

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

11281
Dej.
④

ESTUDIO DEL POTENCIAL DE RECEPTOR EN CELULAS
RETINULARES DE ACOCIL.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)

PRESENTA:

JESUS GERARDO HERNANDEZ FALCON

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1989



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

AGRADECIMIENTOS	X
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
La vision en el ojo del invertebrado	3
Adaptación a la luz y a la oscuridad	13
Organización funcional del ojo compuesto del acocil	15
HIPOTESIS	t
MATERIAL Y METODOS	22
RESULTADOS	27
Reducción de la concentración extracelular de calcio ($[Ca]_e$)	30
Reducción de la concentración del sodio (Na_e) en soluciones con reducción en la $[Ca]_e$	34
Incremento en la $[Ca]_e$ en soluciones sin Na_e	38
Adición de cobalto en soluciones previamente modificadas en su concentración de calcio o de calcio y de sodio	42

DISCUSION	46
Parametros de medicion	46
Reduccion de la concentracion de calcio extracelular	50
Reduccion de la concentracion de sodio en soluciones sin calcio	51
Incremento del calcio en soluciones sin sodio	54
Adicion de cobalto	56
REFERENCIAS	59

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría podido realizarse sin el apoyo decidido y entusiasta de la Dra. Beatriz Fuentes Pardo, asesora académica, entrañable amiga y responsable del laboratorio de Cronobiología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Parte de esta tesis se realizó con el apoyo del CONACyT al proyecto *Estudio del potencial de receptor en células retinulares de acocíl*; P228CCOX880368.

RESUMEN

En la mayoría de los invertebrados la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores (potencial de receptor-PR) es una despolarización graduada, relativamente lenta que consiste de una fase transitoria (FT), seguida por una despolarización lenta o fase estable (FE) que antecede a la repolarización. En la mayoría de las especies se ha asociado a la FT con el ingreso de sodio al citosol a través de la membrana celular, a la FE con el nivel de calcio libre intracelular, y al potasio como el responsable de la repolarización. El PR de las células retinulares del adocil es una respuesta que también está formada por una FT y una FE que antecede a la repolarización. Del fotorreceptor visual del adocil no existe un estudio sistemático de las dependencias iónicas de cada una de las fases que lo componen. Ante esta falta de información se estudió la participación del sodio y del calcio en la generación del PR, en condiciones de equilibrio estable, de adaptación a la luz y durante la adaptación a la oscuridad. Para ello se emplearon tallos oculares seccionados de los que se obtenía el PR de las células retinulares las cuales estaban bañadas por una solución salina en la que se había producido alguna modificación en la concentración del sodio, en la del calcio o en la de ambos iones. El análisis de los resultados puso de manifiesto que en la generación de la FT participan tanto el sodio como el calcio; que la amplitud y la duración de la FE mantienen una relación de proporcionalidad inversa con la disponibilidad de calcio extracelular y con la posibilidad de que el calcio atraviese la membrana del fotorreceptor. Con estos resultados y la información disponible en la literatura se propone un modelo de fototransducción aplicable a fotorreceptores con PR despolarizante.

ABSTRACT

In most invertebrates, the electrical response of the photoreceptors to light (receptor potential, RP) consists of a graded depolarization, relatively slow, which is formed by a transient phase (TP) followed by a slow depolarization or stable phase (SP), anteceding repolarization. In most species, TP has been associated with the entrance of sodium to the cytosol through the cell membrane, the SF with free intracellular calcium, and potassium as responsible for the repolarization. The RP of the reticular cells of crayfish is also formed by a TP and an SP anteceding repolarization. However, no systematic study of the ionic dependencies has been made in crayfish visual receptors. In view of this lack of information, we studied the participation of sodium and calcium in RP generation under conditions of stable equilibrium, light adaptation, and dark adaptation. Isolated eyestalks were used to obtain the RP of reticular cells immersed in saline solution, to which changes in sodium or calcium concentration or both had been made. The results indicated that both calcium and sodium participate in the generation of TP and that the amplitude and duration of SF have an inverse relation to the availability of intracellular calcium and with the possibility of calcium crossing the photoreceptor's membrane. With these results and with the information available in the scientific literature we propose a phototransduction model that can be applied to the study of photoreceptors presenting a depolarizing RP.

INTRODUCCION

El desarrollo evolutivo de los seres vivos está ligado estrechamente con la aparición en ellos de una gran variedad de estructuras especializadas en recoger señales del medio, proceso mediante el cual se inicia una serie de eventos que culminará con la respuesta que dan los centros integradores del sistema nervioso a las modificaciones ambientales. Estas estructuras se denominan receptores y han desarrollado como característica esencial la capacidad de transformar un tipo de energía en otro, la electroquímica, la principal forma de energía reconocible por el sistema nervioso con el que comunican. Esto significa que los receptores actúan como verdaderos transductores de energía. La transducción es un fenómeno complejo, sobre todo si se considera que se lleva a cabo en estructuras muy disímiles como son, necesariamente, los distintos tipos de receptores que se encuentran en la naturaleza. De ahí que una forma de abordar el problema sea por medio de estudios que permitan encontrar, si los hay, aspectos comunes del fenómeno en cuestión. Es así como el hombre ha encontrado que la transducción, lo mismo que muchos otros fenómenos igualmente complicados, muestra aspectos comunes en una gran variedad de estructuras receptoras en toda la escala animal. Siempre que el nivel de análisis del problema trascienda la compleja organización estructural y se mantenga a nivel celular y subcelular, por ejemplo. Lo que dicho en las palabras de Autrum (Autrum, 1979) significa que la fisiología comparada provee de modelos relativamente simples en el estudio de problemas generales.

Un fenómeno de transducción de gran interés es la fototransducción. Si continuamos con Autrum: "La fotorrecepción es filogenéticamente muy vieja. Por ello ha estado expuesta a la acción de muchos factores selectivos, entre los diferentes fila, órdenes, especies y subespecies. El resultado ha sido, por supuesto, una gran variedad de adaptaciones altamente especializadas, cada una de las cuales toma diversas formas, tanto en los vertebrados como en los invertebrados. Las

adaptaciones al habitat son extremadamente variables. "Otra consecuencia de la antigüedad filogenética de la fotorrecepción es su casi ubicuidad en el reino animal. La diversidad de adaptaciones es menos sorprendente que la extrema constancia en la forma de un tipo de órgano visual"

Esta constancia ha quedado claramente establecida en el desarrollo filogenético de los fotorreceptores en el que se han podido determinar dos líneas evolutivas bien definidas, la ciliar y la rabadomérica (Eakin, 1968). La línea ciliar parece tener su máxima expresión en los fotorreceptores visuales del vertebrado, los bastones y los conos; la línea rabadomérica encuentra su mejor exponente en la célula retinular de los insectos y de los crustáceos. Aun cuando entre ambas líneas existen muchas diferencias, también hay un buen número de semejanzas. Por ejemplo, los bastones y las células retinulares parecen poseer un grado de sensibilidad luminosa muy similar ya que ambos tipos celulares son capaces de detectar diferencias de un fotón en la intensidad luminosa (Davis, 1961; Rushton, 1965; Borsellino y cols., 1968; Glantz, 1968); la excitación por luz se inicia con la degradación de un pigmento fotosensible el que, en ambos casos, corresponde a la rodopsina (Wald, 1968; Goldsmith, 1975), etcétera.

