gerschenfeld, 1964. Gerschenfeld
y Chiarandani, 1965. Gerschen-
feld y Stefani, 1965, 1966. Asher
Gerschenfeld y Tauc, 1966.
- Anodontia cygnea Zs-Nagy, 1965. Salanky, Hiripi y
Labos, 1966.
- Gasterópodo Aplysia Dahl, 1966.
- Cefalópodo Octopus doefflini Loe y Florey, 1966.
- Almeja Merounaria Cottrell, 1966, 1967.
- Cefalópodo Octopus Florey y Hinesdorfer, 1967.
- Gasterópodo Buccinum unda- Cottrell y Laverack, 1968.
tus
- Bivalvo Mytilus Twarog, 1969.
- Gasterópodo Aplysia Asher, Marty y Neild, 1978.

Phylum Arthropoda

Propiedades de membrana

Organismo usado

Referencias

Cangrejo Carcinus

Hodgkin, 1938.

Langosta Homarus

Hodgkin y Rushton, 1946.

Contracción Muscular

Crustáceos Cambarus,

Hoyle y Wiersma, 1958.

Panulirus y Cancer

Crustáceos Balanus y Maia

Hoyle y Smith, 1963. Caldwell y
Walster, 1963. Weber y Herz,
1963.

Cirripedio Balanus

Hagiwara y Naka, 1964. Ridgeway
y Ashley, 1967. Ashley y Ridge-
way, 1968.

Farmacología

Langosta Homarus americanus

Kravitz, 1962. Kravitz, Kuffler
y Potter, 1963.

Cangrejo Carcinus

Chaplin et al., 1965.

Langosta

Karabashi, Moore y Scott, 1964.
Takata, Moore y Kao, 1966.

Crustáceo Panulirus argus

Dando y Selverston, 1972.

Langosta Homarus americanus

Wallace et al., 1974.
Cull-Candy, 1976. Russell, 1976.
Marder y Paupardin, 1978.

Langosta Homarus americanus

Kohishi y Kravitz, 1978.

II. Phylum Coelenterata

Las redes nerviosas de los celenterados forman un sistema nervioso primitivo que efectúa algunas funciones de integración semejantes a las de sistemas más complejos, por ejemplo, facilitación y actividad espontánea. El hecho de presentar tales propiedades y una estructura más sencilla ha sido motivo para que se estudien como modelo de sistema nervioso central.

Los organismos pertenecientes al phylum se encuentran en forma de pólipo o de medusa.

Un ejemplo de pólipo son las anémonas, que son animales sésiles de cuerpo cilíndrico. Presentan ritmos cíclicos de actividad lenta (aproximadamente 15 minutos) y respuestas protectoras rápidas que se manifiestan como contracción de la columna del cuerpo. Dichas respuestas son muy notables y pueden producirse experimentalmente por estimulación eléctrica y registrarse fácilmente con ayuda de un quimógrafo. Calliactis parasítica y Metridium senile soportan perfectamente estimulación cada 5 minutos por periodos de 5 a 6 horas, sin que exista cambio aparente en la velocidad o en la magnitud de la respuesta. Esto se ha aprovechado desde hace tiempo en estudios de actividad nerviosa. Pantin (1952) afirma que la ventaja de usar antozoarios en estudios de neurofisiología comparativa, no reside solamente en que sean primitivos filogenéticamente sino, además, en que al ser sésiles, sus actividades pueden ser analizadas completamente y con bastante exactitud. En

otras técnicas es necesario trabajar con órganos o tejidos aislados, o con animales completos inmovilizados. No se sabe hasta qué punto esto interfiere con el fenómeno estudiado.

Las medusas presentan un cuerpo en forma de campana con tentáculos de longitud variable y cuyo número depende de la especie. Los ejemplares maduros de algunas especies tienen un diámetro de 25 cm o más en la base de la campana. Las ventajas que se tienen al trabajar con estos animales son la fácil y rápida localización de las fibras nerviosas. Es suficiente adelgazar el tejido de la campana, para observarlas al microscopio. Responden en forma definida a la estimulación, se mantienen bien en acuario, sobreviven varias horas en condiciones de experimentación y son comunes en todos los océanos la mayor parte del año.

Los primeros trabajos reportados sobre neurofisiología de medusas provienen de Eimer (1874) y Romanes (1876). Ellos observaron en la medusa Aurelia fibras que se extienden desde cada uno de los ocho ganglios marginales (ver Horridge, 1954). Eimer los consideró fibras nerviosas responsables de la transmisión de la onda de contracción. Pero Romanes, por falta de evidencias, sólo les dió el carácter de "líneas de descarga o de continuidad fisiológica". Las localizó por medio de la relación entre estímulo y grado de contracción en diferentes zonas de la campana.

Trabajos posteriores se orientaron a caracterizar estas estructuras por medio de su función. En 1903 Bethe demostró

que la contracción puede ser propagada en áreas sin músculo. Mayer (1906) observó que en esta función es necesaria la presencia de fibras nerviosas y que puede propagarse también cuando el músculo ha sido anestesiado con Lg^{++} .

Pantin (1935) y Bullock (1943) registraron un período refractario en músculos de varias especies de medusas, mayor que el período refractario de los elementos conductores. La estimulación aplicada durante el período refractario de estos músculos provoca respuestas de contracción en la banda de tejido. La estimulación dada en el período refractario de los elementos conductores no provoca respuesta.

Horrige (1954) demostró las propiedades de respuesta "todo o nada", período refractario y propagación del potencial de acción, directamente en las fibras de Aurelia aurita. Con estos resultados afirmó que la contracción de la campana de la medusa, es transmitida a través de las fibras que observaron Elmer y Romanes, y por lo tanto, que eran fibras nerviosas. Sin embargo, con el estudio de la ultraestructura de estos tejidos conductores, se sabe ahora que no se trata propiamente de neuronas, sino de un epitelio capaz de conducir señales eléctricas. Esto se trata adelante con mayor detalle.

a) Transmisión de impulsos nerviosos.

Varios trabajos (Pantin, 1935a-d; Ross, 1952) demuestran que en anémonas y medusas, la estimulación aferente provoca una respuesta máxima, sólo si se aplica un tren de estímulos, con intervalos de 3 segundos. Esto significa que la transmisión nerviosa, se realiza por facilitación.¹

Algunas propiedades de la facilitación neuromuscular provienen de investigaciones sobre la influencia de diversos tratamientos en anémonas. Hall y Pantin (1937) mostraron que este proceso es modificado por cambios de temperatura. El estado de facilitación se prolonga por enfriamiento y se acorta por calentamiento del agua de mar que baña al animal.

Pantin (1935a-d) menciona, aunque superficialmente, haber detectado pequeños movimientos de diferentes tipos, después de estimular en serie, con intervalos de 3 ó más segundos. Este es otro mecanismo de transmisión que presentan los celentados en común con sistemas nerviosos de animales superiores, conocido como actividad espontánea.

La explicación a este proceso en vertebrados, es que después de una estimulación repetitiva, se presenta la respuesta

1. Un sólo estímulo que no provoca un cambio notable en una célula excitable, la deja en estado de facilitación, de tal manera que, un segundo estímulo de igual magnitud, puede provocar la transmisión de un impulso. Esto se observa tanto en la unión neuromuscular como en la unión interneuronal.

facilitada probablemente por incremento en la cantidad de transmisor liberado. Este transmisor tal vez persiste, de manera que una fibra facilitada, previa estimulación única en la vía aferente, da una respuesta repetitiva atrasada. Esto también puede deberse al retraso de impulsos o a la conducción en círculo. Otros autores han dado nombres distintos a este mecanismo. Katz (1966) lo llama potenciación postactiva y Aidley (1975) potenciación posttetánica.

La actividad espontánea fue observada con más detalle por Horridge en 1955. Este autor observó en la medusa Geryonia que la red circular y la red radial están separadas. La respuesta de la red radial es lenta y mantenida; la de la circular es espasmódica, aparentemente producto de actividad espontánea.

b) Probable origen del sistema nervioso.

Estudios en diversos tejidos animales y vegetales, muestran que la conducción no es una propiedad exclusiva del sistema nervioso. En particular, los epitelios excitables se han utilizado durante los últimos años, con el objeto de encontrar bases evolutivas sobre la formación de los sistemas nerviosos en general.

El complejo comportamiento de hidromedusas y la sencillez relativa de su sistema nervioso, han resultado ideales para estudiar los orígenes de la transmisión de impulsos. Estos animales presentan conducción neuroide y mioide, a través de

epitelio simple y mioepitelio. Con estos términos se define la propagación de impulsos eléctricos en los que no intervienen fibras nerviosas ni musculares. La conducción mioide además provoca contracción. El concepto de neuroide fue introducido por Parker en 1919 para describir la propagación de excitación en tejidos de esponjas, aunque aún no se tienen registros eléctricos en este grupo (ver Mackie, 1970).

Del registro de conducción neuroide y mioide en campana de hidromedusas del género Sarsia y sifonóforos de los géneros Nanoia e Hippopodius se ha obtenido información para caracterizar los epitelios conductores.

La conducción neuroide sigue la ley del todo o nada. Es más lenta que la conducción nerviosa en el mismo animal. No es polarizada, es decir, se propaga en todas direcciones. Tiene un período refractario corto. Como medio de transferencia de información no es menos eficiente que la conducción nerviosa. En estos animales, las respuestas elaboradas, graduadas y locales son controladas por el sistema nervioso. Las respuestas simples generalizadas dependen de la conducción neuroide. En los epitelios neuroides y mioides sólo se conoce sensibilidad táctil. La conducción neuroide no siempre propaga cambios eléctricos y cuando lo hace, no siempre transmite información. Los epitelios de la exumbrela y la subumbrela conducen independientemente. El epitelio de la subumbrela está asociado con los movimientos de retracción en respuesta a un estímulo negativo.

Mackie realizó en 1976, el primer intento de registro intracelular en epitelios excitables de invertebrados utilizando el epitelio glandular del hidrozooario Hippopodius (los resultados anteriores se obtuvieron con electrodos de succión, ver Mackie y Passano, 1968). El tejido es transparente y tiene células grandes, lo cual es una ventaja porque la preparación permite observar cambios anatómicos durante la estimulación. En estado de reposo, las células son planas y lisas. Después de ser estimuladas tienen apariencia globosa no lisa, debida a la presencia del producto de secreción en forma de pequeñas gotas.

Estimulando células de este epitelio se registra cambio de voltaje en células vecinas. Esto indica la existencia de flujo de corriente en el tejido.

Los potenciales de acción que se producen en el epitelio son Na^+ dependientes y provocan la liberación de la secreción por un mecanismo Ca^{++} dependiente.

La actividad secretora de este epitelio sólo se logra por estimulación táctil externa. Es entonces un medio de protección que podría ser comparado con las secreciones tóxicas que producen algunos invertebrados marinos. Hace falta probar directamente el papel de esta sustancia.

Sobre el origen de células conductoras, Mackie (1970), hace las siguientes consideraciones: una célula conductora debe tener una membrana excitable rodeada por un medio fluido

de baja resistencia. Su forma y su medio interno deben permitir el flujo de corriente -se ha observado que células esféricas o subsféricas no son capaces de propagar una señal eléctrica-. La excitabilidad de la membrana en diversas células puede tener el mismo principio y deberse al movimiento de iones diferentes. La electrogénesis de espigas se logra con diferentes iones en distintos tejidos, aún en el mismo individuo. Esta diversidad de mecanismos iónicos refleja la evolución independiente de los medios de conducción, que se han obtenido como respuestas adaptativas a diferentes circunstancias.

