

38
207



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EFEECTO Y POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LA
LIDOCAINA SOBRE LA MIGRACION DE ORGANELOS
EN CELULAS RETINALES DURANTE LA ADAPTACION
A LA LUZ Y A LA OSCURIDAD.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

p r e s e n t a

RICARDO MONDRAGON FLORES

Director de Tesis: DR. EUGENIO FRIXIONE G.

Cuatitlán Izcalli, Edo. de México.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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

		pags.
I	Introducción	1
II	Generalidades	2
	1. Efectos de los anestésicos locales sobre el transporte intracelular	2
	2. Las migraciones pigmentarias en células retinales como modelos experimentales para el estudio del transporte intracelular	5
	A. Fotorreceptores de langostino de río.	6
	B. Células del Epitelio Pigmentario Retinal de rana	10
III	Propósitos	14
IV	Objetivos	14
V	Materiales	15
	1. Fotorreceptores retinales de langostino de río	
	A. Materiales biológicos	15
	B. Materiales químicos	15
	2. Epitelio Pigmentario Retinal de rana	
	A. Materiales biológicos	19
	B. Materiales químicos	19
VI	Métodos	
	A. Fotorreceptores retinales de langostino de río.	
	- Procedimiento de disección, tratamiento general de las muestras y medición de los resultados	21
	B. Epitelio Pigmentario Retinal de rana	
	- Procedimiento de disección, tratamiento general de las muestras y medición de los resultados	22
VII	Resultados	
	A. Fotorreceptores retinales de langostino de río	
	1. Efecto de lidocaína en la migración pigmentaria in vitro.	
	- Efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad por lidocaína	28

- Efecto de lidocaína en células adaptadas a la oscuridad	28
Efecto de lidocaína en la adaptación a la luz	31
- Reversibilidad del efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria	34
- Papel del pH en la dispersión pigmentaria por lidocaína en la oscuridad	34
2. Investigación mecanicista del efecto de lidocaína en la migración pigmentaria.	
- Efecto de lidocaína bajo condiciones favorables a la adaptación a la oscuridad por ausencia de Na^+	37
- Efecto de lidocaína bajo condiciones estabilizantes de membrana	39
a. En presencia de Ca^{++} extracelular elevado	
b. En presencia de Co^{++}	
B. Epitelio Pigmentario Retinal de Rana	
1. Migración pigmentaria en el epitelio pigmentario retinal de rana	
- Caracterización de la migración pigmentaria en los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad in vivo .	42
- Caracterización de la migración pigmentaria en los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad in vitro	44
2. Efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria en el EPR in vitro.	
- Efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad por lidocaína	47
- Efecto de lidocaína sobre las células pigmentarias en la oscuridad	53
- Reversibilidad del efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria	53
- Efecto de lidocaína sobre el estado de adaptación a la luz	53
3. Investigación mecanicista del efecto de lidocaína en la migración pigmentaria	
- Efecto de lidocaína en la adaptación a la oscuridad en ausencia de Na^+	55
- Efecto de lidocaína en presencia de Ca^{++} elevado y en presencia de Co^{++}	56

- Caracterización farmacológica e iónica de la migración

	pigmentaria	56
VIII	Discusión General	69
IX	Conclusiones	84
X	Bibliografía	85

I. INTRODUCCION

El desarrollo de la investigación dentro de la farmacología ha conducido a la producción de un gran número de fármacos con utilidad diversa. Uno de estos productos son los anestésicos locales, los cuales representan toda una tradición dentro de la aplicación quirúrgica. El efecto --inhibitorio sobre el estímulo de estos fármacos así como los posibles mecanismos involucrados en este, han sido estudiados extensamente, sin embargo aún siguen sin ser totalmente elucidados.

Recientes estudios con este tipo de fármacos han sugerido que además de la acción anestésica que los caracteriza, producen una serie de alteraciones en la fisiología celular; se ha hablado de cambios en el metabolismo oxidativo, en la organización ultraestructural de la célula y también en los fenómenos de transporte intracelular.

Debido a estos antecedentes, se diseñó el estudio del efecto de la Lidocaína (un anestésico local) específicamente sobre el fenómeno de transporte intracelular, utilizando para este objeto, 2 modelos celulares de diferente naturaleza, uno proveniente de rana (Epitelio pigmentario retinal) y otro de langostino de río (Fotorreceptores retinales). Ambos se caracterizan por presentar movimientos intracelulares de gránulos de pigmento, lo cual actuaría como un excelente ejemplo del fenómeno de transporte de organelos a través del citoplasma.

La importancia del presente estudio, estriba principalmente en el hecho de que este anestésico es ampliamente utilizado en diversos tipos de intervenciones quirúrgicas sin el conocimiento de las lesiones antes mencionadas; posiblemente dichos cambios no sean trascendentales en la integridad funcional del organismo, pero solo será concluyente en el sentido en que se realicen un mayor número de estudios de esta índole.

II. GENERALIDADES

1. Efectos de los anestésicos locales sobre el transporte intracelular.

Los efectos descritos de los anestésicos locales sobre el transporte intracelular, se han reportado sobre el transporte rápido de proteínas en el axón neural de fibras aisladas. Esta acción parece ser independiente de las propiedades anestésicas de este tipo de agentes, y se manifiesta de manera adicional a otras alteraciones celulares como son :

- a. Inhibición del metabolismo oxidativo
- b. Lisis celular

Las primeras observaciones del efecto sobre el transporte fueron realizadas por Fink en 1972 (27,28), en axones aislados, quien utilizando la técnica de inyección de aminoácidos marcados en el soma celular y midiendo marcas radiactivas a diferentes tiempos, evaluó las alteraciones que el halotano (un anestésico general) y la lidocaína (también conocido como xilocaína, un anestésico local) producían sobre el transporte axonal rápido de proteínas. Sus resultados indicaron que la lidocaína a una concentración de 0.1-0.6% inhibió el transporte rápido de una manera reversible, de forma similar al halotano a una presión de 0.03 atm; este último anestésico produjo además una disminución en el número de microtúbulos en el axón.

Estos fueron los primeros antecedentes de efectos no anestésicos sobre el transporte intracelular. A partir de estos trabajos, varios investigadores se han orientado al análisis de las alteraciones que ejercen diversos anestésicos sobre el proceso de transporte, utilizando para ello el modelo experimental adoptado por Fink. Los hallazgos obtenidos desde entonces han esclarecido parcialmente los mecanismos involucrados en este fenómeno. Las evidencias que se tienen son las siguientes:

a) Diversos anestésicos locales del tipo procaína tales como la procaína, la lidocaína y además la tetracaína producen una inhibición del transporte rápido de proteínas en sistemas in vitro como son el nervio ciático de rana y el nervio vago de conejo. Dicha inhibición es un proceso reversible de aparición lenta, y se obtiene a concentraciones más elevadas - que las necesarias para bloquear la conducción del impulso (36.6 mM, 18.5 mM y 1.0 mM de procaína, lidocaína y tetracaína), en contraste con las concentraciones bloqueadoras de la conducción (de 7.4 mM para lidocaína y 18.3 mM para procaína) (1,2, 22). Por otro lado se ha observado que la potencia de inhibición del transporte es dependiente del pH, un factor que

determina la conformación molecular del anestésico (46). Otros anestésicos locales que presentan este efecto son la dibucaína y la etidocaína, así como algunos tranquilizantes como la clorpromazina y procloperazina (22, 47, 48).

b) Comparando el orden de potencia inhibitoria del transporte, se ha determinado la siguiente relación :

Dibucaína > Tetracaína > Etidocaína > Lidocaína > Procaína (47)

c) Los resultados obtenidos con los anestésicos locales, indican que el bloqueo del transporte axonal rápido y el bloqueo de la conducción del impulso son acciones que no se encuentran necesariamente correlacionadas. De hecho existen diferencias notables dependiendo del fármaco, por ejemplo la dibucaína es un anestésico local ligeramente más potente que la tetracaína y también ligeramente más potente en el bloqueo del transporte. Lo mismo ocurre al comparar la lidocaína con procaína. Sin embargo, en el caso de la etidocaína, cuyo efecto anestésico es tan potente como el de la tetracaína, la capacidad de inhibición del transporte axonal es 5 veces menor (47).

La diferencia entre las potencias de los anestésicos locales para el bloqueo del transporte y para la conducción del estímulo encontrada en los sistemas in vitro, no ha sido corroborada sin embargo en los sistemas in vivo. En 1974 Ngai (57) realizando estudios con anestésicos en cobayos intactos, encontró que la lidocaína a una concentración de 1% (pero no a 0.5%) bloqueó el transporte axonal acompañado con el bloqueo nervioso. Por otro lado Fink en 1976 realizando pruebas más detalladas, reportó que el efecto de lidocaína a concentraciones de 1, 2 ó 4% sobre nervio trigémino in vivo en rata, bloqueó el transporte axonal rápido de manera concomitante con el bloqueo de la conducción del impulso, y sugirió que ambos efectos pueden considerarse como simultáneos bajo situaciones clínicas (29).

d) Estudios ultraestructurales de los axones tratados con diversos anestésicos locales, han mostrado evidencias acerca de alteraciones morfológicas a concentraciones a las que se inhibe el transporte axonal rápido in vitro.

La acción de fármacos como la lidocaína (18.3mM), tetracaína (3.3 mM), clorpromazina (0.1 mM) y procloperazina (0.1 mM), produce una disminución en el número de microtúbulos así como un incremento en el número de filamentos en el axón de los nervios tratados, y en algunas ocasiones se observan estructuras microtubulares características (1, 2, 22, 28); por otro lado, a concentraciones que no bloquean el transporte se notan solo pequeñas alteraciones estructurales (40, 42).

Realizando estudios más profundos, Byers en 1973 (15) con ayuda de la microscopía electrónica, presentó resultados secuenciales de los efectos de lidocaína (0.6%) in vitro sobre el nervio vago de conejo a diferentes intervalos de tiempo. Sus resultados indicaron que la inhibición del transporte dependió del tiempo de exposición así como de la concentración del anestésico, manifestandose de manera progresiva la siguiente secuencia ultraestructural :

- a. La primera respuesta al anestésico es un bloqueo de la conducción del impulso.
- b. Se manifiesta posteriormente un retardo del transporte axonal rápido.
- c. Se presenta una reorientación del retículo endoplásmico liso y la total inhibición del transporte rápido.
- d. Hay una despolimerización de los microtúbulos.
- e. Hinchazón de los axones, células de Schwann y mitocondrias.
- f. Se manifiesta una severa hinchazón celular con la desaparición de algunos organelos.

Este cuadro general varía en cuanto el umbral de un nervio a otro, pero la misma secuencia se presenta en todos.

De forma análoga, Byers estudió la reversibilidad del efecto inhibitor del transporte eliminando del medio al anestésico, encontrando lo siguiente :

- a. Se presentó como primera manifestación, una reorientación del retículo endoplásmico liso a la posición normal, desapareciendo la hinchazón del axón y de las células de Schwann.
- b. Se recuperó la conducción de los potenciales de acción, y se observó una repolimerización parcial de los microtúbulos.
- c. Finalmente se recuperó el transporte axonal rápido.

Estudios de polimerización de microtúbulos in vitro en presencia de lidocaína (7.5-21 mM) han mostrado por medio de análisis viscométricos y de microscopía electrónica, que este anestésico produce directamente una inhibición de la polimerización de tubulina, con un efecto reversible y dependiente de la dosis. Este estudio indicó que el fármaco disminuye el número de túbulos, sin afectar su longitud. Este mismo efecto se encontró con procaína y etidocaína. La explicación que se plantea para la inhibición del transporte axonal, toma en cuenta una inhibición de la polimerización de microtúbulos por una interacción directa de los anestésicos con la tubulina, y quizás un desensamblaje de las estructuras tubulares ya formadas (15,40), puesto que los microtúbulos se consideran estructuras fundamentales para el me

canismo del transporte intracelular (61), su disminución podría explicar el trastorno del proceso.

En conjunto estos son los hallazgos más importantes que se han hecho en esta área. Los mecanismos involucrados en el anterior fenómeno, aún permanecen desconocidos de manera parcial en el caso de los elementos de translocación y completamente con respecto a los mecanismos de regulación del mismo.

2. Las migraciones pigmentarias en células retinales como modelos experimentales para el estudio del transporte intracelular.

La semejanza que existe entre el movimiento de *gránulos pigmentarios* en las células retinales (32,66) con los desplazamientos de partículas en las células nerviosas, permite el empleo de las primeras como modelos adecuados en el estudio del transporte intracelular particulado. Se han hecho investigaciones sobre este fenómeno en células pigmentarias de tegumento (44) así como en células pigmentarias de tejido retinal (4, 77).

En el presente estudio se eligieron a las células retinales como los sistemas experimentales de transporte, para investigar el efecto de lidocaína sobre este fenómeno.

Los sistemas biológicos estudiados fueron : a) Fotorreceptores retinales de crustáceo y b) células del epitelio pigmentario retinal de rana.

Estos dos tipos de células presentan diversas características comunes. Ambas son de naturaleza retinal, unas de origen neural y otras epitelial, y contienen en su citoplasma *gránulos de pigmento* de un color parduzco que presentan movimientos de un lado a otro de la célula dependiendo de las condiciones de iluminación.

Las ventajas por las cuales fueron elegidos los dos modelos estudiados en este trabajo son :

- A pesar de ser células de distinto origen, ambas manifiestan el mismo fenómeno de migración pigmentaria, lo cual permite generalizar el estudio del transporte intracelular(33,77)
- Son células fácilmente observables al microscopio fotónico y presentan un pigmento migratorio de color oscuro que puede utilizarse como un indicador de cualquier movimiento intracelular que se presente.
- Este pigmento se desplaza solo en dos direcciones que dependen de las condiciones de ilu-

minación a las que sean sometidas las células. (32, 33, 64).

- Debido a que estos sistemas manifiestan el movimiento granular como una unidad de pigmento que de manera uniforme se desplaza dentro de cada célula y en todo el tejido, es posible realizar determinaciones cuantitativas de esta migración.
- Los fenómenos de migración pigmentaria reportados en animales íntegros, pueden ser reproducidos in vitro, mediante el uso de soluciones de incubación, intervalos de pH y temperaturas fisiológicas, (33, 64, 77)

Dentro de las desventajas de estos sistemas, se pueden mencionar :

- Al estar definida la posición del pigmento por efecto de la luz, no es posible realizar observaciones de las células vivas en el microscopio óptico, por lo que el análisis de la respuesta migratoria se efectúa después de un paso de fijación por calor (33, 64) ó por agentes químicos (glutaraldehído, OsO_4) bajo las condiciones de iluminación estudiadas.
- A pesar de ser relativamente fácil la obtención de las preparaciones aisladas de retina cualquier manipulación que dañe a las células, ya sea durante la disección o durante la incubación, provocará alteraciones irreversibles de las respuestas migratorias.

Con el fin de proporcionar un marco teórico adecuado, se plantearán algunas características de los dos sistemas celulares utilizados en este trabajo.

A. Fotorreceptores retinales de langostino de río.

Los langostinos de río (Género *Procambarus*) tienen como sistemas visuales ojos de tipo compuesto los cuales están constituidos por estructuras multicelulares llamadas omatidios dispuestas en forma radial en la retina; una de estas son las células retinulares proximales, que presentan desplazamientos intracelulares de gránulos de pigmento, y se agrupan constituyendo una subestructura denominada rabdomo o unidad fotorreceptora.

Las células retinales proximales tienen un núcleo en la porción distal adquiriendo un aspecto fibroso o filamentosos hacia su región proximal (Fig. 1), penetrando a lo que se conoce como membrana basal. Un aspecto característico de las células retinulares, es la presencia de un pigmento citoplasmático denominado omocromo (85), que envuelve al rabdomo dándole una tonalidad oscura. Este pigmento tiene la propiedad de desplazarse de manera definida según las condiciones de iluminación; cuando las células son sometidas al estado de "adaptación a la luz", el pigmento ocupa toda la extensión desde la zona inferior de la membrana basal hasta

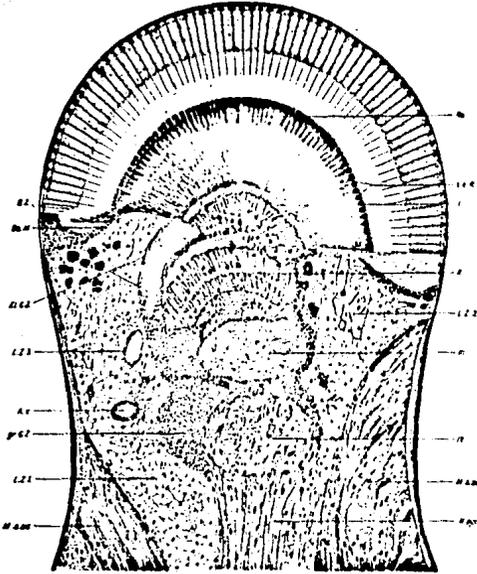


Fig. 17.

