



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA

EFFECTO DE LA HORMONA NEURODEPRESORA DE LOS
CRUSTACEOS SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA
DE LOS MECANORRECEPTORES DE LA RANA

T E S I S

Que para obtener el título de:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

presenta:

CAROLINA JANE GUERRA SMITH



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Al doctor Hugo Aréchiga, por
su apoyo, por sus enseñanzas,
por su tiempo y por su crítica*

*A Javier Flores y
Fernando Alfaro, por
su apoyo brindado en
todo momento*

INDICE

| | |
|--------------------|----|
| INTRODUCCION | 2 |
| HIPOTESIS | 13 |
| OBJETIVOS | 23 |
| MATERIAL Y METODOS | 25 |
| RESULTADOS | 35 |
| DISCUSION | 53 |
| BIBLIOGRAFIA | 56 |

INTRODUCCION

CONCEPTOS GENERALES SOBRE MODULACION SENSORIAL

Es sabido que una de las operaciones fundamentales en la integración sensorial, es la modulación de la actividad de los elementos aferentes. Es función de las características de los estímulos ambientales, y de las condiciones de actividad en los diversos sectores del sistema nervioso. La respuesta sensorial evocada por un estímulo dado, será muy distinta dependiendo del estado de atención del observador o de sus experiencias previas en relación con ese estímulo.

La identificación de fibras centrífugas a la retina en varias especies, llevó a Ramón y Cajal (1904), a postular que tales fibras "transportarían, del cerebro a la retina, alguna acción indispensable para el fisiologismo retiniano, algo así como tensión o energía necesaria a la buena transmisión".

Desde entonces, se han identificado histológicamente fibras eferentes a otros órganos sensoriales, en gran número de especies y se han descrito además, otras formas de regulación de la entrada de información sensorial.

Adrian (1959) distingue dos clases de acciones modulares sobre los aparatos sensoriales. Una es la e-

jercida mediante la actividad muscular, y lleva a seleccionar del complejo de estímulos ambientales, la gama de intensidades compatibles con el margen de operación de los receptores. Este tipo de modulación comprende desde movimientos precisos que afinan la capacidad perceptiva, hasta respuestas reflejas de tipo protector. La otra clase de influencia es mediada por fibras nerviosas eferentes a los órganos sensoriales como las postuladas por Cajal, en relación con la atención.

Además de los dispositivos puramente neurales de regulación, han venido a identificarse en años recientes un buen número de influencias de orden humoral sobre los elementos sensoriales. (ver Aréchiga y Alcocer, 1969).

El empleo de mecanorreceptores tegumentarios para evaluar influencias de tipo humoral, no es reciente; Loewenstein y Altamirano-Orrego (1956) evaluaron la influencia de las catecolaminas, particularmente de la epinefrina, sobre la actividad de estos elementos sensoriales, encontrando que esta substancia provoca un aumento en la actividad de los receptores. Otros autores ulteriormente (ver Chernetski, 1964; Aréchiga y Alcocer 1969) han descrito influencias simpático-adrenales sobre otros receptores.

En invertebrados, se ha demostrado la presencia de diversos mecanismos moduladores de la actividad eferente (ver Aréchiga, H., 1974).

MODULACION SENSORIAL EN CRUSTACEOS

En este grupo zoológico se han descrito diversos mecanismos de regulación de la actividad sensorial.

A. Modulación de neuronas de una modalidad sensorial, por neuronas de otra vía eferente.

En el pedúnculo óptico de los crustáceos decápodos, (ver Wiersma y Yamaguchi, 1967), se encuentra un grupo de interneuronas que responden a estímulos visuales como son la intensidad de luz o el movimiento de objetos, pero lo hacen de manera diferente a estímulos de la misma intensidad, según la postura en la que se encuentre el animal, existiendo incluso una posición a la cual cesa toda respuesta.

Esta influencia moduladora es conducida posiblemente por fibras presentes también en el pedúnculo óptico, y que reciben información de los estatocistos acerca de la posición corporal. La extirpación de dichos órga-

nos elimina la acción moduladora, y entonces las interneuronas visuales responden a la estimulación visual con la misma intensidad, independientemente de la posición del cuerpo.

B. Modulación de interneuronas sensoriales por acción de neuronas motoras.

En el acocil, se ha caracterizado la influencia de neuronas motoras sobre la descarga de interneuronas táctiles. Mediante registros intracelulares, se ha identificado que la excitación de motoneuronas induce un potencial hiperpolarizante que contrarrestaría una despolarización debida a inhibición presináptica, facilitando así la transmisión aferente a ese nivel (Krasne y Bryan, 1973).

Resulta por lo tanto evidente, que los mecanismos de regulación eferente participan en funciones tan importantes como la regulación del flujo de información de esa información, según la actividad concurrente en vías sensoriales vecinas y según el estado conductual del organismo en un momento dado.

C. Modulación hormonal

La acción moduladora que el sistema nervioso del crustáceo ejerce sobre la actividad eferente, no queda restringida a los canales neurales, sino que comprende también una rica gama de influencias humorales que actúan a diferentes niveles (ver Aréchiga y Fuentes Pardo, 1974).

La sensibilidad visual por ejemplo, está modulada por el movimiento de gránulos pigmentarios de cuya posición depende la cantidad de luz que incide sobre los fotorreceptores. Uno de estos efectores pigmentarios, el llamado pigmento retiniano distal, parece estar regulado por vía exclusivamente humoral, ya que a esas células no llegan fibras nerviosas, y en cambio se sabe que el sistema neuroendocrino de diversas especies de crustáceos produce una hormona de naturaleza peptídica, que promueve la migración de ese pigmento hacia la posición de adaptación a la luz] (ver Kleinholz, 1966). Hay datos sugerentes de la existencia de otra neurohormona capaz de inducir la migración hacia la posición de adaptación a la obscuridad] (ver Fingerman, Krashow y Fingerman, 1971). El pigmento retiniano proximal, también es sensible a la acción hormonal, aunque además parece comportarse como efector independiente. El registro simultáneo de la actividad eléctrica de los fotorrecepto-

res y de la posición de los pigmentos retinianos accesorios muestra que la inyección de extractos de distintas áreas del sistema nervioso, y particularmente de la glándula sinusal (ver p. 9) produce depresión de la respuesta retiniana paralela a la migración pigmentaria hacia la posición de adaptación a la luz (ver Aréchiga y Fuentes-Pardo, 1970).

Además del sistema visual, la acción humoral de productos de neurosecreción se extiende a otras esferas de la integración sensorial, como es la existencia de una neurohormona moduladora de la actividad locomotriz en crustáceos; postulada desde la demostración de que la ablación de los pedúnculos oculares, altera el patrón locomotor, trastorno corregido al inyectar extractos de los órganos extirpados. Este fenómeno ocurre en gran variedad de especies (ver Aréchiga y Naylor, 1976). La actividad sensorial es también afectada por la inyección de dichos extractos, que abaten la locomoción (ver Aréchiga, Fuentes y Barrera, 1973; Aréchiga, 1974). La inyección de extractos de tallo ocular produce también una prolongada depresión del régimen de descarga tónica de las fibras de actividad. [La neurohormona que da lugar a esta depresión neuronal, ha sido identificada como un péptido termoestable, dializable, inactivable por

tripsina y de bajo peso molecular] (ver Aréchiga, Huberman y Naylor, 1974).

CARACTERIZACION DE LA HORMONA NEURODEPRESORA

Para este péptido se postuló el nombre de Hormona Neurodepresora (ver Aréchiga, Huberman y Martínez-Palomo, 1977), por presentar las siguientes propiedades.