Según este autor, las mismas rutas por las que se lleva a cabo el transporte de metabolitos en estos tejidos, podrían ser usadas para permitir el paso de corriente eléctrica. La evolución de la conducción es inseparable de la evolución de la especialización de unión y ambas están sujetas a los requerimientos de homeostasis del tejido.

Se podría suponer que originalmente la comunicación era completamente química y que el movimiento de iones causaba manifestaciones eléctricas que no tenían carácter de transmisoras de información, sólo eran un efecto de ajustes iónicos debidos al movimiento de metabolitos. Probablemente esto fue el inicio de verdaderos impulsos.

En los sistemas nerviosos se tienen dos tipos de sinapsis: electrotonica y química. La preponderancia de sinapsis químicas sobre sinapsis electrotonicas, en todos los sistemas

nerviosos, puede deberse a su potencial de amplificación, a la superioridad de inhibición y a la actividad de mayor duración.

Parece ser que en ningún sistema neuroide hay transmisión química. Si es así, la transmisión eléctrica representaría un método primitivo que pudo haber surgido "de novo" en epitelios conectados por puentes de baja resistencia para intercambio de metabolitos.

Lackie propone como origen del tejido conductor en metazoarios, la capa de mioepitelio de celenterados. En éste cada célula sería capaz de llevar a cabo recepción, transmisión y contracción. El tejido muscular se habría originado por aislamiento de células contráctiles. De la misma forma se originarían células sensoriales y nerviosas. En zonas donde persistiera el epitelio primitivo, se formarían epitelios neuroideos y mioides, como los que se ven ahora en los celenterados.

Un sistema nervioso puede ser entonces, un sistema neuroide muy especializado, en que los elementos conductores habrán adquirido los rasgos morfológicos de neuronas. La transformación de la capa primordial de células conductoras incluiría la polarización de la transferencia de información.

Las características estructurales de estos sistemas también se han estudiado recientemente. Las primeras observaciones al microscopio electrónico sobre sinapsis interneuronal

de medusas las describen como morfológicamente no polarizadas, es decir, en ellas se presentan vesículas que probablemente contengan la sustancia neurotransmisora, en las membranas de las dos células. Posteriormente otras observaciones mostraron en algunos celenterados, sinapsis interneuronales y uniones neuromusculares polarizadas.

Westfall (1973) analizó las relaciones celulares en vías neuromusculares de algunos hidrozorios y antozoarios. Localizó conexiones entre células de mioepitelio por desmosomas y espacios. Se sugiere que estos desmosomas sean los sitios de transmisión electrofónica entre células del epitelio. Se observaron sinapsis entre axones sin neuroglia (células con función de soporte y probablemente trófica) y células ganglionares, células mioepiteliales, axones del mismo tipo y otras neuronas. Estas sinapsis se clasificaron como uniones polarizadas, según la distribución de vesículas sobre las membranas.

Las células sensoriales reciben el estímulo externo, por medio de células ganglionares, este estímulo es transmitido a células mioepiteliales. La propagación de la señal entre estas células causa la contracción muscular del tentáculo completo de las especies tratadas (Hydra littoralis, Gonionemus vertens, Haliclystus auricula, Aurelia aurita, Chrysaora quinquecirrha, Astrangia lagollensis y Metridium senile).

c) Farmacología.

En 1940, Ross y Pantin iniciaron estudios sobre facilitación en anémonas, analizando la acción que tenían en este mecanismo iones y algunas sustancias con actividad biológica conocida. Concluyeron que existen dos fases en la transmisión de excitación del nervio al músculo. Una primera fase de facilitación o desarrollo de sensibilidad en la unión neuromuscular, y una segunda fase de excitación que se manifiesta como contracción y sólo sucede después de la primera.

A partir de estas observaciones se trató de encontrar un compuesto químico con propiedades facilitadoras. Primero entre las drogas cuyos efectos son ya conocidos en vertebrados y posteriormente en extractos de las propias anémonas.

En 1945, Ross analizó la acción de diversos fármacos sobre la actividad neuromuscular de la anémona Calliactis parasitica. En el experimento se aplicaron descargas eléctricas y se registró la respuesta del músculo marginal del esfínter en un quimógrafo, colocando al animal en agua de mar y en agua de mar con droga. Las drogas usadas se dividieron en cuatro grupos: i) colinérgicas¹; ii) adrenérgicas²; iii) sustancias

1. Acetilcolina (ACh) es el transmisor de unión neuromuscular, terminaciones preganglionares simpáticas y terminaciones preganglionares y postganglionares parasimpáticas. Las neuronas que liberan ACh se conocen como colinérgicas. Existen otras drogas que excitan o inhiben estas sinapsis, a las

diferentes de las anteriores, que se sabe producen alguna alteración en sinapsis de vertebrados; iv) drogas encontradas en invertebrados marinos.

En el primer grupo, ACh, eserina, nicotina, atropina y curare, demostraron que el mecanismo transmisor en anémonas no es como el de uniones de vertebrados donde ACh es el transmisor químico.

En el segundo grupo, tiramina, triptamina y 933F (piperidinoetilbenzodioxano), sugieren que en Calliactis parasitica existe un proceso químico parecido al que se presenta en terminaciones nerviosas adrenérgicas, aunque las sustancias que tienen efecto sobre ellas, producen uno diferente al que se observa en vertebrados. Este hecho y la falta de efectividad de la adrenalina, indican diferencias de naturaleza química en la transmisión a este nivel.

En el tercer grupo se usaron: pituitrina, veratrina, eztricina, guanidina e histamina. También con estas pruebas se demuestran las diferencias de las propiedades fisiológicas entre los sistemas nerviosos de anémonas y vertebrados.

que también se denomina colinérgicas. Entre éstas se encuentran nicotina, atropina y curare.

2. Adrenalina (Adr) es el neurotransmisor de nervios simpáticos postganglionares. Las neuronas que liberan adr son llamadas adrenérgicas. Las drogas adrenérgicas son las que tienen efecto sobre las sinapsis adrenérgicas. Algunas de estas drogas son ergotoxina, isorenalina y amfetamina.

Dentro del cuarto grupo se incluyeron: hidróxido de tetrametilamonio (que tal vez sea el veneno de la anémona Actinia equina), óxido de tetrametilamina, hidrocloreuro de betaína, tirosina, histamina y guanidina.

La conclusión de lo anterior es que el sistema neuromuscular de la anémona es sensible a drogas con efecto simpático en vertebrados. No hay evidencia de efecto de drogas parasimpatomiméticas como la ACh.¹

Sin embargo, análisis más recientes (Wood y Lenz, 1964) demostraron la presencia de epinefrina, noepinefrina (adrenérgicos), 5-hidroxitriptamina (transmisor central) y acetilcolinesterasa (enzima que degrada ACh), en sistema nervioso de anémonas. Esto indica la existencia de mecanismos nerviosos colinérgicos y adrenérgicos en el grupo.

Teniendo como base la hipótesis del facilitador, se esperaríamos que una anémona expuesta a esta sustancia, presentara: 1) aumento en la magnitud de la respuesta; 2) respuesta al primer estímulo; 3) retraso en el decaimiento de la facilitación. Los dos primeros puntos se cumplen, pero con variaciones muy amplias, no predecibles por la hipótesis. El tercer punto no se presenta.

1. Se consideran drogas con efecto simpatomimético las que excitan el sistema nervioso simpático, y drogas con efecto parasimpatomimético las que excitan el sistema nervioso parasimpático en vertebrados.

Ross (1945b) realizó dos diferentes pruebas con secreciones y extractos de anémonas. En la solución que baña anémonas estimuladas, no se detectó ninguna sustancia facilitadora. Si hubo liberación de alguna, no fue una cantidad suficiente para estimular otro animal. En otra prueba, agregó directamente extracto de anémona al agua de mar en que se encontraban los animales experimentales. Como resultado se produjo respuesta al primer estímulo. Después de unos minutos se recuperó la facilitación y más tarde el extracto produjo una acción depresiva, reacción similar a la producida por aplicación de drogas efectivas en estimulación periférica. Los efectos consistentes del extracto son respuestas a un solo estímulo y efecto depresivo. No se produjo incremento en la respuesta, que es una característica del efecto de las drogas.

El experimento muestra que el extracto contiene una sustancia con algunas propiedades de facilitador que, a diferencia de las drogas, ejerce su efecto con regularidad. Esto sugiere que los efectos sensibilizantes de ambos, se deben a diferentes sustancias y probablemente a diferentes formas de acción. El extracto tampoco retarda el decaimiento, como se esperaba.

En su último reporte de esta serie, Ross (1952) preparó extractos de anémonas estimuladas por manipulación y corte. El extracto control se preparó con anémonas congeladas con aire líquido. No hubo diferencia significativa entre las actividades de ambos extractos. Además, se hicieron dos tipos de ex

tractos: uno con la fracción disco-esfinter y otro con la fracción subesfinter. La primera resultó más efectiva. Esto revela que la sustancia estudiada se encuentra en mayor cantidad en el disco y los tentáculos, que en el resto del cuerpo y tal vez está asociada con la distribución de los nematocitos.

El efecto de los extractos incrementa enormemente la probabilidad de una respuesta rápida a estímulos sencillos, es decir, a mayor dosis de extracto corresponde mayor frecuencia de respuestas en el primer minuto. También hay relación entre el tiempo en que aparece la respuesta y la cantidad de extracto introducido.

No se acepta la presencia de un facilitador por haberse producido efectos similares con diferentes tratamientos. Tal vez este efecto es sólo una respuesta general a sustancias que normalmente no se encuentran en el medio. Sin embargo, esto no es válido para los extractos. Otro hecho contrario a la hipótesis es encontrar la misma actividad en el extracto de animales no estimulados.

Ross concluye con estos resultados, que las dos fases que ya habían detectado -facilitación y excitación- se producen por mecanismos independientes. Se conoce la existencia de la facilitación sólo a través de la respuesta rápida pero puede haber respuesta rápida por otra causa, por ejemplo un estímulo de magnitud mayor o igual al umbral.

Los últimos trabajos que se reportan sobre facilitación provienen de estudios en mamíferos. Las investigaciones rea-

lizadas por Ross y Pantin fueron independientes de aquellas. Ya se mencionó antes la explicación que se da a la facilitación en vertebrados. Este hecho demuestra que no hay completa validez al tomar resultados obtenidos en vertebrados para interpretar actividades en invertebrados.

HorrIDGE (1958) basado en los trabajos realizados por Rosa, trata de explicar el ritmo de nado de las medusas. Sobre esto no se conoce origen ni control, pero se ha pensado en un mecanismo de marcapaso. Existe un patrón constante en los intervalos de los movimientos de contracción, que se ve alterado por la aparición de intervalos mayores que los normales cuando se provocan contracciones adicionales. Después de esta pausa, el movimiento rítmico original se restablece.

Probando la influencia de algunas drogas en este proceso se observó que la triptamina tiene efectos de aceleración en el ritmo de contracción y que la concentración efectiva depende de la especie utilizada. ACh, Adr, curare, efedrina e histamina, no provocan cambio significativo. Estos resultados indican que también el marcapaso es farmacológicamente diferente de mecanismos análogos en otros phyla.