Wappelsaugstachel) durch die rechte Aug. A. 1 bis 50; a. 1. umhüllter Nerven; B. 1, B. 2, B. 3, B. 4, B. 5, B. 6, B. 7, B. 8, B. 9, B. 10, B. 11, B. 12, B. 13, B. 14, B. 15, B. 16, B. 17, B. 18, B. 19, B. 20, B. 21, B. 22, B. 23, B. 24, B. 25, B. 26, B. 27, B. 28, B. 29, B. 30, B. 31, B. 32, B. 33, B. 34, B. 35, B. 36, B. 37, B. 38, B. 39, B. 40, B. 41, B. 42, B. 43, B. 44, B. 45, B. 46, B. 47, B. 48, B. 49, B. 50; C. 1, C. 2, C. 3, C. 4, C. 5, C. 6, C. 7, C. 8, C. 9, C. 10, C. 11, C. 12, C. 13, C. 14, C. 15, C. 16, C. 17, C. 18, C. 19, C. 20, C. 21, C. 22, C. 23, C. 24, C. 25, C. 26, C. 27, C. 28, C. 29, C. 30, C. 31, C. 32, C. 33, C. 34, C. 35, C. 36, C. 37, C. 38, C. 39, C. 40, C. 41, C. 42, C. 43, C. 44, C. 45, C. 46, C. 47, C. 48, C. 49, C. 50; D. 1, D. 2, D. 3, D. 4, D. 5, D. 6, D. 7, D. 8, D. 9, D. 10, D. 11, D. 12, D. 13, D. 14, D. 15, D. 16, D. 17, D. 18, D. 19, D. 20, D. 21, D. 22, D. 23, D. 24, D. 25, D. 26, D. 27, D. 28, D. 29, D. 30, D. 31, D. 32, D. 33, D. 34, D. 35, D. 36, D. 37, D. 38, D. 39, D. 40, D. 41, D. 42, D. 43, D. 44, D. 45, D. 46, D. 47, D. 48, D. 49, D. 50; E. 1, E. 2, E. 3, E. 4, E. 5, E. 6, E. 7, E. 8, E. 9, E. 10, E. 11, E. 12, E. 13, E. 14, E. 15, E. 16, E. 17, E. 18, E. 19, E. 20, E. 21, E. 22, E. 23, E. 24, E. 25, E. 26, E. 27, E. 28, E. 29, E. 30, E. 31, E. 32, E. 33, E. 34, E. 35, E. 36, E. 37, E. 38, E. 39, E. 40, E. 41, E. 42, E. 43, E. 44, E. 45, E. 46, E. 47, E. 48, E. 49, E. 50; F. 1, F. 2, F. 3, F. 4, F. 5, F. 6, F. 7, F. 8, F. 9, F. 10, F. 11, F. 12, F. 13, F. 14, F. 15, F. 16, F. 17, F. 18, F. 19, F. 20, F. 21, F. 22, F. 23, F. 24, F. 25, F. 26, F. 27, F. 28, F. 29, F. 30, F. 31, F. 32, F. 33, F. 34, F. 35, F. 36, F. 37, F. 38, F. 39, F. 40, F. 41, F. 42, F. 43, F. 44, F. 45, F. 46, F. 47, F. 48, F. 49, F. 50; G. 1, G. 2, G. 3, G. 4, G. 5, G. 6, G. 7, G. 8, G. 9, G. 10, G. 11, G. 12, G. 13, G. 14, G. 15, G. 16, G. 17, G. 18, G. 19, G. 20, G. 21, G. 22, G. 23, G. 24, G. 25, G. 26, G. 27, G. 28, G. 29, G. 30, G. 31, G. 32, G. 33, G. 34, G. 35, G. 36, G. 37, G. 38, G. 39, G. 40, G. 41, G. 42, G. 43, G. 44, G. 45, G. 46, G. 47, G. 48, G. 49, G. 50; H. 1, H. 2, H. 3, H. 4, H. 5, H. 6, H. 7, H. 8, H. 9, H. 10, H. 11, H. 12, H. 13, H. 14, H. 15, H. 16, H. 17, H. 18, H. 19, H. 20, H. 21, H. 22, H. 23, H. 24, H. 25, H. 26, H. 27, H. 28, H. 29, H. 30, H. 31, H. 32, H. 33, H. 34, H. 35, H. 36, H. 37, H. 38, H. 39, H. 40, H. 41, H. 42, H. 43, H. 44, H. 45, H. 46, H. 47, H. 48, H. 49, H. 50; I. 1, I. 2, I. 3, I. 4, I. 5, I. 6, I. 7, I. 8, I. 9, I. 10, I. 11, I. 12, I. 13, I. 14, I. 15, I. 16, I. 17, I. 18, I. 19, I. 20, I. 21, I. 22, I. 23, I. 24, I. 25, I. 26, I. 27, I. 28, I. 29, I. 30, I. 31, I. 32, I. 33, I. 34, I. 35, I. 36, I. 37, I. 38, I. 39, I. 40, I. 41, I. 42, I. 43, I. 44, I. 45, I. 46, I. 47, I. 48, I. 49, I. 50; J. 1, J. 2, J. 3, J. 4, J. 5, J. 6, J. 7, J. 8, J. 9, J. 10, J. 11, J. 12, J. 13, J. 14, J. 15, J. 16, J. 17, J. 18, J. 19, J. 20, J. 21, J. 22, J. 23, J. 24, J. 25, J. 26, J. 27, J. 28, J. 29, J. 30, J. 31, J. 32, J. 33, J. 34, J. 35, J. 36, J. 37, J. 38, J. 39, J. 40, J. 41, J. 42, J. 43, J. 44, J. 45, J. 46, J. 47, J. 48, J. 49, J. 50; K. 1, K. 2, K. 3, K. 4, K. 5, K. 6, K. 7, K. 8, K. 9, K. 10, K. 11, K. 12, K. 13, K. 14, K. 15, K. 16, K. 17, K. 18, K. 19, K. 20, K. 21, K. 22, K. 23, K. 24, K. 25, K. 26, K. 27, K. 28, K. 29, K. 30, K. 31, K. 32, K. 33, K. 34, K. 35, K. 36, K. 37, K. 38, K. 39, K. 40, K. 41, K. 42, K. 43, K. 44, K. 45, K. 46, K. 47, K. 48, K. 49, K. 50; L. 1, L. 2, L. 3, L. 4, L. 5, L. 6, L. 7, L. 8, L. 9, L. 10, L. 11, L. 12, L. 13, L. 14, L. 15, L. 16, L. 17, L. 18, L. 19, L. 20, L. 21, L. 22, L. 23, L. 24, L. 25, L. 26, L. 27, L. 28, L. 29, L. 30, L. 31, L. 32, L. 33, L. 34, L. 35, L. 36, L. 37, L. 38, L. 39, L. 40, L. 41, L. 42, L. 43, L. 44, L. 45, L. 46, L. 47, L. 48, L. 49, L. 50; M. 1, M. 2, M. 3, M. 4, M. 5, M. 6, M. 7, M. 8, M. 9, M. 10, M. 11, M. 12, M. 13, M. 14, M. 15, M. 16, M. 17, M. 18, M. 19, M. 20, M. 21, M. 22, M. 23, M. 24, M. 25, M. 26, M. 27, M. 28, M. 29, M. 30, M. 31, M. 32, M. 33, M. 34, M. 35, M. 36, M. 37, M. 38, M. 39, M. 40, M. 41, M. 42, M. 43, M. 44, M. 45, M. 46, M. 47, M. 48, M. 49, M. 50; N. 1, N. 2, N. 3, N. 4, N. 5, N. 6, N. 7, N. 8, N. 9, N. 10, N. 11, N. 12, N. 13, N. 14, N. 15, N. 16, N. 17, N. 18, N. 19, N. 20, N. 21, N. 22, N. 23, N. 24, N. 25, N. 26, N. 27, N. 28, N. 29, N. 30, N. 31, N. 32, N. 33, N. 34, N. 35, N. 36, N. 37, N. 38, N. 39, N. 40, N. 41, N. 42, N. 43, N. 44, N. 45, N. 46, N. 47, N. 48, N. 49, N. 50; O. 1, O. 2, O. 3, O. 4, O. 5, O. 6, O. 7, O. 8, O. 9, O. 10, O. 11, O. 12, O. 13, O. 14, O. 15, O. 16, O. 17, O. 18, O. 19, O. 20, O. 21, O. 22, O. 23, O. 24, O. 25, O. 26, O. 27, O. 28, O. 29, O. 30, O. 31, O. 32, O. 33, O. 34, O. 35, O. 36, O. 37, O. 38, O. 39, O. 40, O. 41, O. 42, O. 43, O. 44, O. 45, O. 46, O. 47, O. 48, O. 49, O. 50; P. 1, P. 2, P. 3, P. 4, P. 5, P. 6, P. 7, P. 8, P. 9, P. 10, P. 11, P. 12, P. 13, P. 14, P. 15, P. 16, P. 17, P. 18, P. 19, P. 20, P. 21, P. 22, P. 23, P. 24, P. 25, P. 26, P. 27, P. 28, P. 29, P. 30, P. 31, P. 32, P. 33, P. 34, P. 35, P. 36, P. 37, P. 38, P. 39, P. 40, P. 41, P. 42, P. 43, P. 44, P. 45, P. 46, P. 47, P. 48, P. 49, P. 50; Q. 1, Q. 2, Q. 3, Q. 4, Q. 5, Q. 6, Q. 7, Q. 8, Q. 9, Q. 10, Q. 11, Q. 12, Q. 13, Q. 14, Q. 15, Q. 16, Q. 17, Q. 18, Q. 19, Q. 20, Q. 21, Q. 22, Q. 23, Q. 24, Q. 25, Q. 26, Q. 27, Q. 28, Q. 29, Q. 30, Q. 31, Q. 32, Q. 33, Q. 34, Q. 35, Q. 36, Q. 37, Q. 38, Q. 39, Q. 40, Q. 41, Q. 42, Q. 43, Q. 44, Q. 45, Q. 46, Q. 47, Q. 48, Q. 49, Q. 50; R. 1, R. 2, R. 3, R. 4, R. 5, R. 6, R. 7, R. 8, R. 9, R. 10, R. 11, R. 12, R. 13, R. 14, R. 15, R. 16, R. 17, R. 18, R. 19, R. 20, R. 21, R. 22, R. 23, R. 24, R. 25, R. 26, R. 27, R. 28, R. 29, R. 30, R. 31, R. 32, R. 33, R. 34, R. 35, R. 36, R. 37, R. 38, R. 39, R. 40, R. 41, R. 42, R. 43, R. 44, R. 45, R. 46, R. 47, R. 48, R. 49, R. 50; S. 1, S. 2, S. 3, S. 4, S. 5, S. 6, S. 7, S. 8, S. 9, S. 10, S. 11, S. 12, S. 13, S. 14, S. 15, S. 16, S. 17, S. 18, S. 19, S. 20, S. 21, S. 22, S. 23, S. 24, S. 25, S. 26, S. 27, S. 28, S. 29, S. 30, S. 31, S. 32, S. 33, S. 34, S. 35, S. 36, S. 37, S. 38, S. 39, S. 40, S. 41, S. 42, S. 43, S. 44, S. 45, S. 46, S. 47, S. 48, S. 49, S. 50; T. 1, T. 2, T. 3, T. 4, T. 5, T. 6, T. 7, T. 8, T. 9, T. 10, T. 11, T. 12, T. 13, T. 14, T. 15, T. 16, T. 17, T. 18, T. 19, T. 20, T. 21, T. 22, T. 23, T. 24, T. 25, T. 26, T. 27, T. 28, T. 29, T. 30, T. 31, T. 32, T. 33, T. 34, T. 35, T. 36, T. 37, T. 38, T. 39, T. 40, T. 41, T. 42, T. 43, T. 44, T. 45, T. 46, T. 47, T. 48, T. 49, T. 50; U. 1, U. 2, U. 3, U. 4, U. 5, U. 6, U. 7, U. 8, U. 9, U. 10, U. 11, U. 12, U. 13, U. 14, U. 15, U. 16, U. 17, U. 18, U. 19, U. 20, U. 21, U. 22, U. 23, U. 24, U. 25, U. 26, U. 27, U. 28, U. 29, U. 30, U. 31, U. 32, U. 33, U. 34, U. 35, U. 36, U. 37, U. 38, U. 39, U. 40, U. 41, U. 42, U. 43, U. 44, U. 45, U. 46, U. 47, U. 48, U. 49, U. 50; V. 1, V. 2, V. 3, V. 4, V. 5, V. 6, V. 7, V. 8, V. 9, V. 10, V. 11, V. 12, V. 13, V. 14, V. 15, V. 16, V. 17, V. 18, V. 19, V. 20, V. 21, V. 22, V. 23, V. 24, V. 25, V. 26, V. 27, V. 28, V. 29, V. 30, V. 31, V. 32, V. 33, V. 34, V. 35, V. 36, V. 37, V. 38, V. 39, V. 40, V. 41, V. 42, V. 43, V. 44, V. 45, V. 46, V. 47, V. 48, V. 49, V. 50; W. 1, W. 2, W. 3, W. 4, W. 5, W. 6, W. 7, W. 8, W. 9, W. 10, W. 11, W. 12, W. 13, W. 14, W. 15, W. 16, W. 17, W. 18, W. 19, W. 20, W. 21, W. 22, W. 23, W. 24, W. 25, W. 26, W. 27, W. 28, W. 29, W. 30, W. 31, W. 32, W. 33, W. 34, W. 35, W. 36, W. 37, W. 38, W. 39, W. 40, W. 41, W. 42, W. 43, W. 44, W. 45, W. 46, W. 47, W. 48, W. 49, W. 50; X. 1, X. 2, X. 3, X. 4, X. 5, X. 6, X. 7, X. 8, X. 9, X. 10, X. 11, X. 12, X. 13, X. 14, X. 15, X. 16, X. 17, X. 18, X. 19, X. 20, X. 21, X. 22, X. 23, X. 24, X. 25, X. 26, X. 27, X. 28, X. 29, X. 30, X. 31, X. 32, X. 33, X. 34, X. 35, X. 36, X. 37, X. 38, X. 39, X. 40, X. 41, X. 42, X. 43, X. 44, X. 45, X. 46, X. 47, X. 48, X. 49, X. 50; Y. 1, Y. 2, Y. 3, Y. 4, Y. 5, Y. 6, Y. 7, Y. 8, Y. 9, Y. 10, Y. 11, Y. 12, Y. 13, Y. 14, Y. 15, Y. 16, Y. 17, Y. 18, Y. 19, Y. 20, Y. 21, Y. 22, Y. 23, Y. 24, Y. 25, Y. 26, Y. 27, Y. 28, Y. 29, Y. 30, Y. 31, Y. 32, Y. 33, Y. 34, Y. 35, Y. 36, Y. 37, Y. 38, Y. 39, Y. 40, Y. 41, Y. 42, Y. 43, Y. 44, Y. 45, Y. 46, Y. 47, Y. 48, Y. 49, Y. 50; Z. 1, Z. 2, Z. 3, Z. 4, Z. 5, Z. 6, Z. 7, Z. 8, Z. 9, Z. 10, Z. 11, Z. 12, Z. 13, Z. 14, Z. 15, Z. 16, Z. 17, Z. 18, Z. 19, Z. 20, Z. 21, Z. 22, Z. 23, Z. 24, Z. 25, Z. 26, Z. 27, Z. 28, Z. 29, Z. 30, Z. 31, Z. 32, Z. 33, Z. 34, Z. 35, Z. 36, Z. 37, Z. 38, Z. 39, Z. 40, Z. 41, Z. 42, Z. 43, Z. 44, Z. 45, Z. 46, Z. 47, Z. 48, Z. 49, Z. 50.

*) Zool. Jahrbuch. Abteilung Anatomie, Bd. 1, S. 624, 676.

Fig. 1 Esquema de un corte sagital de un tallo ocular de langostino de río. Se observan los fotorreceptores retinales (de color oscuro) así como otros detalles estructurales de este tipo de ojo compuesto. Extraído de Bernhards H. (1916), Z. Wiss Zool. 116 : 649

el extremo nuclear distal, quedando así las células totalmente oscuras, por lo que se dice que el pigmento está "disperso". Por el contrario, en condiciones de "adaptación a la oscuridad", la posición del pigmento se limita a la porción fibrosa concentrándose por debajo de la membrana basal, a lo que se ha definido como estado "agregado" (Fig. 2).

El significado funcional de estas migraciones, está relacionado con una eficiencia en el aprovechamiento de la luz así como en la protección retinal.

El tiempo requerido para la adaptación a la luz, se ha determinado entre 30-45 minutos mientras que la adaptación a la oscuridad requiere tiempos de 45-60 minutos (32). Los eventos que se llevan a cabo una vez absorbida la luz y que controlan el movimiento pigmentario no son bien conocidos. A nivel de los sistemas de regulación, se ha planteado que los iones Na^+ y Ca^{++} cumplen con un papel fundamental (33). Aparentemente aquellas condiciones *in vitro* que inducen a un incremento citoplasmático de estos iones, dispersan el pigmento aún en la oscuridad :

- a) La cafeína, (16, 17, '79) parece ejercer su efecto liberando Ca^{++} de los reservorios intracelulares.
- b) El ionóforo A-23187 introduce Ca^{++} al citoplasma (36, 60, 70).
- c) La monensina actúa abriendo el canal de Na^+ aumentando su actividad citoplásmica .
- d) La elevación de Na^+ extracelular

Por el contrario, la promoción de la agregación del pigmento, es decir el estado de adaptación a la oscuridad se obtiene con mayor facilidad cuando el Na^+ tanto fuera como dentro de la célula está disminuido, como ocurre en los siguientes casos:

- a) Con la eliminación de Na^+ del medio de incubación
- b) Con la adición de amilorida, un agente que impide la entrada de Na^+ a la célula (33)
- c) Con condiciones estabilizantes de membrana que disminuyan la entrada de Na^+ , por ejemplo mediante la elevación de Ca^{++} extracelular o por la adición de Co^{++} (6, 33).

Estudios realizados sobre retinas de vertebrados e invertebrados, han evidenciado que durante los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad, se llevan a cabo alteraciones en la actividad de Ca^{++} libre citoplásmico. En la luz se incrementa, mientras que en la oscuridad disminuye. Estos comportamientos oscilatorios en la actividad de Ca^{++} citoplásmico han superado la existencia de reservorios intracelulares para este catión (Retículo endoplásmico y mitocondrias), que cumpliendo con una función amortiguadora, captan Ca^{++} cuando la actividad de este ha excedido los rangos fisiológicos, y lo liberan cuando dicha concentra-

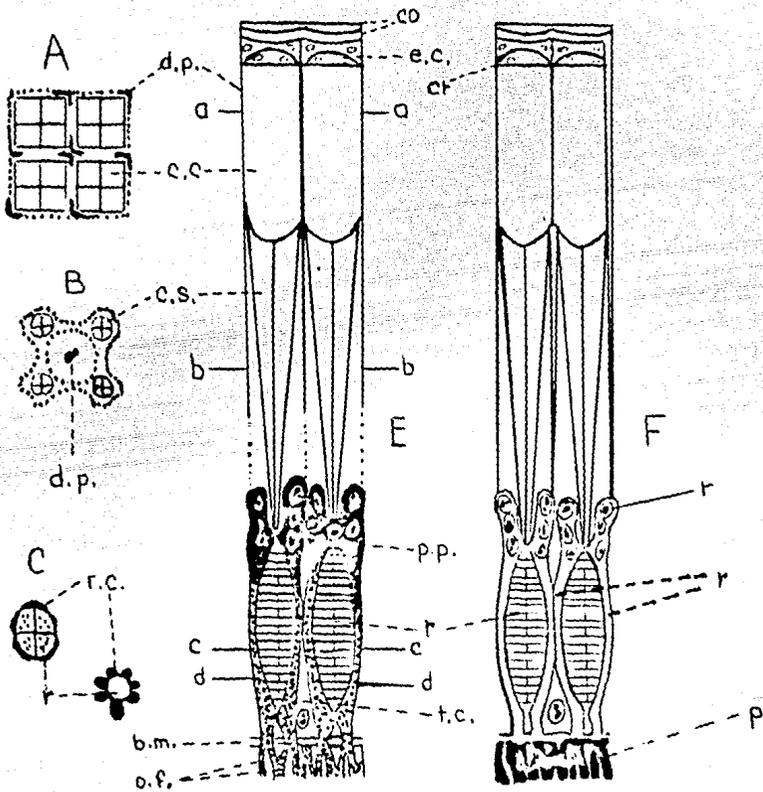


Fig. 2 Esquema de la estructura de los omatidios del ojo compuesto del Langostino.

E: en la adaptación a la luz; F: en la adaptación a la oscuridad. (co) córnea; (ec) células corneáneas; (cr) células del cono cristalino; (pp) pigmento proximal; (r) rabdomo; (rc) células retinulares; (tc) células del pigmento de reflexión ó "tapete lucidum"; (bm) membrana basal; (of) fibras visuales. Los niveles a-a, b-b, c-c y d-d indican los planos del corte correspondiente a las secciones transversales A, B, C, y D respectivamente. Tomado de Waterman (1961). High sensitivity and Vision. The Physiology of Crustacea. Ac. Press :475-478

ción ha disminuído (11, 21, 24, 68, 69, 85).

Acerca de los mecanismos de translocación o transporte de los gránulos pigmentarios se conoce poco. Bajo diferentes condiciones de iluminación, se han observado alteraciones en la densidad y cambios morfológicos en el citoplasma cuando los gránulos de pigmento que están en interacción con microtúbulos y con la matriz citoplásmica, son desplazados de una región a otra dentro de la célula (34).

Las características ultraestructurales determinadas por la observación de células retinulares completas así como de citoplasma extraído, sugieren que los gránulos de pigmento proximal están integrados en una estructura reticular de filamentos que proporcionan funciones dinámicas al sistema (34).

B. Células del Epitelio Pigmentario Retinal de rana

La retina de los vertebrados está constituida por diferentes estratos, los más importantes para este estudio corresponden a : (Fig. 3)

- Epitelio pigmentario retinal. Está estructurada como una monocapa celular unida a la coroides por su parte externa y al tejido nervioso retinal por la interna. Una de las características de estas células son las migraciones pigmentarias dependientes de las condiciones de iluminación.
- Conos y bastones. Están formados por las terminaciones protoplasmáticas de los fotorreceptores. Estos receptores visuales se caracterizan porque su mitad superior se extiende por arriba de la superficie ventricular conocida también como membrana limitante externa, de tal manera que se pueden distinguir dos zonas : un segmento interno y uno externo (38, 71).

Las células del epitelio pigmentario retinal presentan una forma poligonal con un tamaño de 20-25 micrómetros de ancho y de 7-10 de alto, son células muy polarizadas y presentan una zona basal que descansa sobre la membrana de Bruch, una zona nuclear y una zona apical en la que se encuentran prolongaciones citoplásmicas que se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores, este tipo de prolongaciones se encuentran bien desarrolladas en animales como las ranas, peces, y diversos reptiles y aves, y contienen en su citoplasma, gránulos de pigmento de melanina con un diámetro de 0.27 micrómetros (58), que se desplaza desde la parte apical a la basal o viceversa, dependiendo de las condiciones

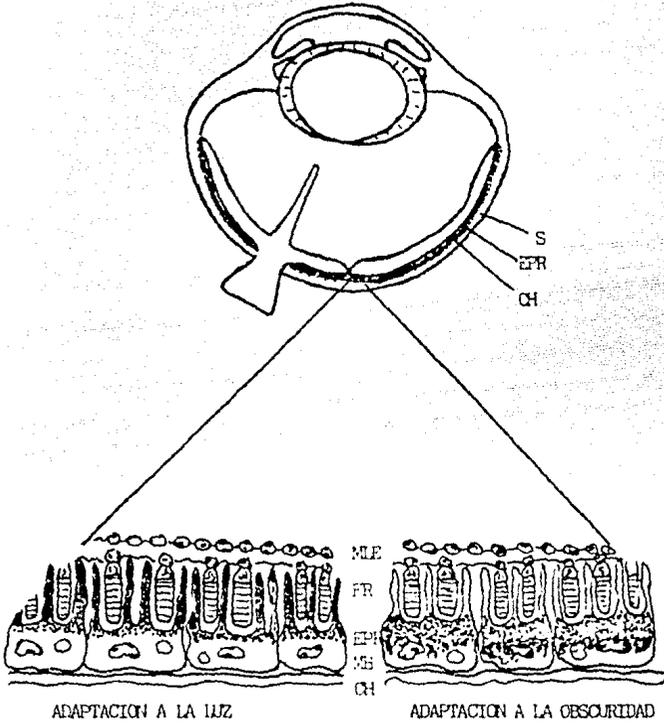


Fig. 3 .Esquema de un corte vertical de un ojo de vertebrado a través de la fovea centralis y el nervio óptico. El epitelio pigmentario es una delgada capa localizada entre la retina neural y la coroides. En una ampliación, se observan las células pigmentarias en el estado de adaptación a la luz y a la oscuridad. S, sclera, RPE epitelio pigmentario retinal, CH coroides, MLE membrana limitante externa, FR fotorreceptores, ME membrana de Bruch.

de iluminación. De esta forma en la oscuridad, los gránulos de pigmento se agregan en la base de las células permaneciendo las prolongaciones citoplásmicas libres del mismo, mientras que en un estado de adaptación a la luz el pigmento se desplaza a lo largo de toda la célula ocupando las porciones apicales que rodean a los segmentos externos.

Los mecanismos que intervienen en la regulación así como en la producción de la fuerza motriz necesaria para el desplazamiento de estos gránulos son aún desconocidos. Se han propuesto dos teorías :

1. En una se postula que el movimiento pigmentario se debe a cambios en la longitud de las prolongaciones, las cuales contienen en forma estática a los gránulos de pigmento.
2. La otra propone que el desplazamiento de los gránulos se efectúa dentro de las prolongaciones citoplásmicas permaneciendo estas inalterables en cuanto a su longitud (81).

Los resultados obtenidos hasta ahora, apoyan la segunda alternativa. Con respecto a los mecanismos regulatorios, de este fenómeno se tienen como única evidencia los trabajos in vitro realizados por Snyder y Zadunaisky, ellos encontraron que el ión Ca^{++} juega un importante papel en los procesos de adaptación a la oscuridad en epitelio pigmentario retinal de rana de forma similar a como se han planteado en otros sistemas móviles (10, 11, 33, 77, 81).

Por medio de microanálisis con rayos X, se ha encontrado que los gránulos de pigmento presentan un alto contenido de Ca^{++} (65). Debido a esta característica se han propuesto como reservorios intracelulares de este catión (11, 73, 74), en donde por efecto de la luz lo liberan induciendo oscilaciones en la actividad citoplásmica de este ión, regulándose así los eventos involucrados en la translocación de los gránulos pigmentarios (11, 41, 65).

Los mecanismos retinomotores del desplazamiento de los gránulos de pigmento en estas células son poco conocidos. Estudios realizados con microscopia electrónica en epitelio pigmentario retinal de rana y pez, han mostrado la presencia de filamentos de actina (10 m) dispuestos axialmente a lo largo de las prolongaciones apicales en interacción tanto con la membrana celular como con los gránulos de pigmento (12, 54). Este tipo de asociaciones parecen ser las responsables de la dirección y de la fuerza con que los gránulos de pigmento son transportados en estas células. La importancia que se le asigna a los filamentos de actina en este modelo, contrasta con los hallazgos realizados en otros sistemas de transporte pigmentario, en donde son los microtúbulos los que intervienen fundamentalmente en el transporte intracelular (34, 55, 72).

Las células del epitelio pigmentario del pez teleosteo, son la excepción de sus con géneres en otras especies; estas células presentan tanto microtúbulos como microfilamentos en las prolongaciones apicales. Estudios realizados por Burnside en este tipo de epitelios, utilizando agentes como la citocalasina B y colchicina, han evidenciado la participación de ambos elementos del citoesqueleto en los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad (13). La característica mencionada para el caso de este pez, no pueden aún así ser aplicables a las células del epitelio pigmentario retinal de otros vertebrados, en donde no existen microtúbulos a nivel apical, recurriéndose para la determinación del mecanismo solamente a dos elementos del citoesqueleto, los filamentos de actina y la matriz citoplásmica.

III. PROPOSITOS

Considerando los antecedentes acerca de la acción inhibitoria de los anestésicos sobre el transporte rápido de proteínas en el axón neural, nos propusimos estudiar el efecto de LIDOCAINA , un anestésico de uso común en la práctica odontológica y hospitalaria, sobre el fenómeno de transporte intracelular de organelos en dos modelos celulares de distinta naturaleza : a) Epitelio pigmentario retinal de rana

b) Fotorreceptores retinales de langostino de río

con el fin de determinar los posibles mecanismos de acción del fármaco involucrados en el proceso del transporte intracelular de gránulos de pigmento.

IV. OBJETIVOS

1. Investigar el efecto de lidocaína sobre la migración intracelular de organelos (gránulos de pigmento) en los fotorreceptores retinales del langostino de río y en las células del epitelio pigmentario retinal de rana.
2. Determinar el posible mecanismo de acción de lidocaína, mediante la evaluación del efecto bajo diferentes condiciones iónicas y farmacológicas de incubación.
3. Caracterización y desarrollo de una nueva preparación celular in vitro para el estudio del fenómeno del transporte intracelular de organelos : células del epitelio pigmentario retinal de rana.

V. MATERIALES

1. Fotorreceptores retinales de langostino de río

A. Materiales biológicos

Se emplearon cangrejos o langostinos de río, adultos de la especie Procambarus clarkii y Procambarus bouvieri (Fig 4) sin hacer distinción en cuanto al sexo. Los animales se mantuvieron en piletas exteriores con recirculación de agua a temperatura ambiente. Aquellos animales que se encontraron en proceso de muda del exoesqueleto, lo cual se manifestó como un ablandamiento del cefalotorax, no fueron empleados para el estudio. Todos los experimentos se realizaron a la misma hora del día para evitar así cualquier influencia del ritmo circadiano en la respuesta migratoria (33).

El material biológico utilizado, fueron los tallos oculares extirpados, los cuales fueron posteriormente disecados y sometidos a las condiciones de incubación respectivas.

Se utilizó el material básico de disección constituido por : tijeras comunes, tijeras de punta aguda, microtijeras de Vannas, pinzas curvas de disección y estilletes.

Las cámaras de incubación que se emplearon, estuvieron construídas por un tapón de hule, sobre cuya cara inferior se encontraba engrapada una placa de poliestireno con cuatro perforaciones, hechas de tal manera que al colocar un tallo ocular longitudinalmente en cada perforación, este se mantuviera prensado y fijo. El tapón que soportaba a las muestras, se introducía en un frasco de vidrio con cuya boca ajustaba perfectamente y en el que se encontraba el medio de incubación, antes de cerrar el frasco se sustituía el aire presente por oxígeno (Fig. 5) . Una vez preparada la cámara, se invertía su posición de tal manera que la solución estuviera en contacto con las muestras, sumergiéndose el sistema completo en un baño de agua a 17°C. Posteriormente se trasladaba a las condiciones de iluminación requeridas en cada experimento (30).

B. Materiales químicos.

Se utilizó como medio de disección e incubación, una solución salina fisiológica para crustáceo, propuesta por Van Harrevelde (solución VH) (39), amortiguada a pH 7.4 con imidazol (Tabla I).