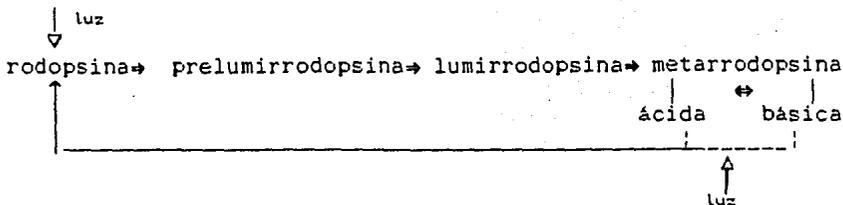
La visión en el ojo del invertebrado

En lo que respecta al órgano de la visión, el ojo, se puede afirmar que a pesar de las diferencias que hay en las distintas especies de vertebrados e invertebrados, existe una organización básica similar en todos los casos, la cual consiste, en esencia, de un medio conductor del estímulo luminoso, un conjunto de células transductoras del estímulo que mantienen estrecha relación con el sistema nervioso y un sistema regulador de la entrada de luz. Las diferencias que suelen presentarse en los distintos grupos animales se refieren a la forma, a la organización alcanzada por cada componente y sobre todo, al nivel de desarrollo que muestra el sistema nervioso.

Por su organización anatómica y funcional, el ojo del invertebrado parece ser, en general, de más fácil acceso al

estudio experimental que el del vertebrado ya que en aquél se encuentran con frecuencia, grandes células fotorreceptoras que han permitido estudiar procesos básicos del fenómeno visual.

Los pigmentos visuales de la mayoría de invertebrados estudiados son cromoproteínas que tienen características de absorción espectral similares y que se encuentran unidas a membranas; en la mayoría de los casos el cromóforo es el mismo que el de la rodopsina de los vertebrados (11-*cis*-retinal). En 1957, Wald y Hubbard encontraron que una fracción membranosa de las células retinulares de la langosta contiene una sustancia análoga a la rodopsina; Goldsmith en 1958 descubrió el retinal y Goldsmith y Warner en 1964 encontraron en la abeja la presencia de retinol. Las diversas investigaciones en artrópodos mayores (langostas y cacerolas de mar) y en cefalópodos han llevado a la ubicación del fotopigmento en los rhabdomeros. Su estructura molecular corresponde a la de una cromoproteína, el cromóforo es el 11-*cis*-retinaldehído, un carotenoide liposoluble de 20 átomos de carbono que se encuentra unido a la porción protéica que es la opsina. Esta molécula (también llamada retineno o rodopsina) es isomerizada por la luz a la forma *trans* (metarrodopsina). En los cefalópodos, y al parecer también en la mayoría de los crustáceos, las reacciones inducidas por la luz se detienen en la formación de intermediarios de la metarrodopsina, de manera que, a diferencia de lo que ocurre en el vertebrado, la opsina y el cromóforo no se separan; las dos formas tautoméricas de la metarrodopsina (la ácida y la básica) son entonces reconvertidas a rodopsina por absorción ulterior de luz sin necesidad de aportar un nuevo cromóforo, hasta que se alcanza un fotoequilibrio según se ilustra más abajo. Este sistema de excitación ↔ regeneración parece estar ampliamente distribuido en los receptores de invertebrados (Wald y Hubbard, 1957; Hubbard y St. George, 1958; Wald, 1967; Wald, 1968; Autrum, 1979; Hamdorf, 1979; Stryer, 1987). En la oscuridad el equilibrio se desplaza hacia la conversión de metarrodopsina en rodopsina.



Se ha propuesto un modelo de funcionamiento del sistema de fotopigmento de los fotorreceptores rabadómicos. Se ha sugerido que las moléculas de rodopsina (R) regeneradas o provenientes de la adaptación a la oscuridad inician la excitación de la membrana a través de la captura de los fotones que pueden causar la transición de R a metarrodopsina (MR); esta MR libera energía que es utilizada en sitios activos de la membrana durante cierto tiempo del proceso excitatorio. La MR puede ser reconvertida en R gracias a la absorción de fotones; la captura de fotones que pueden causar esta reacción inversa, no causan excitación cuando ocurren antes de que la MR libere su energía. Si la energía ya se liberó, la pérdida de ella previene la reacción de MR a R (Stavenga, 1974; Hamdorf, 1979).

La respuesta eléctrica que dan los fotorreceptores visuales ante un estímulo luminoso se ha estudiado desde mediados del siglo pasado. A decir de Hartline y sus colaboradores (1952): "...Hace cien años Holmgren descubrió el potencial de acción de la retina..." A lo que seguramente se refería Hartline es al electroretinograma (ERG). Es este mismo autor en 1928, uno de los primeros en estudiar la respuesta eléctrica a la luz de los ojos de insectos y crustáceos por medio de un dispositivo análogo al electrocardiógrafo de Einthoven.

El ERG de algunos invertebrados, en particular el del acocil, se considera debido únicamente a la actividad de los fotorreceptores (células retinulares) (Naka y Kuwabara, 1959); aunque esto podría ser una ventaja en el estudio del proceso de la fototransducción, es insuficiente, ya que se trata de una

respuesta en el tiempo y en el espacio de un conjunto de células, las que constituyen la retinula. De hecho una mayor comprensión del fenómeno se ha obtenido por el uso del registro intracelular. Son otra vez Hartline y sus colaboradores (1952) quienes por primera vez la utilizan en el estudio de la actividad de los fotorreceptores visuales de *Limulus*. Estos autores obtuvieron dos clases de registro, uno de tipo espiga, es decir una despolarización rápida o potencial de acción, y otro de tipo lento, también despolarizante o potencial de receptor.

La respuesta que dan los fotorreceptores ante un estímulo luminoso es un cambio de voltaje lento, una despolarización de la membrana que corresponde al llamado potencial generador o potencial de receptor (Davis, 1961). En nuestros días el término potencial generador ha quedado para los potenciales graduados que generan espigas, mientras que el de PR se usa cuando la respuesta también es graduada pero es provocada por estímulos sensoriales (Järvilehto, 1979), por lo que en este trabajo emplearemos este término.

En las células fotorreceptoras se han detectado dos tipos de actividad eléctrica; uno de ellos aparece después de una latencia fácilmente medible y asociada con cambios en la conductancia de la membrana, es el llamado potencial tardío de receptor o simplemente potencial de receptor (PR). El otro tipo de respuesta fue observado inicialmente por Brown y Murakami (1964) y se registra sólo cuando se aplican estímulos luminosos muy intensos (Järvilehto, 1979), se le conoce como potencial temprano de receptor (PTR). Dentro de las características del PTR destaca que su latencia es mínima y resulta muy difícil de detectar (se ha calculado en el orden de los nanosegundos)(Hillman y cols., 1973). Se sabe también que su polaridad depende de la temperatura, a temperatura ambiente o mayor (24°C a 37°C) es positivo y se vuelve negativo a temperaturas del orden de los 10°C. Por otro lado el PTR no desaparece cuando la preparación se fija en formaldehído ni es sensible a los cambios en el medio iónico. La amplitud del PTR es linealmente proporcional a la intensidad luminosa. El PTR tiene el mismo espectro de absorción que el PR (Hillman y cols., 1973). Se ha propuesto que está asociado con las primeras etapas de la isomerización del

fotopigmento, y también con su resíntesis (Cone, 1967, Hagins y McGaughy, 1967). No se genera por cambios en la permeabilidad de la membrana (Brindley y Gardner-Melwyn, 1966), sino más bien por una corriente capacitiva consecutiva a la absorción de fotones, que resulta de un cambio en la carga de las moléculas del fotopigmento que tienen la misma orientación espacial en la membrana de las microvellosidades rabdoméricas (Järvilehto, 1979).