Es sintetizado por un conjunto de neuronas conocido como Organo X, que se localiza en la médula terminal del tallo ocular (figura 1). Se transporta por vía axónica, almacenándose en forma de gránulos en terminales neurosecretoras de un órgano neurohemal, la glándula sinusal, localizada entre la médula interna y la médula externa. En este órgano se encuentra la mayor concentración de este péptido; el cual existe también aunque en menor cantidad en el ganglio supraesofágico y los ganglios torácicos y abdominales (ver Aréchiga, Cabrera-Peralta y Huberman, 1979). Para su liberación requiere de la depolarización de las fibras neurosecretoras que las contienen, ejerciendo su acción sobre neuronas distantes al sitio de liberación (ver Aréchiga, Huberman y Martínez-Palomo, 1977). En condiciones basales se encuentra a una concentración elevada en la sangre -

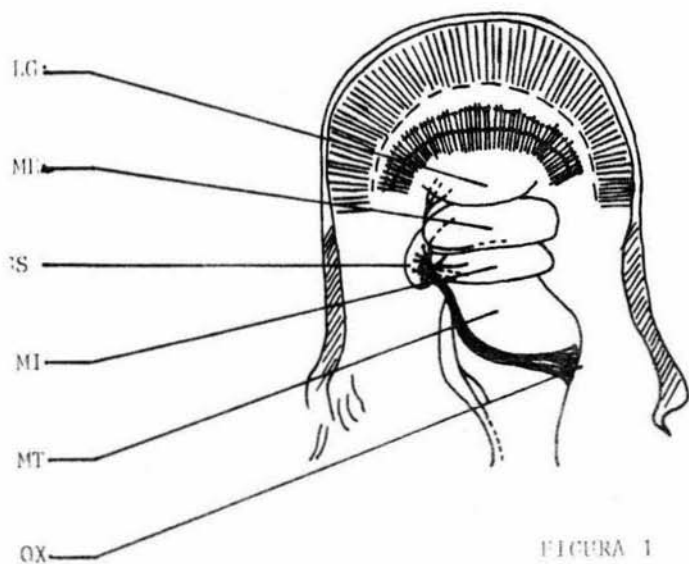


FIGURA 1

ME: Médula externa
GS: Glândula sinusal
MI: Médula interna
MT: Médula terminal
OX: Organo X

(ver Aréchiga, Cabrera-Peralta y Huberman, 1979). Su acción sobre las neuronas efectoras es prolongada, con una vida media mayor a veinticuatro horas.

MECANISMO DE ACCION DE LA HORMONA NEURODEPRESORA

Con base en observaciones hechas en un grupo de motoneuronas de los músculos flexores superficiales del abdomen del acocil Procambarus bouvieri, se ha postulado como un posible mecanismo de acción de la Hormona Neurodepresora, la activación de una bomba de sodio (ver Anaya, Villanueva y Aréchiga, 1977). La caracterización del mecanismo de acción de la Hormona Neurodepresora, se hizo determinando la frecuencia de descarga a diferentes temperaturas (entre 10 - 24°C), tanto en ganglios con solución salina normal, como con soluciones con bajo contenido de potasio (0 - 5mM) o incubadas con ouabaina a diferentes concentraciones (10^{-3} - 10^{-7} M). Para caracterizar el bombeo electrogénico, se tomaba como criterio, que al bloquearlo por cualquiera de estas maniobras, aumentaría la frecuencia de descarga, sobre todo a temperaturas elevadas; observándose que el efecto de la Hormona Neurodepresora se reducía hasta en un 90% a temperaturas elevadas y que la ouabaina a concen-

tración de 10^{-4} M suprimía el efecto neurodepresor. Últimamente, se ha analizado mediante registro intracelular en el axon gigante medial del acocil, una hiperpolarización inducida por Hormona Neurodepresora y bloqueable por ouabaína, ausencia de potasio en el medio extracelular y sustitución de sodio por litio (ver Aceves y Aréchiga, 1979). Dicho efecto depresor también es bloqueado por cafeína o teofilina, o bien por dibutiril - AMPcíclico, siendo imitado por dibutiril GMPcíclico, sugiriéndonos la participación de estos nucleótidos cíclicos, en el mecanismo de acción de esta hormona (ver Aréchiga y Huberman, 1980).

HIPOTESIS

Sabemos que las hormonas peptídicas presentan funciones biológicas claramente diferenciadas y sus dimensiones varían desde unos cuantos aminoácidos como el dipéptido o el tripéptido Hormona Liberadora de Tirotrópiva (TRH) hasta polipéptidos que contienen aproximadamente unos 39 aminoácidos como la Hormona Corticotrófica (ACTH), presentando su estructura química notables coincidencias. Como ejemplos de ello:

La hormona de crecimiento posee 189 a 191 restos de aminoácidos y dos puentes disulfuro. La prolactina posee 198 restos y tres puentes disulfuro, dos de los cuales están situados dentro de la molécula, en una posición similar a la que ocupan los dos puentes de la hormona de crecimiento. Existe una cierta homología (conservación de una secuencia idéntica de aminoácidos) entre estas dos hormonas, y la mayor parte de las diferencias son moderadas respecto a la funcionalidad de la cadena lateral (los aminoácidos polares están situados en posiciones similares dentro de la secuencia de aminoácidos).

Hormona Luteinizante (LH), Hormona Tirotrófica (TSH) y Hormona Foliculo estimulante (FSH) son proteínas poliméricas que pueden ser fácilmente dissociadas en dos subunidades distintas, llamadas α y β . La subuni

dad β es la que determina la especificidad hormonal. Esto se demostró recomblando las subunidades α y β de hormonas diferentes (ver Turner, y Bagnara, 1971); en cada caso, la proteína híbrida presentaba el carácter hormonal de la hormona de la cual procedía la subunidad β . Estas dos subunidades son glucoproteínas, es decir, que contienen carbohidratos.

La secuencia completa de aminoácidos de la α -MSH es idéntica a la de los trece primeros aminoácidos (a partir del N-terminal) del total de treinta y nueve aminoácidos que componen el polipéptido ACTH.

La oxitocina y la ADH poseen nueve aminoácidos cada una, con un puente disulfuro entre los restos 1 y 6.

Estas similitudes en estructura sugieren la existencia de un origen evolutivo común. La comparación entre las estructuras primarias de una determinada hormona peptídica procedente de varias especies distintas pone de manifiesto una gran homología, lo cual sugiere que las partes esenciales de la estructura que se precisan para la actividad biológica se han ido conservando a lo largo de la evolución.

Se ha observado que mientras las hormonas homólogas de los vertebrados "superiores" pueden interactuar con receptores y provocar respuesta en vertebrados "in-

feriores"; siendo el caso inverso, observado con menos frecuencia.

En el presente estudio se trata de ver la probable acción moduladora de una hormona producida por un invertebrado, sobre un vertebrado. Siendo la hipótesis de trabajo la siguiente:

Dado que la Hormona Neurodepresora modula la actividad de los elementos aferentes en crustáceos, se decide explorar este mismo efecto modulador de dicha hormona, sobre elementos aferentes de un vertebrado (Rana pipiens).

Para este fin se escogió a los mecanorreceptores de la piel de rana que presentan las siguientes propiedades.

ORGANIZACION FUNCIONAL DE LOS MECANORRECEPTORES DE LA PIEL DE LA RANA

Las primeras referencias generales sobre la descripción de axones, tanto mielínicos como amielínicos, entrando a la dermis y formando un plexo superficial y uno profundo, fueron los estudios hechos por Eberth y Bunge (1893) y Echer y Wiedersheim (1904), en los cuales encontraba que dichos axones emergen de estos ple-

xos y se ramifican, perdiendo su mielina y terminando como terminaciones nerviosas libres en capas: epidérmica y dérmica.

Por otra parte, Steinach (1896) encontró que estimulando mecanoreceptores del dorso de la rana, se obtenían pequeñas deflexiones en un galvanómetro conectado a través de los nervios dorsales cutáneos.

La preparación piel-nervio utilizada por Steinach fue estudiada con más detalle por Adrian (1926, 1928) - quien realizó estudios comparativos, al realizar registros de los nervios cutáneos de ranas y gatos. Estos estudios fueron proseguidos por Adrian para obtener mayor información sobre los arcos reflejos de estos anuros, usando la activación de receptores cutáneos del dorso y de las extremidades posteriores, como la entrada sensorial de los arcos (ver Morgan, 1922).