El anestésico local empleado se obtuvo de una solución inyectable de clortidrato de

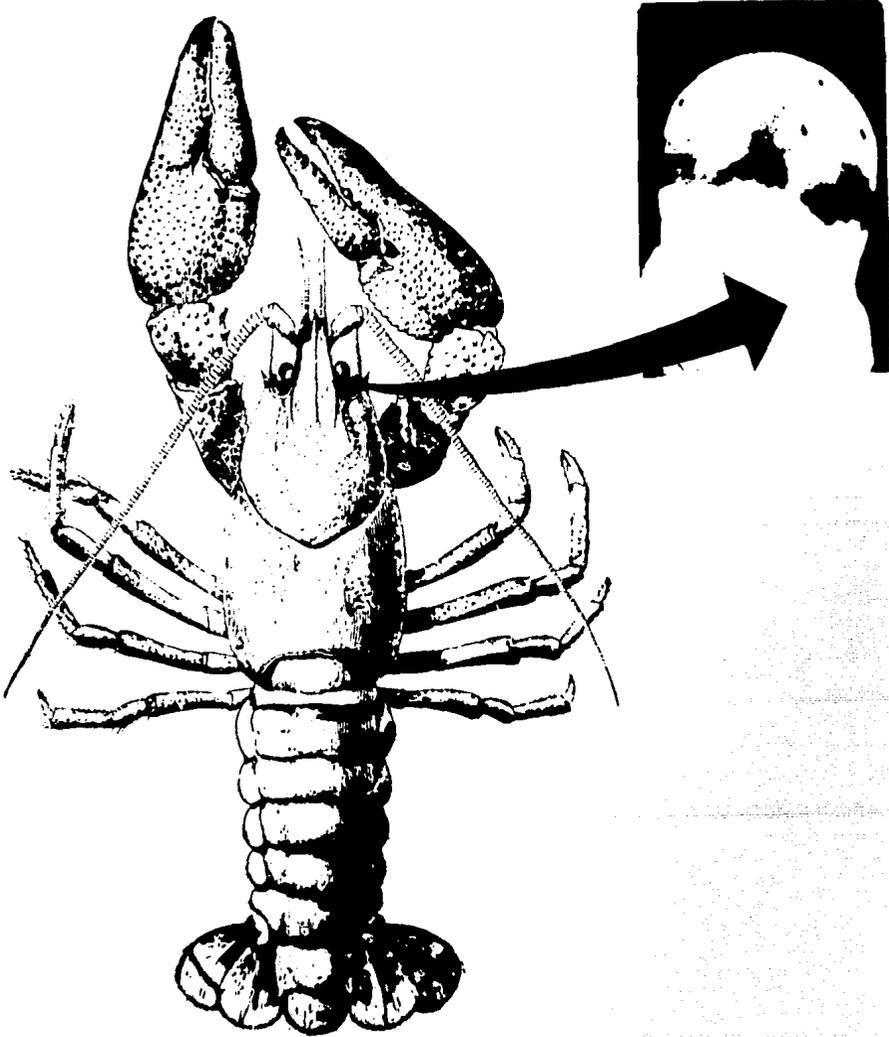


Fig. 4 Esquema de un langostino de río de la especie Procambarus (aumento 1.5x) y fotografía vista al microscopio estereoscópico de un tallo ocular aislado (aumento 14 x). Extraído de Huxley T.H. (1893). An introduction to study of Zoology. New York. ISS.

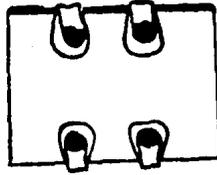
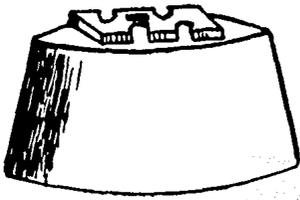


Fig. 5 Cámara de incubación para tallos oculares aislados de langostino de río.

TABLA I. Composición iónica de las soluciones empleadas como medios de incubación.

Solución (mol / lt)	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Co ⁺⁺	Cl ⁻	Imidazol	Colina-Cl ⁻	Lidocafina
A Van Harreveld (VH)	205	5.39	13.49	2.59	-	242.56	10	-	-
B Sol. de VH sin Na ⁺	-	5.39	13.49	2.59	-	242.56	10	205	-
C Sol. VH con CaCl ₂ alto	2.4	-	150	-	-	302.4	10	-	-
D Sol. de VH con CoCl ₂	205	5.39	13.49	2.59	15	272.56	10	-	-
E Sol. VH-Lidocafina(*)	205	5.39	13.49	2.59	-	267.56	10	-	25
F VH sin Na ⁺ /Lidocafina	-	5.39	13.49	2.59	-	267.56	10	205	25
G CaCl ₂ alto/Lidocafina	2.4	5.39	150	-	-	327.2	10	-	25
H CoCl ₂ /Lidocafina	205	5.39	13.49	2.59	15	297.56	10	-	25
I Sacarosa 300 mM	-	-	-	-	-	-	10	-	-
J Sacarosa/lidocafina	-	-	-	-	-	-	10	-	25

Todas las soluciones fueron ajustadas a una osmolaridad aproximada de 500 mOs.

(*) Se evaluó la lidocafina a las concentraciones de 19, 25, y 50 mM.

lidocaína al 1 y 2%, que se adicionó en las proporciones requeridas a la solución VH.

2. Epitelio pigmentario retinal de rana

A. Materiales biológicos

Se emplearon ranas adultas de la especie Rana pipiens y Rana montezuma, indistintamente del sexo, manteniéndolas en estanques exteriores y a temperatura ambiente.

Todos los experimentos se realizaron a la misma hora del día a fin de evitar cualquier intervención del ritmo circadiano en la respuesta migratoria (19,49). El material biológico que se utilizó fueron las copas oculares obtenidas a partir de la enucleación y bisectación de los ojos completos.

B. Materiales químicos.

Se utilizó como medio de disección e incubación una solución salina fisiológica para rana (Ringer de rana), modificada por Sillman, Ito y Tomita (76) con la siguiente composición: Na^+ (110 mM), K^+ (2.0 mM), Cl^- (115.6 mM), Imidazol (10 mM), y glucosa (20 mM), - amortiguada a pH 7.4. Dicho medio sufrió modificaciones en su contenido, en función de los objetivos particulares de cada experimento (Tabla II).

El instrumental fue el mismo que se empleó con el modelo de langostino de río.

TABLA II. Investigación mecanicista del efecto de lidocafina en la migración pigmentaria en el epitelio pigmentario de rana.

Soluciones (mol/lit)	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺	Co ⁺⁺	Cl ⁻	Imidazol	Glucosa	Colina	Lidocafina	Quabafina	Cafeína	A-23187
A Ringer	110	2	1.8	-	115.6	10	20	-	-	-	-	-
B Ringer sin CaCl ₂	110	2	-	-	112.0	10	20	-	-	-	-	-
C Ringer sin NaCl	-	2	1.8	-	115.6	10	20	110	-	-	-	-
D Sin NaCl, sin CaCl ₂	-	2	-	-	113.8	10	20	110	-	-	-	-
E NaCl elevado	165	2	1.8	-	170.6	10	20	-	-	-	-	-
F Control NaCl elevado	110	2	1.8	-	170.6	10	20	55	-	-	-	-
G CaCl ₂	110	2	9.0	-	130.0	10	-	-	-	-	-	-
H CoCl ₂	110	2	1.8	5	120.6	10	20	-	-	-	-	-
I Ouabafina	110	2	1.8	-	115.6	10	20	-	-	0.1-0.5	-	-
J Ouabafina sin NaCl	-	2	1.8	-	115.6	10	20	110	-	0.1-0.5	-	-
K Cafeína	110	2	1.8	-	115.6	10	20	-	-	-	5	-
L Cafeína sin NaCl	-	2	1.8	-	115.6	10	20	110	-	-	5	-
M A-23187	110	2	1.8	-	115.6	10	20	-	-	-	-	1 mg/ml
N Ringer con lidocafina	110	2	1.8	-	115.6	10	20	-	5	-	-	-
O Lidocafina sin NaCl	-	2	1.8	-	120.6	10	20	110	5	-	-	-
P Lidocafina/CaCl ₂	110	2	9.0	-	135.0	10	-	-	5	-	-	-
Q Lidocafina/CoCl ₂	110	2	1.8	5	125.6	10	20	-	5	-	-	-

* Se estudió el efecto de lidocafina a las concentraciones de 5, 19 y 25 mM.
De estas solo la de 5 mM no produjo lisis celular.

VI. METODOS

A. Fotorreceptores retinales de langostino de río.

- Procedimiento de disección, tratamiento general de las muestras y medición de resultados.

El protocolo de disección que se siguió fue el siguiente:

a) Revisión y extirpación del tallo ocular.

Se inspeccionaron los ojos en el animal con ayuda de un microscopio estereoscópico en búsqueda de lesiones retinales que pudieran interferir con el funcionamiento normal de estas células; una vez seleccionadas, con ayuda de tijeras se separó el rostro que los protege para posteriormente cortar con tijeras de punta aguda en la base del tallo ocular a nivel de la unión con el cefalo-tórax .

b) Preparación del tallo ocular.

Una de las características que facilitan la disección de estos tallos oculares, es la presencia de un pedículo quitinoso de consistencia dura que antecede al tejido retinal. Los ojos extirpados fueron sumergidos en solución de VH sobre hielo y con ayuda del microscopio estereoscópico, se cortaron aquellas porciones membranosas que quedaron en la boca del pedículo como resultado de la extirpación, facilitando así la comunicación del medio de incubación con la retina.

c) Protocolo de adaptación a la oscuridad (30).

Se mantuvieron las cámaras en un cuarto oscuro por un tiempo de 90 minutos y a una temperatura de 17°C, con periodos cortos de agitación suave cada 20 minutos.

Para realizar cambios en el medio de incubación, se traspasó el tapón con las muestras a otro frasco que contuviera la nueva solución previamente gaseada con oxígeno. Este tipo de manipulaciones se realizaron bajo las condiciones de iluminación en las que se encontraba la muestra.

d) Protocolo de adaptación a la luz (30).

Se incubaron las muestras bajo iluminación fluorescente común del laboratorio por un tiempo de 1 hora , a 17°C y en presencia de oxígeno.

e) Fijación y determinación del Índice de Pigmento Proximal (IPP).

Una vez finalizada la incubación, se fijó la posición del pigmento, mediante la inmersión de las muestras en agua a 80°C por 30 segundos. Posteriormente se mantienen en formaldehído al 10% por 12 horas a temperatura ambiente con el fin de endurecer los tejidos. Enseguida se colocan los ojos verticalmente sobre una placa de cera dental y con la ayuda de una navaja de afeitar se dividen lentamente a la mitad. Las partes así obtenidas se depositan en cajas petri con agua, y se observa la magnitud de la respuesta migratoria del pigmento con ayuda del microscopio estereoscópico.

Por medio de una escala micrométrica se realizan dos mediciones en la estructura retinal, un valor " a " que consiste en la distancia recorrida por la masa pigmentaria a partir de la membrana basal, y un valor " b " que representa la distancia total y constante de recorrido desde la membrana basal hasta el extremo nuclear de los fotorreceptores retinales. El cociente a/b corresponde al Índice de Pigmento Proximal (IPP), que adopta un valor de 0 ó tendiente a 0 en el estado de adaptación a la oscuridad, y un valor de 1 ó tendiente a 1 en el estado de adaptación a la luz (Fig. 6) (32).

Con fines estadísticos, se estudió como mínimo un número de tres muestras por experimento repitiéndose este a su vez 2 o más veces, con un total de 5-8 valores de IPP. Cabe aclarar que la determinación del IPP también se puede hacer con microscopía óptica, pero el tratamiento al que deben someterse las muestras, es más complejo y prolongado (ver protocolo en epitelio pigmentario de rana), por lo que se prefirió trabajar en condiciones para microscopía estereoscópica.

B. Epitelio pigmentario retinal de rana.

- Procedimiento de disección, tratamiento general de las muestras y medición de los resultados.

Se sacrificaron los animales por decapitación rápida, posteriormente con una navaja de afeitar y tijeras se cortó la piel y masa muscular que rodeaba al ojo, de tal manera que este pudiera salir fácilmente de su cuenca, los globos oculares así separados son sumergidos en una solución de Ringer sobre hielo, y con ayuda de navaja nueva y microtijeras son partidos por detrás de la Ora serrata, eliminándose el humor vitreo y el iris mediante un goteo con la solución salina, obteniéndose así la copa ocular (Fig.7).

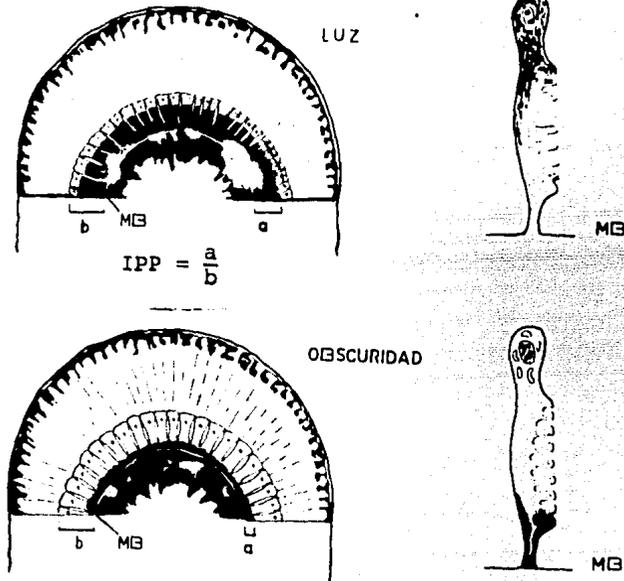


Fig. 6 El Índice del Pigmento Proximal (IPP) que es una medida de la migración pigmentaria, se determinó mediante el cociente de dos distancias fundamentales : 1) De la membrana basal (MB) a la zona distal alcanzada por el pigmento (valor a) y 2) Desde la MB hasta el extremo distal de la retina (valor b). (Fridone et al 1979)

PREPARACION DEL EPITELIO
PIGMENTARIO RETINAL



IN SITU



OJO AISLADO



COPA OCULAR

Fig. 7 Etapas desarrolladas para la obtención del epitelio pigmentario retinal, localizado en la copa ocular aislada. Aumento 7 x.

La incubación de las copas oculares se realizó colocándolas en un frasco de vidrio en el que se encontraba la solución de Ringer de prueba; después de oxigenar el medio se cerró el frasco con un tapón de hule y se sumergió en una cámara de agua a 17°C , manteniéndola bajo las condiciones de iluminación y tiempos de incubación requeridos. Otro proceso que se siguió, fue el de sujetar la muestra sobre la cara inferior del tapón cerrando el frasco e invirtiéndolo a manera que la solución bañara a la copa ocular. Con esta manipulación fue posible cambiar el contenido del medio cuando se requirió, traspasándose solo el tapón a otro frasco con la solución nueva.

Una vez transcurrida la incubación, se fijó la posición del pigmento con glutaraldehído al 4 % en solución amortiguadora de PO_4 0.1 M a pH 7.4 por un tiempo de 30 minutos a 17°C y por 1 hora sobre hielo (77), realizándose después 3 lavados de 10 min. cada uno con una solución de sacarosa al 5 % en el mismo amortiguador de PO_4 . Durante esta fase del lavado, la copa ocular se cortó en pequeñas porciones. Posteriormente se hace una postfijación utilizando OsO_4 al 1 % (en PO_4 0.1 M, pH 7.4) por 1 hora sobre hielo. Al finalizar este período se lavaron las muestras con una solución de sacarosa- PO_4 por 30 min. Las fijaciones con el glutaraldehído, se realizaron bajo las condiciones de iluminación en las que se desarrollaron los experimentos siguiendo las fases posteriores del protocolo en presencia de luz.

Las muestras ya fijadas, se sometieron a un tratamiento de deshidratación con etanol, a concentraciones de 70, 80, 90 y 100 % por tiempos de 10 minutos cada uno y tres cambios en el solvente puro a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se sometieron las muestras a una infiltración con resinas epóxicas a fin de favorecer su penetración a las células siendo así posible su inclusión en bloques plásticos para corte en ultramicrotomo. Para esto se sumergieron los tejidos en un volumen de resina-solvente (el utilizado en la deshidratación) en una relación de 1:1 por 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, posteriormente se cambiaron a una nueva mezcla en proporción de 3:1 por 1 hora más. Después de esto se pasaron a resina pura por 2 horas. Al terminar la inclusión, se colocaron las muestras en moldes para microscopía llenándolos con resina y polimerizándolos a una temperatura de $60-70^{\circ}\text{C}$ por 20 horas. De los bloques así obtenidos se hicieron cortes semifinos (150-190 nm) en un ultramicrotomo Reichert-Jung y se montaron por calor en placas de vidrio, se hizo una tinción con azul de toluidina y se observaron los resultados en microscopio óptico.

Determinación del Índice de Pigmento (IP). La magnitud de la migración pigmentaria se evaluó mediante el Índice de Pigmento (IP) (Fig. 8). Por medio de una escala micrométrica se consideraron 2 mediciones : un valor " a " que correspondió a la distancia recorrida por el pigmento a partir de la membrana de Bruch y un valor " b " que fue una distancia total y constante que se extendió desde la membrana de Bruch hasta lo que se conoce como membrana limitante externa. El cociente a/b es el Índice de Pigmento (IP) y que en el estado de adaptación a la luz tiende a un valor de 1 mientras que en la obscuridad tiende a un valor de 0. Este método de cuantificación de la migración pigmentaria se estandarizó en este trabajo mediante la medición de un gran número de muestras con el fin de demostrar la reproducibilidad de los resultados. Las determinaciones del IP se hicieron con un microscopio óptico Microstar American Optical, utilizando una cámara fotográfica montada en el mismo para la obtención de las micrografías,.

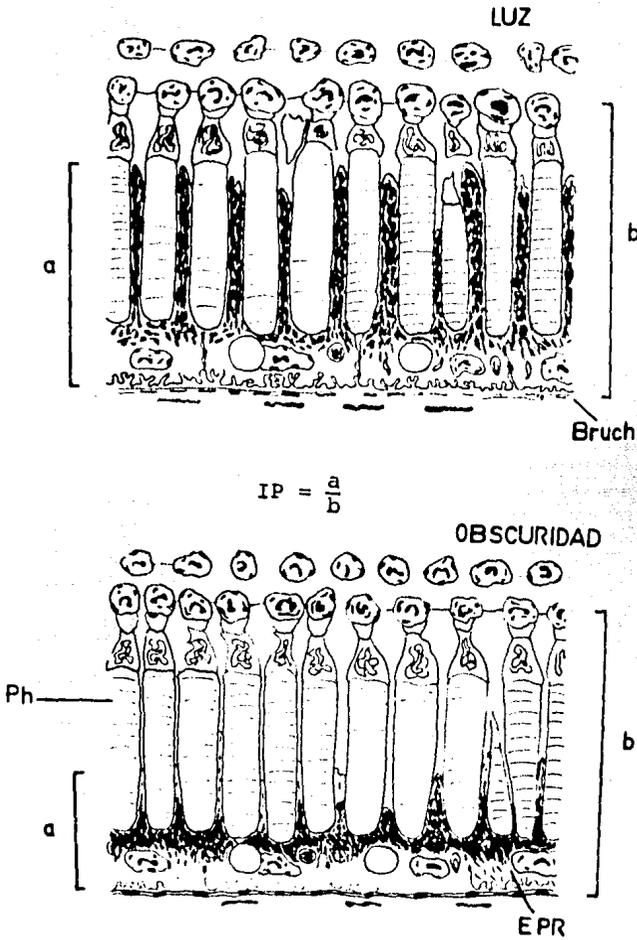


Fig. 8 La evaluación de la migración pigmentaria en las células del EPR, se realizó mediante el "Índice de Pigmento" (IP) que corresponde al cociente de dos distancias: 1) De la membrana de Bruch a la zona distal alcanzada por el pigmento (valor a) y 2) De la membrana de Bruch a la membrana limitante externa (valor b). (500 x)

VII. RESULTADOS

A. Fotorreceptores retinales de langostino de río.

1. Efecto de lidocaína en la migración pigmentaria in vitro.

- Efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad por lidocaína.

Se estudiaron dos tipos de condiciones. En la primera, se preincubaron las muestras con lidocaína 25 mM (sol E) (2,28) en presencia de luz por 2 horas a 17°C y posteriormente en la oscuridad por 90 minutos, fijándose finalmente las muestras. En la segunda condición o muestra testigo, se mantuvieron las retinas en solución de VH sin anestésico, incubándose el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de iluminación a las que fue sometido el sistema anterior.

Al mantener las células retinales bajo las condiciones requeridas para su adaptación a la oscuridad in vitro, se observó que todo o casi todo el pigmento proximal migró desde la porción nuclear hasta la porción axonal de los fotorreceptores, concentrándose por debajo de la membrana basal (Fig.9) tal y como lo reportó Fridone (30). Bajo estas condiciones se pudieron notar dos niveles de agregación, uno en el cual todo el pigmento se retrajo quedando por debajo de la membrana basal con un valor de 0, y otro que se obtuvo con mayor frecuencia pero que presentaba un IPP que oscilaba entre 0.10 y 0.15, lo que indicó que bajo las condiciones habituales de incubación, el pigmento proximal no se retrae totalmente, quedando algo de él por arriba de la membrana basal.

En las condiciones de adaptación a la luz, el pigmento proximal se encontró disperso a lo largo de todo el fotorreceptor dándole una tonalidad oscura.

Al evaluar el efecto de lidocaína a una concentración de 25 mM se presentó una inhibición de la agregación pigmentaria en la oscuridad, mientras que el testigo sin anestésico se adaptó bajo estas condiciones a la forma habitual (Fig.10).

- Efecto de lidocaína en células adaptadas a la oscuridad.

Se analizó la respuesta de dos grupos. Ambos se sometieron primero a las condiciones de adaptación a la oscuridad (90 min/17°C) en solución de VH (Sol. A), posteriormente a uno de ellos se le cambió a medio de lidocaína 25 mM en VH (Sol. E), y se incubó por un tiempo de 2 horas antes de ser fijadas las muestras. Al segundo grupo, después de la adaptación a la

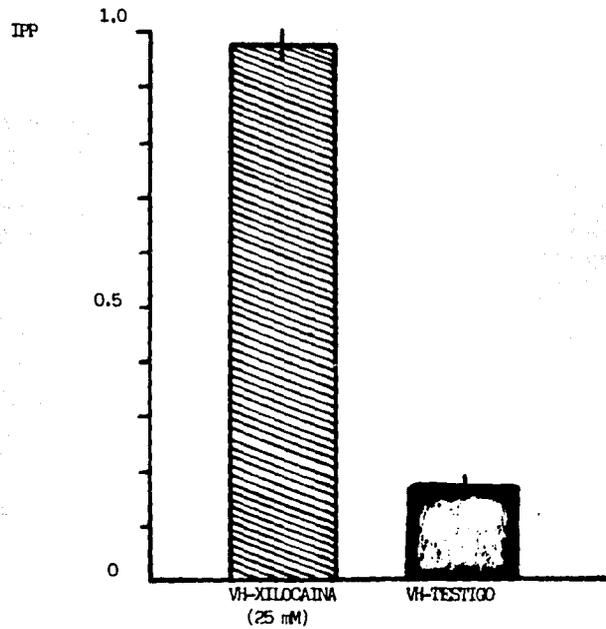


Fig. 10 Efecto de Lidocaína en la agregación del pigmento proximal en la oscuridad. El anestésico inhibe la agregación pigmentaria manteniendo el pigmento disperso aún en la oscuridad. Cada columna representa cuando menos IPP de 6 tallos oculares. Las barras representan las desviaciones estándar de cada grupo estudiado.

obscuridad se le cambio a nueva solución VI y se incubó por 2 horas más hasta su fijación.

Una vez confirmado el efecto del anestésico bajo estas condiciones, se determinó la respuesta a diferentes tiempos de incubación de 30, 60, 120 y 180 minutos, y a concentraciones del anestésico de 19, 25 y 50 mM. En cada experimento se estudiaron paralelamente muestras que fueron incubadas en ausencia del anestésico por iguales periodos de tiempo.