Como resultado del cambio conformacional del fotopigmento se presentan cambios en la conductancia de la membrana, que originan pequeños cambios de voltaje conocidos como despolarizaciones miniatura unitarias o "despolarizaciones cuánticas" debido a su semejanza con los potenciales de placa neuromuscular que provienen de la liberación de *quanta* de transmisor químico. Su número parece ser proporcional a la intensidad luminosa y su suma podría dar origen al PR (Yeandle, 1958; Adolph, 1964). Las despolarizaciones cuánticas también se pueden presentar en condiciones de oscuridad constante por lo que se ha propuesto que su origen podría ser tanto la isomerización térmica de las moléculas de rodopsina como el daño de algunas áreas de la membrana (Srebro y Behbehani, 1972; Behbehani y Srebro, 1974). Se ha propuesto que cada una de las despolarizaciones miniatura es consecuencia de que se abran del orden de cien canales de sodio (Cone, 1973). Se han construido algunos modelos matemáticos que pretenden representar esta suma lineal o que analizan el comportamiento de las despolarizaciones cuánticas y que en mayor o menor medida se ajustan a las condiciones impuestas por los autores. Con base en ellos se puede afirmar que la amplitud de las despolarizaciones cuánticas es independiente de la latencia de las mismas y de los niveles extracelulares de calcio; por otro lado, la latencia parece estar relacionada con el grado de oscuridad previa, con los niveles de iluminación y con los niveles extracelulares de calcio ya que la reducción de este ion significa un aumento en la latencia (Srebro y Behbehani, 1971; Stieve y Bruns, 1980, 1981, 1983; Wong y cols, 1980a, 1980b, 1982; Payne y Howard, 1981).

Gran número de autores está de acuerdo en que otra consecuencia de la isomerización de la rodopsina, que resulta de

la llegada de un estímulo luminoso, es un cambio en la permeabilidad de la membrana del fotorreceptor. Este cambio es el antecedente inmediato a la generación del PR, el cual es una despolarización relativamente lenta que consiste de dos fases: una, la fase rápida o transitoria (FT), y otra, la fase sostenida o estable (FE), a partir de la cual se inicia la repolarización. En la mayor parte de los invertebrados, la respuesta a la luz es esencialmente la misma, aunque en algunos casos el potencial de receptor puede estar precedido de una respuesta de tipo espiga, además de las fases transitoria y estable, como sucede en la célula excéntrica del ojo lateral de *Limulus* y en los fotorreceptores visuales del zángano (*Apis mellifera*) (Naka y Eguchi, 1962; Bader y cols., 1976; Baumann, 1968; Järvillehto, 1979).

En términos generales, se puede decir que el origen de cada fase del PR es incierto. Sin embargo se ha propuesto que la isomerización de la rodopsina provee la energía necesaria para que se desencadene un cambio en la conductancia de la membrana (Hamdorf, 1979). Este cambio afecta principalmente al sodio, ya que su retiro del medio extracelular, en casi cualquier tipo de preparaciones, origina una reducción notable en la amplitud del PR (Washizu, 1964; Eguchi, 1965; Fulpius y Baumann, 1969; Millecchia y Mauro, 1969a, 1969b; Bader y cols., 1976; Muijser, 1979; Chinn y Gillary, 1985). Aunque la falta de Na reduce la amplitud del PR no anula la respuesta; de hecho no ha sido posible hacer desaparecer la FT o todo el PR mediante la reducción iónica extracelular o mediante la aplicación de bloqueadores de los sistemas de ATP-asa pese a que se ha propuesto la existencia de bombas electrogénicas que podrían estar participando en la generación de la FT del PR (Smith y cols., 1968; Brown y Lisman, 1972; Baumann y Mauro, 1974; Chinn y Gillary, 1985). Aún no hay un acuerdo sobre el papel que desempeñan en la FT los iones de calcio, pues no se han podido descartar como un posible acarreador de corriente en ninguna de las especies en las que se ha estudiado su participación en el PR (Fulpius y Baumann, 1969; Millecchia y Mauro, 1969a, 1969b; Bader y cols., 1976; Muijser, 1979); sin embargo, en años recientes han aparecido datos que apoyan la participación del calcio

directamente en el proceso de generación de la FT (Bolsover y Brown, 1985; Bacigalupo y cols., 1986; Payne, Corson y Fein, 1986). La FE parece desencadenarse como consecuencia de la FT. Durante la FE el nivel de calcio libre intracelular (Ca_i) se eleva en una secuencia que semeja el curso temporal de la despolarización. De hecho parece ser este nivel de Ca_i el que determina la amplitud y la duración total de la respuesta de manera que cuanto menor es la Ca_i mayor es la duración del PR y lo opuesto es también cierto (Fulpius y Baumann, 1969; Lisman y Brown, 1972; Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Bader y cols., 1976; Brown y cols., 1977; Muijser, 1979; Lo y cols., 1980; Hochstrate y Hamdorf, 1985; Levy y Fein, 1985). Esto equivale a decir que el calcio está también íntimamente ligado con la posibilidad de que se inicie la repolarización del PR, fase que, por otra parte, depende en buena medida de la presencia de K^+ (Millecchia y Mauro, 1969a, 1969b).

El papel del calcio en el proceso de la fototransducción ha sido ampliamente estudiado en los invertebrados. Los trabajos de Washizu (1964) en *Calliphora*, de Eguchi (1965) en *Procambarus* y de Millecchia y Mauro, 1969a, 1969b) en *Limulus* pusieron de manifiesto que la reducción en la concentración de calcio extracelular (Ca_e) produce cambios en el PR que son del mismo tipo de los encontrados como resultado de la adaptación a la oscuridad; es decir, crecimientos en la amplitud y fundamentalmente en la duración de la respuesta. También demostraron que el exceso de Ca_e origina cambios en sentido opuesto tal como lo hace la adaptación a la luz; esto es, respuestas de magnitud pequeña y muy corta duración. Con los resultados obtenidos con el empleo de técnicas de microinyección de calcio por presión o por microiontoforesis, y con el uso de quelantes de calcio o de sustancias luminiscentes sólo en presencia del calcio, Lisman y Brown (1972) propusieron al calcio como el segundo mensajero y principal responsable del proceso de adaptación a la luz en los fotorreceptores ventrales de *Limulus* (Baumann, 1968; Brown y Blinks, 1972, Lisman y Brown, 1972). Con el empleo del mismo tipo de técnicas de microinyección de calcio, de agentes quelantes de calcio como el EDTA o el EGTA, de sustancias luminiscentes en presencia del calcio como la ecuorina

y el Arsenazo III, o de sustancias que al modificar el metabolismo celular elevan el nivel de Ca^{2+} (Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Brown y cols., 1977; Wong y cols., 1979; Lo y cols., 1980; Levy y Fein, 1985), se ha llegado a la conclusión de que la concentración de Ca^{2+} aumenta como resultado de la iluminación, se mantiene en niveles altos en el citosol todo el tiempo que esta dure, y disminuye durante la oscuridad debido a que es retirado hacia el exterior o hacia los depósitos intracelulares que lo mantienen en forma no ionizada.