Desde el punto de vista morfológico, entre los distintos tipos de receptores de anfibios, en la segunda mitad del siglo XIX, se incluían terminales de varias categorías (ver Gaupp, 1904), y encapsulaciones táctiles (ver Merckel 1880; Nafstad y Baker, 1973), así como también terminales nerviosas en unión con músculo liso y tejido granular. En los primeros estudios anatómicos de estas terminales se encontró una distribución di

fusa a través de la capa más superficial de la dermis y la penetración de algunas terminales en la epidermis. Con estudios más recientes se ha esclarecido considerablemente esta estructura (ver Ackerman, 1932; Whitear, 1955; Bolgarski, 1964), encontrándose que las terminales dérmicas son de dos tipos: terminaciones nerviosas libres, que se distribuyen en la profundidad de la dermis y terminan en unión con vasos sanguíneos de esta región; y terminales en punta o encapsuladas, las que forman distintas estructuras más superficiales en la dermis superior (figura 2).

Es comúnmente supuesto que las terminaciones nerviosas en la epidermis responden a estímulos táctiles; mientras que las terminaciones dérmicas, participan en las sensaciones de presión constante, al igual que las de calor y frío.

La rama dorsal cutánea (rami cutanei dorso medialis) de las raíces sensoriales de los niveles espinales 2 a 8, se encuentran en el dorso entre el latissimus y dorsi longissimus. Cada nervio viaja como una rama de fibras aferentes a través del espacio dorso linfático - por distancia de unos centímetros a la piel. Siendo el dorso abastecido por 4 a 8 pares de nervios dorsales cutáneos, cada uno inervando un 20% de la superficie -

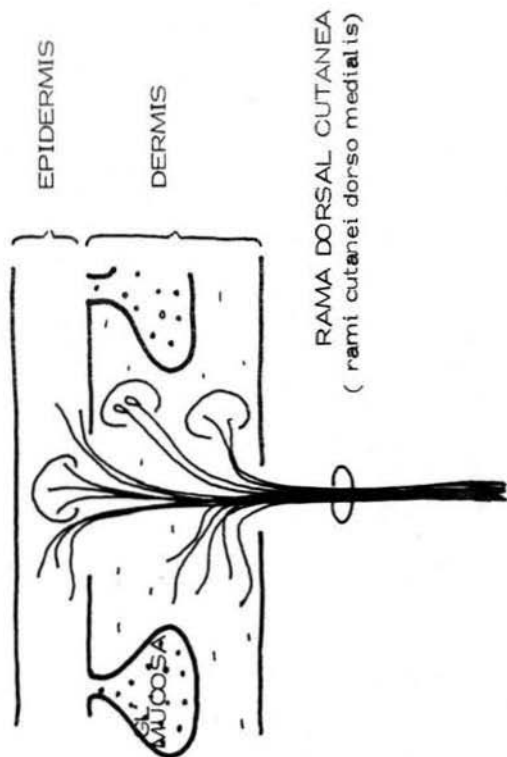


FIGURA 2
Distribución de los diferentes
tipos de terminales nerviosas.

dorsal de la piel, siendo dicho porcentaje más pequeño en la región ventral (ver Adrian, 1931; Verveen, 1962). Estos campos receptivos varían en área y se superponen unos con otros (ver Habgood, 1950; Verveen, 1963; Lindbloom, 1958). (Figura 3)

Spray y Chronister (1974) hicieron registros extracelulares de dichos nervios dorsales cutáneos, obteniendo potenciales de acción de diferentes tamaños, dependientes del diámetro del axón (ver Adrian y cols., 1931; Mathews, 1929).

Catton (1958), clasifica a los mecanorreceptores en la piel de la rana, dependiendo de la amplitud de la espiga y su velocidad de conducción:

- a.- amplitud de espiga $400\mu V$; velocidad 25m/seg.
- b.- espigas 200 - $300\mu V$; velocidad 10 a 15 m/seg.
- c.- espigas 100 - $150\mu V$; velocidad 5 a 10m/seg.
- d.- espigas menores $100\mu V$; velocidad 0.1 a 0.3m/seg.

Estas son algunas de las características por las que los mecanorreceptores cutáneos en la piel de la rana constituyen un sistema fácil de abordar para estudios de fisiología sensorial.

Por otra parte, el que se les haya descrito una mo

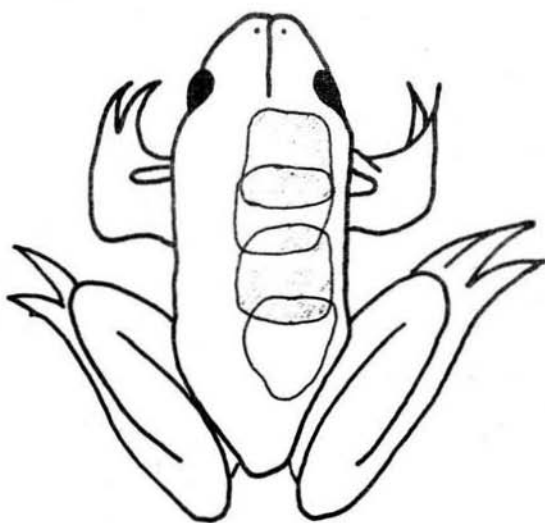


FIGURA 3

Campos receptivos de cuatro nervios dorsales cutaneos unilaterales en Rana pipiens. Dichos se sobreponen innervando areas en la piel.

(Habgood, 1950; Verveen, 1963)

dulación hormonal adrenérgica (Loewenstein y Altamirano-Orego, 1956), sugiere una posible susceptibilidad a otros agentes humorales y por tanto hace plausible la posibilidad de que, de haber receptores a péptidos hormonales en la rana pudieran encontrarse en esta zona.

OBJETIVOS

Dados los antecedentes mencionados, se plantea la presente tesis, con dos objetivos fundamentales:

I.- Caracterizar la respuesta eléctrica de los mecanorreceptores de la piel de la rana.

II.- Analizar el efecto de la Hormona Neurodepresora, - extraída del tallo ocular del crustáceo, sobre la respuesta a estímulos mecánicos, de los mecanorreceptores cutáneos de la piel de rana.

MATERIAL Y METCDO

PREPARACION BIOLOGICA PARA REGISTRO

Los experimentos fueron hechos en Rana pipiens sin distinción de sexo y edad durante el otoño y el invierno de 1980.

Se destruía el sistema nervioso central de la rana, se aislaba el tercer nervio dorsal cutáneo derecho (figura 4) junto con una zona circundante de piel de aproximadamente 1.5 centímetros de diámetro. Esta preparación se colocaba en una cámara de lucita de 1 cm³ de capacidad, quedando la piel sobre una pequeña cúpula de sylgard, a la cual se fijaba con minucias, como se muestra en la figura 5.

Para regular el grado de estiramiento al que se sometía la piel, al colocarse en la cámara en el inicio del estudio, se procuraba no estirarla tanto, que se registrara actividad espontánea en el nervio. Dicha actividad bajo condiciones de estiramiento extremo ha sido descrita por Loewenstein (1956).

La preparación se mantuvo en solución Ringer, a temperatura ambiente (18-20°C).