Al estudiarse el efecto del anestésico en fotorreceptores en los que inicialmente el pigmento proximal se mantenía agregado, se observó una dispersión del pigmento a una posición de adaptación a la luz en condiciones de oscuridad, contrario al comportamiento del testigo.

Las cinéticas del efecto anterior a diferentes concentraciones del anestésico (Fig.11) indicaron que hay un aumento en la respuesta a tiempos prolongados de incubación siendo para las concentraciones de lidocaína de 25 y 50 mM igual, y diferente para 19 mM. A partir de estas curvas, se eligió la concentración intermedia de lidocaína de 25 mM y el tiempo de exposición de 2 horas como las condiciones más adecuadas para los estudios de caracterización del efecto y mecanismos de acción de la droga. Este efecto dispersante se puede observar en la Fig.12 .

- Efecto de lidocaína en la adaptación a la luz.

Para investigar si la lidocaína presentaba alguna interferencia en el proceso de adaptación a la luz, similar a lo observado en la adaptación a la oscuridad, se estudiaron los siguientes cuatro sistemas.

En el primero se incubaron las retinas bajo las condiciones de adaptación a la obscuridad en VH, posteriormente se pusieron en medio de lidocaína 25mM por 2 horas y por último fueron iluminadas por 1 hora antes de fijarse. En el segundo sistema, se estudió la capacidad de las células para adaptarse a la oscuridad bajo las condiciones experimentales. Esto se logró manteniendo a las muestras en medio VH sin anestésico en la oscuridad por 3 ½ horas, con un recambio de medio y oxígeno en los primeros 90 minutos. El tercer grupo se utilizó como testigo del efecto de lidocaína en ausencia de luz; las muestras fueron adaptadas a la oscuridad y posteriormente se expusieron al anestésico por 2 horas, por último se fijaron. En el cuarto grupo, se estudió la respuesta migratoria en ausencia de lidocaína durante las diferentes variaciones de iluminación; se adaptaron las células a la oscuridad en

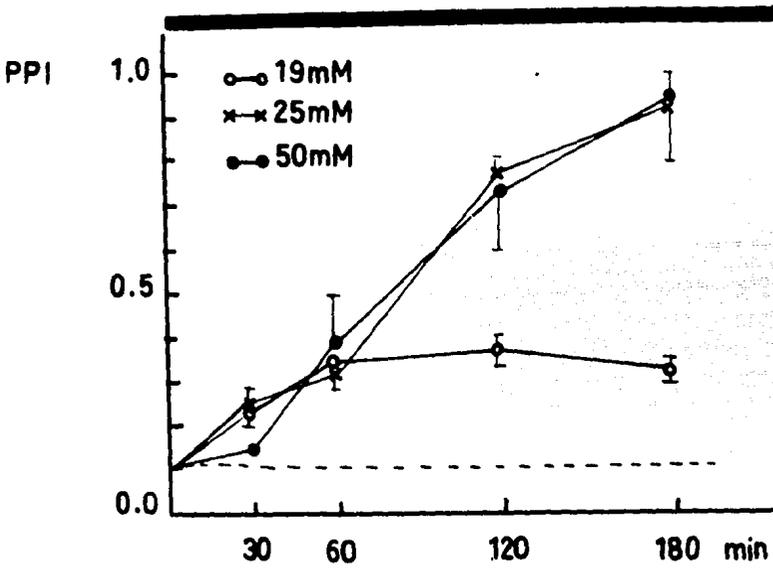


Fig. 11 Curva cinética de efecto/tiempo de lidocaína a diferentes concentraciones sobre ojos adaptados a la oscuridad. Este fármaco promovió la dispersión pigmentaria en la oscuridad con una respuesta proporcional al tiempo. La línea punteada representa los valores de IPP de tallos oculares en ausencia del anestésico. Cada punto corresponde al promedio de cuando menos 6 tallos oculares. Las barras verticales representan la desviación standard de cada punto.

OBSCURIDAD

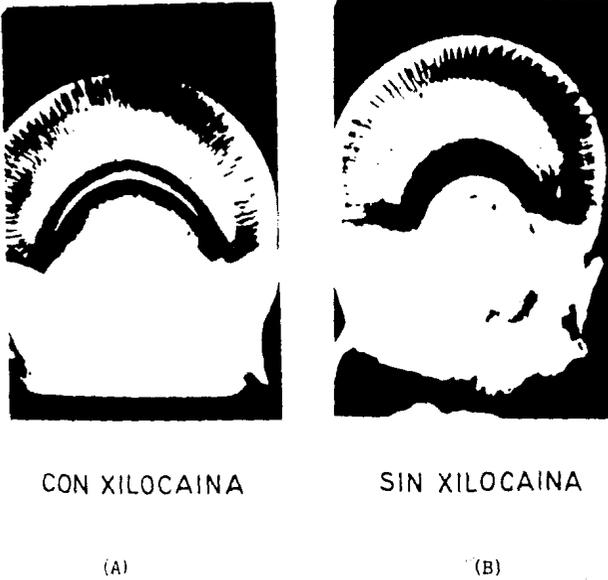


Fig. 12. Cortes longitudinales de retinas de langostino de río, mostrando el efecto promotor de la dispersión por lidocaína (25 μ M/2 hrs) en la oscuridad(A). En ausencia del anestésico no se presenta el efecto (B). Aumento 14 x.

VH por 90 minutos, después se renovó el medio y se incubaron 2 horas más, para por último trasladar la cámara a la luz por 1 hora.

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de luz, una vez que la lidocaína había dispersado el pigmento en la oscuridad hasta un nivel de IPP=0.80, fue capaz de estimular a las células para completar la migración del pigmento a un nivel máximo de 1.0 de IPP similar al observado en las células no tratadas con el anestésico. De esta forma se infiere, que la lidocaína no induce efectos inhibitorios sobre el fenómeno de adaptación a la luz (Fig. 13).

- Reversibilidad del efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria.

Se investigaron tres grupos de muestras. El primero se preincubó en la luz en solución E con lidocaína 25 mM por 2 horas, después se eliminó el anestésico, y se realizaron de 4 a 5 lavados con solución nueva de VH, por períodos de 20 minutos cada uno (total 90 minutos), posteriormente se mantuvo en la oscuridad por 90 minutos. En el siguiente grupo, en el cual se estudió la capacidad de adaptación a la oscuridad en ausencia del anestésico, se siguió el mismo protocolo anterior realizando las incubaciones solo en medio de VH. En el tercer grupo o control del efecto del fármaco, se incubaron las muestras en presencia de lidocaína con iluminación por 2 horas para luego ser fijadas.

Al eliminar el anestésico del medio de incubación y mantener a las muestras en solución de VH, se logró que las células fotorreceptoras recuperaran su capacidad de adaptación a la oscuridad, bloqueada originalmente por la droga, mostrando así una buena agregación del pigmento, similar a la que se presentó con los testigos sin anestésico (Fig. 14).

- Papel del pH en la dispersión pigmentaria por lidocaína en la oscuridad.

Se estudiaron los efectos de lidocaína a dos valores de pH, 7.4 y 8.0. Primero se adaptaron las muestras a la oscuridad en soluciones de VH amortiguadas a los respectivos pH's. Posteriormente se exponen a la lidocaína 25 mM en VH continuando a los pH iniciales y se desarrolla una cinética de efecto a diferentes tiempos de exposición de 30, 60 y 150 minutos. Finalmente se fijan las muestras. Para cada tiempo de exposición al fármaco, se evaluaron controles de pH sin el anestésico.

Al estudiar el efecto de lidocaína (25 mM) a diferentes valores de pH, se encontró una respuesta dispersante del pigmento en la oscuridad que no difirió significativamente

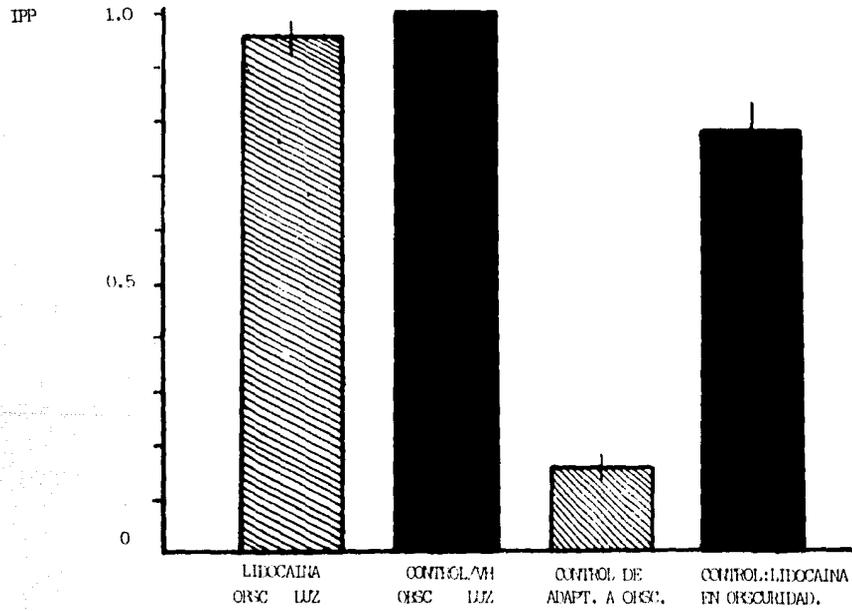


Fig. 13. Efecto de lidocaína en la adaptación a la luz. La incubación de los tallos con lidocaína (25 mg/2 hrs) en la oscuridad y exposición a la luz, no inhibió la dispersión del pigmento, presentando una respuesta equivalente al control. Número de muestras por columna 6. Las barras representan la desviación std.

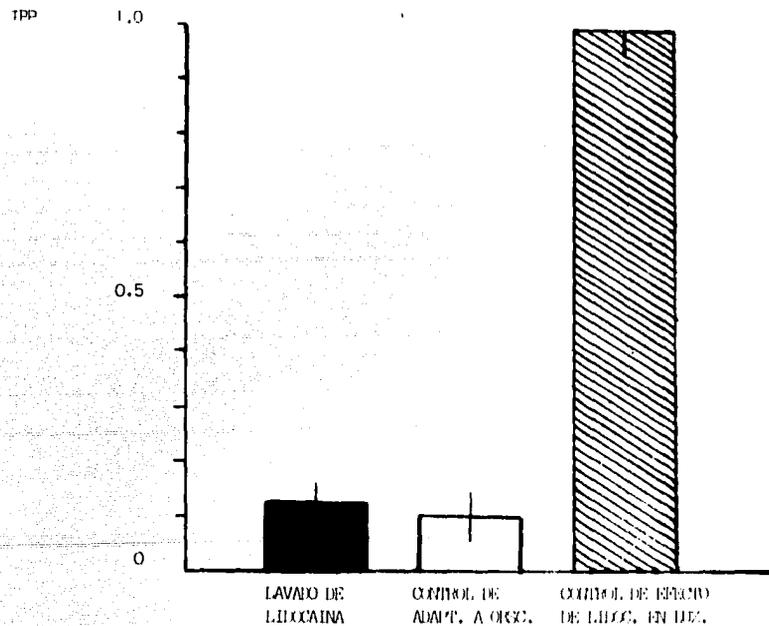


Fig. 14, Reversibilidad del efecto de Lidocaína sobre la migración pigmentaria en la oscuridad. Al eliminarse la lidocaína del medio de incubación mediante lavados exhaustivos, se logró recuperar la respuesta normal de las células a las condiciones de adaptación a la oscuridad. (tallos oculares). Las barras verticales son los valores de desviación standard.

en los comportamientos cinéticos entre sí como se puede determinar de la Fig. 15.

2. Mecanismo del efecto de lidocaína en la migración pigmentaria.

- Efecto de lidocaína bajo condiciones favorables a la adaptación a la oscuridad por ausencia de sodio.

Considerando la importancia que se le ha atribuido al ión Na^+ sobre los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad en los fotorreceptores retinales de langostino de río (32), se planteó como objetivo, investigar el papel que este ión cumple en el efecto inhibido de la migración pigmentaria por lidocaína en estas células.

Se estudiaron 4 grupos de muestras. El primero se mantuvo bajo condiciones de adaptación a la oscuridad por 90 minutos en una solución de VH en la que el ión Na^+ fué eliminado sustituyéndose por cloruro de colina a una concentración isotónica, después se cambió a medio de lidocaína 25 mM en solución de VH sin Na^+ y se incubó por un tiempo de 2 horas en ausencia de luz para ser fijado finalmente. El segundo grupo o control de la migración del pigmento bajo las condiciones de experimentación, se adaptó a la oscuridad en solución de VH sin Na^+ por 90 minutos, al término del cual se renovó tanto el VH sin Na^+ como la atmósfera de oxígeno, manteniéndose en estas condiciones por 2 horas adicionales antes de su fijación. El tercer grupo o testigo del efecto de lidocaína en VH normal en la oscuridad, se incubó bajo las condiciones requeridas para su adaptación a la oscuridad, después se expuso a un medio de lidocaína 25 mM en VH normal por 2 horas y se fijó. El cuarto grupo de muestras testigo de la agregación del pigmento, se adaptó a la oscuridad en VH normal por 3.5 horas, renovándose el medio salino en los primeros 90 minutos de incubación, fijándose después la posición del pigmento.

Se siguieron 2 cámaras adicionales en las que se estudió el efecto del fármaco en una solución de sacarosa isotónica (300 mM), siguiendo protocolos similares a los anteriores, es decir, se adaptaron las muestras a la oscuridad en la solución de sacarosa (amortiguada a pH 7.4) y posteriormente se expusieron al anestésico en la misma solución por 2 horas.

Al mantener las células en presencia de lidocaína, pero en ausencia de Na^+ extracelular ya sea en la solución de VH o en la solución de sacarosa isotónica, no se presentó el efecto dispersante del pigmento en la oscuridad, por el contrario, la masa pigmentaria se agregó

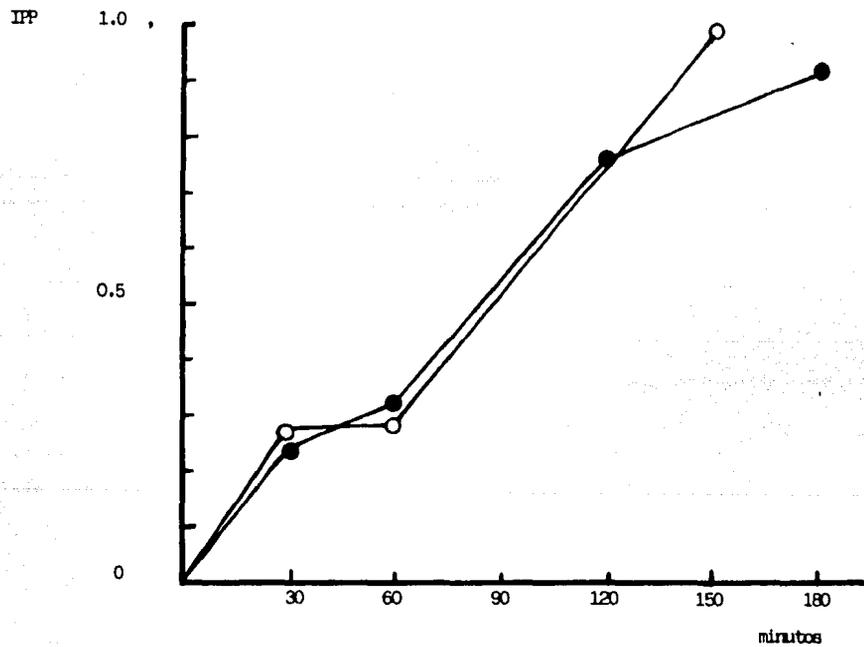


Fig. 15. Cinética del efecto de lidocaína (25 mM) en la oscuridad. A pH 7.4 (o-o) y a pH 8.0 (●-●). La variación del pH no modificó significativamente la potencia del anestésico sobre la migración pigmentaria, en tallos oculares.

totalmente por debajo de la membrana basal con un IPP=0, comportándose similarmente a los controles de Na^+ sin anestésico (Fig. 16 y Fig. 17). De esta forma, la presencia de este ión parece ser indispensable para que el efecto del anestésico se manifieste sobre estas células.

- Efecto de lidocaína bajo condiciones estabilizantes de membrana.

Considerando los antecedentes del efecto promotor de la adaptación a la oscuridad por los iones Ca^{++} y Co^{++} debido a una aparente función estabilizante de membrana, se propuso de terminar el efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria en la oscuridad en presencia de ambos iones (6,35,87).

a. En presencia de Ca^{++} extracelular elevado.

Se estudiaron tres grupos de ojos. En el primero se incubaron las muestras para adaptación a la oscuridad en un VH con Ca^{++} elevado (150 mM) (32), posteriormente se expusieron a lidocaína 25 mM en VH con Ca^{++} elevado por 2 horas, luego se fijaron las muestras. En el segundo grupo, testigo de la adaptación a la oscuridad, se incubó en ausencia de luz en VH con Ca^{++} elevado por 3½ horas con un recambio de medio y oxígeno en los primeros 90 minutos de incubación. En el último sistema, se siguió un protocolo idéntico al planteado para el estudio de lidocaína en oscuridad en VH normal.

b. En presencia de Co^{++} .

Se utilizó cloruro de cobalto (CoCl_2) a la concentración a la que se ha observado un efecto promotor de la agregación del pigmento proximal en las células retinulares de esta especie animal, y que fue de 15 mM.

Se investigaron tres sistemas. En el primero se adaptaron las células a la oscuridad en VH con Co^{++} 15 mM por 90 minutos, posteriormente se mantuvieron en una solución de lidocaína 25 mM mas Co^{++} 15 mM por 2 horas en oscuridad. El segundo sistema, testigo del efecto de Co^{++} , se incubó por 3½ horas en VH en presencia de este catión (15 mM), se renovó el medio en los primeros 90 minutos, para por último ser fijadas. En el tercero, testigo del efecto de lidocaína bajo oscuridad en VH normal, se siguió el protocolo ya conocido.

Al estudiar el efecto de lidocaína 25 mM en los fotorreceptores retinales previamente adaptados a la oscuridad, pero en presencia de dos cationes a los que se les han atribuido características estabilizantes de la membrana, como son el Ca^{++} y el Co^{++} , no se encontró efecto del anestésico sobre la posición del pigmento, obteniéndose en su lugar una muy buena adapta-

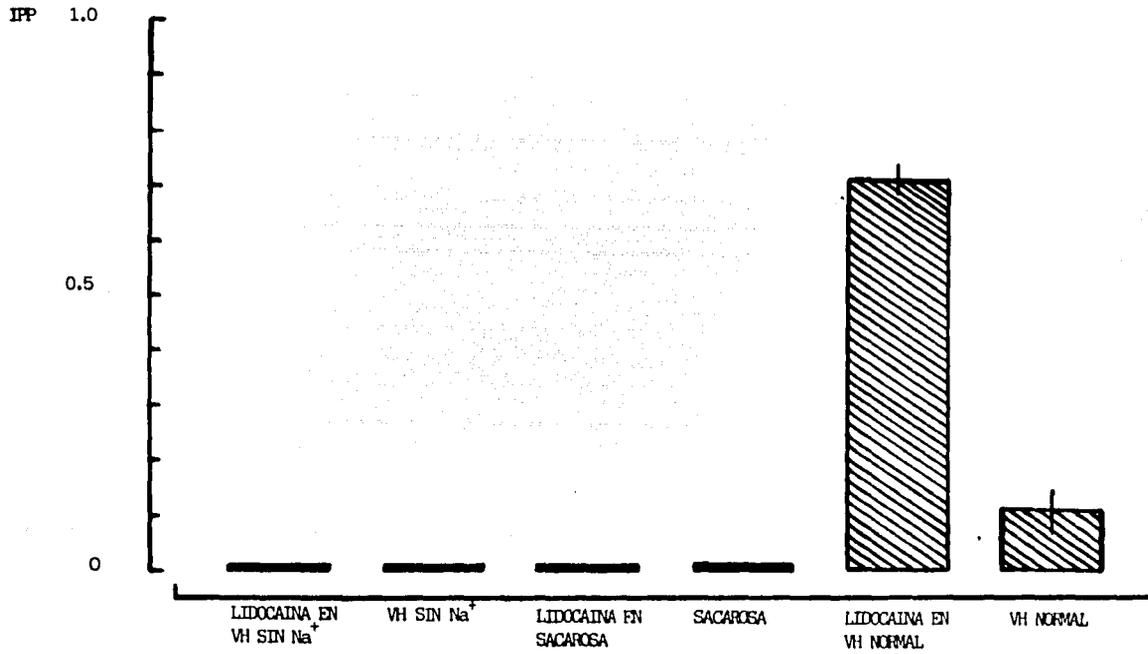


Fig. 16 Efecto de lidocaína (25 mM) sobre la migración pigmentaria en la oscuridad en ausencia de Na⁺. La eliminación del Na⁺ extracelular, inhibió el efecto dispersor del pigmento por el anestésico en la oscuridad, en retinas aisladas de langostino de río. Las barras representan la desviación estándar.

OBSCURIDAD CON XILOCAINA 25mM



CON SODIO



SIN SODIO

Fig. 17 Cortes longitudinales de retinas aisladas de langostino de río mostrando el efecto de lidocaína sobre el proceso de adaptación a la oscuridad, en presencia y ausencia de sodio. Al eliminar el sodio extracelular no se manifestó el fenómeno dispensor. Aumento 14 x .

ción a la oscuridad, idéntica a la observada con los controles del efecto de Ca^{++} y Co^{++} en ausencia del fármaco (Fig. 18).

A partir de estos resultados se infiere una acción protectora a las células por ambos iones bloqueándose el efecto dispersante de la lidocaína en la oscuridad, aún incluso en presencia del Na^{+} , el cual estuvo en el medio de incubación.

B. Epitelio pigmentario retinal de rana (EPR).

1. Migración pigmentaria en el epitelio pigmentario retinal de rana.

- Caracterización de la migración pigmentaria en los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad in vivo.

a) Adaptación a la oscuridad.

Se mantuvieron las ranas íntegras en jaulas con agua por toda la noche en un cuarto oscuro, al día siguiente y por la mañana se sacrificaron los animales por decapitación y se realizó la disección en la oscuridad, con ayuda de una luz roja de seguridad, posteriormente se fijó el tejido y se sometió al tratamiento respectivo para microscopía.

b) Adaptación a la luz.

Los animales traídos de los estanques exteriores, se sometieron por 60 minutos a iluminación con luz brillante a fin de asegurar una total adaptación, se sacrificaron y se fijaron preparándose adecuadamente las muestras.

La inspección de las copas oculares obtenidas de animales completos mantenidos bajo diferentes condiciones de iluminación, revelaron diversas características. El EPR se observó como la capa celular más externa de la retina, encontrándose en íntimo contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales semejan estructuras en forma de bastón dispuestas ordenadamente. Arriba de estos se encontraron los segmentos internos, la membrana limitante externa y la zona nuclear externa entre otras.

Las células del EPR mostraron en su citoplasma, densas masas de gránulos de pigmento de un color oscuro; estos presentaban distribuciones que dependieron de las condiciones de iluminación a las que fueron sometidas.