Por métodos histoquímicos se ha encontrado histamina en diferentes tejidos animales y vegetales. Existe más información sobre el papel de esta sustancia en vertebrados que en invertebrados. En algunos invertebrados marinos se le atribuyen funciones de defensa y ataque por haberse detectado en al

tas concentraciones en secreciones venenosas (Nood y Lenz, 1964). En nematocistos del antozoarrio Alipasia taretes se encuentra en concentraciones muy altas (Mettrick, 1965) razón por la cual este animal puede ser de mucha ayuda en determinar la función de este compuesto.

III. Phylum Mollusca

Las fibras eléctricamente excitables proveen al animal de un medio rápido de comunicación interna. En forma análoga a los cables conductores, estas fibras aumentan su velocidad de transmisión al ser aisladas del medio ambiente o al aumentar su sección transversal.

Estas dos variantes se han presentado a lo largo de la evolución de los sistemas nerviosos. La formación de una capa aislante -mielina- es lo que se presenta en vertebrados y el desarrollo de "fibras gigantes" lo que se presenta en invertebrados. Este último rasgo es característico de moluscos y ha sido utilizado como objeto de experimentación en fisiología.

a) Propiedades de membrana.

El concepto de membrana delular ha sido ampliamente discutido. Sin embargo, aún en la actualidad se explican con diversos modelos sus propiedades. Los primeros estudios realizados en axón gigante de calamar estuvieron enfocados precisamente a este tópico y abarcaron problemas relacionados con estructura, contenido y funcionamiento de la membrana.

El axón gigante de calamar ha sido muy usado por los neurofisiólogos a partir de la descripción realizada por Young en 1936. La fibra gigante del primer nervio estelar puede alcanzar un milímetro de diámetro y además es muy resistente. Estas características permiten un manejo relativamente sencillo.

llo. Su interior puede ser vaciado fácilmente, lo cual hace posible analizar cuantitativamente su contenido. Este ~~tam-~~ ~~bien~~ puede ser sustituido por soluciones de composición química conocida, manteniendo su capacidad normal de funcionamiento.

Por extracción de axoplasma se han determinado las concentraciones iónicas que existen a ambos lados de la membrana. Hodgkin (1958) obtuvo los siguientes valores en fibra gigante de calamar:

Tabla 1.

ión	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Isethionato	Aniones orgánicos
mM int	50	400	40-100	0.4	10	250	ca. 110
mM ext	460	10	540				

La distribución asimétrica de iones en el interior y exterior celular es un requisito para que ocurran los cambios eléctricos y con esto la transmisión del impulso.

La detección del movimiento de iones dentro de la célula y a través de la membrana, se ha realizado por distintos métodos, principalmente por el uso de iones radioactivos (Hodgkin y Katz, 1949; Hodgkin y Keynes, 1953, 1955).

Los iones se distribuyen bajo diferentes mecanismos, como resultado de las características de la membrana celular.

Sodio, potasio y cloro han sido los mejor estudiados por su importancia en los cambios eléctricos de la actividad nerviosa.

Movimiento de iones K^+ .

Tomando como base la teoría de equilibrio de Donnan para explicar el potencial de membrana en reposo, se ha propuesto la hipótesis del electrodo de K^+ . Según ésta, el potencial sería determinado principalmente por el gradiente electroquímico del ión K^+ . Hodgkin y Keynes (1955) al estudiar la relación entre potencial de membrana y concentración externa de K^+ , obtuvieron resultados semejantes en axón tratado con 2,4-dinitrofenol (DNP) y axón normal. Los valores obtenidos y los teóricos para potencial de membrana por medio de equilibrio de iones K^+ (E_K^+) son similares cuando se trabaja con concentraciones externas de potasio mayores de 10 mM.

En el cálculo teórico se considera que las concentraciones de K^+ corresponden sólo a potasio en forma iónica. Entonces, para aceptar esta explicación, es necesario demostrar que todo el potasio interior se encuentra en forma iónica (el total es lo que se determina por análisis químico). En 1953, Hodgkin y Keynes demostraron que todo el potasio radioactivo que se inyectó en un axón colocado en un campo eléctrico longitudinal, se desplaza hacia el cátodo. Este hecho apoya la hipótesis anterior.

Hodgkin y Katz (1949) encontraron en axón gigante de Sepia officinalis, que el Na^+ externo tiene un efecto mayor sobre el potencial de membrana cuando la concentración externa de K^+ es baja.

Movimiento de iones Na^+ .

El movimiento de Na^+ del interior al exterior de la célula se hace contra un gradiente químico y eléctrico (ver Tabla 1). Proporciones constantes de iones Na^+ son removidas de la célula en intervalos sucesivos iguales (Hodgkin y Keynes, 1955a). Esto se estudió en axón de Sepia, sustituyendo por Na^+ radioactivo todo el Na^+ interno y midiendo la radioactividad de la solución externa a diferentes tiempos.

El movimiento de Na^+ hacia afuera es un proceso activo. Se ha probado que consume energía de compuestos orgánicos fosforados (Hodgkin y Keynes, 1955a; Caldwell, Hodgkin, Keynes y Snaw, 1960). Al adicionar al medio inhibidores respiratorios como DNP o cianuro, el eflujo de iones Na^+ disminuye notablemente y alcanza su valor normal con inyecciones de adenosin-trifosfato (ATP), fosfato arginina (AP) o fosfoenolpiruvato.

Este eflujo de Na^+ parece estar acoplado con la concentración externa de K^+ , ya que se ha observado que el transporte activo de Na^+ no se efectúa si el medio externo queda libre de iones K^+ . Sin embargo, en el axón envenenado con cianuro, no existe este acoplamiento si se usa ATP como fuente energética, pero sí al usar AP (Caldwell et al., 1960). La explicación a esto es que probablemente el sistema no sólo requiera ATP, sino también una relación ATP/ADP alta. Si ocurre la reacción $\text{ADP} + \text{ATP}$, la cantidad de ADP se mantiene baja. Si sólo interviene ATP, se produce ADP, al ser aquél consumido.

Hodgkin y Keynes (1955) reportaron otro aspecto de la relación entre el movimiento de estos dos iones. Usando axón de Sepia officinalis, observaron que en una fibra a la que se aplica cianuro, el cual inhibe la bomba metabólica de Na^+ , la cantidad de Na^+ que sale, disminuye considerablemente. La cantidad de Na^+ que entra no sufre ningún cambio. Al mismo tiempo se observa disminución del influjo de K^+ y ninguna alteración en eflujo del mismo ión. Esto indica que el influjo de K^+ es activo y está acoplado con el eflujo de Na^+ .

Movimiento de iones Cl^- .

Por diversos métodos se ha probado que la membrana es permeable al Cl^- . Cuando se estudió por primera vez el movimiento de este ión en músculo de rana (Boyle y Conway, 1941), se obtuvieron valores de flujo que eran consistentes con el mecanismo de distribución pasiva.

Keynes (1963) analizando el contenido del axoplasma de axón gigante de calamar detectó valores de concentración total de cloro interior superiores a lo que se esperaba. Este autor llevó a cabo experimentos para conocer la causa de las concentraciones tan altas del ión. Él pensó que las alternativas eran que parte del cloro medido estuviera unido a otras especies químicas y la otra parte correspondiera efectivamente al ión Cl^- o, que el cloro estuviera siendo transportado contra un gradiente electroquímico, en forma activa. El valor que se obtuvo para actividad de cloro del axoplasma indicó que todo el cloro estaba en forma iónica. Otra prueba que se hizo consistió en colocar dos segmentos de un mismo

axón en una solución de ^{36}Cl , en uno de ellos se aplicó además DNP como inhibidor metabólico. En el interior del segmento normal se registró una cantidad alta de cloro marcado. En el segmento envenenado el influjo fue reducido aproximadamente a la mitad del valor normal.

Aplicando ouabaina, sustancia que bloquea la salida de sodio sin interferir en el metabolismo, no se alteró el influjo de cloro. El mecanismo activo que transporta Cl^- hacia el interior de la fibra es entonces independiente de la bomba de Na^+ .

Estos mismos tratamientos se hicieron sobre eflujo de Cl^- sin obtener diferencia alguna entre axón envenenado y axón normal. Significa esto que la salida de Cl^- no es un proceso activo.

No se sabe si el transporte activo de Cl^- es funcionalmente importante, o si es una consecuencia de la relación entre influjo de cloro y movimiento de algún otro ión.

La bomba de cloro se ha detectado en axón de varias especies de calamar, pero no se ha probado en otros tejidos excitables.

Movimiento de otros iones.

A través de la membrana del axón se realiza transporte de aminoácidos (Caldwell y Lea, 1975). Esto se ha comprobado por extrusión del axoplasma después de un período de exposición a aminoácidos marcados -glicina, glutámico, aspártico, arginina-.

El flujo de cada aminoácido fue reducido aplicando ouabaína. Esta inhibición es diferente a la que se produce en la bomba de Na^+ y se presenta con retraso. Parece no estar acoplada con ella, ya que los cambios de Na^+ interno y externo no alteran el flujo de aminoácidos.

Caldwell y Lea concluyeron que la entrada de aminoácidos en la fibra es debida a un sistema de transporte cuya inhibición por ouabaína no está relacionada con la inhibición de la bomba de Na^+ , producida por la misma sustancia.

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica para cuantificar aminoácidos marcados en el axoplasma de calamar por medio de un centellador intracelular de vidrio (Caldwell y Lea, 1978). Con este método se han obtenido resultados similares a los de la técnica de extrusión de axoplasma y análisis posterior de éste.

Los aminoácidos que llegan al interior de la fibra se distribuyen uniformemente. Caldwell y Lea (1973, 1978) han estudiado particularmente el flujo de glicina y han observado que se realiza por dos diferentes mecanismos. Uno ATP dependiente y el otro parece ser un proceso de difusión. Este último probablemente envuelve un sistema de intercambio de aminoácidos ya que el flujo de glicina al interior y exterior de la célula no presenta una relación 1:1, algunos otros aminoácidos (cisteína, alanina, serina, fenilalanina, leucina, isoleucina, tiramina) son intercambiables con glicina.

Se cuenta también con estudios sobre las características físicas de la propia membrana. Moore, Narahashi y Scott (1967) han tratado de conocer la concentración de poros en la membrana. Su experimento muestra que 13 moléculas de tetrodotoxina deben ser absorbidas en una μ^2 de membrana para bloquear los canales de Na^+ . Suponiendo que cada molécula bloquea un canal y que la distribución de dichos canales es uniforme, éstos deben estar separados entre sí aproximadamente por 2000 Å.

b) Transmisión de impulsos.

La transmisión de impulsos se analiza, generalmente, en dos niveles: i) cambios de potencial y mecanismos de propagación de la señal eléctrica a lo largo de una fibra nerviosa o muscular y; ii) paso del impulso a través de los límites de las células, en sinapsis.

Propagación del cambio de potencial dentro de una fibra.

La primera teoría sobre potencial de acción fue propuesta por Bernstein en 1902. Él pensaba que la membrana era selectivamente permeable al potasio y que al ser excitada, su permeabilidad se extendía a todos los iones, tendiendo a anular el potencial eléctrico entre el medio intracelular y el medio extracelular.