Durante la evaluación del efecto de la Hormona Neurodepresora sobre los mecanorreceptores de la piel de la rana, la solución de la cámara se recambiaba por so-

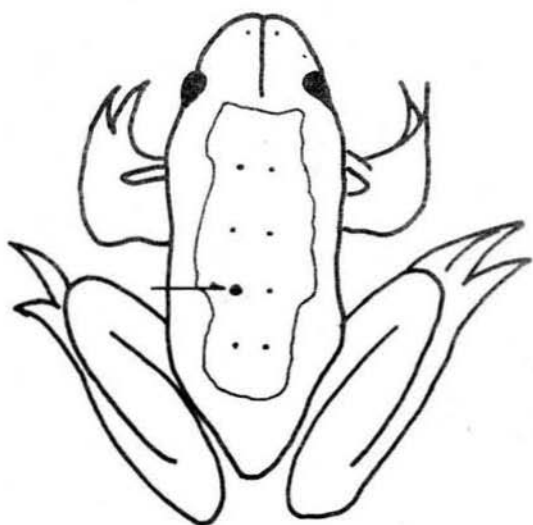


FIGURA 4

tercer nervio dorsal cutaneo

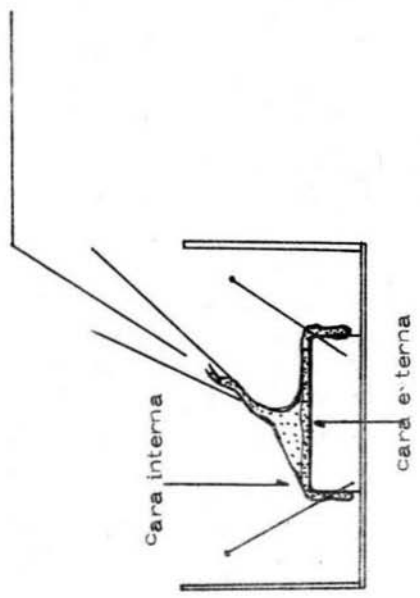


FIGURA 5

lución Ringer con Hormona Neurodepresora. Una vez evaluado el efecto, se lavaba la preparación con solución Ringer.

PREPARACION DE LA HORMONA NEURODEPRESORA

La Hormona Neurodepresora empleada para este estudio, se obtenía por el siguiente procedimiento:

La Hormona Neurodepresora era purificada de tallos oculares de camarón de la especie Penneus vanamei, los cuales eran homogenizados, tratados con acetona y cloroformo, y resuspendidos en solución Van Harreveld, centrifugados a 900 x g. por diez minutos. El sobrenadante (porción que contiene la substancia activa) era pasado sucesivamente a través de columnas de Sephadex G-25 y G-15. De las fracciones que contenían la hormona, se tomaron alícuotas para análisis en espectrofotómetro de absorción atómica para determinar la cantidad de sodio y potasio que contenían. Posteriormente se liofilizaba para su mejor almacenamiento, tomándose de este producto las muestras (que eran resuspendidas en solución Ringer), para el estudio a realizar.

| | |
|-------------------------------|------------------------------|
| TEJIDO NERVIOSO | HEMOLINFA |
| DISECCION | EXTRACCION |
| HOMOGENIZACION | PRECIPITACION DE PROTEINAS |
| EXTR. EN ACETONA Y CLOROFORMO | CALENTAMIENTO (75°C/5 min.) |
| CALENTAMIENTO (75°C/5 min.) | CENTRIFUGACION (900g/5 min.) |
| CENTRIFUGACION (900g/5 min.) | LIOFILIZACION |
| SEPHADEX G-25 | SEPHADEX G-25 |
| LIOFILIZACION | LIOFILIZACION |
| SEPHADEX G-15 | SEPHADEX G-15 |
| LIOFILIZACION | LIOFILIZACION |
| OBTENCION DE HND | OBTENCION DE HND. |

BIOENSAYO

FIGURA 6: Procedimientos seguidos para la obtención de
 Hormona Neurodepresora del sistema nervioso
 y de hemolinfa.

Tomado de " Tesis de Cabrera Peralta, C.

SOLUCION RINGER

| | | |
|----------------------|----------|---------|
| Dextrosa | 11.10 mM | (Baker) |
| Cloruro de sodio | 115 mM. | (Baker) |
| Cloruro de magneio | 20mM. | (Baker) |
| Cloruro de potasio | 2mM. | (Baker) |
| Cloruro de calcio | 10mM. | (Baker) |
| Bicarbonato de sodio | 2mM. | (Baker) |

Al final se agregaba el cloruro de calcio disuelto, para evitar la precipitación de las demás sales. Después de preparar la solución salina, se medía el pH de la solución y se ajustaba a 7.5.

BIOENSAYO DE HORMONA NEURODEPRESORA

La actividad de la Hormona Neurodepresora fue calibrada por bioensayo electrofisiológico en la preparación del tensorreceptor abdominal del acocil Procambarus clarkii (ver Aréchiga, Fuentes y Barrera, 1973). Siendo el material resuspendido en un mililitro de solución Ringer.

SISTEMA DE ESTIMULACION

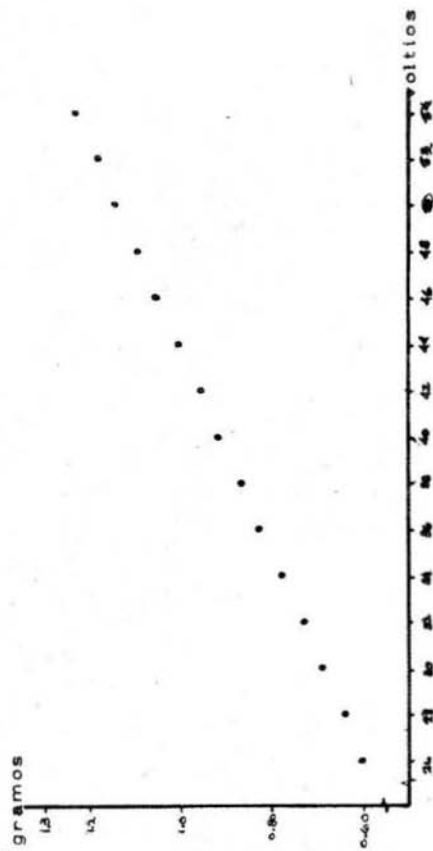
Los pulsos de estimulación se aplicaban por medio de un estimulador Grass (Modelo S-8), a cuya salida estaba conectada una bobina, la cual, al paso de la corriente generaba un campo magnético alterno que atraía o repelía una ceja metálica con la frecuencia e intensidad del pulso. A esta ceja estaba unido un estilete de vidrio con la punta finamente redondeada y que a consecuencia de dicha atracción o repulsión, se movía verticalmente aplicándose de esta manera estímulos a la cara interna de la piel de la rana.

La intensidad de estimulación se calibró comparando el desplazamiento del estilete con el producido con pesas conocidas (ver gráfica 1).

SISTEMA DE REGISTRO

La actividad eléctrica de los mecanorreceptores fue registrada extracelularmente a través de un electrodo de aspiración, conectado mediante un adaptador a un preamplificador Grass (Modelo P-5). A la salida de éste se conectó un osciloscopio Tektronix (Modelo 5115) en el que se registraba la señal. La respuesta era enviada en paralelo a un Audiomonitor Grass (figura 7).