Han sido muchos los trabajos orientados en apoyo a la hipótesis de Lisman y Brown de que el calcio es el segundo mensajero en la adaptación a la luz y parecen indicar que, en efecto, durante la adaptación a la luz de la mayoría de los fotorreceptores de invertebrado estudiados, el incremento en el Ca^{2+} es el determinante de la disminución de la sensibilidad a la luz. Si embargo, en años recientes se ha propuesto la existencia de un segundo mensajero en el proceso de la fototransducción para los fotorreceptores del invertebrado que no es directamente el calcio; el candidato más viable para cumplir esta función es alguno de los polifosfatos de inositol (Berridge e Irvine, 1984).

Se ha implicado a los polifosfatos de inositol como intermediarios en un gran número de aspectos de la función celular que dependen del calcio, de manera que la hidrólisis de estos fosfolípidos de la membrana parece representar una etapa básica y obligada en los procesos de transducción de los receptores. El comportamiento de las células está gobernado por sistemas de señales que traducen la información externa en un repertorio limitado de señales internas, los segundos mensajeros. Los receptores en la superficie celular funcionan como elementos que captan información externa (antenas moleculares), la cual es luego transducida y amplificada en los segundos mensajeros que regulan muchos procesos celulares como el metabolismo, la secreción, la fototransducción, etc. (Berridge e Irvine, 1984). Los segundos mensajeros se han estudiado sobre todo con respecto a las acciones hormonales y de neurotransmisores; fue en el páncreas donde se encontró que la acción de la acetilcolina implica un aumento en la incorporación de P^{32} en los fosfolípidos de la membrana que precede a la secreción (Hokin y Hokin, 1953).

Posteriormente, Durell y sus colaboradores (1969) demostraron que la acción de la acetilcolina implicaba un aumento en la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana y que éste podría ser el mecanismo de acción general de los receptores. Por otro lado Michell propuso que el metabolismo del inositol concierne sólo a los agonistas que elevan el calcio intracelular (Michell, 1975). Son muchos los agonistas que aumentan el metabolismo de los fosfatos de inositol de la membrana (acetilcolina, vasopresina, noradrenalina, hormona liberadora de tiotropina, luz, etcétera; Berridge, 1984); como característica común a los receptores a estas sustancias está el que son de naturaleza multifuncional y que se les ha implicado como parte de un mecanismo de transducción general para la movilización del calcio, la activación de la proteína quinasa C, la liberación de ácido araquidónico y la estimulación de la guanilatociclasa (Berridge, 1984). El término fosfoinosítido se ha utilizado para describir a tres fosfolípidos aniónicos que contienen *m*to-inositol en sus grupos principales. El más abundante de ellos es el fosfatidilinositol el cual contiene *m*to-inositol unido a un fosfato en el hidroxilo de la posición 1; los otros dos fosfatos de inositol se forman por fosforilación secuencial de los grupos hidroxilo en las posiciones 4 y 5. Estos fosfolípidos se encuentran localizados en la hoja interna de la membrana plasmática y en la propia membrana se localizan las enzimas responsables de la fosforilación y del proceso inverso. Estas enzimas son la fosfatidilinositol quinasa que fosforila en la posición 4 para producir fosfatidilinositol-4-fosfato; la fosfatidilinositol-4-P quinasa que fosforila el hidroxilo en la posición 5 para formar fosfatidilinositol-4,5-difosfato. Las reacciones inversas son llevadas a cabo por dos fosfomonoesterasas que específicamente remueven el fosfato de las posiciones 4 y 5. Al parecer existe un equilibrio muy fino entre la fosforilación y la reacción inversa de estos fosfolípidos de manera que las proporciones de ellos se ajustan en función de su utilización (Berridge, 1984). Bajo la acción del agonista (hormona, neurotransmisor, luz) la membrana celular sufre una "perturbación" (que puede ser un cambio conformacional en alguna de las proteínas membranales) que inicia una cascada de

reacciones que se bifurca en un ciclo lipídico y en el ciclo del fosfato de inositol; la perturbación activa a una fosfodiesterasa (fosfolipasa C) la cual rompe el fosfatidilinositol_{4,5-P₂} dejando libres sn-1,2-diacilglicerol y trifosfato de inositol. Se han identificado dos isómeros del trifosfato de inositol, el 1, 4, 5-trifosfato de D-*mio*-inositol y el 1, 3, 4-trifosfato de D- o L-*mio*-inositol. El más conocido es el isómero 1, 4, 5. El trifosfato de inositol parece ser el segundo mensajero y parece unirse a las membranas del retículo endoplásmico donde promueve el eflujo de calcio hacia el citosol (Seyfred y cols., 1984; Burgess y cols., 1984). Posteriormente, el trifosfato de inositol es desfosforilado en forma secuencial por tres fosfatasa de manera que el inositol es reciclado hacia la membrana en donde la diacilglicerol inositol fosfátido transferasa resintetiza fosfatidilinositol. Por el lado del ciclo lipídico, la acción de la diacilglicerol lipasa libera ácido araquidónico y monoacilglicerol; el primero puede funcionar como segundo mensajero o como sustrato para la síntesis de otros compuestos. Sobre el diacilglicerol también actúa una quinasa la cual produce ácido fosfatídico (que ha sido propuesto como un ionóforo de calcio sobre la membrana plasmática, Seyfred y cols., 1984); sobre el ácido fosfatídico actúa la CTP-fosfátido citidil transferasa que resintetiza CDP-diacilglicerol el cual sirve de sustrato para la nueva síntesis de fosfatidilinositol (Berridge e Irvine, 1984). El propio diacilglicerol actúa en el plano de la membrana celular mediante la activación de la proteína quinasa C, lo que implica la fosforilación de proteínas específicas que contribuyen a diversos procesos fisiológicos especialmente aquellos que ocurren en forma independiente de los niveles de calcio o frente a niveles muy bajos del ion.

Desde el punto de vista de la fototransducción se ha encontrado que la inyección de 1, 4, 5-trifosfato de *mio*-inositol en el fotorreceptor ventral de *Limulus* induce cambios de corriente a través de la membrana fotorreceptora del mismo tipo que los producidos por la estimulación luminosa e incluso se produce una desensibilización del receptor (adaptación) tras inyecciones sucesivas de polifosfato, del mismo tipo que la producida por la luz (Brown y Rubin, 1984; Brown y cols, 1984).

Se ha demostrado que la corriente y la adaptación del receptor se acompañan de un aumento en el Ca_i de manera que el 1, 4, 5-trifosfato de inositol podría cumplir con la función de segundo mensajero entre la isomerización de la rodopsina (la perturbación o cambio conformacional en la membrana plasmática) y la elevación de los niveles de Ca_i que acompañan a la adaptación a la luz (Brown y Rubin, 1984; Corson y cols., 1984; Fein y cols., 1984; Payne y cols., 1984; Payne y cols., 1986; Corson y Fein, 1987). De los resultados de estos trabajos se puede plantear que la estimulación luminosa induce la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, en forma análoga a como lo hace la unión agonista-receptor probablemente como consecuencia de la isomerización de la rodopsina, lo que da como resultado la producción del 1,4,5, trifosfato de inositol. Este compuesto sería el responsable de la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico. El diacilglicerol liberado en el ciclo del fosfatidilinositol, u otros productos como el ácido fosfatídico, modificarían la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio con lo que se tendría una fuente interna y una externa o transmembranal para elevar el Ca_i cuyos niveles determinan la adaptación a la luz del fotorreceptor (Payne y cols., 1986; Corson y Fein, 1987).