Los primeros registros que se hicieron para conocer el cambio de potencial durante la actividad de una fibra, se hicieron en axón de crustáceo, usando electrodos externos (Hodg

kin, 1939). Los resultados no fueron satisfactorios ya que sólo se obtuvieron valores relativos de la diferencia de potencial, entre distintos puntos en el exterior del axón.

El estudio de los cambios de potencial a través de la membrana usando electrodos intracelulares lo hicieron por primera vez Hodgkin y Huxley en 1939, y con una técnica similar, Curtis y Cole en 1940, usando como preparación el axón gigante de calamar.

El electrodo intracelular era un capilar de vidrio de 100 μ de diámetro, lleno de agua de mar (Hodgkin y Huxley, 1942) o de una solución de KCl isotónica al agua de mar (Curtis y Cole, 1942). Se insertó a través del extremo cortado del axón y se introdujo hasta un nivel a partir del cual se obtuvo amplitud constante para el potencial de acción (aproximadamente a 1Cm del extremo). El potencial de membrana se obtuvo de la diferencia entre potencial del microelectrodo dentro de la célula y su potencial en el agua de mar.

En cada uno de los dos trabajos, al estimular con electrodos externos, el registro indicó que el potencial de acción no es sólo despolarización, sino inversión del potencial de reposo, pero los resultados no coincidieron cuantitativamente. El mayor potencial de acción que obtuvieron Hodgkin y Huxley fue de 95 mV; el de Curtis y Cole fue de 168 mV. Probablemente el error se debió al estado de las fibras, ya que se comprobó que el potencial de acción es modificado por uso

y tiempo de aislamiento. Los potenciales de membrana en reposo son semejantes en ambos. Este resultado no se esperaba porque era contrario a la teoría de Bernstein sobre la membrana activa.

En estos experimentos se supo que la magnitud del potencial de acción depende de las condiciones en que se encuentra la fibra. La membrana es distensible. Esto lo muestra el diagrama experimental de Hodgkin y Huxley, cuando la inserción de un microelectrodo no provocó desplazamiento de axoplasma, aunque el incremento del diámetro del axón, no fue mayor del 2%.

Por diferentes experimentos se demostró que la excitabilidad depende del Na^+ exterior, disminuye o desaparece al ser retirado este ión del medio externo (Hodgkin, Huxley y Katz, 1949; Huxley y Stampfli, 1950; Keynes, 1951; Hodgkin y Huxley 1952a-e).

El modelo para la teoría de Na^+ lleva a una serie de reacciones en ciclo, difíciles de estudiar. El método de "control de voltaje, ideado por Hodgkin, Huxley y Katz (1952) permitió el análisis completo del potencial de acción. El método está basado en el concepto de potencial de equilibrio de un ión, dado por la ecuación de Nernst:

$$E = \frac{RT}{zF} \log_e \frac{X_1}{X_2}$$

en donde, E es el potencial de membrana, R es la constante

universal de los gases, T es la temperatura absoluta del sistema, F es la constante de Faraday, z es la carga del ión, X_1 y X_2 son las concentraciones del ión a los lados de la membrana.

Esta técnica consiste en controlar el potencial de membrana bajo valores constantes y por medio de la cuantificación de cambios de Na^+ exterior, conocer el incremento de conductancia del sodio (g_{Na^+}) y el flujo hacia el exterior.

Por este método se demuestra que la corriente inicial que provoca la despolarización, se debe al movimiento de iones Na^+ hacia adentro. El potencial al cual la corriente se invierte corresponde al potencial de equilibrio de sodio (E_{Na^+}).

La corriente lenta mantenida hacia afuera y que repolariza la fibra, es causada por el movimiento de iones K^+ (Hodgkin y Huxley, 1953).

La despolarización produce entonces tres efectos: rápido incremento de g_{Na^+} (flujo hacia adentro); lento decremento de g_{Na^+} (flujo hacia afuera); lento incremento de g_{K^+} (flujo hacia afuera).

La dirección de la corriente iónica cambia cuando el potencial de acción se encuentra en el potencial de equilibrio de Na^+ . Es importante hacer notar que las permeabilidades de Na^+ y K^+ no aumentan en forma simultánea.

El incremento de g_{Na^+} es el factor regenerativo que refuerza el crecimiento de la espiga. Significa esto que al dejar la membrana el estado de reposo, los iones Na^+ entran más

rápido, se hace más positivo el interior con respecto al exterior, disminuye el potencial y esto provoca la entrada de más cargas positivas y la repetición de todo el mecanismo.

Como factores de autorreparación funcionan incremento de gK^+ y gCl^- , que provocan la caída de potencial a su nivel original. La membrana vuelve a su permeabilidad iónica inicial. El tiempo que toma esto corresponde al período refractario. El umbral corresponde al punto de equilibrio entre flujo de Na^+ y flujo de K^+ y Cl^- , lo que mantiene la despolarización en una fase inestable.

En este mismo trabajo, se obtuvieron valores de gNa^+ y gK^+ para distintos potenciales de membrana. En todos apareció primero incremento de gNa^+ y después incremento de gK^+ . Los autores expresaron los resultados en ecuaciones con las que hicieron predicciones de conductancia en potencial de acción normal, que resultaron correctas.

Según esta teoría de la conducción nerviosa, existen 3 iones principales en la determinación del potencial de membrana: Na^+ , K^+ , Cl^- . Este se desplaza hacia el potencial de equilibrio del ión de mayor conductancia en ese momento.

Si la teoría iónica es cierta, debe haber una transferencia neta de cargas positivas, o sea, debe entrar una cantidad de Na^+ mayor que la cantidad de K^+ que sale, durante la despolarización.

Keynes y Lewis (1951) usando iones radioactivos, midieron el intercambio neto de Na^+ y K^+ en actividad nerviosa,

comparando el contenido de estos iones en axón de Sepia en reposo y axón estimulado durante un tiempo. La entrada neta de Na^+ es de $3.6 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2/\text{imp}$. La pérdida neta de K^+ es de $3.6 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2/\text{imp}$.

Para explicar las bases moleculares de los cambios de permeabilidad se han propuesto diversos mecanismos. Desde la realización de los primeros experimentos es conocida la influencia del ión Ca^{++} en la actividad de las células excitables. Una alta concentración externa de Ca^{++} provoca incremento en potencial de umbral y en resistencia de la membrana. Una disminución de la concentración externa de Ca^{++} llega a provocar respuestas espontáneas. Esto sugiere que el calcio en el medio externo y el sistema que controla g_{Na^+} y g_{K^+} , están asociados.

Frankenhaeuser y Hodgkin (1957) propusieron la hipótesis de que el Ca^{++} se encuentre bloqueando poros o acarreadores de Na^+ , sobre la membrana, de tal manera que, la disminución de Ca^{++} en el exterior, hace al tejido más excitable porque requiere una menor despolarización para alcanzar el nivel en que g_{Na^+} sea mayor que g_{K^+} , factor necesario para producir el potencial de acción.

Otra hipótesis basada en cambios de g_{Na^+} y g_{K^+} es que es tos dos iones pasan por poros comunes. Sin embargo, Narahashi, Moore y Scott (1964) al aplicar tetrodotoxina bloquearon exclusivamente los canales de Na^+ y no los de K^+ .

Desde 1937 se contaba con técnicas para obtener el axoplasma de axones de calamar. En 1961, Baker y Shaw usaron fibras previamente vaciadas y observaron que rellenándolas con soluciones isotónicas de sales de K^+ , se registraban en ellas nuevamente impulsos eléctricos durante dos o tres horas.

Otra forma de demostrar que la membrana no es dañada por la extrusión de axoplasma, es remover el axoplasma de la mitad de una fibra y llenarla con el axoplasma de la otra mitad. Este segmento modificado de axón excitable, propaga el potencial de acción con la misma amplitud que lo hacía antes de la operación.

En el experimento que realizaron Baker, Hodgkin y Shaw en 1962 mostraron el efecto que produce el llenar una fibra con sales de potasio. Estas fibras dan potenciales de acción aproximadamente del tamaño normal. Usando una solución isotónica de sulfato de K^+ , que tiene una mayor conductividad eléctrica que el axoplasma, se obtuvieron potenciales de acción y velocidad de conducción mayores que en el axón intacto.

Se vio también que a medida que aumenta el volumen de la fibra, la magnitud de la respuesta es mayor y el tiempo de conducción es menor.

Los axones que fueron llenados con soluciones artificiales también fueron sometidos a estimulación masiva hasta que la respuesta dejaba de ser "todo o nada". Axones intactos y axones rellenos alcanzaron un promedio de 5×10^5 impulsos.

Tomando los datos de Keynes y Lewis (1951) de salida de K^+ y entrada de Na^+ , se calculó la cantidad de sodio que aumenta y la cantidad de potasio que disminuye en el interior de la fibra al ser excitada. Renovaron el fluido interno con la idea de "rejuvenecer" la fibra y obtuvieron respuestas nuevamente. Sin embargo, no aseguran que esto se debiera al cambio de la concentración interna o al grado de expansión del axón.

Estimulando a diferentes temperaturas (Keynes y Lewis, 1951), los axones rellenos con K_2SO_4 , se observa que la duración del potencial de acción es mayor a baja temperatura. Lo mismo reportan Hodgkin y Katz en 1949, trabajando con axones intactos, por lo que se cree que la temperatura influye directamente sobre membrana y no en axoplasma.

Hodgkin y Huxley (1952e), usando un modelo teórico con propiedades de cable (medidas en experimentos anteriores, de los mismos autores 1952a-d) idénticas a las del axón, aplicaron pulsos eléctricos obteniendo la misma forma de espiga, su carácter "todo o nada", las cantidades de intercambio iónico y la velocidad de propagación.

Cuando se aplicaron pulsos eléctricos de la misma magnitud, pero de signo contrario sobre la membrana, se formaron corrientes asimétricas. Sin embargo, se esperarían corrientes iguales y opuestas. Se explica esta asimetría por la existencia de partículas móviles cargadas, que forman parte de la membrana.

Haciendo una comparación entre el comportamiento de estas partículas y el de conductancia de Na^+ , en fibras en reposo y fibras en actividad, Keynes y Rojas (1975) han encontrado una gran similitud y las han identificado como las partículas de entrada de Na^+ . A estas partículas se les atribuye el control de la abertura de los canales de Na^+ cuando la membrana se despolariza. La comparación además sugiere que existen tres de estas partículas por cada canal.

Transmisión eléctrica en sinapsis.

Debido a las propiedades de cable de las neuronas, la señal eléctrica no viaja más de 1 ó 2 mm sin disminuirse y distorsionarse considerablemente. Además, la corriente longitudinal decrece al aumentar la distancia y una parte de ella se pierde por la conductancia de la membrana. El alcance de la señal depende de la resistencia de la membrana y del medio interno (Palk y Fatt, 1964). Ante estas propiedades del medio conductor queda el problema de conocer el mecanismo por el cual, se evita la atenuación del impulso transmitido en la fibra nerviosa.

El estudio de la transmisión eléctrica en sinapsis fue iniciado en 1937 por Hodgkin. El detectó algunas propiedades de cable conductor en las fibras nerviosas y la necesidad del acoplamiento entre ellas para que pudiera haber transmisión de cambios eléctricos. La corriente que llega a la membrana postsináptica disminuye su potencial hasta un nivel en que se produce excitación y cambio de potencial amplificado, mandan

do una corriente capaz de excitar a la región siguiente. Al aplicar anestésicos locales, se bloquea la propagación del estímulo sólo en forma local. Normalmente el incremento de potencial es tan grande que puede pasar sobre la región no excitada y continuar excitando. Para bloquear completamente es necesario anestesiar una región mayor.