CALIBRACION DEL ESTIMULADOR



GRAFICA 1

SISTEMA DE REGISTRO

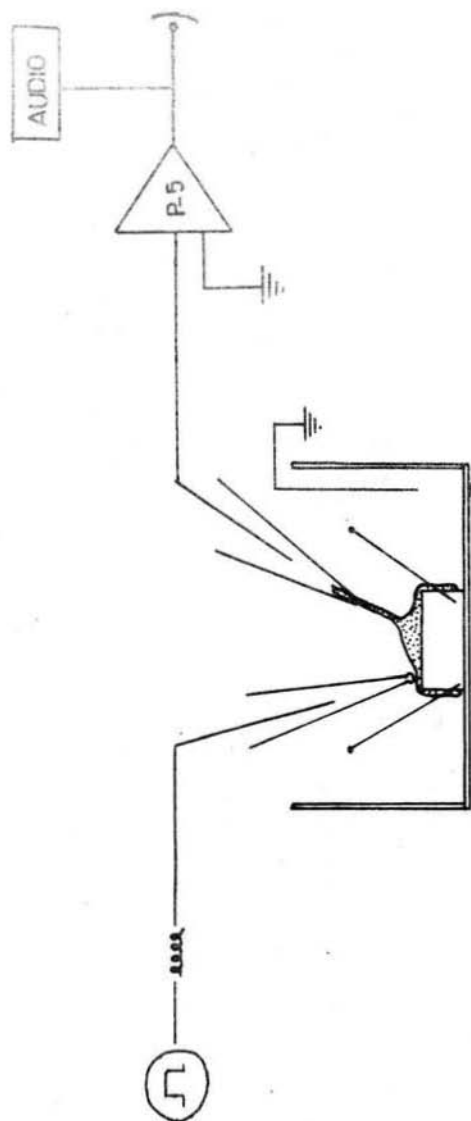


FIGURA 7

RESULTADOS

Parte I

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA ELECTRICA DE LOS MECANORRECEPTORES CUTANEOS

Como ya se mencionó, los mecanorreceptores tegumentarios poseen velocidades de conducción diferentes dependiendo del diámetro de los axones (ver Spray, 1974). Por otra parte se ha demostrado que la respuesta sensorial - en estos receptores, está relacionada con el tamaño y la velocidad de conducción (ver Mathews, 1929). Estos criterios, así como la amplitud de las espigas producidas - por la activación de los mecanorreceptores, han permitido su clasificación (ver Catton, 1958), y son por ello características establecidas que permiten valorar la magnitud de la respuesta sensorial.

Otro de los parámetros indispensables en el estudio de la respuesta, es la latencia. El incremento en la intensidad del estímulo mecánico o eléctrico conlleva - una reducción apreciable en la latencia (ver Catton, - 1966). En estudios previos se han encontrado valores - para la latencia de entre 1.4 y 4.3 mseg.

Catton (1961) observó que la intensidad de estimulación necesaria para activar a estas neuronas sensoriales

(intensidad umbral) presenta fluctuaciones estocásticas en el tiempo, aunque no existen datos precisos acerca de la magnitud de estos cambios.

Las consideraciones anteriores nos proporcionan los parámetros necesarios para realizar una evaluación de las características funcionales en nuestra preparación y con nuestros sistemas de estimulación y registro.

La figura 8 ilustra cómo la aplicación de intensidades crecientes de estimulación provoca diversas respuestas eléctricas de los mecanorreceptores de la piel de la rana. En la figura mencionada pueden apreciarse espigas con diferentes latencias, las que se explican, como hemos visto, por la existencia de distintos umbrales y velocidades de conducción axónica. Al mismo tiempo, el aumento en el estímulo mecánico produce la aparición de nuevas espigas que probablemente son de tipo unitario, así como de potenciales compuestos. Las respuestas unitarias han sido juzgadas como tales dado que sus duraciones (aproximadamente 1 a 2 mseg.) corresponden a la duración característica de potenciales de acción de fibras únicas; por otra parte, su magnitud se mantiene constante a pesar del aumento de la intensidad de estimulación, características que no se hayan presentes en los potenciales compuestos.

El empleo de patrones regulares de estimulación cada diez segundos e intensidades que de entre 0.52 a 1.20 gramos nos permitió observar la relación existente entre la latencia y la intensidad de estimulación. La gráfica 2 muestra esta relación para dos distintas preparaciones; como puede apreciarse, es posible detectar diversas unidades caracterizables por sus umbrales y latencias (en todos los experimentos realizados en la presente tesis, el número máximo de unidades encontradas fue de entre cinco y seis). Para prácticamente todas las unidades, la latencia se reduce a medida se aumenta la intensidad del estímulo, pudiéndose apreciar una reducción de tipo exponencial. Como hemos mencionado, el aumento en la intensidad de la estimulación provoca la aparición creciente de nuevas espigas. La gráfica 3 muestra la relación entre el número de espigas y la aplicación de estímulos de distintas intensidades. En esta gráfica conviene hacer notar que cada unidad presentó umbrales perfectamente definidos, lo que es de gran importancia para el estudio que en esta tesis se realizó.

Mediante la aplicación de una frecuencia de estimulación de seis estímulos por minuto, se procedió a estudiar la magnitud de las fluctuaciones estocásticas en el umbral, descritas previamente (ver Catton, 1961). La -

gráfica 5 muestra las variaciones en el umbral encontradas a lo largo de dos horas de observación. El umbral se mantuvo prácticamente constante durante los 80 primeros minutos de observación, modificándose de manera notable después de este tiempo. Esta información es de gran importancia, puesto que el umbral es uno de los parámetros a los que mayor atención se dio en el presente estudio. En la figura 9 se muestran varios trazos superpuestos con los que se ilustra que a una intensidad de estimulación dada (intensidad umbral), corresponden respuestas reproducibles en todos los casos, cuando la observación se hace durante los primeros 80 minutos.

Los resultados que se muestran en esta sección nos indican que la caracterización de la respuesta eléctrica de los mecanorreceptores tegumentarios de la rana, arroja datos similares a los ya descritos en la literatura (ver Mathews, 1929; Catton, 1958; 1961; 1966; Spray 1974).

Nuestros resultados muestran la actividad de entre cinco y seis unidades dependiendo de la intensidad de la estimulación aplicada.

Al aumentar la intensidad del estímulo por encima del umbral fue posible excitar fibras con espigas más pequeñas. Las diferencias en las latencias corresponden

también a las ya descritas por los autores citados, especialmente en cuanto a su relación con las intensidades de estimulación.

A pesar de que el umbral del receptor varía estocásticamente en el tiempo se puede precisar un período estable en los primeros 80 minutos con mínimas variaciones.

Dado que el objetivo central de esta tesis es el estudio de la influencia de la Hormona Neurodepresora de los crustáceos sobre la actividad eléctrica de estos mecanorreceptores, con base en las propiedades que se acababan de mencionar, se probó el estudio de posibles modificaciones inducidas por la mencionada neurohormona.

Parte II

EFFECTO DE LA HORMONA NEURODEPRESORA DE LOS CRUSTACEOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE MECANORRECEPTORES CUTANEOS DE LA RANA

En esta parte se analiza el efecto de la Hormona Neurodepresora sobre las citadas neuronas sensoriales, para la cual se emplearon distintas concentraciones de Hormona Neurodepresora (HND) parcialmente purificada. (Ver método)

Como se ha visto, la Hormona Neurodepresora posee un amplio efecto depresor en el sistema nervioso de los crustáceos. La pregunta que se plantea en esta sección es si este neuropéptido tiene influencia sobre la actividad de células nerviosas en una especie evolutivamente más avanzada. Con base en lo anterior, se decidió estudiar la influencia de esta sustancia en los mecanorreceptores de la piel de la rana.

INFLUENCIA DE LA HORMONA NEURODEPRESORA SOBRE LOS MECANORRECEPTORES TEGUMENTARIOS DE LA RANA

La primera etapa del estudio consistió en evaluar de manera muy general el efecto de la Hormona Neurodepresora; para ello se realizó el experimento que se muestra en la gráfica 6. Utilizando un patrón de estimulación constante de seis estímulos por minuto a una intensidad umbral, se determinó la proporción de estímulos que producían respuesta, comparándola con la de aquéllos que no la producían (fallas). Al aplicar Hormona Neurodepresora a concentraciones distintas ($5 \times 10^{-8} \text{M}$; $7.5 \times 10^{-8} \text{M}$; y $1 \times 10^{-7} \text{M}$), se encontró un aumento en el número de fallas de las unidades con menor umbral. El efecto es dependiente de la concentración (gráfica 6), encontrándose un

efecto detectable con una concentración de 5×10^{-8} m (siendo esta concentración la mínima necesaria para deprimir la actividad de motoneuronas identificadas en la cadena ganglionar abdominal del acocil Procambarus bouvieri. - (Ver Aréchiga, Cabrera-Peralta y Huberman, 1979). Como puede observarse en la figura 10, el efecto es totalmente reversible al lavar la preparación. Al parecer, el efecto es sobre el umbral, puesto que la aplicación de intensidades mayores de estimulación, permite que la respuesta eléctrica se manifieste aún en presencia de Hormonas Neurodepresora (figura 10 parte C).