Adaptación a la luz y a la oscuridad

Los fenómenos de adaptación a la luz y a la oscuridad los podemos enfocar desde el punto de vista de los fotorreceptores o del de las estructuras parareceptoras. En el primer caso se puede decir que, en general, la capacidad de respuesta de las células fotorreceptoras depende fundamentalmente de la disponibilidad de fotopigmento. Durante la adaptación a la oscuridad, el pigmento se acumula en forma de rodopsina, lo que significa que la célula incrementa su capacidad de respuesta a la luz. Al mismo tiempo, disminuyen los niveles de Ca_i , ya que éste es secuestrado y almacenado en depósitos intracelulares que lo mantienen fijo y también es expulsado hacia el medio extracelular. Durante la adaptación a la luz, los fenómenos se invierten, pues la mayor cantidad de fotopigmento pasa a la forma trans (metarrodopsina), lo que significa una menor capacidad de

respuesta por parte de la célula fotorreceptora. Por otra parte el Ca_i aumenta como resultado de su salida desde los depósitos intracelulares, como ocurre en el ojo de *Balanus*, y de su ingreso desde el medio extracelular como sucede en el ojo lateral de *Limulus* (Brown y Blinks, 1974). Se ha propuesto que durante la fotorrespuesta los niveles intracelulares de calcio iónico siguen una secuencia temporal muy parecida a la de la respuesta eléctrica hasta un punto tal que se le ha asociado con el fenómeno de la adaptación característico de los receptores sensoriales; es decir, que por una parte el PR tiene una determinada amplitud al inicio de la estimulación luminosa la cual decrece con el tiempo aun cuando el estímulo permanezca constante, en tanto que, en forma paralela, el ingreso de calcio libre al citosol es también máximo al inicio de la estimulación luminosa y disminuye durante la iluminación sostenida. De hecho, el aumento experimental en la Ca_e significa en muchas especies, un incremento en el Ca_i que tiene efectos comparables en todo a los de la adaptación a la luz y la disminución en la concentración del ion mimetiza en todos sentidos los efectos que se derivan de la adaptación a la oscuridad (Baumann, 1968; Lisman y Brown, 1972, 1975; Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Bader y cols., 1976; Brown y cols., 1977; Lo y cols., 1980; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Levy y Fein, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986). Desde el punto de vista morfológico se han encontrado diversas modificaciones en la ultraestructura de los fotorreceptores que parecen asociarse con los estados de adaptación a la luz o a la oscuridad. Estas incluyen cambios en la longitud del rabadomo, destrucción del arreglo de los microtúbulos, aparición de cisternas en o cerca del rabadomo que se han asociado con el almacenamiento de calcio, aumento en el número y el tamaño de los cuerpos multivesiculares (Eguchi, 1965; Horridge y Barnard, 1965; Eguchi y Waterman, 1967, 1976; White y Lord, 1975; Tsutsumi y cols., 1981; Meyer-Rochow y Eguchi, 1984), etcétera.

En lo que se refiere a las estructuras parareceptoras es necesario hacer alusión a los llamados pigmentos accesorios de los insectos y de los crustáceos. En ellos las células que contienen a estos pigmentos funcionan como sistemas que regulan

la entrada de luz a los fotorreceptores. En términos generales se puede decir que durante la adaptación a la luz blindan el rabadomo de manera que la cantidad de luz que llega a la región fototransdutora se reduce; durante la adaptación a la oscuridad se redistribuyen dejando completamente libre al rabadomo con lo cual todo haz luminoso que ingrese al ojo tiene la posibilidad de estimular alguna región fototransdutora. En la mayoría de los insectos y de los crustáceos estudiados, estas estructuras se encuentran bajo la acción reguladora del sistema neuroendocrino (Hernández Falcón, 1984).

En resumen, con base en los estudios hechos en gran número de especies de invertebrados se propone que la fototransducción se ajustaría al siguiente esquema general: la iluminación causa la isomerización del retineno; como consecuencia de ello, y con la participación de un segundo mensajero como el trifosfato de inositol, aumenta la conductancia de la membrana al sodio lo que induce una despolarización de la célula; se produce un aumento en la conductancia al calcio y en la concentración del Ca^{2+} que determina el inicio de la FE, la duración de la cual depende del nivel intracelular de calcio y del pH intracelular (Brown y Meech, 1976); el inicio de la repolarización se lleva a cabo una vez que la conductancia al sodio ha disminuido y prevalece la salida de potasio (Millecchia y Mauro, 1969b; Goldsmith, 1975; Autrum, 1979; Järvilehto, 1979; Berridge e Irvine, 1984; Brown, y cols., 1984; Payne y cols., 1986).

Organización funcional del ojo compuesto del acocil.

La organización general del ojo compuesto de los insectos y de los crustáceos se basa en la presencia de múltiples unidades estructurales y funcionales que se conocen con el nombre de omatidias. Desde los trabajos de Exner (1889) y de Parker (1932) se sabe que la omatidia está constituida por una porción dióptrica, una retinular y una reguladora de la entrada de la luz. De la primera forman parte la córnea, el cono cristalino y las células pigmentarias accesorias (en la medida en que éstas absorben algunas longitudes de onda del estímulo mejor que otras).

En 1889, Exner estudió el aparato dióptrico y los pigmentos

visuales de los insectos. De estos estudios se originó la clasificación de los ojos de los insectos, que luego se extendería a los crustáceos, en dos grandes grupos: ojos por superposición y ojos por aposición. En los primeros la formación de imágenes depende de la organización de múltiples omatidias con rbdomos cortos, lo que permite que en la retina se formen muchas imágenes que se superponen. En los ojos por aposición las omatidias tienen rbdomos largos y la imagen se forma en sólo un punto de la retina. Por otro lado, hay ojos compuestos que, dependiendo de la posición que tengan los pigmentos accesorios, pueden funcionar tanto por superposición como por aposición. El ojo del acocil pertenece a este grupo aunque funciona principalmente por superposición y sólo cuando está totalmente adaptado a la luz lo hace por aposición.

La segunda parte de la omatidia la constituyen las 8 células retinulares por omatidia que se encuentran en la base del cono cristalino y descansan sobre la membrana basal. En cada célula retinular se encuentra un rbdómero formado por microvellosidades que no son otra cosa que pliegues de la membrana que contienen el pigmento fotosensible y que al entrelazarse con los de las otras células de la misma omatidia forman el rbdomo. El rbdomo está constituido por capas alternas de rbdómeros de manera que en una capa son las células 1, 4 y 5 las que contribuyen a formarlo; en la siguiente son las células 2, 3, 6 y 7 las que lo hacen (Eguchi, 1965) (Fig. 1). Hasta ahora no está muy clara la posición de la célula 8 como parte del rbdomo habiéndose propuesto que podría participar en la detección de la luz polarizada (Meyer-Rochow, 1975; Nässel, 1976).