En cierta forma Hodgkin plantea la posibilidad de otro mecanismo de transmisión, al observar que ésta disminuye notablemente al intercalar una membrana, y es muy remota si se separan dos partes del axón por un espacio aproximadamente de 150 \AA , distancia que se observa entre algunas sinapsis. Es decir, que según las características de la sinapsis, la transmisión se podrá realizar directamente por la propagación de cambios eléctricos o por algún neurotransmisor químico que viaje de una fibra a la otra.

Transmisión química en sinapsis.

Los axones gigantes de calamar también han sido usados en el estudio de la transmisión en sinapsis. Como otra posible preparación para este tipo de experimentos, Tauc (1958, 1959) sugiere los ganglios de Aplysia que tienen neuronas de 800μ de diámetro, en las que se han registrado intracelularmente potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios.

Los estudios de sinapsis gigante de calamar, con microscopio electrónico mostraron la existencia de prolongaciones axoplásmicas de la fibra postsináptica hacia la presináptica.

Con el fin de conocer el mecanismo de transmisión del im pulso nervioso a través de sinapsis, Hagiwara y Tasaki (1958) realizaron una serie de experimentos.

Demostraron que existe un aislamiento eléctrico perfecto entre los dos axones. Produciendo una despolarización subumbral, o una alta hiperpolarización del axón presináptico, no observaron cambios en el potencial de membrana del axón postsináptico. Tampoco la fuerte despolarización o hiperpolarización en axón postsináptico produjo variación en la membrana del axón presináptico.

Mediendo el potencial eléctrico a través de las fibras sinápticas, observaron que el pequeño espacio que existe entre ellas tiene un potencial similar al del medio extracelular circundante.

Observaron además un paralelismo entre potencial sináptico y conductancia del axón postsináptico.

Estos hechos, junto con la comprobación de un retraso sináptico en la transmisión de señales sugieren que ésta es una sinapsis química.

Por estudios histológicos (Hama, 1962) se observaron en sinapsis de calazar, vesículas en la membrana presináptica y una completa separación de las membranas.

En axones donde hay contacto sináptico, se distinguen } tipos de vesículas, tal vez cada una asociada con un neurohormona específico. Esto se ha visto en ganglio visceral y nervio cardíaco de la almeja Mercenaria (Cottrell, 1965).

La liberación de paquetes de transmisor en sinapsis química produce un potencial de subumbral en la fibra postsináptica, que se registra como "potencial miniatura". Esto sucede en todas las sinapsis químicas y se ha demostrado en sinapsis gigante de calamar. En ésta, probablemente L-glutamato sea el transmisor (Miledi, 1966).

La sinapsis de ganglio estelado, entre los axones gigantes del cerebro y neuronas que inervan diversas partes del manto de calamar han sido investigadas por varios autores (Miledi, 1966; Katz y Miledi, 1966; Miledi y Slater, 1966).

En esta preparación se ha visto que al hiperpolarizar la fibra presináptica, lo cual aumenta el potencial de acción, aumenta el tamaño del potencial postsináptico excitatorio (EPSP), mientras que la despolarización lo disminuye (Tasaki, 1958). Esto significa que mientras mayor sea el potencial de acción presináptico, mayor es el número de cuantos transmisores liberados (Miledi y Slater, 1966).

c) Integración nerviosa.

Diferentes ramas de una neurona pueden causar excitación en unas sinapsis e inhibición en otras (Kandel, Coggeshall, 1967). Diferentes neuronas de ganglio abdominal de Aplysia californica fueron estimuladas, después se registró simultáneamente la respuesta en dos o más de estas células. Se vieron potenciales postsinápticos sincronizados de signo contrario, entre ciertas combinaciones de células sugiriendo que la acción presináptica estaba mediada por la misma interneurona.

Cuando ésta se despolarizaba, se registraron potenciales de hiperpolarización en unas células y potencial de despolarización en otras. La latencia constante y breve de la respuesta, y la naturaleza todo o nada de los potenciales, indica que había conexiones unitarias monosinápticas entre la interneurona y las células de las que se obtuvo el registro. Las células que fueron hiperpolarizadas sinápticamente, también fueron hiperpolarizadas al aplicar ACh, esta sustancia también despolarizó células que fueron despolarizadas sinápticamente. Curare bloqueó los dos tipos de respuesta, como resultado de la activación de la interneurona. De manera que, ACh, en una neurona puede excitar un tipo de sinapsis e inhibir otras. Este trabajo es la primera demostración definitiva de este fenómeno. Aún no se sabe si esto es un proceso restringido al sistema nervioso de algunos invertebrados o si es algo más general (Eccles, 1964).

d) Farmacología.

En tejidos de invertebrados se han detectado sustancias de importancia farmacológica en concentraciones relativamente altas, esto los hace preparaciones ideales para la investigación.

Probables neurotransmisores.

5-hidroxitriptamina.

Actualmente la investigación de 5-hidroxitriptamina (5-HT) en invertebrados está a la vanguardia de los estudios sobre la función de esta amina. 5-HT, su precursor 5-hidroxil-

triptofano (5 HTP), las enzimas necesarias para la conversión de 5HTP en 5HT y la actividad de éste, se han detectado en sistema nervioso de moluscos.

Por estudios histológicos sobre localización y distribución neuronal de 5HT en el gasterópodo Buccinum undatum (Cottrell y Laverack, 1968), se ha identificado este compuesto en altas concentraciones dentro del cuerpo celular y el axón terminal. En la mayor parte del axón la concentración es baja. Se cree que la síntesis se lleva a cabo en el soma, el transporte se hace a lo largo del axón y el almacenamiento en las terminales presinápticas.

En ganglio de la almeja Mercenaria, ACh y 5HT se encuentran unidos a partículas. Los cambios de pH, temperatura y tonicidad provocan una liberación cuantitativa similar de los 2 compuestos. Esto indica que los mecanismos de acción de ambos con estas partículas, son semejantes (Cottrell, 1966).

En moluscos gasterópodos existen ganglios con células que presentan una respuesta inhibitoria prolongada a la estimulación presináptica, a las que se conoce como células CILDA (Gerschenfeld y Stefani, 1965, 1966). Estas neuronas son excitadas y se disparan en potencial de acción por la aplicación de 5HT.

El comportamiento de 5HT es semejante al de ACh en estas células. La aplicación repetida de 5HT provoca desensibilización, en la misma forma en que receptores de ACh non desensibilizados al recibir un estimulador colinérgico. Como se esperaría, si 5HT actúa como transmisor en estas células, debe al

terar la conductancia de la membrana. ACh también despolariza las células CILDA, pero en forma menos potente que 5HT. Atropina (antagonista de ACh) bloquea la respuesta de estas neuronas tanto para ACh como para 5HT. Entonces, en sistema nervioso de gasterópodo, 5HT tiene función de neurotransmisor.

En células CILDA, ACh y 5HT causan la misma respuesta. por otro lado, en estas mismas neuronas, en el gasterópodo Aplysia se ha observado excitación por transmisores colinérgicos, con el mismo resultado (Asher, Gerschenfeld y Tauc, 1966). En esta preparación 5HT es otro transmisor colinérgico.

Una forma de acción distinta de 5HT, se ha detectado en el músculo retractor del biso anterior del bivalvo Xytilus. Esta preparación es muy usada en fisiología debido a la respuesta doble que presenta ante la estimulación eléctrica. La actividad de los elementos contráctiles es controlada por un sistema colinérgico, la relajación del músculo es causada por 5HT. Este compuesto disminuye el umbral a la estimulación nerviosa, incrementa la amplitud y frecuencia de las espigas de potencial y refuerza la recuperación de la preparación.

En 1969, Twarog demostró que la aplicación de 5HT en esta preparación provoca relajación y ningún cambio en potencial de membrana, de aquí planteó la posibilidad de acción de esta sustancia, a nivel intracelular. Se tendrían que realizar estudios histoquímicos más finos para determinar la localización celular de 5HT en este sistema. El autor ha observado que 5HT promueve la unión intracelular de iones Ca^{++} , y la

contracción tónica depende de concentraciones altas de estas iones dentro de la célula.

La función transmisora de 5HT es muy discutida porque no cumple totalmente los criterios propuestos por Florey en 1965, para un transmisor químico. No hay pruebas definitivas sobre: acción de 5HT en membrana postsináptica; localización de 5HT; liberación de 5HT desde terminaciones nerviosas durante la estimulación. Sin embargo, Cottrell y Laverack (1968) argumentan que estas características corresponden a uno de los transmisores mejor estudiados, ACh, y no debería esperarse que todos los neurotransmisores tuvieran propiedades idénticas. Una sustancia probablemente tenga una forma de acción semejante a la de un transmisor, en elementos vecinos al sitio de liberación, y otra distinta, semejante a la de una neurosecreción, en elementos distantes.

5HT también se ha localizado en tejido no nervioso. Se descubrió en las glándulas salivales productoras de toxina de Octopus vulgaris (Erspamer, 1953) y desde entonces se ha detectado en el veneno de varias especies. Probablemente su función, al ser aplicado el veneno, también sea de transmisor.

Catecolaminas.

Por medio de fluorescencia pueden detectarse catecolaminas en tejido nervioso (Dahl et al., 1963). Se ha observado que en ganglio de molusco la fluorescencia característica de catecolaminas representa sólo 3.4.dihidroxifenilalanina (DOPA

mina), compuesto intermedio en la síntesis de adrenalina a partir de tirosina. Algunas neuronas en que se han detectado catecolaminas, son sensoriales. Moluscos tratados con reserpina en grandes cantidades presentan disminución de esta catecolamina (Cottrell, 1967).

En Aplysia depilans, como en otros gasterópodos, existen dos tipos de neuronas: células H, que son neuronas hiperpolarizadas con una entrada inhibitoria colinérgica y células D, que son neuronas despolarizadas por ACh, con vías aferentes excitatorias. Adrenalina y noradrenalina excitan las células H e inhiben las células D. En ellas noradrenalina es casi 10 veces más activa que adrenalina. El efecto en células D es aproximadamente 10 veces mayor que en células H (Gerschenfeld y Tauc, 1961).

Posteriormente se encontró un nuevo tipo de células (Gerschenfeld, 1964), las D-inhi, que no reciben entrada directa inhibitoria colinérgica. Se vio que el potencial postsináptico inhibitorio es resultado del incremento selectivo a la permeabilidad de K^+ . Entre todas las sustancias naturales ensayadas DOPAMINA fue la más activa (Gerschenfeld y Chiarandani, 1965). Es necesario hacer notar que esta catecolamina es la que se ha detectado definitivamente.

Acetilcolina.

Se tienen algunos reportes de localización histológica de ACh, colinesterasa y colinacetilasa en arón gigante de ca-

lamar. Las más altas concentraciones de estas sustancias se encontraron en sinapsis distal de ganglio estelado (Webb, Dettbarn y Brzin, 1966).

La retina del ojo de calamar también contiene ACh. En ganglio óptico del cefalópodo Octopus doefflini se detectó colinesterasa y ACh, ésta última en altas concentraciones. Otros ganglios del sistema nervioso central también probaron ser ricos en estas sustancias. Existe correlación entre la actividad de acetilcolinesterasa y el contenido de ACh en diversos ganglios. Loe y Florey (1966) señalaron que el ganglio óptico de O. doefflini será una preparación excelente para estudiar la localización subcelular de ACh, ya que en este órgano la concentración es de 50 a 200 veces mayor que en cerebro de mamífero.