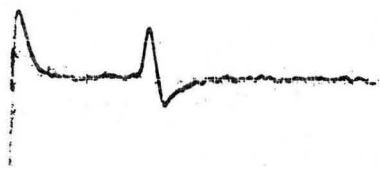
INFLUENCIA DE HORMONA NEURODEPRESORA SOBRE EL UMBRAL

Con el fin de cuantificar aun de manera aproximada la magnitud del efecto de la Hormona Neurodepresora, se realizó el experimento que se muestra en la parte inferior de la gráfica 7. En esta figura se ilustra cómo la Hormona Neurodepresora aplicada a la concentración 1×10^{-7} , modifica el umbral de una forma importante, teniendo que producir aumentos de hasta 0.07 gramos.

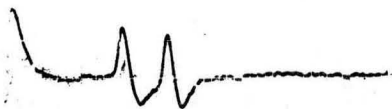
Las modificaciones al umbral inducidas por la Hormona Neurodepresora son reversibles, pues después del lavado se recobra el umbral inicial, como puede observarse

en la parte superior de la gráfica 7, ya que la latencia se recupera íntegramente para la intensidad umbral inicial.

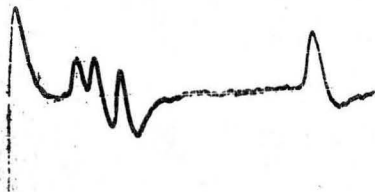
Con el fin de confirmar que el cambio observado en el umbral es atribuible a la Hormona Neurodepresora, se realizaron experimentos similares a los anteriores pero en presencia de Hormona Neurodepresora inactivada. Dado que este péptido es susceptible a la acción de enzimas proteolíticas, ha sido mostrado con anterioridad (ver - Aréchiga, Huberman y Martínez-Palomo, 1977), que la tripsina anula su efecto neurodepresor. Con base en lo anterior, se realizó el experimento que se ilustra en la gráfica 8. Evaluando el número de fallas se puede ver cómo la aplicación de Hormona Neurodepresora induce un aumento del 70% en el número de fallas; efecto claramente reversible, mientras que la Hormona Neurodepresora tratada con tripsina (3mg. de tripsina incubados a 35°C durante 15 minutos. La enzima era luego inactivada por calentamiento a 75°C por diez minutos). La Hormona Neurodepresora tratada de esta manera no induce modificaciones en la ocurrencia de fallas.



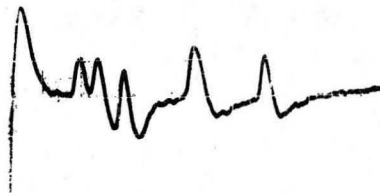
0.62gr.



0.66gr.



1.061gr.

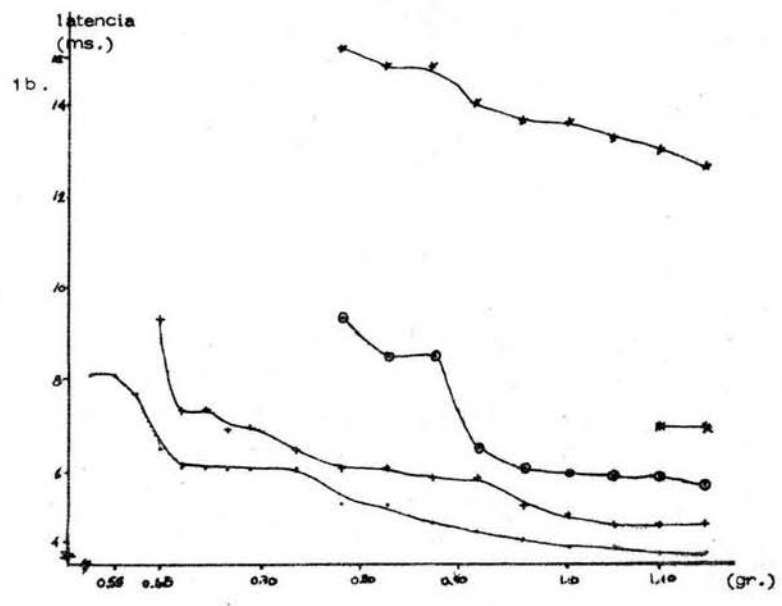
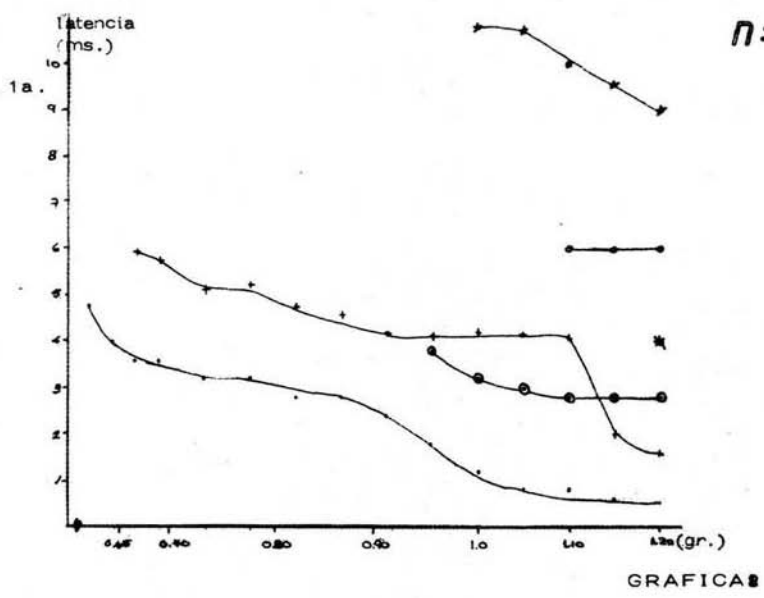


1.108gr.

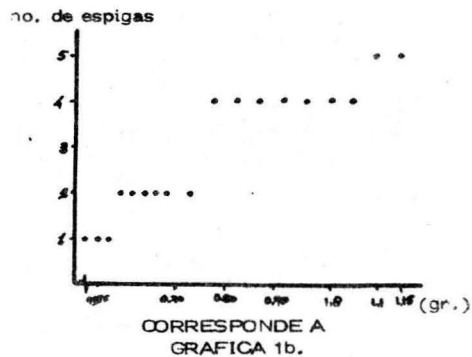
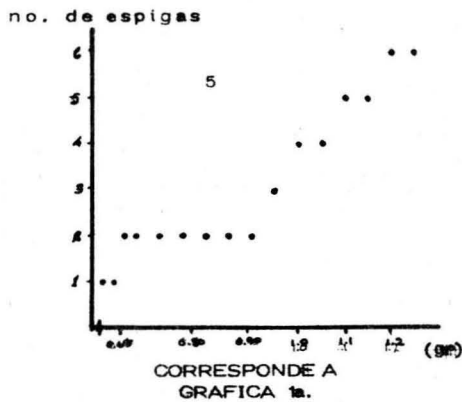
0.2v.
2ms.

FIGURA 8
Aplicación de intensidades
crecientes de estimulación.