El proceso de la fototransducción se lleva a cabo justamente en el rbdomo el cual se continúa con la porción de cada una de las células retinulares en la que se inician los cambios eléctricos (es decir el PR) que anteceden a los potenciales de acción que viajan a lo largo del axón de las células retinulares: los axones llegan hasta la lámina ganglionar que es el sitio en el que se establece la primera sinapsis de la vía aferente. Aunque en algunos invertebrados y moluscos parece haber uniones comunicantes que permiten la comunicación eléctrica entre las células de una misma omatidia, éstas no se han identificado en el

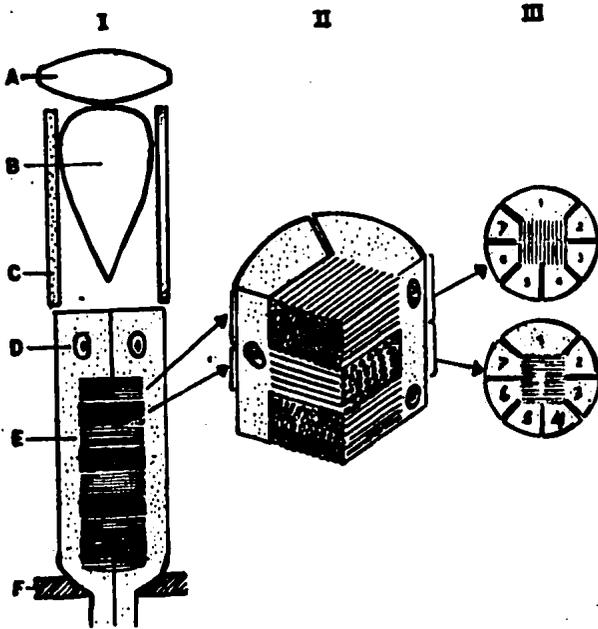


Figura 1. Diagramas de una omatidia del ojo compuesto del acocil. I: corte longitudinal a través del eje óptico. Las estructuras que se muestran son: células corneágenas (A), cono cristalino (B), célula pigmentaria (C), célula retinular (D), rabdomo (E), membrana basal (F). II: diagrama estereográfico de una parte del rabdomo. III: sección transversal de la retínula a nivel de dos capas vecinas; los números señalan a las células retinulares. Nótese la participación de las células 1, 4 y 5 en una capa y de las células 2, 3, 6 y 7 en la siguiente. (Modificado de Eguchi, 1965).

acocil (Lasansky, 1967; Eakin, 1971). Sin embargo sí parecen existir uniones de otro tipo. Justo a un lado del rabdomo se han identificado desmosomas en banda que rodean a la omatidia y que parecen mantener la estructura de la misma (Shróder y cols., 1979; Shaw y Stowe, 1982). También se han encontrado uniones entre las células de los conos cristalinos las cuales también parecen jugar el papel de sustentadoras de la estructura de la omatidia (Roach, 1976). Por último, las terminaciones axónicas de las células retinulares parecen tener uniones comunicantes entre ellas o entre las de otras omatidias al menos en los insectos (Ribi, 1978; van Hateren, 1986).

La porción reguladora de luz de la omatidia la constituyen las células de los pigmentos accesorios. En 1890, Stefanowska estudió los pigmentos oculares de los insectos y sus modificaciones por la luz. Lo mismo hizo Szczawinska en crustáceos. Entre 1891 y 1897, Parker realizó estudios sobre los ojos compuestos de los crustáceos, la migración de los pigmentos con los ciclos de luz-oscuridad y la participación del sistema nervioso en esta migración. Por su parte Exner y Stefanowska, hablan de una área de reflexión de la luz en la córnea, la que más tarde (Parker, 1897) recibió el nombre de pseudopupila.

En el acocil, alrededor de los rabdomos y de los conos cristalinos, se encuentran las células pigmentarias accesorias (Eguchi, 1965; Eakin, 1971). Estas células son de tres tipos: distales, proximales y de reflexión; en las dos primeras se encuentra un pigmento químicamente similar a la melanina y en las últimas el pigmento es del tipo de las guaninas y pteridinas (Kleinholz, 1966). La iluminación del ojo provoca que los pigmentos proximal y distal se aproximen entre sí y cubran al rabdomo; en la oscuridad el pigmento distal se desplaza hacia la córnea y el proximal lo hace en sentido contrario con lo que el rabdomo queda descubierto y llega la luz con más facilidad. En consecuencia, estos pigmentos influyen sobre la sensibilidad del ojo a la luz. Es esta migración de los pigmentos lo que permite los cambios de tamaño de la pseudopupila al incidir y reflejarse la luz sobre el pigmento de reflexión (Stavenga, 1979). La posición de los pigmentos proximal y distal se encuentra regulada por la llamada hormona de adaptación a la luz la cual se libera

desde la glándula sinusal, órgano neuroendocrino ubicado en el tallo ocular y desde el que salen a la circulación general un buen número de neurosecreciones provenientes de distintas regiones del sistema nervioso. Bajo la acción de la hormona de adaptación a la luz el pigmento distal se distribuye a lo largo del eje mayor del cono cristalino, lo que limita la entrada de la luz a los fotorreceptores solamente a aquellos rayos que son perpendiculares al eje longitudinal de cada omatidia. El pigmento proximal parece mostrar también una redistribución bajo la acción de la misma hormona aunque su sensibilidad es menor que la del distal (Welsh, 1939; Kleinholz, 1966; Hernández Falcón, 1984). De hecho se sabe que sus movimientos en la omatidia dependen, en buena medida, de los cambios del potencial de membrana del propio fotorreceptor. El pigmento de reflexión no presenta migración alguna, sólo queda cubierto o descubierto por el pigmento proximal según la posición que éste asuma.

Cuando en el ojo de un acocil, se introduce un microelectrodo a diferentes profundidades y se aplica un estímulo luminoso, la forma de la respuesta cambia dependiendo de la profundidad a la que se encuentre el microelectrodo. Si una vez retirada la córnea el electrodo se coloca en la superficie que resta, se obtiene un trazo que corresponde a una respuesta extracelular, electrorretinograma -ERG, que se denomina HII; al descender el electrodo, la amplitud de la respuesta crece. Si se continúa el descenso del electrodo, aparece otro trazo de signo contrario al de HII, denominado componente HI, cuya amplitud crece a expensas de la componente HII. Cuando el electrodo se coloca muy cerca, o en la superficie de la célula retinular, la componente HII desaparece. Si el electrodo se hace descender aún más, se observa una brusca caída de potencial del orden de los 40 mV, que corresponde al potencial de membrana en reposo de la célula retinular que se ha atravesado (Naka y Kuwabara, 1959; Hernández Falcón, 1984). Si en estas condiciones se aplica un destello luminoso, la respuesta que se registra cambia totalmente y es sustituida por una respuesta despolarizante conocida como PR. Cabe destacar que no se tienen aún pruebas histológicas, de tinción intracelular, que demuestren, sin lugar a dudas, el origen intracelular del PR del acocil. Sin embargo los valores de

voltaje (10 a 12 mV) de la respuesta, el registro de una caída brusca de potencial que se obtiene, tanto en penetraciones longitudinales como perpendiculares al rabdomo, las respuestas ante luces de distintos ángulos de polarización o diferente longitud de onda; y la obtención de un potencial de inversión obtenida con técnicas de fijación de voltaje, permiten afirmar, con poco riesgo de equivocarse, que en el acocil las respuestas conocidas como PR, realmente corresponden a respuestas intracelulares (Naka y Kuwabara, 1959; Muller, 1973; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández Falcón, 1984; Cummins y Goldsmith, 1986)

El PR de las células retinulares del acocil tiene esencialmente las mismas características que se encuentran en los fotorreceptores de otras especies de invertebrados. Es una respuesta graduada que consiste de una despolarización rápida, la FT, cuya amplitud mantiene una relación logarítmica con respecto a la intensidad del estímulo aplicado (Glantz, 1968), seguida de una despolarización sostenida, la FE, que antecede a la repolarización. La FE depende de la duración del estímulo, del estado de adaptación a la luz o a la oscuridad y de la disponibilidad de calcio en el medio (Naka y Kuwabara, 1959; Eguchi, 1965; Glantz, 1968; Stieve y Claßen-Blinke, 1980; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón, 1984; Farías, 1989). No se conoce nada acerca de los mecanismos inherentes a la repolarización.