De esta forma, en el estado de adaptación a la luz, el pigmento se encontró disperso en

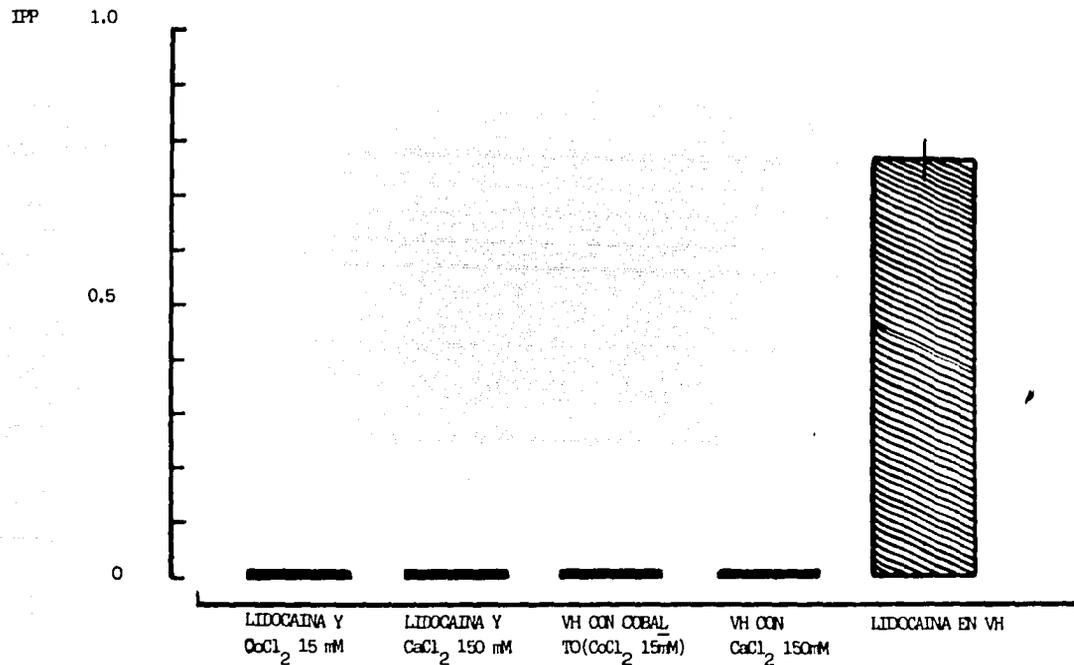


Fig. 18 Efecto de lidocaína (25 mM) en la oscuridad bajo condiciones estabilizantes de la membrana. La incubación de las retinas con CaCl_2 (150 mM) y con CoCl_2 (15 mM) inhibió el efecto dispersor del pigmento en la oscuridad por el anestésico, en retinas aisladas de langostino de río.

todas las células abarcando desde la porción basal hasta las prolongaciones citoplásmicas apicales. En este estado el pigmento alcanzó la zona correspondiente a los segmentos internos de los fotorreceptores, formando una pantalla oscura en esta zona retinal (Fig. 19).

En el caso de los animales adaptados a la oscuridad (Fig. 20), la masa pigmentaria se agregó a nivel basal del epitelio pigmentario, permaneciendo los espacios entre los fotorreceptores casi totalmente libres de gránulos de pigmento.

Ambas distribuciones pigmentarias expresadas como Índice de Pigmento se muestran en la Figura 22.

- Caracterización de la migración pigmentaria en los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad in vitro.

Se utilizaron para este estudio, retinas aisladas que fueron incubadas en frascos que contenían la solución Ringer con O_2 a $17^{\circ}C$ bajo diferentes condiciones de iluminación.

En el estado de adaptación a la oscuridad, las copas oculares se incubaron por 3 horas en un cuarto oscuro con periodos intermedios de agitación cada 20 minutos, realizándose finalmente la fijación con glutaraldehído.

Para la adaptación a la luz, las muestras fueron expuestas a iluminación brillante por 1 hora previa a la fijación.

Los tiempos de incubación empleados en ambas condiciones de iluminación, se definieron como los óptimos después de evaluar el fenómeno migratorio a diferentes periodos.

Por medio de diferentes pruebas se determinaron las condiciones fisiológicas de incubación in vitro que permitieron obtener las distribuciones pigmentarias respectivas a los diferentes estados de adaptación, tales como temperatura de incubación, oxigenación, pH y contenido iónico de la solución Ringer utilizada, así como la manipulación de las muestras aisladas y el protocolo de preparación de estas para su observación al microscopio óptico.

Los resultados obtenidos en estas muestras, presentaron un comportamiento migratorio análogo al manifestado in vivo. En ambos estados de adaptación, las características morfológicas de la retina, se mantuvieron idénticas a las observadas en el animal íntegro.

En el caso de las retinas adaptadas a la luz, se encontró la dispersión del pigmento desde las porciones basales de las células epiteliales, hasta los segmentos internos de los

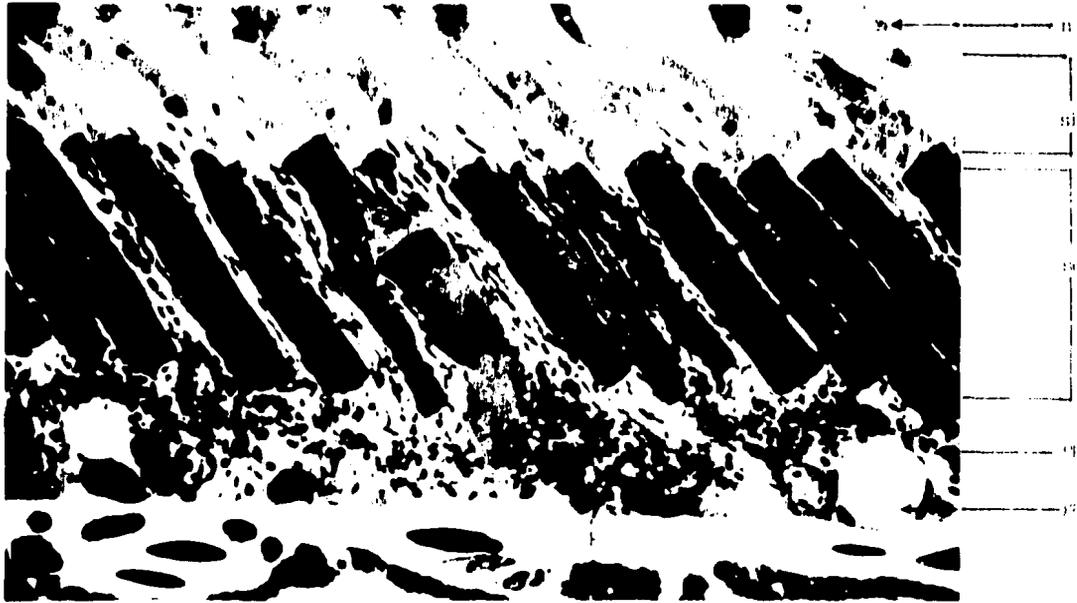


Fig. 14 Epitelio pigmentario y retina distal de una copa ocular fijada después de la decapitación de un animal adaptado a la luz. La micrografía de luz muestra a los gránulos de pigmento de melanina (p) dispersos desde el epitelio pigmentario (ep) llenando los espacios entre los segmentos externos de los fotorreceptores (se) hasta los segmentos internos (si). n, núcleos celulares; ga, gotas de aceite. Aumento 1250 x.



Fig. 20. Epitelio pigmentario y retina distal de un corvo ocular fijada despues de la decapitacion de un animal adaptado a la obscuridad por toda la noche. La micrografia muestra gránulos de melanina (p) concentrados en el borde apical del epitelio pigmentario (ep) rodeando algo de los segmentos externos de los bastones. Los segmentos internos de los fotorreceptores están libres de pigmento. Aumento 1250 x.

fotorreceptores, alcanzándose incluso la zona de la membrana limitante externa, con una extensión mayor a la observada en el animal íntegro (Fig. 21).

Por otro lado, en las condiciones de adaptación a la obscuridad, el pigmento se agregó totalmente a nivel basal de estas células, quedando los espacios entre los fotorreceptores completamente libres de gránulos de pigmento (Fig. 22). La cuantificación de estas distribuciones pigmentarias se muestra en la figura 23.

Comparando las distribuciones pigmentarias in vivo e in vitro, se observó que el movimiento de los gránulos, independientemente de los estados de adaptación, es más completo en las preparaciones aisladas (Fig. 23). La manipulación de las retinas in vitro, permitió producir los comportamientos migratorios que se presentan en el animal íntegro, lo cual justifica su elección como un modelo celular útil en el estudio de la migración intracelular de organelos.

2. Efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria en el EPR in vitro.

- Efecto inhibitorio de la adaptación a la obscuridad por lidocaína.

Se investigaron dos condiciones. En la primera, se mantuvieron las copas oculares en presencia de lidocaína 5 mM en Ringer (Sol. N) y en la obscuridad por un tiempo de 3 horas fijándose finalmente. En la segunda, se incubaron las muestras en Ringer por 3 horas a 17°C en ausencia de luz. La concentración de 5 mM del anestésico, se utilizó, ya que al evaluar distintas cantidades de 19, 25 y 5 mM del fármaco, fue esta última, la única que no causó destrucción a las células, no lesionando su funcionalidad.

Analizando la respuesta migratoria, se observó que el anestésico produjo una inhibición de la agregación en la obscuridad, manteniéndose el pigmento casi completamente disperso, simulando así la presencia de la luz. Adicionalmente se observaron algunas alteraciones morfológicas tales como deformaciones en la membrana de los bastones y una alteración de la estructura normal de las células del epitelio pigmentario. (fig. 24). Este tipo de respuestas difirieron con las presentadas por las muestras testigo, en donde no solo se mantuvo la integridad retinal, sino que se manifestó el proceso migratorio normal (Fig. 25).

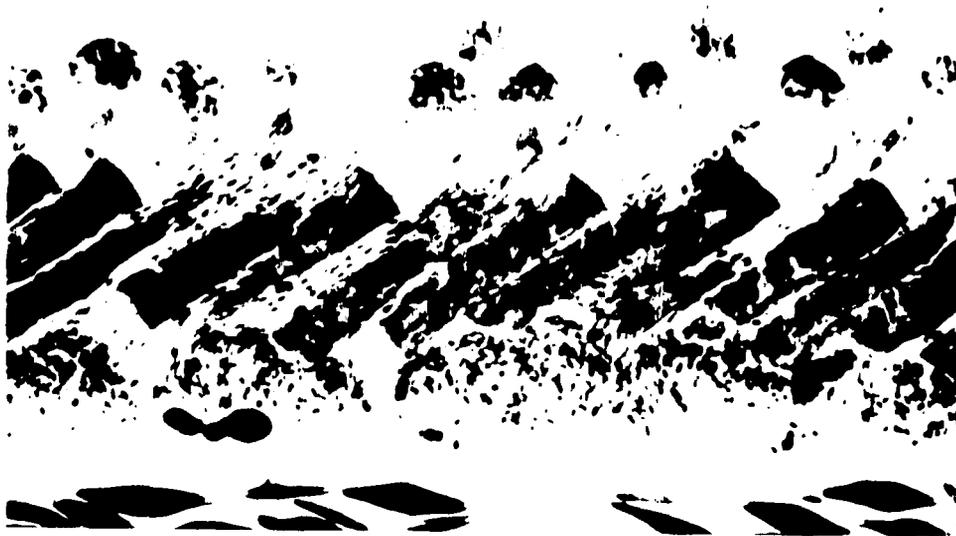


Fig. 21. Epitelio pigmentario y retina distal de una copa ocular incubada in vitro bajo condiciones fisiológicas de adaptación a la luz. La micrografía muestra un comportamiento idéntico al observado en el sistema in vivo en donde se presenta una dispersión que alcanza la membrana limitante externa. micrografía en microscopía óptica, aumento 1250 x .



Fig. 24. Distribución pigmentaria y retina distal de un ojo ocular inoebada in vitro bajo condiciones de adaptación a la oscuridad. Se puede observar que los gránulos de pigmento se concentran a nivel del cuerpo celular del epitelio pigmentario quedando las prolongaciones libres de gránulos. La integridad morfofuncional de este tejido se mantiene aún en el órgano aislado. Aumento 1250 x.

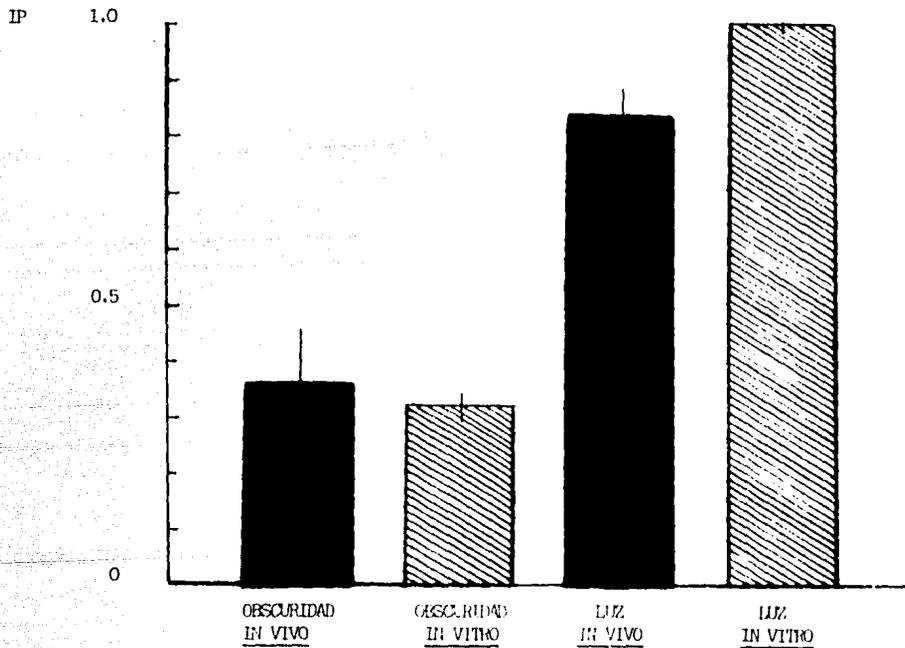


Fig. 23 Gráfica comparativa de las distribuciones pigmentarias bajo condiciones de adaptación a la luz y a la oscuridad In vivo e in vitro (EAG)

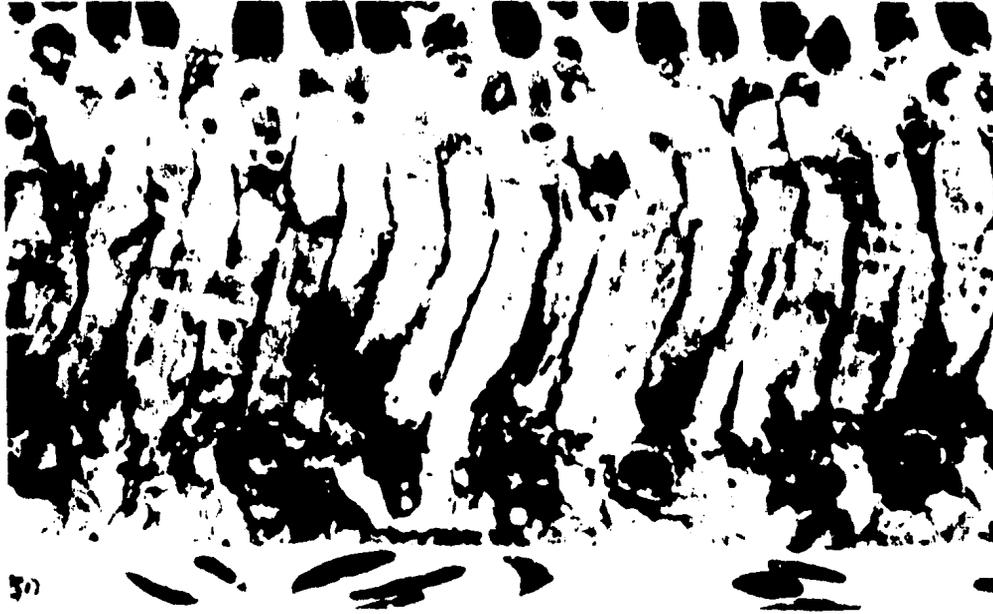


Fig. 41 Corte transversal de retina de rata mostrando el efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad por lidocaína 5 μ M. Se observa el pigmento disperso entre los fotorreceptores así como alteraciones en la forma de las células del epitelio pigmentario y de los segmentos externos de los bastones. Aumento 1250 x.

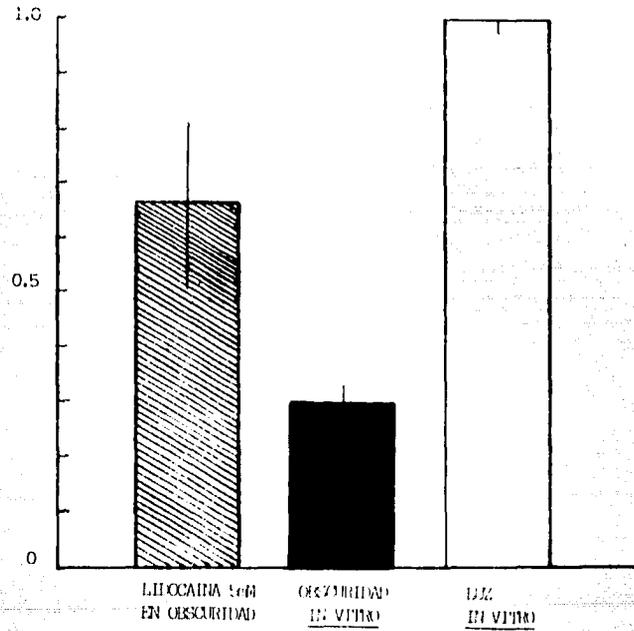


Fig. 25 Efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad por lidocaína. La presencia del anestésico inhibió la agregación pigmentaria con una respuesta de dispersión similar a la que se presenta en la luz. Células del epitelio pigmentario retinal. barra, desviación std.

- Efecto de lidocaína sobre las células pigmentarias en la oscuridad,

El protocolo que se desarrolló consistió por un lado, en incubar las copas oculares en Ringer en oscuridad por 3 horas, cambiándose posteriormente a una solución de lidocaína 5 mM e incubándose por 2 horas más hasta su fijación. Paralelamente, las muestras testigo se incubaron en Ringer en ausencia de luz por 5 horas renovándose el medio y la atmósfera de O_2 después de las 3 primeras horas.

Los resultados obtenidos mostraron una dispersión de los gránulos de pigmento, alcanzándose niveles dentro de las prolongaciones citoplásmicas, diferentes a los presentados por las muestras testigo (Fig. 26). De nuevo se encontraron las alteraciones morfológicas antes mencionadas.

- Reversibilidad del efecto de lidocaína sobre la migración pigmentaria.

Para poder discernir entre una acción tóxica y una farmacológica por el anestésico sobre el transporte intracelular en este sistema, se realizaron las siguientes condiciones. En la primera, se preincubaron las muestras en la oscuridad con lidocaína 5 mM (Sol N) por 2 horas, posteriormente se retiró el fármaco del medio y se cambiaron a Ringer por 3 horas, realizándose varios lavados durante las primeras 1.5 horas con oxigenación y cambios de solución cada 20 minutos, para dejarlas otras 1.5 horas en un solo medio en la oscuridad, como paso previo a la fijación. En el sistema testigo de viabilidad, las copas oculares se mantuvieron en Ringer siguiendo los mismos pasos de lavado presentados con el sistema anterior pero en ausencia del anestésico. El tercer sistema testigo del efecto de lidocaína, se incubaron las células con el fármaco en la oscuridad (2 horas).

Como un estudio complementario, se estudió la reversibilidad del efecto de lidocaína.

Los resultados indicaron que aquellas muestras en las que se lavó el anestésico, presentaron una completa recuperación en la funcionalidad migratoria, encontrándose una adaptación a la oscuridad tan evidente como la presentada por los testigos. Sin embargo los cambios morfológicos se mantuvieron, no revirtiendo a sus características normales.

- Efecto de lidocaína sobre el estado de adaptación a la luz.

Se estudiaron 4 grupos de retinas, dos de ellos se sometieron a luz brillante en Ringer por 1 hora/ $17^{\circ}C/O_2$, posteriormente una de estas muestras se incubó en Ringer con lidocaína

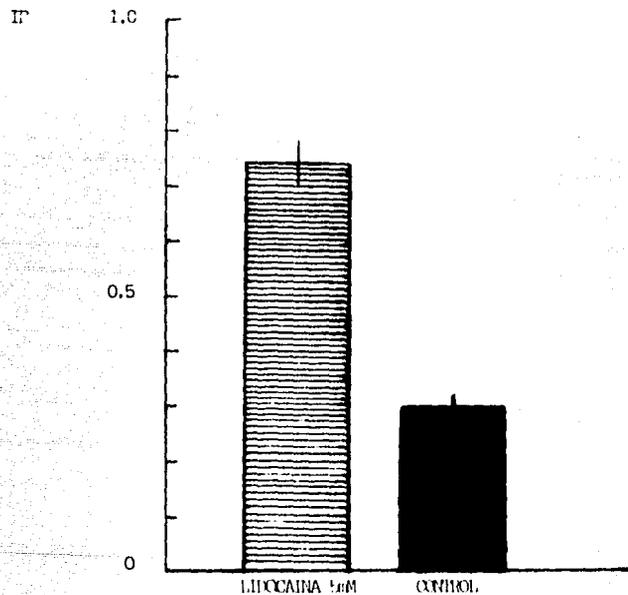


Fig. 26 Efecto de lidocaina sobre células del epitelio pigmentario retinal adaptadas a la oscuridad. La incubación del fármaco en la oscuridad en células cuyo pigmento inicialmente se encontraba agregado, produjo su dispersión simulando la presencia de la luz.

(Sol N) por dos horas y se fijó. La otra muestra solo se cambió a un nuevo Ringer y se incubó el mismo tiempo. Los otros dos grupos se incubaron en la oscuridad en Ringer, uno con anestésico y el otro sin él, por dos horas a 17°C. Posteriormente se pasaron a la luz por 1 hora y se fijó la posición del pigmento.

Bajo estas condiciones, no se observó ninguna alteración en el proceso adaptativo ya que se presentó una dispersión del pigmento total, idéntica a la observada en los respectivos testigos; sin embargo, las muestras incubadas con el anestésico, siguieron presentando los cambios morfológicos ya descritos.

3. Investigación del mecanismo de acción de lidocaína en la migración pigmentaria.

Las metodologías que se desarrollaron en este apartado, se plantearon en torno a 2 objetivos, el primero acerca del mecanismo de acción de la lidocaína, y el segundo con respecto a la determinación de los eventos regulatorios que intervienen en el fenómeno de la migración pigmentaria bajo condiciones fisiológicas.

Para estudiar el primer punto, se siguieron estrategias similares a las planteadas en las células retinales del langostino de río, es decir :

- Efecto del anestésico en ausencia de Na^+
- Efecto de lidocaína en presencia de Ca^{++} elevado y Co^{++} (6, 35, 87).

De manera simultánea se desarrollaron testigos sin anestésico que proporcionaron información acerca de las características iónicas de este epitelio en la migración pigmentaria.

Por otro lado se hizo un estudio farmacológico con el fin de profundizar sobre los mecanismos fisiológicos de regulación del movimiento del pigmento, utilizando diversos agentes de acción conocida como la cafeína, la ouabaína y el ionóforo A-23187 (17, 36, 60, 70).

- Efecto de lidocaína en la adaptación a la oscuridad en ausencia de Na^+

Se estudiaron 3 sistemas. En el primero, se incubaron las copas oculares en presencia de lidocaína 5 mM sin Na^+ (Sol O) en la oscuridad por 3 horas a 17°C. En el segundo sistema testigo de la migración en ausencia de Na^+ , se incubaron las muestras en Ringer sin Na^+ (Sol C) manteniéndose la tonicidad con cloruro de colina, por 3 horas en la oscuridad. En el último grupo (testigo del efecto del anestésico), se expusieron las muestras al anestésico por 3 horas en la oscuridad.

Al eliminarse el Na^+ de la solución Ringer de lidocaína, no se presentó el efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad, presentándose por el contrario una buena adaptación con la agregación total del pigmento (Fig. 27). Los resultados obtenidos con los testigos respectivos, evidenciaron la importancia del ión Na^+ en la manifestación del efecto de este fármaco.

Las retinas que se incubaron en la solución sin Na^+ (Sol. C), presentaron una marcada agregación que difirió solo cualitativamente de las muestras mantenidas en el Ringer normal (Fig. 28). Parece ser que este ión no solo interviene en la acción de la lidocaína, sino parece jugar un papel más importante dentro de los eventos regulatorios del transporte de gránulos pigmentarios.

- Efecto de lidocaína en presencia de Ca^{++} elevado (5 veces) y en presencia de Co^{++} .

Se estudiaron 4 grupos. En los dos primeros se incubaron las muestras en lidocaína 5 mM (Sol. N), en uno se adicionó Ca^{++} 9 mM (Sol. P) y en otro Co^{++} 15 mM (Sol. Q). Se mantuvieron en la oscuridad por 3 horas, fijándose finalmente las muestras. Los otros dos grupos se incubaron bajo las mismas condiciones de los iones Ca^{++} y Co^{++} e iluminación, pero en ausencia de lidocaína.