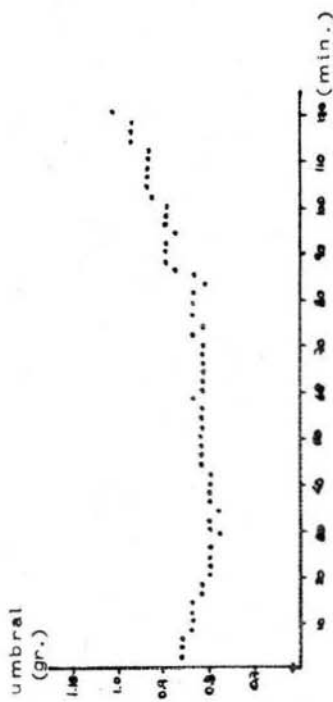
$n=4$



$n=4$



GRAFICA 8



GRAFICA 5

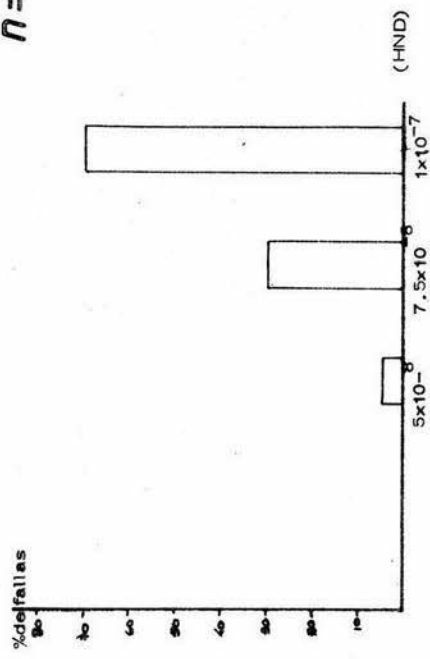


50mV.
.5ms.

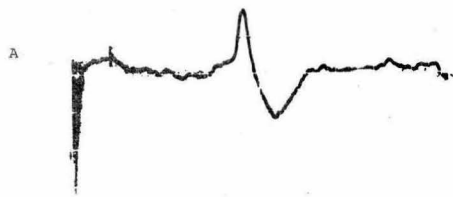
FIGURA 9

Trazos superpuestos
a una intensidad umbral.

$n=5$



GRAFICA 6



1.15gr.
TESTIGO



1.15gr.
($1 \times 10^{-7} M$)



1.22gr.



RECUPERACION
1.15gr.

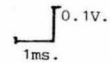
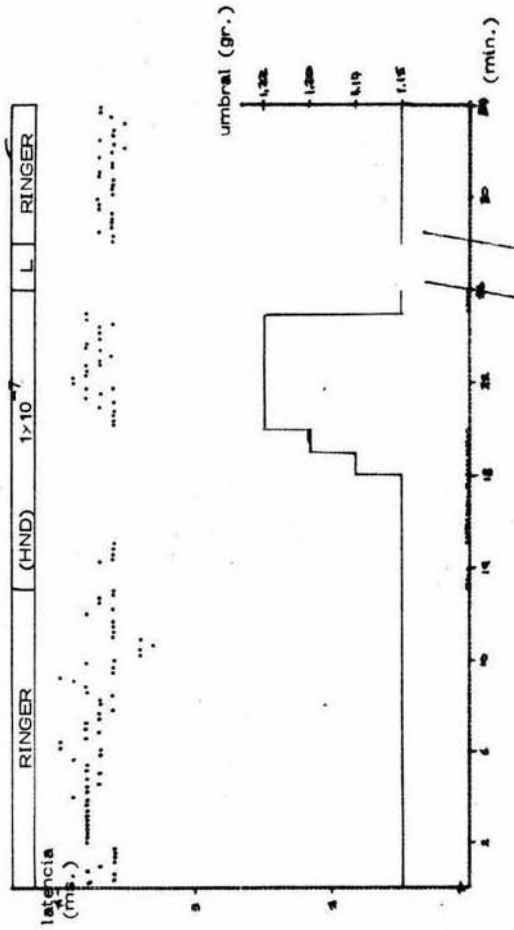


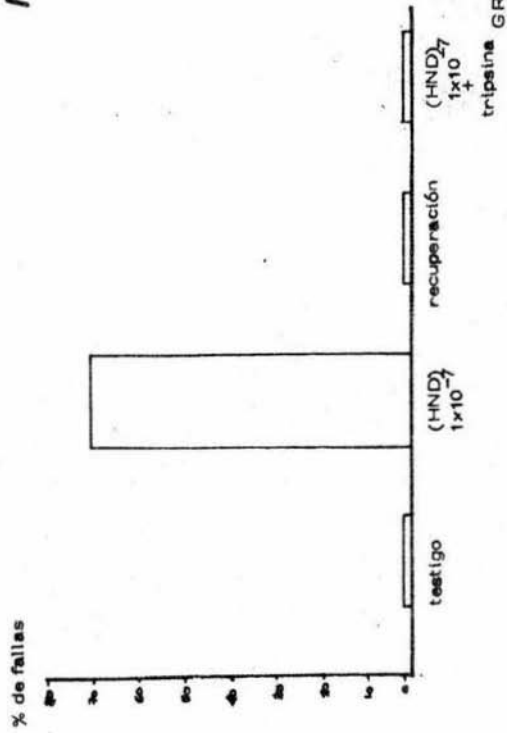
FIGURA 10
Efecto de la Hormona Neurodepresora
sobre el umbral.

$n = 3$



GRAFICA 7

$n = 5$



DISCUSION

Según los resultados expuestos la hormona neurodepresora afectaba la actividad eléctrica de los mecanorreceptores tegumentarios de la rana elevando el umbral de respuesta, para lo cual la explicación que por nuestra parte proponemos, es que el efecto que se observa es debido a la persistencia en el sitio del tejido afectado del receptor químico a la Hormona Neurodepresora a través de la evolución. Como ha sucedido con los receptores colinérgicos, que como se sabe existen en las distintas especies de la escala zoológica.

Hay datos en vertebrados que apoyan nuestros resultados como son los cambios inducidos por la Hormona Neurodepresora en células nerviosas de vertebrados en cultivo (Aréchiga, comunicación personal); y los registros en sistema nervioso de gato en que la Hormona Neurodepresora induce cambios semejantes a los producidos por opiáceos (ver Pacheco, Muzquiz y Aréchiga, 1978).

En la primera parte de los resultados presentados en esta tesis, se caracterizaron algunas propiedades electrofisiológicas de los mecanorreceptores tegumentarios de la piel de la rana. Estos resultados fueron concordantes con los ya descritos en la literatura.

Se observa claramente en la figura 5, que la latencia de las respuestas de estas neuronas sensoriales, disminuye al aumentar la intensidad de la estimulación, de manera análoga es lo descrito por Catton (1958).

En la gráfica 3, por otra parte, se observó una relación directa entre la intensidad de la estimulación y el número de espigas registradas. Estas espigas eran, bien de tipo unitario (su amplitud no crecía con el aumento de intensidad), y además, espigas compuestas (aumentaban de tamaño con el aumento de la intensidad de la estimulación).

Se encontró también que el umbral de los mecanorreceptores, presentaba un período estable dentro de los primeros ochenta minutos, encontrándose mayores variaciones, después de este lapso de tiempo.

En la segunda parte, estudiamos el efecto de la Hormona Neurodepresora del crustáceo, en las propiedades eléctricas de los mecanorreceptores de la piel de la rana. Dicho neuropéptido eleva el umbral de la respuesta de los mecanorreceptores, no pudiéndose atribuir dicho efecto a

los cambios estocásticos del umbral, dado que los experimentos fueron realizados dentro de los primeros ochenta minutos en los cuales, los cambios espontáneos en el umbral no son significativos. Por otra parte, la reversibilidad del fenómeno, y su bloqueo por incubación en tripsina, nos sugieren que el efecto es provocado por el péptido.