Como en todas las células receptoras, el PR de las células retinulares del acocil muestra una reducción progresiva ante la presencia de un estímulo constante (adaptación). Se sabe que junto con los efectos que tiene sobre el fotorpigmento, la luz puede alterar la estructura de los componentes subcelulares de las células retinulares y provocar, por ejemplo, la destrucción del arreglo de los microtúbulos, el aumento en el número y el tamaño de los cuerpos multivesiculares, y algunos otros efectos que han sido descritos por diversos autores (Eguchi, 1965; Horridge y Barnard, 1965; Eguchi y Waterman, 1967; Eguchi y Waterman, 1976).

Aunque se conocen además algunos otros aspectos importantes de la organización y el funcionamiento de las células retinulares

del acocil, se desconocen muchos otros más. Así, por ejemplo, es muy poco lo que se sabe de la relación entre las características del estímulo y las de la respuesta; no existe un estudio sistemático de las dependencias iónicas del PR ni mucho menos de cada una de sus fases (Eguchi, 1965; Stieve y Claßen-Linke, 1980; Fuentes-Pardo y cols., 1984); se ignora la participación del calcio en el proceso de la fototransducción; etcétera. El presente trabajo pretende contribuir a que se amplie el conocimiento sobre las propiedades que caracterizan al PR de las células retinulares del ojo del acocil con énfasis en la participación de los iones de sodio y de calcio en la generación de la fase transitoria, de la fase estable y de la duración de la respuesta. Para ello se emplearon tallos oculares seccionados de los que se obtenía la respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares (PR) las cuales estaban bañadas por una solución salina en la que se había producido alguna modificación en la concentración de iones de sodio, de calcio o en la de ambos iones. El registro se hacía en condiciones de estado estable, de adaptación a la luz y de adaptación a la oscuridad y de él se analizaba el comportamiento de las fases transitoria y estable y de la duración del PR. Del análisis de los resultados se puso de manifiesto la posibilidad de hacer generalizaciones aparentemente válidas sobre la participación del sodio y del calcio en el PR que nos llevaron a asignarles a estos dos iones un papel en la generación del PR y a proponer al calcio, en particular, como un elemento determinante de la amplitud y la duración del PR, así como a formular un modelo teórico sobre el origen del PR en el que se incluyeron tanto nuestros hallazgos como un cierto número de datos sobre la fototransducción disponibles en la literatura.

HIPOTESIS

El PR de las células retinulares del acocil es una respuesta despolarizante que muestra el mismo tipo de componentes que el PR de otros fotorreceptores de invertebrado; es decir, una FT seguida de una FE que antecede a la repolarización. Los diversos estudios hechos en otros fotorreceptores, también de invertebrado, han mostrado que después de la llegada del estímulo luminoso se isomeriza la rodopsina; como resultado de ello se producen cambios en la conductancia de la membrana fotorreceptora que originan una despolarización que se conoce como PR; este está constituido por una FT y una FE que antecede a la repolarización; las dependencias iónicas estudiadas implican al sodio como el ion cuya entrada a la célula desencadena la FT; al calcio como un posible acarreador de corriente y además como el responsable de la disminución en la sensibilidad del fotorreceptor durante la adaptación a la luz; y al potasio como el responsable del proceso de repolarización. En el fotorreceptor visual del acocil no se han estudiado en forma sistemática las dependencias iónicas del PR. Los estudios existentes parecen mostrar que el sodio participa en la generación de la FT; el ingreso de calcio a través de la membrana celular parece determinar la amplitud y la duración de la respuesta; del fenómeno de repolarización no se tiene información.

La FT del PR de las células retinulares del acocil disminuye en amplitud cuando se reduce el sodio extracelular; no se conoce si esta reducción en la amplitud es mayor cuando la preparación está adaptada a la luz que cuando está adaptada a la oscuridad; cuando no hay sodio en la solución de prueba la FT no desaparece ni se ha propuesto la participación en ella de otros iones. Por otro lado, la FE decrece cuando se eleva el Ca_{e} y aumenta en amplitud y duración cuando se retira el calcio de la solución de prueba; no están claras las relaciones entre la FT y la FE. A partir de esta información, surge la necesidad de estudiar las dependencias iónicas del PR, así como las características del mismo tanto en condiciones de adaptación a la luz como en las de adaptación a la oscuridad, tratando de establecer el papel del sodio y del calcio en la generación de la FT. En consecuencia se

pueden formular las siguientes hipótesis:

a) Si el Na^+ participa en la generación del PR, entonces la amplitud de la FT mostrará una relación directa y proporcional con la $[\text{Na}^+]_e$.

b) Si el ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana celular participa en la generación de la FT entonces, las modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ producirán cambios directamente proporcionales en la amplitud de la FT del PR.

c) Si el nivel de Ca^{2+} , determina el estado de adaptación a la luz, entonces el bloqueo en el ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana celular, producirá respuestas equivalentes a la adaptación a la oscuridad.

d) Si el nivel de Ca^{2+} , determina el estado de adaptación a la luz, entonces el incremento de Ca^{2+} en el citosol, por aumento en el ingreso o por liberación desde los depósitos intracelulares, producirá respuestas equivalentes a la adaptación a la luz.

e) Si el nivel de Ca^{2+} , determina la duración del PR, entonces el bloqueo en el ingreso de Ca^{2+} inducirá respuestas de gran duración, y el incremento en el ingreso de Ca^{2+} , reducirá la duración de la respuesta.

MATERIAL Y METODOS

La preparación biológica consistía de tallos oculares aislados de acociles *Procambarus digueti* procedentes de Michoacán o de acociles *Cambarellus montezumae* procedentes del Estado de México.

El tallo ocular se seccionaba desde su base y una vez aislado se efectuaba un corte transversal sobre la córnea con una navaja fina, de manera que la sección no fuera mayor al 50% de la esfera corneal. En estas condiciones el tallo ocular se sumergía en solución salina de Van Harreveld (Van Harreveld, 1936) de donde se tomaba para su uso ulterior.

Los tallos oculares eran colocados en una cámara de registro dentro de una jaula de Faraday enegrecida en la que se podía regular la entrada de luz. Dentro de la jaula de Faraday se encontraba el vástago de un portamicroelectrodos que se conectaba al sistema de registro. La respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales se obtenía mediante registro intracelular de las células retinulares. Para ello se utilizaban micropipetas de vidrio llenas con solución de KCl 2.8 M, cuyo diámetro en la punta era del orden de 0.5 μm y que tenían una resistencia de 30 M Ω a 50M Ω . La señal eléctrica recogida como respuesta a los estímulos luminosos de características conocidas se enviaba a un preamplificador de alta impedancia (WPI, M707) y de éste al amplificador de un osciloscopio de rayos catódicos (Hewlett Packard, mod. 1201B); en paralelo, la señal era enviada a un poligrafo (Grass, mod. 7) en el que se obtenía el cambio de potencial y la velocidad de cambio de potencial (dV/dt) (Fig. 2). Bajo control microscópico se hacía descender la micropipeta mediante un micromanipulador hasta obtener una caída de potencial del orden de los 40 mV que corresponde al potencial de membrana en reposo de la célula retinular. Los estímulos luminosos provenían de un fotoestimulador (Grass PS22) y consistían en destellos de prueba de 1800 lux de intensidad y 14 μs de duración aplicados cada dos minutos.