Por métodos químicos también ha sido posible asociar ACh con la actividad nerviosa en moluscos. La centrifugación de tejido cerebral de Octopus proporciona una fracción rica en ACh, que tiene terminaciones nerviosas con vesículas sinápticas (Florey y Winesdorfer, 1967).

En estos animales se han determinado distintos tipos de colinesterasa. En Aplysia hay evidencias bioquímicas de acetilasa (Dettbarr. y Rossenberg, 1962). En Anodontia cygnea (Salanky, Hiripi y Labos, 1966) se encontró una acetil-colinesterasa específica que hidroliza acetil-metilcolina y ACh. Sin embargo, en la misma especie Zs-Nagy (1965) reportó no haber detectado actividad de acetil-colinesterasa.

Tetrodotoxina.

Estudios recientes realizados por Asher, Marty y Neild (1978) sobre antagonitos de ACh (particularmente curare y hexamethonium) en sistema nervioso de apluia apoyan la hipótesis de que la forma de acción de estas sustancias es de bloqueadores de poros abiertos por ACh y por tanto que no se trata de un antagonismo competitivo.

IV. Phylum Arthropoda

En estudios a nivel de membrana, transmisión de impulsos y contracción muscular, son muy usadas las preparaciones de axones y fibras musculares gigantes de crustáceos.

a) Propiedades de membrana.

Los primeros estudios realizados con tejido de artrópodo toman como fundamento las técnicas empleadas en axón gigante de calamar.

En las patas caminadoras de langostas Homarus, se encuentran neuronas grandes. Usando el axón de estas células Hodgkin y Rushton (1946) obtuvieron más pruebas que apoyan la teoría de "cable conductor", es decir, que el axón en forma pasiva, se comporta como un cable pobremente aislado.

Hodgkin (1938) localizó en crustáceos, nervios formados por axones no mielinizados en las patas del cangrejo Carcinus. Los seleccionó para realizar sus experimentos porque pensó que en ellos se notarían mejor que en axones mielinizados, las propiedades eléctricas. Durante el desarrollo de su trabajo, notó que era posible separar una sola fibra, semejante a la del calamar pero más corta. Otra ventaja que se tiene al utilizar esta neurona, reside en la facilidad de eliminar tejido inactivo circundante, esto permite obtener un registro más real de los potenciales que se generan.

Hodgkin llevó a cabo diferentes pruebas sobre la relación que existe entre magnitud de estímulo y cambios eléctricos.

cos provocados en la membrana del axón. Aplicó dos clases de estímulos: estímulo anodal, que consiste en hacer pasar corriente hacia el interior a través de la membrana y; estímulo catodal, en el que la corriente va hacia afuera.¹ Para estímulos pequeños se obtienen en ambos casos cambios de potencial de membrana de igual magnitud, pero de sentido contrario. El estímulo anodal hace más negativo el potencial. El estímulo catodal lo hace más positivo. Cuando el estímulo es suficientemente grande (alcanza el potencial de umbral), provoca el disparo del potencial de acción.

El fenómeno de adición latente se observó por primera vez en esta preparación. Se detectó que por un tiempo breve, después de la estimulación catodal se requiere menos corriente para disparar un potencial de acción.

b) Contracción muscular.

Algunos artrópodos marinos, particularmente crustáceos como Salarus y Maia, han resultado muy útiles en el estudio de la contracción muscular por presentar fibras musculares muy grandes. Su diámetro varía entre 0.5 y 2.0 mm (Hoyle y Smith, 1963).

En una de las primeras investigaciones realizadas con el fin de conocer la relación existente entre cambios eléctricos

1. El sentido de la corriente se determina por el movimiento de electrones.

de membrana y contracción de una fibra muscular, se utilizaron fibras de crustáceos (músculos abridores y extensores de Cambarus, Panulirus y Cancer). La ventaja que presentan estos músculos es que están asociados a dos o más mecanismos excitatorios y uno o dos mecanismos inhibitorios (Hoyle y Wierana, 1958).

Cuando es activada una neurona excitatoria, se produce despolarización en el músculo. Inversamente, la activación de una vía inhibitoria repolariza la fibra. Es posible aplicar estímulos excitatorios e inhibitorios de tal manera que por cada uno de estos dos mecanismos se alcance un mismo potencial de membrana. La respuesta física del músculo no es la misma en cada caso. Se piensa que probablemente existe una fase intermedia, en la que hay transporte de un ión a través de la membrana, que provoca el inicio de la contracción. De aquí se concluye que la contracción no está asociada directamente a cambio de potencial sino a la permeabilidad de algún ión.

Caldwell y Walster (1963) desarrollaron una técnica para inyectar soluciones al interior de fibras musculares en el cangrejo Maia, con esto fue posible analizar el papel del ión Ca^{++} en la contracción muscular.

Las primeras sustancias que se probaron en este estudio fueron los cloruros de Ca, Ba, K, Na y Mg. Se contaba con el dato de que las dos primeras producen contracción en músculo de rana, mientras que las tres restantes no lo hacen. Se concluyó que sólo $CaCl_2$ causa contracción en esta preparación.

En otro estudio (Weber y Herz, 1963) se encontró que la concentración de Ca^{++} necesario para producir la contracción era significativamente cercana a la de Ca^{++} necesario para activar el sistema de ATPasa en microfibrillas aisladas.

Existe una medusa que produce destellos bioluminiscentes debido a la reacción entre una proteína, llamada aequorin, y los iones de Ca^{++} libres. Se ha extraído y utilizado esta proteína en determinaciones de cambios en la concentración de Ca^{++} en el sarcoplasma.

Se inyectaron soluciones de aequorin en fibras musculares del cirripedio Balanus nobilis y después de aplicar estímulos se cuantificó con un tubo fotomultiplicador la emisión de luz, que necesariamente se debía a la concentración de iones Ca^{++} en el interior de la fibra. Como resultados experimentales se observó que la concentración de calcio aumenta después de la estimulación (Ridgeway y Ashley, 1967; Ashley y Ridgeway, 1968).

El tiempo que dura la bioluminiscencia lo definieron los autores como el transitorio de calcio (t.c.). Algunas de las características del t.c. son: aumenta con el grado de despolarización, sobre cierto umbral; el desarrollo de tensión muscular aumenta con el t.c.; el t.c. se inicia después de un período latente y disminuye inmediatamente después del pulso de estímulo; la tensión va un poco defasada, aumenta y alcanza su máximo cuando el t.c. ha terminado.

También se ha demostrado que a diferencia de lo que sucede en axón gigante de calamar, la respuesta de la membrana de fibra muscular de crustáceo cirripedio, no se debe al flujo hacia adentro de Na^+ , sino de Ca^{++} (Hagiwara y Naka, 1964).

e) Farmacología.

Acido gamma-aminobutírico.

Mecanismos inhibitorios han sido explicados a partir del estudio de sinapsis periféricas de crustáceos y muestran una gran similitud con los vertebrados. Por esta razón, en una serie de trabajos que realizaron Kravitz, Kuffler y Potter (1963), seleccionaron sistema nervioso de crustáceo para identificar compuestos que actúan como transmisores sinápticos.

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) bloquea las descargas del receptor extensor, esto sugiere que GABA o un compuesto relacionado está envuelto en el proceso inhibitorio. GABA sólo se había reportado en sistema nervioso central de mamíferos. Estos autores identificaron tres principales agentes bloqueadores en extractos de SNC de langosta: GABA (que es el más activo), taurina y betaína. Además se vió que el contenido de GABA aumenta en la misma forma que la proporción de axones inhibitorios de la muestra. Se cree que en fibras inhibitorias esta sustancia tiene función de transmisor, ya que cumple tres de los requisitos que marca Patton (1958): la neurona presináptica contiene y sintetiza la sustancia; la aplicación de la sustancia a la fibra postsináptica reproduce el efecto de la transmisión normal; la acción de la sustancia es

afectada por agentes bloqueadores competitivos, en la misma forma que la transmisión sináptica.

En estudios relacionados con propiedades farmacológicas de circuitos neuronales, ha sido muy estudiado el ganglio esotomogástrico de crustáceos decápodos (Dando y Selverston, 1972; Russell, 1976; Marder y Paupardin, 1978). Esta preparación permite analizar potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios, dentro del ganglio y el resto del sistema nervioso y en conexiones neuromusculares.

Como transmisores en sinapsis de este ganglio en el cangrejo Cancer pagurus, se han reportado L-glutamato, GABA y ACh en conexiones sinápticas inhibitorias. Estos compuestos pueden provocar un incremento en gK^+ , gCl^- o una despolarización (Marder y Paupardin, 1978). Los transmisores de algunos grupos de células de este ganglio aún no se conocen.

Ácido glutámico.

Trabajos realizados por Chaplin et al. (1965), indican que el ácido glutámico es un metabolito importante en ciertas uniones neuromusculares (probablemente relacionado con inhibición). El tejido nervioso de artrópodos y el músculo de Carcinus tienen grandes cantidades de este ácido. También se han detectado en algunos crustáceos enzimas que trabajan en la biotransformación de ácido glutámico (Kravitz, 1962).

Tetrodotoxina.

Esta sustancia, que es el principio activo de la toxina del pez globo, ha permitido saber que los mecanismos de g_{Na^+} y g_{K^+} son esencialmente diferentes (Kao, 1966). Bloquea la corriente de Na^+ del potencial de acción, pero no afecta la conductancia de K^+ , como muestran los experimentos de control de voltaje en axón gigante de langosta (Narahashi, Moore y Scott, 1964; Takata, Moore y Kao, 1966).

Cuando se aplicaron corrientes despolarizantes mayores que el potencial de equilibrio del Na^+ a través de la membrana de axón de langosta, en presencia de tetrodotoxina, el movimiento de iones Na^+ hacia afuera disminuyó.

La tetrodotoxina parece entonces bloquear la propagación del potencial de acción en nervios y músculos por una acción específica de transferencia de Na^+ , a través de membranas activas.

La selectividad inhibitoria de esta toxina sobre la conductancia de sodio, se ha probado también en axón gigante del tejido circumesofágico de langosta, Homarus americanus, y que es más fuerte que drogas como cocaína y procaína, que también afectan el paso de Na^+ a través de la membrana.

En esta preparación, la concentración de umbral de tetrodotoxina es de 5×10^{-9} gm/ml o menor; la de cocaína y procaína va de 10^{-3} a 10^{-4} gm/ml.

Octopamina.

Este compuesto es un fenol análogo a la noradrenalina. En sistema nervioso de mamífero se ha detectado octopamina en pequeñas cantidades en cerebro y neuronas simpáticas periféricas, siempre asociado a noradrenalina, por esta razón es difícil conocer su función.

Wallace et al. (1974), descubrieron en SNC de langosta, Homarus americanus, neuronas que sintetizan y acumulan octopamina. La estimulación de estas células produce activación periférica colinérgica. Este hecho y la localización de las células con relación a SNC sugiere que sean una forma análoga primitiva de sistema nervioso de mamífero.