Los resultados obtenidos con cualquiera de los dos iones, fueron el de una inhibición del efecto de lidocaína sobre la migración. Por otro lado, la incubación de las muestras con Ca^{++} elevado ó con Co^{++} en ausencia del anestésico, produjo una agregación del pigmento similar a la observada en el Ringer sin Na^+ (Fig. 29).

- Caracterización farmacológica e iónica de la migración pigmentaria.

Una vez definidas las características iónicas relacionadas con el efecto de la lidocaína sobre estas células, se procedió a estudiar los diversos elementos involucrados en el mecanismo(s) regulatorio de la migración bajo condiciones fisiológicas, centrando nuestra atención sobre los iones Na^+ y Ca^{++} .

a. Efecto de Na^+ elevado (1.5 veces) en la adaptación a la oscuridad.

Se estudiaron 2 cámaras, en una se incubaron las muestras en un Ringer cuya concentración del ión Na^+ estaba elevada 1.5 veces (Sol. E) en la oscuridad por 3 horas. En la otra, las muestras se mantuvieron en un Ringer fisiológico pero en el que se aumentó la tonicidad

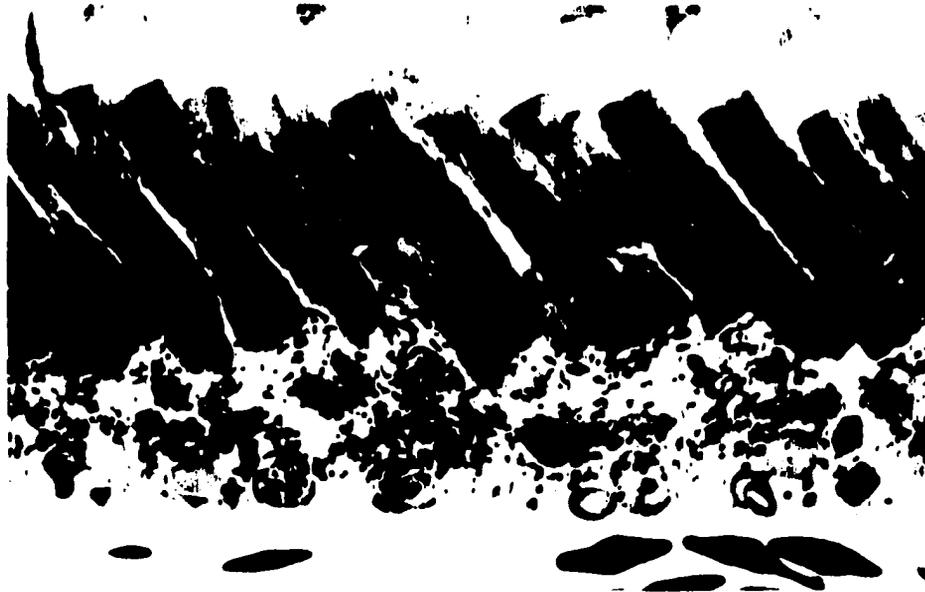


Fig. 24 Corte transversal de retina de rana vista al microscopio de luz, mostrando un bloqueo del efecto inhibitor de la adaptación a la oscuridad por lidocaina, al eliminarse el Na^+ del medio. Similamente, no se presentan las alteraciones morfológicas de los bastones características del efecto de la droga en solución Ringer. Aumento 1250 x.

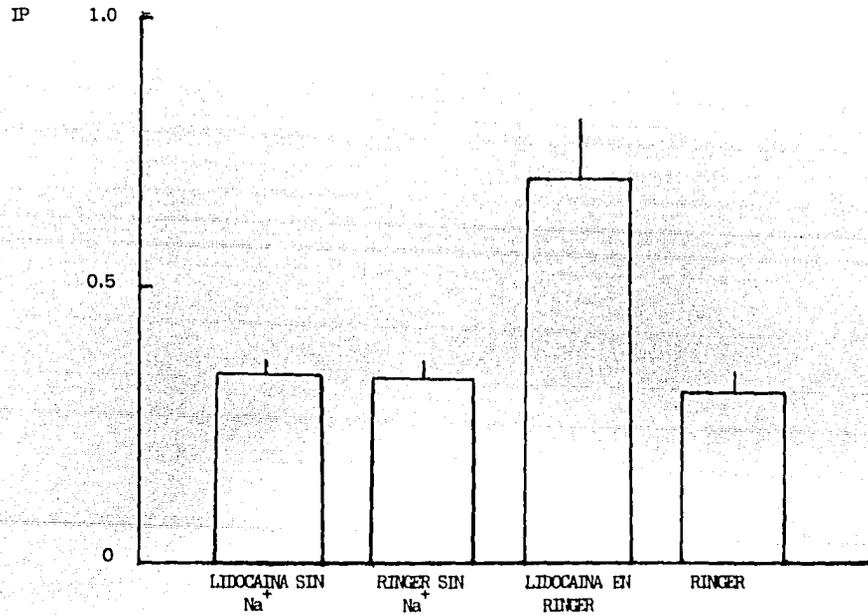


Fig. 28 Efecto de lidocaína en la adaptación a la oscuridad en ausencia de Na⁺. La eliminación del Na⁺ extracelular (medio de incubación), bloqueó el efecto inhibitorio de la agregación pigmentaria por lidocaína. La ausencia de este ión en el Ringer "per se" estimuló la agregación pigmentaria en estas células del EPR. Las barras representan la desviación estándar.

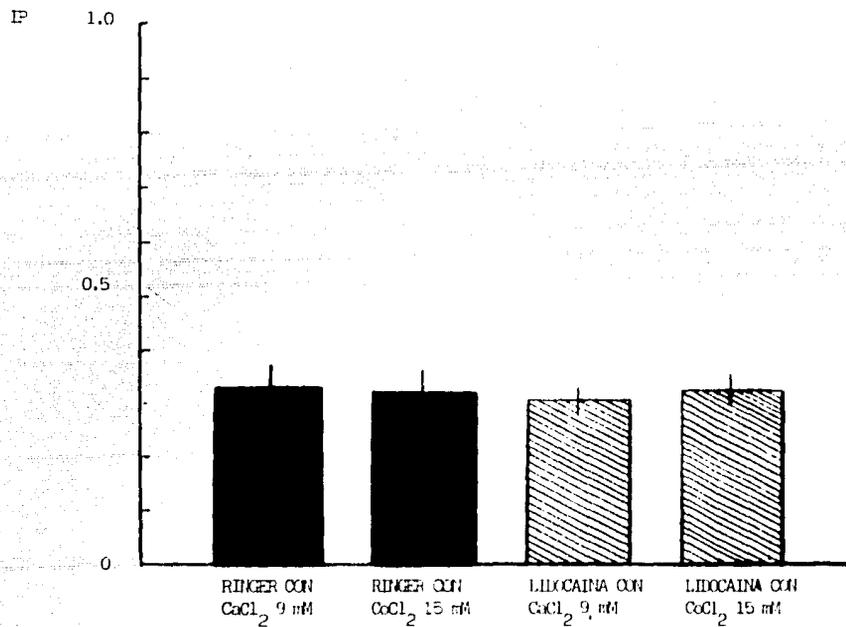


Fig. 29 Efecto de lidocaína en presencia de Ca^{++} elevado y en presencia de Co^{++} . La presencia de ambos iones, bloqueó el efecto del anestésico sobre el proceso de adaptación a la oscuridad en las células del EPR. Las barras representan la desviación estándar.

al mismo nivel del sistema anterior, adicionando cloruro de colina (Sol. F). Al finalizar estos tiempos se fijaron las muestras.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones, mostraron una marcada inhibición de la agregación al aumentar el Na^+ , manteniendo el pigmento disperso (Fig.30), presentandose a la vez, alteraciones en las estructuras fotorreceptoras similares a las encontradas en presencia de lidocaína. Por otro lado la adaptación a la oscuridad de las muestras testigos en las que se ajustó la osmolaridad con cloruro de colina, demostraron que la inhibición de la adaptación a la oscuridad no fue el resultado de variaciones en osmolaridad, por lo menos en este intervalo , sino por la presencia del ión Na^+ (Fig.31).

b. Efecto de la ausencia de Ca^{++} en la adaptación a la oscuridad.

Se investigaron 2 grupos. Uno de ellos se sometió a las condiciones de adaptación a la oscuridad en un Ringer sin Ca^{++} por 3 horas. El segundo grupo se mantuvo en un Ringer fisiológico bajo idénticas condiciones de incubación.

En el caso de la solución Ringer sin Ca^{++} (Sol B), no fue necesario equilibrar la osmolaridad del medio , el protocolo se basó en el realizado por otros investigadores (77).

Al realizar este tipo de estrategias, se obtuvo una marcada inhibición de la agregación, con una dispersión del pigmento (Fig. 31) y alteración en la morfología de los fotorreceptores.

c. Efecto de la ausencia de Ca^{++} y Na^+ en la adaptación a la oscuridad.

De los anteriores resultados, se puede observar que los efectos que se producen al eliminar el Na^+ o el Ca^{++} del medio extracelular son antagonistas entre sí, ya que mientras que en el primer caso se ve favorecida la agregación pigmentaria, en el segundo se inhibe dicho proceso. Ante esto se evaluó el comportamiento migratorio en ausencia simultánea de ambos iones.

Se analizaron 3 condiciones. En la primera se mantuvieron las copas oculares en un Ringer sin Ca^{++} y sin Na^+ con osmolaridad ajustada con cloruro de colina en la oscuridad por 3 horas. En la segunda, las células estuvieron en Ringer sin Ca^{++} (Sol.B). En la última, las muestras permanecieron en un Ringer sin Na^+ (Sol C) bajo las mismas condiciones de incubación de los 2 sistemas anteriores.



Fig. 30 La incubación de las retinas aisladas en solución Ringer con Na^+ elevado y en la obscuridad inhibió completamente la agregación del pigmento, observándose también una alteración morfológica de los fotorreceptores. Aumento 1250 x .

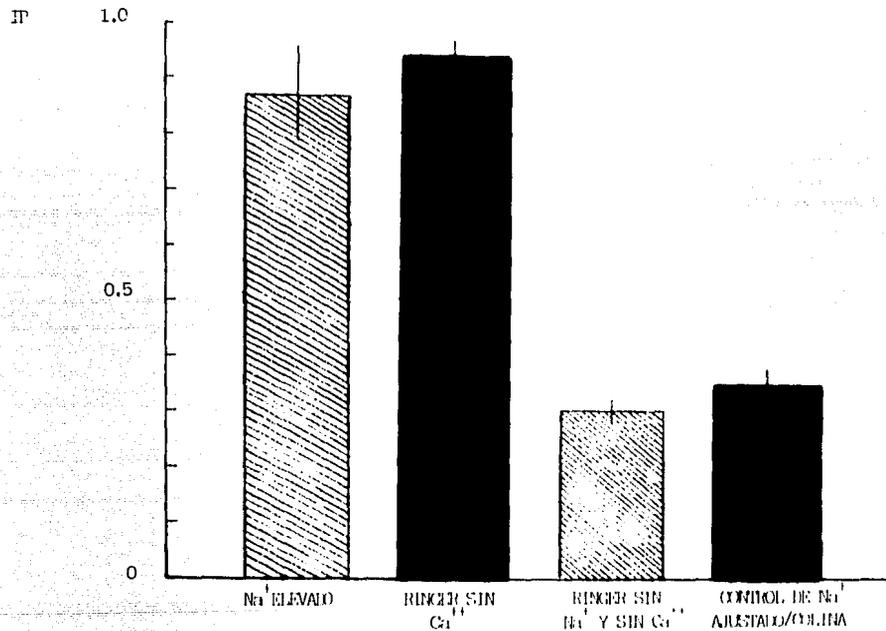


Fig. 31. Papel del Na⁺ y del Ca⁺⁺ en la migración pigmentaria en la oscuridad. Esta gráfica muestra la migración pigmentaria en presencia de diferentes condiciones de incubación como parte del estudio del mecanismo de regulación de estos movimientos pigmentarios.

Los resultados obtenidos mostraron, que la ausencia de ambos iones en el medio, induce a una buena agregación del pigmento anulándose el efecto inhibitorio antes reportado para la ausencia de Ca^{++} , es decir, la facilitación a la adaptación a la oscuridad proporcionada por la ausencia de Na^+ predominó sobre la respuesta esperada para una ausencia de Ca^{++} (Fig. 31).

d. Efecto de ouabaína 0.1 y 0.5 mM en la adaptación a la oscuridad.

Para investigar si el incremento en la actividad de Na^+ citoplásmica está relacionada con la distribución pigmentaria en estas células, se utilizó la ouabaína, una sustancia cuyo efecto inhibitorio de la actividad de la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ ha sido bien caracterizado y definido (61).

Se siguieron 2 condiciones. En una se incubaron las células en un Ringer con ouabaína 0.1 ó 0.5 mM (Sol. I) en la oscuridad por 3 horas. En la segunda condición, se mantuvieron las células en un Ringer fisiológico bajo las mismas condiciones de incubación.

La utilización de estas concentraciones de esta droga, se fundamentó en los estudios realizados sobre langostino de río (33) en donde se emplean estos niveles.

Los resultados obtenidos fueron el de una inhibición de la adaptación a la oscuridad producida por este agente aunado con importantes daños sobre las células del EPR (en la Fig. 32, 33 se muestra esta respuesta expresada como IP). De esto se puede inferir que posiblemente la elevación de la actividad de este ión (Na^+) en el citoplasma, altera de alguna forma los procesos normales que intervienen en la migración pigmentaria, produciendo así el bloqueo de la agregación.

e. Efecto de Ouabaína 0.1 y 0.5 mM en la adaptación a la oscuridad en ausencia de Na^+ .

Se estudiaron 2 grupos. En el primero se incubó en un Ringer con ouabaína (0.1 ó 0.5 mM) en ausencia de Na^+ y en la oscuridad por 3 horas. En el segundo, la ouabaína se encontraba en un Ringer fisiológico, es decir bajo la concentración normal de Na^+ .

Bajo las anteriores condiciones de experimentación, se siguió presentando el efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad, por ahora no podemos explicar este resultado, ya que lo esperado sería un bloqueo de la actividad de la ouabaína al no haber Na^+ en el medio, sin embargo cabe mencionar que el Na^+ presente en el agua es suficiente para inducir



Fig. 32 Micrografía de un corte transversal de retina de rana vista al microscopio óptico mostrando una inhibición de la adaptación a la oscuridad por ouabaína 0,1 mM. La presencia de este agente bloqueó la migración pigmentaria hacia la posición de agregación, permaneciendo el pigmento disperso, produciéndose a la vez marcadas alteraciones morfológicas de los fotorreceptores. Aumento 1250 x.

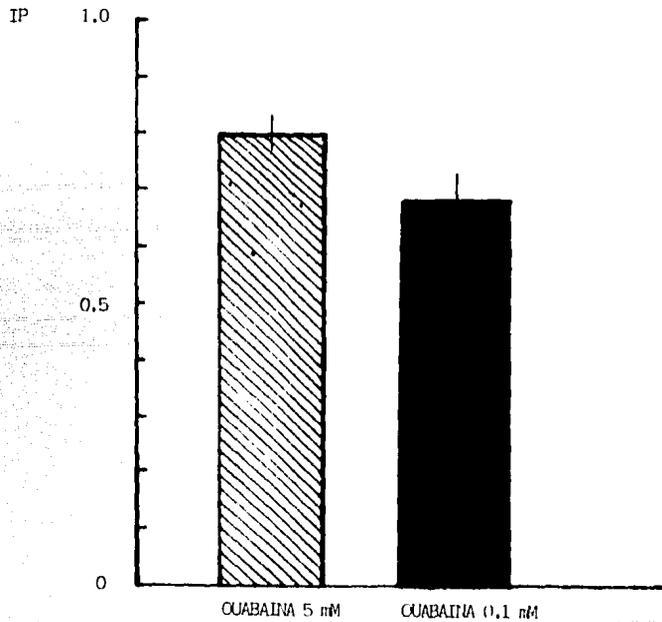


Fig. 33 Efecto de ouabaina en la migración pigmentaria. La incubación de las células del EPR en la oscuridad con ouabaina, inhibió la agregación del pigmento, simulando la presencia de luz. Este comportamiento refleja la importancia del Na^+ en la respuesta migratoria.

el efecto dispersante de ouabaina.

f. Efecto de la temperatura en la adaptación a la oscuridad.

Se ha propuesto que la temperatura presenta importantes consecuencias sobre la estabilidad de las membranas, de esta forma, se ha visto a temperaturas altas y bajas un aumento en la permeabilidad y como consecuencia una inestabilidad de la misma (75).

Se estudiaron dos grupos. Ambos fueron incubados en Ringer fisiológico y en la oscuridad por 3 horas. La única diferencia fue que uno de estos grupos se mantuvo a una temperatura de 10°C y el otro a 25°C.

Bajo cualquiera de las dos condiciones de temperatura, el pigmento se encontró disperso imitando una adaptación a la luz. Esto muy posiblemente indique un cambio en la permeabilidad de la membrana que traiga como resultado esta dispersión. (Fig. 34).

g. Efecto de la cafeína 5 mM en la adaptación a la oscuridad.

Partiendo del antecedente del efecto de cafeína sobre la liberación de Ca^{++} de los reservorios intracelulares (16), se evaluó si el incremento de este catión en el citoplasma de esta células está involucrado en la migración del pigmento tal como se ha propuesto en otros sistemas (9, 10, 33, 73).

Se evaluaron dos conjuntos de muestras. En el primero, las células se incubaron en Ringer con cafeína 5 mM (Sol. K) en la oscuridad por 3 horas. El segundo se incubó bajo las mismas condiciones pero en ausencia de cafeína. La elección de la concentración utilizada se consideró tomando como referencia la usada para lidocaína.

Bajo las condiciones de adaptación a la oscuridad pero en presencia de cafeína, se presentó una dispersión del pigmento llegando incluso a niveles de IP cercanos a 1.0, mientras que el control se adaptó perfectamente a la oscuridad (Fig. 34)

h. Efecto de cafeína 5 mM en Ringer sin Na^+ en la adaptación a la oscuridad.

A partir de la inhibición a la adaptación a la oscuridad producida por cafeína en el protocolo anterior, se requirió determinar si este era el producto de una acción tóxica ó una farmacológica sobre las células del EPR,.

En la estrategia que se siguió, se estudiaron dos sistemas. En uno, las células del

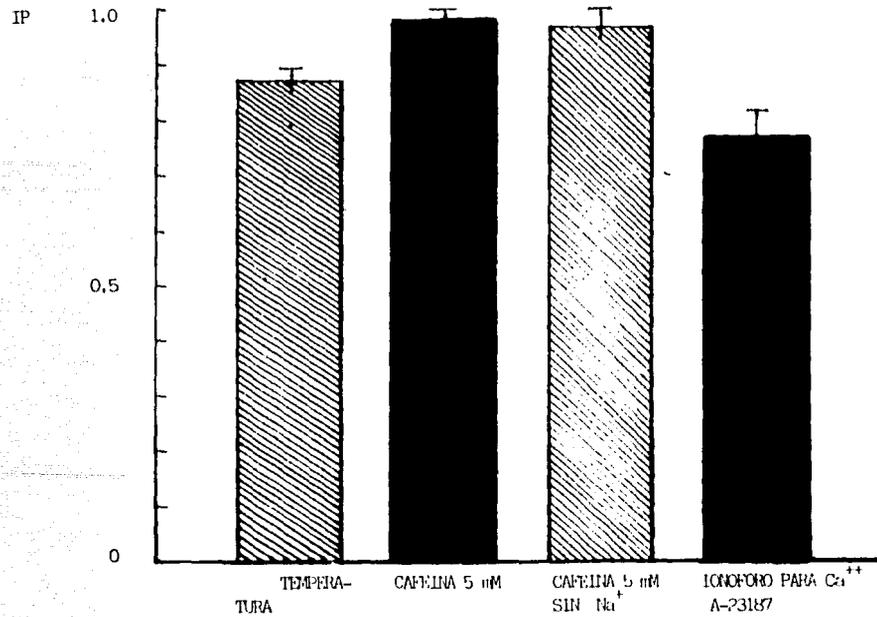


Fig. 34 Investigación farmacológica del fenómeno de migración pigmentaria en células del EPR como parte esencial en la búsqueda del mecanismo de regulación del movimiento pigmentario.

EPR se incubaron en Ringer sin Na^+ con cafeína 5 mM (Sol. L) en la oscuridad por 3 horas. En el otro sistema, se mantuvieron similares condiciones excepto que el Ringer utilizado contenía los niveles fisiológicos de Na^+ .

Independientemente de las condiciones de ausencia ó presencia de Na^+ el efecto de dispersión del pigmento por cafeína se siguió presentando, lo cual indica una acción intracelular por parte de este agente, tal y como se ha reportado (5). (Fig. 34)

i. Efecto del ionóforo A-23187 en la adaptación a la oscuridad.

Una estrategia desarrollada para determinar que la elevación de la actividad intracelular de Ca^{++} en estas células influye en la posición del pigmento, fue mediante el uso del ionóforo para Ca^{++} , A-23187.

Se examinaron dos condiciones. En la primera, las copas oculares se incubaron en un Ringer fisiológico junto con el ionóforo A-23187 (Sol M) a una concentración de 1 mg/ml en la oscuridad hasta su adaptación. La otra condición consistió en incubar las muestras en Ringer normal con etanol al 1% por 3 horas en la oscuridad. El empleo de etanol fue necesario para solubilizar al ionóforo (insoluble en agua) como un primer paso, posteriormente fue incorporado al medio de Ringer.

Los resultados obtenidos con este agente, indicaron que su sola presencia produjo una detención en la respuesta migratoria hacia el estado de adaptación a la oscuridad, distinta a la respuesta mostrada por los testigos sin el ionóforo (Fig. 34). Una observación acerca del pigmento disperso, fue que la pantalla de gránulos no se encontró uniformemente distribuida en todas las células, lo que posiblemente se explica por el grado de liposolubilidad que esta sustancia presente, mostrando así una limitada capacidad de difusión a través del medio de incubación.

VIII. DISCUSION GENERAL .

Los estudios que se realizaron utilizando lidocaína sobre los modelos celulares antes expuestos, han proporcionado información acerca del fenómeno general de transporte intracelular y del mecanismo de acción de este anestésico sobre este proceso cinético.

A. Fotorreceptores retinulares de langostino de río.

Los resultados obtenidos en el primer modelo han demostrado los siguientes aspectos:

1. La lidocaína en un intervalo de concentración de 19 a 50 mM, tuvo un importante efecto inhibitorio sobre el transporte intracelular de los gránulos de pigmento.
2. Esta inhibición se encontró únicamente para el transporte de gránulos hacia la posición de adaptación a la oscuridad.
3. El bloqueo del transporte de los gránulos por el anestésico, depende de la concentración y del tiempo de exposición.
4. La inhibición del transporte es reversible, por lo menos a la concentración de 25 mM y no depende del pH en el intervalo de la escala probada en este trabajo.
5. La inhibición del transporte pigmentario por el anestésico, requiere del ión Na^+ proponiéndose un posible sitio de acción del fármaco sobre la membrana celular.

Las bases para cada una de las anteriores conclusiones son las siguientes :

Las retinas aisladas, presentaron migraciones bidireccionales del pigmento proximal equivalentes a las que se han encontrado en el animal intácto (32, 4). Este tipo de respuestas, son dependientes de las condiciones de iluminación, e incluyeron estados de agregación pigmentaria en la oscuridad y de dispersión en la luz, confirmando a la vez los hallazgos previamente reportados de movimientos retinomotores en órganos aislados (4, 32, 66).

Los resultados que se obtuvieron en presencia de lidocaína, demuestran que cuando se exponen las retinas aisladas a este agente, el transporte intracelular de los gránulos de pigmento se ve inhibido principalmente hacia la posición del estado de adaptación a la oscuridad, lo cual apoya los resultados de inhibición del transporte rápido de proteínas en el axón neural reportado por otros investigadores (2, 15, 57), proporcionando así evidencias de una posible acción bloqueadora general sobre los fenómenos intracelulares de transporte.