BIBLIOGRAFIA

- Ackerman, J.: Über die Innervierung der Haut des Frosches Rana esculenta. Bult Int. Acad. Cracovie, Cl. Méd. 2:187-201, 1932. Citado en: **
- Adrian, E.D.: The impulses produced by sensory nerve endings. Part 4 Impulses from pain receptors. J. Physiol. (L) 62:33-51, 1926.
- Adrian, E.D.: The Basis of Sensation. London, Christophers, 1928.
- Adrian, E.D., Cattel, M.K. and Hoagland, H.: Sensory discharges in single nerve fibres. J. Physiol. (L) 72:373-391, 1931.
- Adrian, E.D. Sensory mechanism. Introduction in Handbook of Physiology. Field, H. Magoun y V. Hall, eds. American Physiological Society, Sec. I, 1:365-369, 1959.
- Aceves, R y Aréchiga, H.: Análisis de la estimulación del bombeo electrogénico de sodio inducido por la Hormona Neurodepresora en el axón gigante medial del acocil. Res. XXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Aguascalientes, Ags. p. 52, 1979.
- Anaya, V., Villanueva, T. y Aréchiga, H.: Los mecanismos de acción de la Hormona Neurodepresora de los crustáceos: I Estimulación de una bomba electrogénica de sodio. Res. XIII Congreso Latinoamericano de

- Ciencias Fisiológicas. XX Congreso Nacional de -
 Ciencias Fisiológicas. México, D.F., p. 78, 1977.
- Aréchiga, H. y Alcocer Cuadrón C.: Adrenergic effects on
 electro-olfatogram. Exp. Med. Surg. 271:384-394, -
 1969.
- Aréchiga, H. y Fuentes-Partdo, B.: Correlatives changes
 between retinal shielding pigments position and -
 ERG in crayfish. The Physiologist 13:137, 1970.
- Aréchiga, H. Fuentes, B. y Barrera, B.: Circadian rhythm
 of responsiveness in the visual system of the cray
 fish. In: Neurobiology of Invertebrates. J. Salan-
 ki, Ed. Publishing House of the Hungarian Academy
 of Sciences, Budapest, p.p. 403-421. 1973.
- Aréchiga, H., Huberman, A. y Naylor, E.: Hormonal modula
 tion of circadian neural activity in Carcinus mae-
nas (L) Proc. Roy. Soc. B. 187:299-313, 1974.
- Aréchiga, H. y Fuentes-Pardo, B.: Influencias hormonales
 sobre el sistema nervioso del invertebrado. En -
 problemas actuales de Ciencias Fisiológicas, Soc.
 Méx. Ci. Fisiol. p.p. 261-285, 1974.
- Aréchiga, H.: Modulación de la actividad aferente en el
 sistema nervioso del crustáceo. Anales de la So-
 ciedad Mexicana de Historia de la Ciencia y la Tec
 nología, Méx., D.F., No. 4, p. 334, 1974.

- Aréchiga, H. y Huberman A.: Peptide modulation of neural activity in crustaceans. En The Role of peptides in Neuronal function. J.F. Baker y T.G. Smith, Eds. Marcel Dakker, Inc. 1980. Cap. 13, p.p. 317-349.
- Aréchiga, H., Huberman, A, y Martínez-Palomo.: Release of a neurodepressing hormona from the crustacean sinus gland. Brain Research 128: 93-108, 1977.
- Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C y Huberman, A.: Functional characterization of the neurodepressing hormone in the crayfish. J. Neurobio., 10:409-422, 1979.
- Aréchiga, H. y Huberman, A.: Hormonal modulation of circadian behavior in crustaceans. In: Frontiers of Hormona Research. "Comparative aspectos of neuroendocrina control of behavior". Valverde, C. y Aréchiga, H., Eds.) p.p. 16-34, 1980.
- Bolgaski, K.A.: Zur Frage uber die besonderen Formen der rezeptorischen Nerveapparate in der Haut der Amphibien. Anat. Anz. 144:38-47, 1964. Citado en:**
- Cabrera Peralta, C.: Estudos dos sitios de sintesis de um neurohormonio que deprime as funcoes do sistema nervoso, em invertebrados: Tesis de Grau de Livre docencia. C.I.E.A. I.P.N. Aracatuba, 1978.
- Catton, W.T.: Some properties of frog skin mechano-recep

- tors. J. Physiol. (L) 141:305-322, 1958.
- Catton, W.T.: Threshold, recovery and fatigue of tactile receptors in frog skin. J. Physiol. (L) 158: 333-365, 1961.
- Catton, W.T.: A comparison of the responses of frog skin receptors to mechanical and electrical stimulation. J. Physiol. (L) 187:23-33, 1966.
- Chernetski, K.E.: Sympathetic enhancement of peripheral sensory input in the frog. J. Neurophysiol. 27:493-515, 1964.
- Eberth, C.J. und Bunge, R.: Die Endigungen der Nerven in der Haut des Frosches. Anat. Hefte 2, 1893. citado en: **
- Ecker, A. und Wiedersheim, R.: Anatomie des Frosches. Dritte Abt. Braunschweig: Vieweg, 1904. citado en: **
- Fingerman, M., Krasnow, R.A. and Fingerman, S.W.: Separation, assay and properties of the distal pigment - light adapting and dark adapting hormones in the eyestalk of the prawn Palaemonetes vulgaris. Physiol. Zool. 44:119-128, 1971.
- Gaupp, E.: Anatomie des Frosches. Braunschweig: Vieweg 1904. Citado en: **

- Habgood, J.L.: Sensitization of sensory receptors in the frog skin. *J. Physiol. (L)* 111:195-213, 1950.
- Kleinholz, L.H.: Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans in the functional organization of the compound eye. Ed. by C.G. Bernhard - Pergamon Press p.p. 89-101, 1966.
- Krasne, F.B. y Bryan, J.S.: Habituation: Regulation through presynaptic inhibition *Science* 182: 590-592, 1973.
- Lyndblom, M.F." Excitability and functional organization within a peripheral tactile unit. *Acta Physiol. scand.* 44 Suppl. 153, 1958.
- Loewenstein, W.R. y Altamirano Orrego, R.: Enhancement of activity in a Pacinian corpuscle by sympathetic agents. *Nature (L)* 178: 1292-1293, 1956.
- Loewenstein, W.R.: Excitation and changes in adaptation by stretch of mechanoreceptors. *J. Physiol (L)* 133: 588-602, 1956.
- **Llinas, R.: Frog neurobiology. A Handbook. Berlin Springer-Verlag, 1976.
- Mathews, B.H.C.: Specific nerve impulses. *J. Physiol. (L)* 67: 169-178, 1929.
- Merkel, F.: Über die Edingungen sensiblen Nerven in der Haut der Wirbelthiere. Rostock: H. Schmidt, 1980.
Citado en: **

- Morgan, A.H.: The temperature senses in the frog's skin.
J. exp. Zool 35:83-114, 1922.
- Nafstad, P.H.J. y Baker, R.E.: Comparative ultrastructural study of normal and grafted skin in the frog, Rana pipiens, with special reference to the neuro-epithelial connections. Z. Zellforsch 139: 451-462, 1973.
- Pacheco, P., Aréchiga, H., Muzquiz, L. y Bracamontes, M. E.: Efectos de un neuropéptido de crustáceo sobre la actividad electrofisiológica y conductual del gato. Res. XXII, Congreso Nac. de Ciencias Fisiológicas, p. 146, 1979.
- Ramón y Cajal, S.: Textura del sistema nervioso central del hombre y vertebrados. Ed. Moya, Madrid, 1904.
- Spray, D.C. y Chronister, R.: Composition of the dorsal cutaneous nerve in Rana pipiens. Experientia (Basel) 30:44-45, 1974.
- Steinach, E.: Ueber die electromotorischen Erscheinungen an Hautsinnesnerven bei adäquater Reizung. Rflugers Arch. ges. Physiol. 43-495-520, 1896.
Citado en: **
- Turner, C.D. y Bagnara, J.T.: General endocrinology. P. 193 W.B. Saunders Philadelphia, 1971.
- Verveen, A.A.: Fields of touch receptors in frog skin. Exp. Neurol. 8:482-492, 1962.

Whitear, M.: Dermal nerve endings in Rana and Bufo. Quart.
J. micr. Sci. 96:343-349, 1955.

Wiersma, C.A.G. y Yamaguchi, T.: Integration of visual
stimuli by the crayfish central nervous system. J.
Exptl. Biol. 47:409-431, 1967.