Los últimos estudios realizados sobre la función de neuronas que contienen aminas, en sistema nervioso de langosta, tienen un enfoque sobre integración nerviosa, muy interesante que no se ha entendido completamente. Analizando concretamente la función de octopamina y serotonina (Kohishi y Kravitz, 1976), se sabe que ambas se encuentran en ganglios torácicos de langosta Homarus americanus (serotonina en una cantidad 6 veces menor que octopamina) y no se ha determinado si se localizan ambos compuestos en las mismas células nerviosas. Todas las neuronas de este ganglio son colinérgicas, por tanto deben estar asociadas a neuronas sensitivas. Al ser excitadas liberan las aminas hacia la hemolinfa, de aquí son distribuidas a todo el organismo, principalmente al corazón. Serotonina y octopamina incrementan frecuencia e intensidad de los la

tidos cardiacos. Los cambios de temperatura afectan la excitabilidad de estas células, dentro del rango de temperatura (10 17°C) a que son sometidas en condiciones naturales las langostas. También se ha destacado el cambio conductual estacional de estos animales.

Es posible que exista relación entre estas variaciones. Se piensa que la actividad de las neuronas que contienen aminas representa un medio de control neurohumoral dentro del organismo.

Para conocer la causa que activa este sistema sería necesario investigar las células sensoriales que tienen conexión con él.

VI. Conclusiones

En esta revisión se destacan los siguientes aspectos:

- Existen organismos marinos que se usan ampliamente en estudios de neurofisiología general.
- Existen organismos marinos de importancia aún potencial tanto en neurofisiología como en farmacología.
- El efecto que tiene una sustancia neuroactiva sobre sistema nervioso de invertebrados no siempre es el mismo que el que se tiene en sistema nervioso de vertebrados.

Para entender la relación que esto tiene con la Farmacología Marina, consideremos que: desde hace algunos años, se reconoce la importancia de sustancias biológicamente activas extraídas de organismos marinos en problemas biomédicos. Generalmente los experimentos realizados consisten en la extracción de estas sustancias y su administración por diferentes vías a animales intactos (ratones, conejos o ranas son los más usados), o a las preparaciones clásicas de órganos aislados. De aquí se han obtenido agentes neurotrópicos valiosos, un ejemplo de éstos es la tetrodotoxina.

Como en muchos problemas de la naturaleza, sería muy conveniente para el hombre, hacer una clasificación de estas sustancias para una utilización efectiva. Tal vez la mejor clasificación sería la más natural, es decir, aquella que tome en cuenta el significado adaptativo de la toxina desarrollada. Esto implicaría estudiar cada una de estas sustancias en orga

nismos con los que está relacionada en forma natural. Posteriormente, la utilización médica podría llevarse a cabo las similitudes y diferencias que existen entre sistema nervioso de los animales afectados y sistema nervioso humano.

De aquí, se ve la necesidad de desarrollar, sólo en el campo de la Farmacología Marina, líneas de estudio sobre:

1) Ecología fisiológica de las toxinas marinas. Inicialmente, como sucede en la mayoría de los temas de investigación científica, las toxinas fueron conocidas de manera accidental, por efectos nocivos de distintos grados sobre el hombre, por ingestión o por contacto con los animales tóxicos. Sabiendo que tales sustancias existen, podría desarrollarse el estudio de nuevas sustancias por medio del análisis de las relaciones biológicas de los organismos.

2) Fisiología de las especies atacadas. Una vez identificadas las relaciones de estos animales, sobre todo las asociadas a defensa y ataque, sería necesario conocer detalladamente el mecanismo de acción de los compuestos químicos involucrados.

3) Fisiología comparativa. Mientras mayor sea el conocimiento de estos mecanismos fisiológicos, en particular los neurotóxicos, se podrá establecer una mejor comparación de funcionamiento con la fisiología humana.

A partir de esto, se derivarían otros problemas sobre fisiología de organismos marinos y muy probablemente se localizarían nuevas técnicas y preparaciones útiles a la fisiología general, como fue al principio el hallazgo del axón gigante de calamar.

VI. Bibliografía

1. Aidley D.J. (1971). The Physiology of Excitable Cells. Cambridge Univ. Press. 466 p.
2. Asher P., E.M. Gerschenfeld y L. Tauc (1966). Excitation synaptique d'un meme neurone central de l'Aplysia transmise par deux mediateurs differents. J. Physiol. (Paris) 58, 200.
3. Asher P., A. Marty y T.O. Neild (1978). The mode of action of antagonists of the excitatory response to acetylcholine in Aplysia neurones. J. Physiol. (London). 278, 207-235.
4. Ashley C.C. y E.B. Ridgeway (1968). Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres. Nature (London). 219, 1168-1169.
5. Baker P.P., A.L. Hodgkin y T.I. Shaw (1962). Replacement of the axoplasm of giant nerve fibres with artificial solutions. J. Physiol. (London). 164, 330-354.
6. Baker P.P., A.L. Hodgkin y T.I. Shaw (1962). The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons. J. Physiol. (London). 164, 355-374.
7. Baker P.P. y T.I. Shaw (1961). Report for 1960-61. J. Mar. biol. Ass. U.K. 41, 865.
8. Baslow M.H. (1969). A Study of Toxins and other Biologically Active Substances of Marine Origin. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. 286 p.
9. Bethe (1903). Citado en Horridge G.A. (1954).
10. Bullock T.H. (1943). Citado en Horridge G.A. (1954).
11. Caldwell P.C., Hodgkin A.L., R.D. Keynes y T.I. Shaw (1960). The effects of injecting "energy-rich" phosphate compounds on the active transport of ions in the giant axons of Loligo. J. Physiol. (London). 152, 561-590.
12. Caldwell P.C. y T.J. Lea (1973). Use of an intracellular glass scintillator for the continuous measurement of the uptake of ¹⁴C-labelled glycine into squid giant axons. J.

- Physiol. (London). 232, 4-5P.
13. Caldwell P.C. y T.J. Lea (1975). Some effects on ouabain on the transport of aminoacids into squid giant axons. J. Physiol. (London). 245, 91-92P.
 14. Caldwell P.C. y T.J. Lea (1978). Glycine fluxes in squid giant axons. J. Physiol. (London). 278, 1-25.
 15. Caldwell P.C. y G.B. Walster (1963). Studies on the micro-injection of various substances into crab muscle fibres. J. Physiol. (London). 169, 353-372.
 16. Chaplin A.E. y A.K. Higgins (1965). Citado en Kerkut G.A., L.D. Leake, A. Shapira, S. Cowan y R.J. Walker (1965). The presence of glutamate in nerve-muscle perfusates of Helix Carcinus and Periplaneta. Comp. Biochem. Physiol. 15, 485-502.
 17. Cottrell G.A. y M.S. Laverack (1968). Invertebrate Pharmacology. Ann. Rev. Pharmacol. 8, 273-298.
 18. Cottrell G.A. (1966). Separation and properties of subcellular particles associated with 5-hydroxytryptamine, with acetylcholine and with an unidentified cardio-excitatory substance from Mercenaria nervous tissue. Comp. Biochem. Physiol. 17, 891-907.
 19. Cottrell G.A. (1967). Occurrence of dopazine and noradrenaline in the nervous tissue of some invertebrate species. B. it. J. Pharmacol. 29, 63-69.
 20. Cull-Candy S.G. (1976). Two types of extrajunctional L-glutamate receptors in locust muscle fibres. J. Physiol. (London). 255, 449-464.
 21. Curtis H.J. y K.S. Cole (1942). Membrane resting and action potentials in giant fibres of squid nerve. J. Cell. Comp. Physiol. 19, 135-144.
 22. Dahl E., B. Falk, C. von Mecklenburg y H. Myrberg (1963). An adrenergic nervous system in sea anemones. Quart. J. Microscop. Sci. 104, 531-534.
 23. Dando M.E. y A.I. Selverston (1972). Command fibres from the supraoesophageal ganglion to the stomatogastric gan-

- gilion in the Panulirus argus. J. Comp. Physiol. 78, 138-175.
24. Dettbarn W.D. y P. Rosenberg (1962). Acetylcholinesterase in Aplysia Biochim. Biophys. Acta. 65, 362-363.
 25. Eccles J.C. (1964). The Physiology of synapses. Springer-Verlag. Berlin. 316 p.
 26. Eimer (1874). Citado en Herridge G.A. (1954).
 27. Erspaner V. y B. Asere (1953). Isolation of enteramine from extracts of Octopus vulgaris and of Liscolglossus pictus skin. J. Biol. Chem. 200, 311-318.
 28. Falk G. y P. Fatt (1964). Linear electrical properties of striated muscle fibres observed with intracellular electrodes. Proc. Roy. Soc. (London) ser. B. 160, 69-123.
 29. Florey E. (1965). Citado en Cottrell G.A. y Laverack M.S. (1966).
 30. Florey E. y J. Winesdorfer (1967). Cholinergic nerve endings from Octopus brain. Fed. Proc. 26 #2840.
 31. Frankenhaeuser B. y A.L. Hodgkin (1957). The action of calcium on the electrical properties of squid axons. J. Physiol. (London). 137, 218-244.
 32. Gerschenfeld H.M. (1964). A non-cholinergic synaptic inhibition in the central nervous system of mollusc. Nature. 203, 415-416.
 33. Gerschenfeld H.M. y D.J. Chiarandani (1965). Ionic mechanism associated with non-cholinergic synaptic inhibition in molluscan neurons. J. Neurophysiol. 28, 710-723.
 34. Gerschenfeld H.M. y E. Stefani (1965). 5-hydroxytryptamine receptors and synaptic transmission in Molluscan neurones. Nature. 205, 1216-1218.
 35. Gerschenfeld H.M. y E. Stefani (1966). An electrophysiological study of 5-hydroxytryptamine receptors of neurones in the molluscan nervous system. J. Physiol. 185, 684-700.
 36. Gerschenfeld H.M. y L. Tauc (1961). Pharmacological specificities of neurones in an elementary nervous system. Nature. 189, 924-925.