Las concentraciones en las que se encontró la inhibición del movimiento pigmentario

en este modelo fueron de 19, 25 y 50 mM utilizándose la de 25 mM como la óptima para el desarrollo de los estudios sobre el mecanismo de acción. Cabe mencionar que esta concentración se enmarca dentro de los niveles empleados para la lidocaína sobre el transporte axonal de proteínas por otros investigadores, así Ander y Edstrom (2) emplearon lidocaína 18.5 mM, Edstrom y colbs (22) usaron 18.3 mM y Byers y colbs (15) usaron 22.1 mM.

El efecto inhibitorio sobre el transporte axonal de proteínas antes mencionado, se ha reportado a concentraciones mucho mas elevadas que las requeridas para el bloqueo del impulso nervioso de 7.2 mM (2, 22).

Nuestros resultados se suman a este tipo de conclusiones, ya que los estudios iniciales que realizamos en búsqueda de la concentración del anestésico que produjera un efecto, indicaron que dosis bajas del orden de 5 mM no tuvieron efecto alguno sobre las migraciones pigmentarias.

La detención del transporte en nuestro sistema experimental, fue un proceso de aparición lenta, distinta al rápido bloqueo de la conducción del impulso que se conoce para este fármaco, con una respuesta en aumento en base al tiempo de exposición al anestésico. Este comportamiento posiblemente se debe a la paulatina interacción del anestésico con la membrana ejerciendo así su efecto.

Un punto importante de considerar basándonos en nuestros hallazgos, es el hecho de que la lidocaína como un producto anestésico local, está indicada para el uso clínico a concentraciones del 1 a 5% (35mM y 170 mM respectivamente), es decir en dosis muy por arriba de la necesaria para el bloqueo del impulso y cercana a las reportadas como inhibidoras del transporte intracelular. Sin embargo debemos considerar que gran parte de esta sustancia se pierde durante las fases de penetración por lo tejidos hasta llegar finalmente al nervio, de tal manera que posiblemente la concentración efectiva que alcanza a la célula blanco es justa la necesaria para cumplir su función anestésica sin alterar otros procesos. Esto debe de tomarse con cierta reserva ya que existen trabajos como los realizados por Ngai (57), quien demostró en cobayos intáctos, que la lidocaína altera evidentemente el transporte intracelular.

La alteración sobre el transporte intracelular de gránulos de pigmento sólo se observó en el estado de adaptación a la obscuridad, bloqueando el proceso de agregación pigmentaria así como produciendo un desplazamiento pigmentario en células que se encontraban adaptadas a la obscuridad. En la luz y en presencia del fármaco no ocurrió ningún cambio significativo.

De estos resultados se puede pensar que la alteración producida en la oscuridad se manifiesta como un patrón análogo al que se ha propuesto en la adaptación a la luz bajo situaciones fisiológicas.

Se sabe que el pH altera la potencia de los anestésicos tanto sobre el bloqueo del impulso como sobre el bloqueo del transporte axonal de proteínas (46). A pH ácidos, la lidocaína disminuye su potencia sobre el transporte en nervios aislados, lo cual ha sido explicado basándose en las características ácido-base (anión-catión) que estas moléculas presentan y que en primera instancia se relaciona con la capacidad de penetración a través de las membranas. La tetracaína, un anestésico local con un pKa de 8.2, inhibe el transporte de tal manera que es más potente cuando el pH es más alcalino, es decir cuando predomina la forma no cargada de la molécula del anestésico (46).

Al analizar el efecto inhibitorio de la agregación por lidocaína a diferentes valores de pH de 7.4 y 8.0, no se encontró diferencia alguna en cuanto a la potencia de acción.

Aparentemente nuestros resultados no concuerdan con los estudios reportados por otros grupos (46,47) quienes han demostrado un incremento de la potencia a pH básicos y no en ácidos. Posiblemente lo que está ocurriendo se deba a las características altamente amortiguadoras del tejido, que ocasione que el pH de la solución esté siendo neutralizado impidiendo así observar los efectos diferenciales del anestésico.

Un punto a evaluar acerca del fenómeno inhibitorio del transporte por lidocaína es el de determinar si el efecto es el resultado de una acción tóxica sobre la célula ó si ocurre como una acción específica en la que solo se cambian algunas condiciones fisiológicas sin llevar a la muerte celular. Aunque existen diversos reportes en donde se ha demostrado que la lidocaína inhibe el transporte rápido de proteínas de una manera reversible, evaluamos el anterior planteamiento en nuestro modelo experimental (2,15,28).

Los resultados favorecieron positivamente la segunda alternativa. Mediante pruebas de reversibilidad, se demostró que aquellas células cuyos procesos de migración pigmentaria habían sido previamente alterados por lidocaína, recuperaron su total capacidad adaptativa al ser eliminado el anestésico del medio de incubación, esta reversión se evaluó a la concentración de 25 mM.

Uno de los problemas que se han tratado de resolver desde que se descubrió la alteración del transporte rápido de proteínas en axones por anestésicos es el que corresponde al mecanismo de acción.

Se ha propuesto que el efecto bloqueador del impulso y el inhibidor del transporte intracelular en axones neurales por anestésicos, son procesos no relacionados. Mientras que se acepta que el bloqueo del impulso resulta de las interacciones del anestésico con la membrana, por otro lado se plantea que la inhibición del transporte de organelos es consecuencia de alteraciones sobre procesos y organelos intracelulares involucrados en el fenómeno de transporte (2, 40).

Esta acción intracelular se ha descrito en modelos tales como músculo esquelético (5), en donde se ha encontrado que la presencia de lidocaína produce contracciones musculares posiblemente por la interacción del fármaco con el retículo sarcoplásmico produciendo así una liberación y aumento de la actividad de calcio intracelular a un nivel tal que fuera capaz de activar la maquinaria móvil.

A partir del papel de reservorio de Ca^{++} que se le ha atribuido al retículo endoplásmico axonal (21,63) y de los antecedentes en músculo esquelético, se ha propuesto que los anestésicos locales bloquean el transporte axonal al incrementar el Ca^{++} intracelular libre, interfiriendo no solo con la fosforilación oxidativa, sino también con el transporte intracelular (15, 40, 47)..

Generalmente los mecanismos que se han atribuido a los anestésicos, principalmente se centran sobre los elementos involucrados directamente con la traba locación, como son los microtúbulos; no hay evidencias reportadas de las alteraciones que producen los anestésicos sobre los eventos regulatorios que intervienen en la migración pigmentaria, siendo por lo tanto nuestros resultados de los primeros reportados al respecto.

Los experimentos realizados con el fin de determinar el mecanismo de acción de la lidocaína, mostraron que la inhibición de la migración del pigmento proximal producida por este anestésico, se vió a su vez bloqueada por las siguientes condiciones:

- Ausencia de Na^+ extracelular.
- Alta concentración de Ca^{++} extracelular
- Presencia de Co^{++} en el medio extracelular

La explicación de estos comportamientos dirige la atención hacia la posibilidad de que el fármaco esté actuando no a un nivel intracelular como se ha propuesto para el caso del transporte axoplásmico, sino sobre la membrana de las células retinales. Las bases para esta consideración son las siguientes :

Se ha propuesto en fotorreceptores retinulares de langostino (31, 23), que las respuestas a los estímulos luminosos que se manifiestan con movimiento de los gránulos pigmentarios están relacionadas con el potencial de membrana de este tipo de células. De tal manera que

en la presencia de luz, se produce un potencial despolarizante que se acompaña con la migración respectiva del pigmento. En la oscuridad por el contrario, se favorece una hiperpolarización que se traduce en la agregación pigmentaria.

Este tipo de hipótesis han sido comprobadas mediante el manejo de condiciones de incubación de tipo : 1) Despolarizantes : con ouabaína, sustitución de Na^+ por K^+ ó por Li^+ y elevación de los niveles extracelulares de Na^+ . 2) Hiperpolarizantes, como ocurre con : sacarosa, o ausencia de Na^+ y aumento de Ca^{++} extracelular (33).

La lidocaína al mantener el pigmento disperso imitando así el efecto de la luz, nos conduce a proponer una acción sobre la membrana similar a la producida por la iluminación, que conduzca a la entrada de Na^+ extracelular que estimula la dispersión del pigmento. Esta hipótesis se confirmó cuando al eliminar el Na^+ del medio en presencia del anestésico, no se presentó el efecto que este agente tiene sobre la migración de los gránulos. Este hallazgo sugiere varios aspectos : 1) El Na^+ extracelular es necesario para que se manifieste el efecto. 2) Se demuestra que el fármaco no tiene su sitio de acción a nivel intracelular, ya que en caso contrario se esperaría que se manifestara el efecto aún en ausencia de Na^+ .

En estudios realizados por Fraxione(31, 33) sobre fotorreceptores delangostino, se demostró que la elevación de Ca^{++} o la presencia de Co^{++} en el medio extracelular favorecen la agregación pigmentaria (estado de adaptación a la oscuridad) proponiéndose para el caso del primer ión, funciones promotoras de la resistencia eléctrica de la membrana y en consecuencia una facilitación de la migración a la posición de adaptación a la oscuridad; con respecto al Co^{++} , los estudios de Weakly (83) le proponen una función protectora o de impedimento a la entrada de iones Ca^{++} al competir por el mismo canal a través de la membrana plasmática.

En ambas situaciones se favorece un bloqueo a la entrada de Ca^{++} y posiblemente Na^+ extracelular.

Al extrapolar lo anterior a nuestros resultados, se puede inferir que la acción protectora de estos dos iones sobre la superficie celular (tal vez por una estabilización), en una forma impide que el anestésico actúe sobre la membrana, no induciéndose así la entrada de Na^+ extracelular previa a la inhibición del transporte.

En conclusión, podemos plantear el siguiente mecanismo de acción para la lidocaína.

1. Al incubarse las células en presencia del anestésico, este entra en contacto con.

la membrana en forma paulatina, lo cual explica la lenta aparición del efecto una vez ahí, compite por el ión Ca^{++} presente en los fosfolípidos de membrana desplazándolo y ocupando así su lugar en un ambiente de interacciones electrostáticas (7, 26); este tipo de interacciones expandirían y fluidificarían la membrana produciendo un rompimiento de las interacciones lípido-lípido y/o lípido-proteína (8), dicha alteración traería como consecuencia un aumento en la permeabilidad hacia iones externos, de los cuales el Na^+ es el más abundante; la entrada anormal de este ión produciría una respuesta cortocircuitante con la respectiva despolarización de la membrana (31). Se ha propuesto que la elevación del Na^+ citoplásmico dispara la liberación de Ca^{++} a partir de los reservorios intracelulares (3, 50, 81), de tal manera que es posible que este fenómeno se reproduzca en presencia del anestésico.

2. Tomando en cuenta el papel que se le ha atribuido al Ca^{++} en el fenómeno de migración pigmentaria en este y otros modelos experimentales en los que se ha planteado que la elevación de este catión en el citoplasma durante la adaptación a la luz produce la dispersión del pigmento (31, 33, 51), entonces se puede asumir que la liberación de este catión de sus almacenes por el aumento de la actividad intracelular de Na^+ , dispersa el pigmento aún incluso en ausencia de luz. Esto no ocurre al eliminar el Na^{++} extracelular, de tal forma que a pesar de que la lidocaína esté alterando la permeabilidad de la membrana, no existe Na^+ que entre a la célula y desencadene el anterior proceso. Por otro lado, cuando se impide que el anestésico interactúe con los fosfolípidos, ya sea estabilizándolos en su unión con el Ca^+ , mediante una elevación en la concentración extracelular de este catión, entonces el efecto anterior sobre el transporte se inhibe desde las etapas tempranas.

El papel que las alteraciones iónicas producen dentro de la célula aún no se conocen totalmente, aunque se han propuesto modificaciones sobre los microtúbulos y algunas enzimas involucradas en la regulación de la migración pigmentaria (51).

B. Epitelio Pigmentario Retinal de rana.

En lo que respecta a este segundo modelo celular empleado, solo se tiene conocimiento de un reporte (77) en donde se trató de reproducir la respuesta migratoria en el EPR bajo

condiciones in vitro.

Considerando que las mejores condiciones para el estudio del fenómeno del transporte intracelular de partículas son las que proporcionan los sistemas aislados, retomamos en esta parte del trabajo dicho problema, caracterizando el comportamiento migratorio así como las condiciones de incubación que resultaron fisiológicas al funcionamiento celular.

Basándonos en los estudios de Snyder y Zadunaisky (77) sobre retinas aisladas de rana, logramos reproducir la respuesta migratoria que caracteriza a las células del EPR en el animal íntegro. Con base en estos resultados, proponemos a estas células pigmentarias como un potencial sistema experimental para el estudio del fenómeno del transporte intracelular de partículas.

Para que el sistema operara eficientemente con una buena reproducibilidad, se tuvieron que realizar un gran número de pruebas abarcándose desde los pasos de disección y aislamiento de la retina, determinación de las condiciones de oscuridad del medio, temperaturas y tiempos de incubación así como los parámetros de cuantificación de la respuesta migratoria.

La exposición de las retinas aisladas a diferentes condiciones de iluminación (luz y oscuridad) se encontró estar asociada con el movimiento de los gránulos de pigmento a lo largo de las prolongaciones citoplásmicas interdigitadas entre los segmentos externos de los fotorreceptores, similar al obtenido en la rana íntegra y reportado por varios grupos (13, 19 66).

A partir de las evidencias obtenidas y presentadas en este trabajo, se pueden concluir una serie de puntos :

1. Mediante cortes histológicos realizados sobre retinas aisladas bajo diferentes condiciones de iluminación, se pudieron reproducir las distribuciones diferenciales de los gránulos de pigmento que se presentan en el animal íntegro. Por otro lado, estas mismas observaciones nos indicaron que efectivamente, el pigmento presentó un desplazamiento inducido por la iluminación parecido al que se encuentra en algunas células pigmentarias de retinas de invertebrados y de tegumento de vertebrados (37, 51).
2. Por medio de este estudio hemos llegado al mantenimiento funcional de estas células in vitro con respecto a la migración pigmentaria, hecho que no se había demostrado por otros investigadores (77).
3. La presencia de la migración pigmentaria en sistemas aislados independientemente de la hora del día, eliminó toda posibilidad de intervención circadiana, que en los animales íntegros

es evidente (19).

Con base en los resultados obtenidos, podemos pensar que el movimiento pigmentario es dependiente del metabolismo, por lo menos hacia la posición de adaptación a la obscuridad, lo cual se vió apoyado por la inhibición de la agregación del pigmento ante altas y bajas temperaturas no fisiológicas, anoxia y daños a nivel retinal, encontrándose los gránulos en una posición de adaptación a la luz aún ausente de esta. De lo anterior se puede inferir que la agregación es un proceso altamente comprometido que requiere muy posiblemente de energía para llevarse a cabo, siendo la dispersión el estado energético de reposo. En células de invertebrados y en axones aislados, se ha demostrado la intervención del metabolismo oxidativo como un sistema indispensable para los respectivos fenómenos de transporte intracelular (30, 61, 62, 77). Es obvio considerar, la necesidad de realizar estudios adicionales utilizando agentes que alteren directamente el metabolismo oxidativo, como son el cianuro, dinitrofenol etc (61, 77).

Al observar los movimientos pigmentarios, aparentemente controlados por los estímulos fótico, cabría la posibilidad de considerar a estas células del EPR como efectores pigmentarios independientes, como se ha propuesto para sistemas de diferente naturaleza (33), de tal que no existiera mediación de tipo nervioso o humoral en el anterior fenómeno, es decir, que las células del epitelio respondieran "per se" a la exposición luminosa. Aunque no hay datos tan extensos como en otros modelos celulares (33,84), tal parece que las células pigmentarias de retina de rana, no actúan como unidades independientes, sino que distribuyen su pigmento de manera diferencial bajo mecanismos aún no totalmente conocidos. Se ha propuesto que los fotorreceptores, posiblemente por una acción de acoplamiento con las células pigmentarias liberan vitamina A o diversos iones que podrían entrar en juego en este fenómeno. (49).

Este tipo de consideraciones en parte están de acuerdo con algunas de nuestras observaciones, en donde se notó que aquellos tejidos en los que accidentalmente se separó el EPR de las demás capas celulares, no presentaban aún bajo condiciones de obscuridad la retracción del pigmento como normalmente ocurriría, encontrándose este totalmente disperso.

A pesar de no haber clasificado esquemáticamente en un apartado la caracterización iónica de la migración pigmentaria en este modelo, ya que fue estudiada a la par con la investigación del mecanismo de acción de la lidocaína, en esta sección analizaremos el significado funcional de la evidencias iónicas obtenidas, a fin de elucidar el mecanismo regulatorio del

del movimiento pigmentario. Una vez hecho esto, discutiremos el efecto del anestésico sobre el fenómeno.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la composición de iones en el medio sobre las células del EPR, indican que la migración pigmentaria se encuentra afectada por el contenido de algunos iones a nivel extracelular y posiblemente intracelular. Así por ejemplo, encontramos dos tipos de condiciones generales que favorecieron ya sea la dispersión ó la agregación del pigmento como a continuación se presenta :

1). Condiciones promotoras de la agregación

- Ausencia de Na^+
- Presencia de Ca^{++} a una concentración por arriba de la normal (9mM).
- Presencia de Co^{++}

2) Condiciones dispersantes (iones extracelulares y fármacos)

- Elevación de Na^+
- Ausencia de Ca^{++}
- Cafeína 5 mM
- Ionóforo A-23187
- Ouabaina 0.1 mM

Se ha visto que las migraciones pigmentarias retinales en artrópodos, se encuentran relacionadas con los potenciales de membrana de estas células (23,136), de tal manera que los estados de adaptación a la luz se correlacionan con respuestas de tipo despolarizante mientras que en la obscuridad ocurre lo contrario. Aunque no existen estudios en rana en donde se analicen potenciales de membrana con respecto a la migración pigmentaria, consideramos dada la similitud de las respuesta migratoria por condiciones iónicas, un comportamiento común entre los fotorreceptores de crustáceo (33) y las células del EPR de la rana.

La presencia de concentraciones elevadas de Na^+ extracelular y de ouabaina, inducen una entrada anormal de Na^+ al citoplasma produciendo todas aquellas alteraciones que traen como consecuencia la dispersión pigmentaria. Existe un estudio donde se demuestra la existencia de una ATPasa Na^+/K^+ electrogénica localizada apicalmente en las células del EPR, que es capaz de inducir una despolarización en presencia de ouabaina (53).

En los casos de falta de Na^+ , presencia de Co^{++} y Ca^{++} a una concentración elevada, en donde se estimula una respuesta hiperpolarizante, se encuentra una promoción a la adaptación

a la oscuridad. Por otro lado se puede pensar que la ausencia de Na^+ directamente produce la hiperpolarización que es una condición necesaria para el estímulo de la agregación pigmentaria, y por otro, la presencia de Ca^+ se ha planteado tener un efecto de incremento en la resistencia eléctrica de la membrana (32), lo que trae como consecuencia una disminución en el paso de iones extracelulares al citoplasma; el efecto del Ca^{++} sería el mismo antes propuesto.

De estos puntos se puede notar que el Na^+ juega un importante papel en la migración de estos organelos, y coincidiendo con los resultados obtenidos con los fotorreceptores de crustáceos.

En cuanto al efecto inhibitorio de la adaptación a la oscuridad observado en ausencia de Ca^{++} extracelular lo podemos explicar considerando una alteración de la estabilidad de la membrana. El Ca^+ se ha propuesto en cuando menos 4 funciones de la membrana: 1) Es requerido para la estabilidad eléctrica (26). 2) el influjo de Ca^{++} contribuye parcialmente a la corriente hacia adentro del potencial de acción. 3) El Ca^{++} es necesario para acoplar los eventos eléctricos de la membrana con otras respuestas fisiológicas de la célula (2,5,20). 4) El Ca^{++} intracelular puede regular la permeabilidad de la membrana celular para iones y para solutos neutros (43, 86).

De esta manera, podemos proponer que al eliminar este ión extracelular, puede presentarse dos tipos de alteraciones:

a) Al disminuir la actividad de este catión, el Ca^{++} unido a los fosfolípidos, (el cual está en equilibrio con el presente extracelularmente) se separa de sus sitios de unión por efecto del cambio en el gradiente de tal manera que se desestabiliza la membrana con un aumento en la permeabilidad y permitiendo que iones como el Na^+ entren a la célula y disparen las migraciones pigmentarias.

Además de estas observaciones, se ha postulado por otros investigadores la presencia de funciones regulatorias de la migración pigmentaria por efecto de variaciones en las actividades iónicas en el citoplasma. Existen referencias sobre células retinales de crustáceo y de tegumento de algunos vertebrados, en donde los estímulos luminosos se han asociado con incrementos en la concentración intracelular de Ca^{++} (9,33,64) y de Na^+ (3). Sin embargo estos comportamientos no son del todo uniformes en todos los modelos conocidos, ya que mientras que la incubación en soluciones con alta concentración de Ca^{++} induce la dispersión del pigmento en el melanóforo de rana (59), por otro lado, este catión es requerido para la agregación del

pigmento en el EPR de este animal (77). Contrariamente a lo esperado, se encontró que al elevar el Ca^{++} del medio e incubar bajo estas condiciones al EPR, no se indujo el efecto dispersante observado anteriormente en la piel de rana (59), sino que la posición del pigmento se vió favorecida al estado de adaptación a la oscuridad. Similarmente con melanóforos de iguana se ha observado que la deficiencia de Ca^{++} en el medio extracelular promueve la agregación del pigmento mientras que en nuestro sistema produce una marcada inhibición de la migración pigmentaria, demostrado también por Snyder y Zadunaisky (77).

Como se puede notar, la variabilidad de respuestas migratorias imposibilita el plantear cuadros comparativos totales sobre los eventos involucrados en la regulación del movimiento pigmentario. Sin embargo, si analizamos los antecedentes de la dependencia iónica de la migración en las células retinulares de langostino de río y la comparamos con los resultados obtenidos en este segundo modelo, podemos notar parámetros comunes que facilitan la interpretación de los datos, sobre todo porque el primer sistema celular ha sido muy estudiado, existiendo una abundante literatura que podemos extrapolar en un momento dado al análisis del EPR de rana. En este sentido podemos estructurar el siguiente modelo :

Si partimos del hecho de que una actividad aumentada de Ca^{++} en el citoplasma promueve la dispersión del pigmento a la posición del estado de adaptación a la luz en las células retinulares (81), podemos explicar el efecto observado en presencia de cafeína, la cual estimulo un estado de dispersión pigmentaria en la oscuridad (17). Esta droga actúa probablemente sobre los reservorios intracelulares de Ca^{++} liberándolo y por lo tanto aumentando su actividad en el citoplasma, simulando así un proceso que posiblemente ocurre en presencia de la luz.

Una estrategia mas específica utilizada para apoyar la anterior hipótesis, se realizó con el ionóforo para Ca^{++} A-23187, un agente que permite la entrada de este catión de manera selectiva (36,70); los resultados obtenidos están de acuerdo con lo propuesto, ya que la interacción de las células con esta sustancia en la oscuridad, produjo un comportamiento imitativo a la presencia de la luz, con la característica dispersión del pigmento.

Si consideramos las conclusiones propuestas para el langostino de río, en donde se sugirió que la elevación de Ca^{++} citoplásmico durante la adaptación a la luz puede ser consecuencia de un aumento previo en la actividad de Na^+ interna (3), entonces podemos explicar el efecto inhibitorio de la agregación por cafeína y con Na^+ extracelular elevado.

De esta manera, con base en los resultados de nuestros experimentos, así como de la

información ya existente al respecto, podemos plantear los posibles eventos iónicos que se lleven a cabo en los diferentes estados de adaptación en el EPR de rana.

Lo que proponemos es lo siguiente :

Durante el estado de adaptación a la luz, los estímulos fóticos promueven el paso de Na^+ hacia el interior de la célula, probablemente como resultado de cambios despolarizantes y de la permeabilidad de la membrana. La elevación de este ión en el citoplasma produciría una liberación de Ca^{++} de los reservorios internos (gránulos de pigmento o retículo endoplásmico) (65), de forma similar al fenómeno observado en organismos como *Aplysia* y *Euhadro* cuyos gránulos pigmentarios tienen un contenido rico en Ca^{++} el cual es liberado como resultado de una fotoabsorción (41). Una vez incrementado este ión, se producirían alteraciones intracelulares relacionadas íntimamente con la dispersión del pigmento de estas células.