37. Hagiwara S. y K. Naka (1964). The initiation of spike potential in barnacle muscle fibres under low intracellular Ca^{++} . J. Gen. Physiol. 48, 141-162.
38. Hagiwara S. y I. Tasaki (1958). A study of the mechanism of impulse transmission across the giant synapse of the squid. J. Physiol. (London). 143, 114-137.
39. Halstead B.W. (1965). Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. U.S. Govt. Printing Office, Washing. D.C. vol I, 994 p.
40. Halstead B.W. (1967). Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C. vol 2, 1070p.
41. Halstead B.W. (1978). Poisonous and Vencomous Marine Animals of the World. The Darwin Press, Inc. Princeton, New Jersey. 1043 p.
42. Hall D.M. y C.F.A. Pantin (1937). The nerve net of the Actinozoa. J. Exp. Biol. 14, 71-78.
43. Hama K. (1962). Some observations on the fine structure of the giant synapse in the stellate ganglion of the squid Doryteuthis bleekeri. Z. Zellforsch. 56, 437-444.
44. Hodgkin A.L. (1937). Evidence for electrical transmission in nerve. J. Physiol. (London). 90, 183-232.
45. Hodgkin A.L. (1938). The subthreshold potentials in a crustacean nerve fibre. Proc. Roy. Soc. London ser B. 126, 87-121.
46. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1939). Action potentials recorded from inside a nerve fibre. Nature. (London). 144, 710.
47. Hodgkin A.L., A.F. Huxley y B. Katz (1949). Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch. Sci. Physiol. 3, 129-150.
48. Hodgkin A.L., A.F. Huxley y B. Katz (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London). 116, 424-448.
49. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1952a) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the squid

- giant axon of Loligo. J. Physiol (London). 116, 449-472.
50. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1952b). The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London). 116, 473-496.
51. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1952c). The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J. Physiol. (London). 116, 497-506.
52. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1952d). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol. (London). 117, 500-544.
53. Hodgkin A.L. y A.F. Huxley (1953). Movements of radioactive potassium and membrane current in a giant axon. J. Physiol (London). 121, 403-414.
54. Hodgkin A.L. y B. Katz (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. (London). 103, 37-77.
55. Hodgkin A.L. y R.D. Keynes (1953). The mobility and diffusion coefficient of potassium in giant axons from Sepia. J. Physiol. (London). 119, 513-528.
56. Hodgkin A.L. y R.D. Keynes (1955). Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. J. Physiol. (London). 125, 28-60.
57. Hodgkin A.L. y W.A.H. Rushton (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fibre. Proc. Roy. Soc. London ser. B. 133, 444-479.
58. Horridge A. (1954). The nerves and muscles of medusae. I. Conduction in the nervous system of Aurelia aurita. J. Exp. Biol. 31, 594-600.
59. Horridge G.A. (1955). The nerves and muscles of medusae. II. Geryonia proboscidalis J. Exp. Biol. 32, 555-568.
60. Horridge G.A. (1956). The nerves and muscles of medusae. VI. The rhythm. J. Exp. Biol. 35, 72-91.
61. Hoyle G. y J. Smith (1963). Neuromuscular physiology of giant muscle fibres of a barnacle Balanus nobilis. Darwin. Comp. Biochem. Physiol. 10, 291-314.

62. Hoyle G. y C.A. Wiersma (1958a). Excitation at neuromuscular junctions in Crustacea. *J. Physiol. (London)*. 143, 403-425.
63. Hoyle G. y C.A. Wiersma (1958b). Coupling of membrane potential to contraction in crustacean muscles. *J. Physiol.* 143, 441-453.
64. Huxley A.F. y R. Stampfli (1951). Effect of potassium and sodium on resting and action potentials of single myelinated nerve fibres. *J. Physiol. (London)*. 112, 496-508.
65. Kandel E. y G. Coggeshall (1967). Opposite synaptic actions mediated by different branches of an identifiable interneuron in Aplysia. *Science*. 155, 346-349.
66. Kandel E. y H. Kupfermann (1970). The functional organization of invertebrate ganglia. *Ann. Rev. Physiol.* 32, 198-258.
67. Kao C.Y. (1966). Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev* 18, 997-1049.
68. Katz B. y B. Miledi (1966). Input-output relation of a single synapse. *Nature*. 212, 1242-1245.
69. Katz B. (1966). *Nerve, Muscle and Synapse*. Mc Graw Hill. 166 p.
70. Keynes R.D. (1951). The ionic movements during nervous activity. *J. Physiol. (London)*. 114, 119.
71. Keynes R.D. (1963). Chloride in the squid giant axon. *J. Physiol. (London)*. 169, 690-705.
72. Keynes R.D. y P.R. Lewis (1951). The sodium and potassium content of cephalopod nerve fibres. *J. Physiol. (London)*. 114, 151-162.
73. Keynes R.D. y E. Rojas (1976). The temporal and steady-state relationships between activation of the sodium conductance and movement of the gating particles in the squid giant axon. *J. Physiol. (London)*. 255, 157-189.
74. Konishi S. y E.A. Kravits (1978). The physiological properties of amine-containing neurones in the lobster nervous system. *J. Physiol.* 279, 215-229.

75. Kravitz E.A. (1962). Enzymatic formation of gamma-aminobutyric acid in the peripheral and central nervous system of lobsters. *J. Neurochem.* 9, 363-370.
76. Kravitz E.A., S.W. Kuffler y D.D. Potter (1963). Gamma-aminobutyric acid and other blocking compounds in Crustacea. III. Their relative concentrations in separated motor and inhibitory axons. *J. Neurophysiol.* 26, 739-751.
77. Loe P.R. y E. Florey (1966). The distribution of acetylcholine and cholinesterase in the nervous system and in innervated organs of Octopus dofleini. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 509-522.
78. Mackie, G.O. (1970). Neuroid conduction and the evolution of conducting tissues. *Quart. Rev. Biol.* 45, 319-332-
79. Mackie G.O. (1976). Propagated spikes and secretion in a coelenterate glandular epithelium. *J. Gen. Physiol.* 68, 313-325.
80. Mackie G.O. y L.M. Passano (1968). Epithelial conduction in hydromedusae. *J. Gen. Physiol.* 52, 600-621.
81. Marder E. y D. Paupardin (1978). The pharmacological properties of some crustacean neuronal acetylcholine, gamma-aminobutyric acid, and L-glutamate responses. *J. Physiol.* 280, 213-236.
82. Marisol R.N. (1974). *Experimental Marine Biology*. Academic Press, Inc. N.Y. 373 p.
83. Mayer (1906). Citado en Horridge G.A. (1954).
84. Mettrick D.F. y J.M. Telford (1965). The histamine content and histidine decarboxylase activity of some marine and terrestrial animals from the West Indies. *Comp. Biochem. Physiol.* 16, 547-559.
85. Miledi (1966). Miniature synaptic potentials in squid nerve cells. *Nature (London)*. 212, 1240-1242.
86. Miledi K. y C.R. Slater (1966). The action of calcium on neuronal synapses in the squid. *J. Physiol. (London)*. 184, 473-498.
87. Moore J.W., T. Narahashi y T.I. Shaw (1967). An upper limit to the number of sodium channels in nerve membrane? *J. Physiol. (London)*. 188, 99-105.

88. Narahashi T., J.W. Moore y W.R. Scott (1964). Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. *J. Gen. Physiol.* 47, 965-974.
89. Pantin C.F.A. (1935a) The nerve net of the Actinozoa. I. Facilitation. *J. Exp. Biol.* 12, 119-138.
90. Pantin C.F.A. (1935b). The nerve net of the Actinozoa. II. Plan of the nerve net. *J. Exp. Biol.* 12, 139-155.
91. Pantin C.F.A. (1935c). The nerve net of the Actinozoa. III. Polarity and after-discharge. *J. Exp. Biol.* 12, 156-164.
92. Pantin C.F.A. (1935d). The nerve net of the Actinozoa. IV. Facilitation and the "stair-case". *J. Exp. Biol.* 12, 389-396.
93. Pantin C.F.A (1952). The elementary nervous system. *Proc. Roy. Soc. ser B.* 140, 147.
94. Parker (1919). Citado en Mackie G.O. (1970).
95. Patton W.D.M. (1958). Central and synaptic transmission in the nervous system. *A. Rev. Physiol.* 20, 431-470.
96. Romanes (1876). Citado en Horridge G.A. (1954).
97. Ross D.M. (1945a). Facilitation in sea anemones. I. The action of drugs. *J. Exp. Biol.* 22, 21-31.
98. Ross D.M. (1945b). Facilitation of sea anemones. II. Tests on extracts. *J. Exp. Biol.* 22, 32-36.
99. Ross D.M. (1952). Facilitation on sea anemones. III. Quick responses to single stimuli in Metridium senile. *J. Exp. Biol.* 29, 235-254.
100. Ross D.M. y C.F.A Pantin (1940). Citado en Ross D.M. (1945 a).
101. Russell D.F. (1976). Rhythmic excitatory inputs to the lobster stomatogastric ganglion. *Brain Res.* 101, 582-588.
102. Russell, F.E. (1971). *Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Animals.* Academic Press, Inc. (London). 176 p.
103. Salanky S., L. Hiripi y E. Labos (1966). Citado en Cottrell G.A. y K.S. Laverack (1968).
104. Takata K., J.W. Moore, C.Y. Kao y F.A. Farman (1966). Blockage of sodium conductance increase in lobster giant axon by tarichatoxin (tetrodotoxin). *J. Gen. Physiol.* 49, 977-988.

105. Tauc L. (1958). Processus post-synaptique d'excitation et d'inhibition dans le soma neuronique de l'Aplysie et de l'Escargot. Arch. Ital. Biol. 96, 78-110.
106. Tauc L. (1959). Interaction non synaptique entre deux neurons adjacents du ganglion abdominal de l'Aplysie. C.r. hebdomadaire Acad. Sci. (Paris). 248, 1857-1859.
107. Twarog B.M. (1966). Catch and the mechanism of action of 5-hydroxytryptamine (serotonine-5HT) on molluscan muscles: a speculation. Life Sci. 5, 1201-1213.
108. Wallace B.G., B.R. Talamo, P.D. Evans y E.A. Kravitz (1974). Octopamine: selective association with specific neurons in lobster nervous system. Brain Res. 74, 349-355.
109. Webb G.D., W.D. Dettbarn y K. Briza (1966). Biochemical and pharmacological aspects of the synapses of the squid stellate ganglion. Biochem. Pharmacol. 15, 1813-1819.
110. Weber A. y R. Herz (1963). The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity. J. biol. Chem. 238, 599-605.
111. Westfall J.A. (1973). Ultrastructure evidence for neuromuscular systems in Coelenterates. Amer. Zool. 13, 237-246.
112. Wood J.G. y T.L. Lenz (1964). Histochemical localization of amines in Hydra and sea anemones. Nature. 201, 88-89.
113. Young J.Z. (1936). The giant nerve fibres and epistellar body of cephalopods. Q. Jl. microsc. Sci. 78, 367.
114. Zs-Nagy I y J. Salanky (1965). Histochemical investigations of cholinesterase in different molluscs with reference to functional conditions. J. Nature. 206, 842-843.

105. Tauc L. (1958). Processus post-synaptique d'excitation et d'inhibition dans le soma neuronique de l'Aplysie et de l'Escargot. Arch. Ital. Biol. 96, 75-110.
106. Tauc L. (1959). Interaction non synaptique entre deux neurons adjacents du ganglion abdominal de l'Aplysie. C.r. heb. Seauc. Acad. Sci. (Paris). 248, 1857-1859.
107. Twarog B.M. (1966). Catch and the mechanism of action of 5-hydroxytryptamine (serotonine-5HT) on molluscan muscles: a speculation. Life Sci. 5, 1201-1213.
108. Wallace B.G., B.R. Talamo, F.D. Evans y E.A. Kravitz (1974) Octopamine: selective association with specific neurons in lobster nervous system. Brain Res. 74, 349-355.
109. Webb G.D., W.D. Dettbarn y K. Brinn (1966). Biochemical and pharmacological aspects of the synapses of the squid stellate ganglion. Biochem. Pharmacol. 15, 1813-1819.
110. Weber A. y R. Herz (1963). The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity. J. Biol. Chem. 238, 599-605.
111. Westfall J.A. (1973). Ultrastructure evidence for neuromuscular systems in Coelenterates. Amer. Zool. 13, 237-246.
112. Wood J.O. y T.L. Lenz (1964). Histochemical localization of amines in Hydra and sea anemones. Nature. 201. 88-89.
113. Young J.L. (1936). The giant nerve fibres and epistellar body of cephalopods. Q. Jl. microsc. Sci. 78, 367.
114. Zs-Nagy I y J. Salanky (1965). Histochemical investigations of cholinesterase in different molluscs with reference to functional conditions. J. Nature. 206, 842-843.