Por el contrario, durante el estado de adaptación a la oscuridad, se encuentra una polarización de la membrana y por lo tanto un bloqueo al paso de iones al citoplasma. Se observaría adicionalmente una captación de Ca^{++} citoplásmico por los almacenes intracelulares disminuyendo así su actividad como ión libre y favoreciendo así la agregación pigmentaria.

En cuanto a los sistemas que se activan una vez que aumenta o disminuye el Ca^{++} citoplásmico, y que están involucrados en la translocación granular, se conoce muy poco, y los datos que existen son un tanto inconsistentes ya que mientras que en el EPR de peces (teleosteo) se ha propuesto a los microtúbulos y microfilamentos íntimamente involucrados en el movimiento granular (12,13), en la mayoría de otras especies tales como anfibios, reptiles, aves e incluso primates, solo se encuentran filamentos de 100 \AA interactuando directamente con este tipo de organelos, observándose microtúbulos agregados solo en la porción basal de estas células (54).

Sin embargo podemos inferir un acoplamiento armónico entre los mecanismos iónicos de regulación y los elementos del citoesqueleto en estas células.

Se puede pensar según los estudios de Murray y Dubin (54) que la luz activa procesos dependientes de filamentos de actina posiblemente bajo interacción actina-miosina que proporcionan la fuerza necesaria para la translocación de los gránulos de pigmento. Tomando en consideración la disposición axial de los filamentos de actina, es posible pensar que los gránulos son desplazados de un sitio de interacción a otros más distantes, de tal manera que se dispersen en las prolongaciones apicales.

Debido a que las interacciones actino-miosina parecen estar activadas por niveles

elevados de Ca^{++} intracelular (18), cabe pensar que la luz al producir el aumento de Na^+ citoplásmico y por tanto de Ca^{++} , estimula este tipo de interacciones proporcionando así la fuerza motriz..

Para explicar el movimiento facilitado de los gránulos por las prolongaciones apicales en donde se encuentra un citoplasma que involucra la unión entrecruzada de filamentos de actina y la matriz citoplásmica, podemos adoptar la idea propuesta por Taylor y Condeelis (78) quienes propusieron que la elevación de Ca^{++} libre interno, inhibe las interacciones entre filamentos de actina permitiendo de esta forma, una translocación facilitada de los gránulos de pigmento una vez disperso, quizá alguna señal distinta alterara estas interacciones actina-miosina de tal manera que se puedan mantener los gránulos en el estado disperso con un mínimo de requerimiento energéticos.

Quando se colocan las células en la oscuridad ocurriría un fenómeno opuesto.

Los reservorios intracelulares captan al Ca^{++} y disminuyen su actividad citoplásmica, y por otro lado la bomba de Na^+/K^+ se encarga de equilibrar la cantidad de Na^+ intracelular proporcionando así el ambiente propicio para los demás eventos. Es posible que se induzca una señal inhibitoria del entrecruzamiento de los filamentos de actina sin intervención de la contracción actina-miosina, posiblemente una elevación de AMPc es la responsable de esta función (14). Esto permitiría la posterior translocación de los gránulos. La disposición de los microtúbulos en la parte basal de la célula, posiblemente cumple una función de anclaje y de canal para los gránulos provenientes de la zona apical, de tal manera que estos organelos puedan ser dirigidos al cuerpo celular.

En cuanto al efecto observado en presencia de lidocaína, las respuestas obtenidas fueron similares a aquellas registradas para el caso del langostino de río, como fueron :

1. Se encontró que la lidocaína 5mM fue capaz de inhibir de manera reversible el movimiento intracelular del pigmento hacia la posición de adaptación a la oscuridad mas no en la luz.
2. Dicho efecto fue dependiente de la presencia de Na^+ extracelular, en donde la ausencia de este protegió a las células de la acción de este fármaco.
3. Estudios con el Na^+ , Co^{++} y Ca^{++} sobre los procesos de adaptación en presencia del anestésico, indicaron que el posible sitio de acción de la lidocaína, tal como se propuso para Langostino de río, es sobre el plasmalema.

Investigando si este anestésico producía un efecto parecido al observado con nuestro

anterior modelo, se estudiaron los eventos involucrados en los procesos de adaptación en presencia del anestésico.

Inicialmente se probaron las concentraciones a las que se había encontrado en los fotoreceptores de langostino los efectos ya conocidos (con. de 19 y 25mM). Sin embargo estos niveles de fármaco produjeron marcadas lesiones sobre la retina con desprendimiento y separación del EPR perdiendo totalmente sus funciones; finalmente se determinó la concentración de 5 mM como la adecuada para los estudios.

Esta lisis del tejido retinal la podemos explicar porque en el caso del EPR, este se encuentra totalmente expuesto a la acción del fármaco ya que no existen las barreras difusivas que caracterizan a los tallos oculares del langostino. En cuanto a la acción destructiva del anestésico, se han reportado 3 tipos de efectos sobre la membrana celular (75) :

- 1) Una acción protectora, 2) Una acción de prelisis y 3) una lítica. Esta última se presenta a concentraciones altas del fármaco, la primera a bajas concentraciones y en la prelisis corresponde a un estado intermedio entre las dos, en donde la célula se hace muy permeable a iones pero no a proteínas (75) no destruyéndose y conservando así la funcionalidad celular. De lo anterior se puede considerar que la concentración efectiva sobre la membrana de las células del EPR a 19 y 25mM eran tan altas que entraban dentro de las zonas líticas con los respectivos resultados; comparando esto con los tallos oculares del langostino, podemos suponer que las barreras difusionales que se encuentran en el tallo ocular de estos animales disminuye y importante la concentración del anestésico que entra en contacto con las células, contrariamente a lo que ocurre en las copas oculares de rana en donde estas barreras son mínimas. Parece ser que la concentración de 5 mM se sitúa dentro del rango de prelisis, en donde posiblemente se estimula un aumento del paso de iones al citoplasma.

Es evidente, la importancia de estas observaciones, si se considera que el nivel terapéutico de este agente está por arriba del utilizado en este estudio.

El efecto presentado por el fármaco, solo fue evidente hacia el estado de adaptación a la oscuridad y de manera reversible a la concentración de 5 mM pero no de 25 y 50 mM.

La reversibilidad del efecto, confirmó que la acción del anestésico no es la respuesta a lesiones que las células hubieran sufrido al entrar en contacto con el agente, sino mas bien a cambios posiblemente de tipo iónico en el citoplasma, que trae como resultado la dispersión del pigmento. Las células se recuperaron con el solo lavado del anestésico del medio de incubación.

Cuando se investigó el comportamiento del anestésico en presencia de diferentes condiciones de incubación, se observó que la presencia o ausencia de Na^+ , determinó que se manifestara o no el efecto dispersor del pigmento en la oscuridad.

Por otro lado, condiciones hiperpolarizantes como ocurre con concentraciones elevadas de Ca^{++} extracelular o presencia de Co^{++} favorecieron la posición del pigmento a nivel basal (agregado).

Con base a los resultados encontrados en presencia y ausencia del anestésico, podemos plantear, que el anestésico altera de alguna forma el intercambio iónico en la frontera de la célula, de tal manera que produce un anormal influjo de Na^+ que trae como consecuencia un desequilibrio interno no solo electroquímico sino también metabólico, que se refleja como la inhibición de los procesos normales de adaptación. Esta conclusión se determinó al observar que el anestésico en ausencia de Na^+ no ejercía efecto alguno, lo cual indicó que sus sitio blanco no se localiza dentro de la célula, sino probablemente sobre la membrana.

La estabilización de la membrana con Co^{++} y Ca^{++} como antes se planteó, también bloqueó el efecto de lidocaína, y se explica porque al incrementarse la fuerza electrostática entre el complejo de fosfolípido- Ca^{++} -fosfolípido aumenta la resistencia eléctrica anulando el efecto del anestésico como un agente estimulante de la entrada de Na^+ .

Aunque no existen más datos en la literatura acerca del comportamiento del EPR, las respuestas que estas células presentaron en este estudio hacia las diferentes condiciones de incubación (iónicas y con lidocaína), nos inducen a pensar una serie de eventos similares a los que se han planteado para el caso del langostino de río, dada la similitud de respuesta entre ambos sistemas, proponiendo así un fenómeno de tipo general sobre la membrana

IX. CONCLUSIONES

Una vez analizados ambos modelos podemos concluir lo siguiente :

1. Parece ser que los mecanismos regulatorios del transporte intracelular de gránulos de pigmento, presentan un esquema común en los eventos involucrados en las diferentes células independientemente de su naturaleza y función, con pequeñas variaciones según las especies referidas y en donde el Na^+ parece jugar un importante papel. En este sentido, condiciones de incubación que producen un aumento en la actividad de Na^+ citoplásmico tales como alto Na^+ extracelular, ouabaina, etc., producen un movimiento de los gránulos hacia el estado de adaptación a la luz, mientras que condiciones que tienden a bloquear la entrada de Na^+ como son por ejemplo, soluciones sin Na^+ , alto Ca^{++} y presencia de Co^{++} favorecen el movimiento pigmentario hacia la posición de adaptación a la oscuridad.
2. La lidocaína a concentraciones por debajo de la utilizadas en la clínica para bloquear la conducción del estímulo, produce dramáticas alteraciones en los procesos de transporte intracelular de organelos en los modelos celulares empleados, lo cual podría en un momento dado considerarse (interpretarse) como alteraciones en los procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el organismo de aquellos individuos a los que se les administra dicho anestésico.
3. Mediante los diferentes estudios con el anestésico en presencia y ausencia de Na^+ , se concluye que este ejerce su efecto inhibitor del transporte de gránulos específicamente sobre la membrana, induciendo alteraciones en la permeabilidad de la misma y la entrada de Na^+ que dispara a su vez la dispersión pigmentaria.
4. La respuesta obtenida al evaluar el fenómeno de migración pigmentaria en el EPR aislado de rana, hacen a este sistema especialmente atractivo para considerarlo como un buen modelo celular para el estudio del fenómeno de transporte intracelular de partículas aunado a las diversas ventajas que proporciona.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Aasheim, G., Raymond, B., Middaugh, B.A. (1974). Inhibition of rapid axoplasmic transport by procaine hydrochloride. *Anesthesiology*. 41 : 549-553
2. Anderson, K.E., Edstrom, D. (1973). Effects of nerve blocking agents on fast axonal transport of proteins in frog sciatic nerves in vitro. *Brain Research*. 50 : 125-134.
3. Bader, C.R., Baumann, F., Bertrand, D. (1976). Role of intracellular calcium and sodium in light-adaptation in the retina of the honey bee drone (*Apis mellifera* L.). *J. Gen. Physiol.* 67 : 475-491.
4. Bennitt, R. (1924). The migration of the retinal pigment in crustaceans. *J. Exp. Zool.* 40 : 381-435.
5. Bianchi, C.P. (1968). Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle. *Fed. Proc.* 27 : 126-131.
6. Blaustein, M.P., Goldman, D.E. (1968). The action of certain polyvalent cations on the voltage-clamped lobster axon. *J. Gen. Physiol.* 51 : 279-291.
7. Bondani, A., Karler, R. (1970). Interaction of calcium and local anesthetics with skeletal muscle microsomes. *J. Cell Physiol.* 75 : 199-211.
8. Bradford, P., Marinetti, G.U. (1981). Trinitrobenzensulfonic acid and fluorodinitrobenzene: probes to study local anesthetic effects in cell membrane. *J. Membrane Biol.* 61 : 193-198.
9. Brown, J.E. (1977). Calcium ion, a putative intracellular messenger for light-adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *Biophys. Struct. Mech.* 3 : 141-143 .
10. Brown, J.E., Blinks, J.R. (1974). Changes in intracellular free calcium during illumination of invertebrate photoreceptors: detection with aequorin. *J. Gen. Physiol.* 64 : 643-665.
11. Brown, A.M., Baur, B.S., Tutley, F.H. (1975). Phototransduction in *Aplysia* neurons, calcium release from pigmented granules is essential. *Science*. 188 : 157-160.
12. Burnside, B. (1976). Possible roles of microtubules and actin filaments in retinal pigmented epithelium. *Exp. Eye Res.* 23: 257

13. Burnside, B., Adler, R., O'Connor, P. (1983). Retinomotor pigment migration in the teleost retinal Pigment epithelium. Invest. Opth. and Visual Sci. 24 : 1-15.
14. Burnside, B., Basinger, S. (1983). Retinomotor pigment migration in the teleost retinal pigment epithelium. II. Cyclic-3'-5'-adenosine monophosphate induction of dark-adaptive movement in vitro . Invest. Opth. and Visual Sci. 24 : 16
15. Byers, R.M., Fink, R., Kennedy, R.D., Middaugh, M.E., Hendrickson, A.E. (1973). Effects of lidocaine on axonal, morphology, microtubules and rapid transport in rabbit vagus nerve in vitro. J. of Neurobiol. 4 : 2, 125-143.
16. Carvalho, A.P. (1968). Calcium binding properties of sarcoplasmic reticulum as influenced by ATP, caffeine, quinine, and local anaesthetics. J. Gen. Physiol. 52 : 622-642.
17. Chiarandini, D.J., Reuben, J.P., Brandt, P.W., Grundfest, H. (1970). Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. I. Activation of contraction and induction of Ca^{+2} spike electrogenesis. J. Gen. Physiol. 55 : 640-664.
18. Dedman, J.R., Brinkley, B.R., Means, A.R. (1979). Regulation of microfilaments and microtubules by calcium and cyclic AMP. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 11 : 131
19. Detwiler, S.R. (1943). Vertebrate Photoreceptors. Mac Millan. New York.
20. Douglas, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling : the concept and clues from chromaffin and other cells. Brit. J. Pharmacol. 34 : 451-474.
21. Duce, I.R., Keen, P. (1978). Can neural smooth endoplasmic reticulum function as a calcium reservoir?. Neuroscience. 3 : 837-848.
22. Edstrom, A., Hansson, H.A., Norstrom, A. (1973). Inhibition of axonal transport in vitro in frog sciatic nerves by chlorpromazine and lidocaine. Z. Zellforsch. 143 : 53-69.
23. Eguchi, E. (1965). Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish reticular cells. J. Cell Comp. Physiol. 66: 411-429.

24. Fabiato, A., Fabiato, A. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 40 : 119-129.
25. Fahrenbach, W. (1975). The visual system of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *Int. Rev. Cytol.* 41 : 285-349.
26. Feinstein, M.B. (1964). Reaction of local anesthetics with phospholipids. *J. Gen. Physiol.* 48 : 357-374.
27. Fink, B.R., Kennedy, R.D. (1972). Rapid axonal transport: effect of halothane anesthesia. *Anesthesiology.* 36 : 422-432.
28. Fink, B.R., Kennedy, R.D., Hendrickson, A.E., Middaugh, M.E. (1972). Lidocaine inhibition of rapid axonal transport. *Anesthesiology.* 36 : 13-20.
29. Fink, B.R., Kish, S.J. (1976). Reversible inhibition of rapid axonal transport in vivo by lidocaine hydrochloride. *Anesthesiology.* 44 : 139-146.
30. Frixione E. (1977). Mecanismo de migración del pigmento proximal en el ojo del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis de Maestría. Departamento de Neurociencias. CIEA del IPN. México.
31. Frixione E. (1979). Mecanismos de transporte de gránulos pigmentarios en fotorreceptores retinales de crustáceo. Tesis de Doctorado. Departamento de Neurociencias. CIEA del IPN. México.
32. Frixione E, Aréchiga, H., Tsutsumi, V. (1979). Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish. *J. Neurobiol.* 10 : 573-590.
33. Frixione, E., Aréchiga, H. (1981). Ionic dependence of screening pigment migrations in crayfish retinal photoreceptors. *J. Comp. Physiol.* 144 : 35-43.
34. Frixione, E., Tsutsumi, V. (1982). Photomechanical responses in crustacean retinula cells: the role of microtubules. *Vision Res.* 22 : 1507-1514.
35. Fulpius, B., Baumann, F. (1969). Effects of sodium, potassium and calcium ion slow and spike potentials in single photoreceptors cells. *J. Gen. Physiol.* 53 : 541-561.

36. Gómez-Puyou, A., Gómez-Lojero, C. (1977). The use of ionophores and channel formers in the study of the function of biological membranes. *Curr. Top. Bioenerg.* 6 : 221-257.
37. Hagins, W.A., Liebman, P.A. (1962). Light-induced pigment migrations in the squid retina. *Biol. Bull.* 123 : 498
38. Ham, W.A. (1967). *Histología*. 5ª Ed. Ed. Interamericana. México.
39. Harreveld, A.V. (1936). A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34 : 428-432.
40. Hasche, R.H., Byers, M.R., Fink, B.R., (1974). Effects of lidocaine on rabbit brain microtubular protein. *J. Neurochem.* 22 : 837-843.
41. Henkart, M. (1975). Light induced changes in the structure of pigmented granules in aplysia neurons. *Science.* 188 : 155-157.
42. Hinkley, R.E., Samson, F.E. (1972). Anesthetics-induced transformation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 53 : 258-263.
43. Holloszy, J.O., Narahara, H.T. (1967). Enhanced permeability to sugar associated muscle contraction. Studies of the role of Ca. *J. Gen. Physiol.* 50 : 551-562.
44. Junqueira, L., Porter, K.R. (1969). Mechanisms for the pigment migration in melanophores and erythrophores. *J. Cell Biol.* 43 : 62a.
45. Kühne, W. (1877). *Fortgesetzte Untersuchungen. Retina und die pigmente des auges.* *Untersuch. Physiol. Institut Univ. Heidelber.* 2 : 89.
46. Lavoie, P.A. (1982). Inhibition on fast axonal transport in vitro by tetracaine: an increase in potency at alkaline pH, and no change. *Can. J. Physiol.* 60 : 1715-1720.
47. Lavoie, P.A. (1982). Anesthetics and axonal transport. *J. Pharm. Exp. Ther.* 223.
48. Lavoie, P.A. (1982). Block of fast axonal transport in vitro by local anesthetics Dibucaine and Etidocaine. *J. Pharm. Exp. Ther.* 223 : 251.
49. Liebman, P.A., Carroll, S., Laties, A. (1969). Spectral sensitivity of retinal screening pigment migration in the frog. *Vision Res.* 9 : 377-
50. Lisman, J.E., Brown, J.E. (1972). The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 59 : 701-719.

51. Luby-Phelps, K., Porter, K.R. (1982). The control of pigment migration in isolated erythrocytes of Holocentrus ascensionis (osbeck). II. The role of calcium. Cell. 29 : 441-450.
52. Malawista, S.E. (1971). On the action of colchicine. The melanocyte model. J. Exp. Med. 122 : 361-
53. Miller, S.S., Steinberg, H.R., Oakley, B. (1978). The electrogenic sodium pump of the frog retinal pigment epithelium. J. Membrane Biol. 44 : 259-279.
54. Murray, L.R., Dubin, W.M. (1975). The occurrence of actin like filaments in association with migrating pigment granules in frog retinal pigment epithelium. J. Cell Biol. 64 : 705-710.
55. Murphy, D.B., Tilney, G. (1974). The role of microtubules in the movement of pigment granules in teleost melanophores. J. Cell Biol. 61 : 757
56. Narahashi, T., Anderson, N.C., Moore, J.W. (1966). Tetrodotoxin does not block excitation from inside the nerve membrane. Science, 153 765-767.
57. Ngai, S.H., Wallace, D., Marchelle, M. (1974). Effects of lidocaine and etidocaine on the axoplasmic transport of catecholamine synthesizing enzymes. Anesthesiology. 41 : 542-548.
58. Nguyen-Legros, S. (1978). Fine structure of the pigment epithelium in the vertebrate retina. Int. Rev. Cytol. Suppl. 7 : 287-328.
59. Novaler, R.R., Novaler, B.J., Zinner, S.H., Stoner, J.A. (1962). The effects of sodium, chloride and calcium, concentration on the response of melanophores to melanocyte-stimulating hormone. Gen. Comp. Endocr. 2 : 286-295.
60. Novales, R.R. (1977). The effect of the divalent cations ionophore A-23187 on amphibian melanophores and iridophores. J. Invest. Derm. 69 : 446-450.
61. Ochs, S. (1971). Characteristics and a model for fast axoplasmic transport in nerve. J. Neurobiol. 2 : 331-345.
62. Ochs, S. (1974). Energy metabolism and supply of P to the fast axoplasmic transport mechanism in nerve. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 33 : 1049-1058.

63. Ogawa, Y. (1970). Some properties of fragmented frog sarcoplasmic reticulum with particular reference to its response to response to caffeine. *J. Biochem.* 67: 667-683.
64. Olivo, R.F., Larsen, M.E. (1978). Brief exposure to light initiates screening pigment migration in the retinula cells of the crayfish *Procambarus*. *J. Comp. Physiol.* 125: 91-96.
65. Panessa, B.J., Zadunaisky, J.A. (1981). Pigment granules: A calcium reservoir in the vertebrate eye. *Exp. Eye Res.* 32: 593-604.
66. Parker, G.H. (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment crustaceans. *J. Exp. Zool.* 40: 381-435.
67. Parker, G.H. (1932). The movements of the retinal pigment. Cambridge (Mass.) USA.
68. Perrelet, A., Bader, C.R. (1978). Morphological evidence for calcium stores in photoreceptor of the honeybee drone retine. *J. Ultrastruct. Res.* 63: 237-243.
69. Posner, A.S. (1978). Intramitochondrial storage of stable amorphous calcium phosphate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 307: 248-
70. Pressman, B.C. (1976). Biological application of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 501-530
71. Ruch, T., Patton, H., Woodbury, W., Towe, A. (1978). *Neurophysiology* W.B. Saunders Co. Philadelphia and London. 2nd ed.
72. Schliwa, M., Bereiter-Hahn, J. (1975). Pigment movements in fish melanophores-morphological and physiological studies.V. Evidence for a microtubule-independent contractile system. *Cell Tiss. Res.* 158:61.
73. Schroeder, W., Frings, D., Stieve, H. (1980). Measuring calcium uptake and release by invertebrate photoreceptor cells by laser microprobe mass spectroscopy. *Scanning Electron Microscopy, II.* Chicago USA.
74. Schroeder, W. (1981). Quantitative LAMMA analysis of biological specimens. I. Standards. II. Isotope labeling. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 308: 212-217.
75. Seeman, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tranquilizers, *pharmacological reviews.* 24: 583-655.

76. Sillman, A.J., Ito, H., Tomita, T. (1969). Studies on the mass receptor potential. I. General properties of the response. *Vis. Res.* 9 : 1435-1442.
77. Snyder, W.Z., Zadunaisky, J.A. (1976). A role for calcium in the migration of retinal screening pigment in the frog. *Exp. Eye. Res.* 22 : 377-388.
78. Taylor, D.L., Condeelis, J.S. (1979). Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int. Rev. Cytol.* 56 : 57.
79. Thrope, W.R., Seeman, P. (1971). The site of action of caffeine and procaine in skeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 179 : 324-330.
80. Walz, B. (1979). Subcellular calcium localization and ATP-dependent Ca-uptake by smooth endoplasmic reticulum in an invertebrate photoreceptor cell. *Eur. J. Cell Biol.* 20 : 83-91.
81. Walz, B. (1982). Ca sequestering smooth endoplasmic reticulum in an invertebrate photoreceptor. *J. Cell Biol.* 93 : 849-859.
82. Waterman, T. (1961). Light sensitivity and vision. The physiology of crustacea. Academic Press. : 475-478.
83. Weakly, J.N. (1973). The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. *J. Physiol.* 234 : 597-612.
84. Welsh, J.H. (1939). The actions of eyestalk extracts on retinal pigment migration in the crayfish Cambarus bartoni. *Biol. Bull.* 77 : 119-125.
85. White, R.H., Michaud, N.A. (1980). Calcium is a component of omochrome pigment granules in insect eyes. *Comp. Biochem, Physiol.* 65A : 239-242.
86. Whittam, R. (1968). Control of membrane permeability to potassium in red blood cells. *Nature.(London).* 219 : 610.
87. Wulff, U.J., Stieve, H., Fahy, J.L. (1975). Dark-adaptation and sodium pump activity in *Limulus* lateral eye retinular cells. *Vision Res.* 15 : 759-765.