Del registro de voltaje de cada respuesta, se midió la amplitud de la fase transitoria (FT), la amplitud de la fase estable (FE) y la duración de la respuesta (τ). Del registro

obtenido con el diferenciador se midieron las velocidades de despolarización (DdV/dt) y de repolarización (rdV/dt y RdV/dt). Los métodos de medición y las formas de análisis de las diferentes variables, se describen con más detalle en la sección de resultados.

La participación de los iones de sodio y de calcio se estudió en tres condiciones funcionales: de equilibrio (estado estable), de adaptación a la luz y de adaptación a la oscuridad; para ello se realizaron curvas de adaptación a la luz (CAL) y curvas de adaptación a la oscuridad (CAOS).

Para determinar la secuencia temporal de los cambios en el PR durante la iluminación sostenida se realizaron las curvas de adaptación a la luz (CAL). Los tallos oculares eran colocados desde el inicio del experimento en la solución de prueba correspondiente; una vez obtenido el potencial de membrana en reposo, se mantenía la preparación en oscuridad durante 10 min., y se aplicaban destellos de prueba cada dos minutos; al término de este tiempo se iluminaba la preparación con una luz tenue orientada a 45° , iluminación de adaptación, durante diez minutos en los que se mantenía la estimulación de prueba cada dos minutos.

Para obtener las CAOS, se procedía de la siguiente manera: después de penetrar a la célula retinular, se mantenía la preparación en oscuridad constante durante 20 min, aplicando los destellos de prueba cada dos minutos, lo que permitía tener la preparación en un estado de equilibrio dinámico (estado estable); al término de los 20 minutos se iluminaba la preparación con luz tenue durante 10 min sin aplicar los destellos de prueba. Esta iluminación permitía llevar a todas las preparaciones a condiciones equivalentes en cuanto a cantidad de fotorpigmento y sensibilidad a los estímulos de prueba; al término de la iluminación la preparación se mantenía en oscuridad constante, sólo interrumpida por los destellos de prueba aplicados cada dos minutos, durante el resto del experimento (50 min). La preparación era colocada en una cámara de perfusión continua de 0.5 ml de capacidad que permitía mantener flujos continuos de hasta 0.5 ml/s y en la cual se podía efectuar el intercambio total de la solución

de perfusión por otra en un intervalo mínimo (del orden de los 30 s). La preparación se perfundía con solución de Van Harreveld desde el inicio del registro; esta solución era sustituida por la solución de prueba 10 min después de iniciado el registro; la preparación permanecía en la solución de prueba durante 50 minutos y era regresada luego a la solución de Van Harreveld en la que se mantenía durante el resto del registro (de 10 a 40 min). Este protocolo de trabajo permitía que cada preparación fuera su propio testigo, además de descartar deterioros imputables al tiempo y no a la modificación iónica.

Las modificaciones iónicas efectuadas para ambos tipos de curvas se dividieron en cuatro grupos experimentales:

- 1 Reducción de la concentración extracelular de calcio ($[Ca]_e$).
- 2 Reducción de la concentración extracelular de sodio ($[Na]_e$) en soluciones con reducción de la $[Ca]_e$.
- 3 Incremento en la $[Ca]_e$ en soluciones sin Na_+ .
- 4 Adición de cobalto en soluciones previamente modificadas en su concentración de calcio o de calcio y de sodio.

En la Tabla 1, se muestra la composición de cada una de las soluciones utilizadas. A menos que se indique lo contrario, de cada solución se hicieron por lo menos seis experimentos, los que se promediaron y cuyos resultados se muestran en la sección correspondiente.

En las soluciones en las que se retiró el calcio y se agregó EDTA, se midió la concentración de calcio libre con un electrodo sensible a este ion y se obtuvieron valores de aproximadamente 3×10^{-7} M/l. El electrodo fue fabricado en el laboratorio y consiste en una mezcla 1:1 de una resina de intercambio catiónico sensible a Ca^{++} (calcium²⁺- cocktail p.a.; Fluka AG, CH-9470 Buchs) con cloruro de polivinilo diluido en tetrahidrofurano. Aproximadamente $7 \mu l^1$ de la mezcla fueron colocados en la punta del electrodo, que fue llenado con una de las soluciones de calibración a un pCa de 7 y conectado al medidor de pH. Este medidor, utilizado como voltímetro, mide el potencial entre el electrodo sensible a calcio y un electrodo de referencia colocado en la misma solución. Las soluciones utilizadas para calibrar el electrodo fueron facilitadas amablemente por el Dr. Fidel Ramón, Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN.

electrodo tienen diferentes con concentraciones de calcio libre y fueron preparadas siguiendo formulas publicadas (Tsien y Rink, 1980; Arellano, 1986) (cabe aclarar que en este caso el término pCa tiene el mismo significado que el de pH pero aplicado a la concentración de calcio)

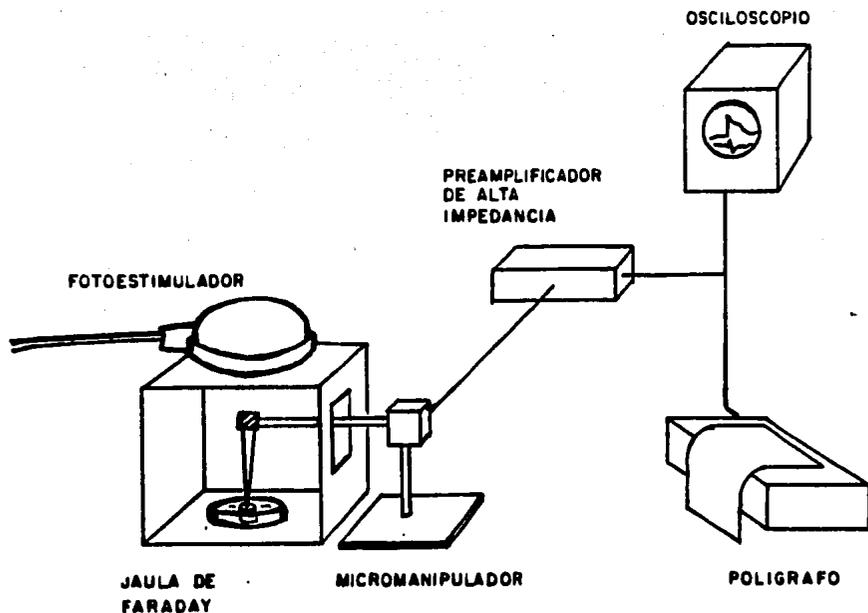


Figura 2. Diagrama del dispositivo de registro utilizado para medir la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados del acocil.

TABLA 1

Composición milimolar de las soluciones

Sol.	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaHCO ₃
ST	205.34	5.36	13.51	1.23	2.38
Ca 0.5	205.34	5.36	6.75	1.23	2.38
Ca 0.25	205.34	5.36	3.40	1.23	2.38
Ca 0	205.34	5.36	0.00	1.23	2.38
Ca0/EDTA	205.34	5.36	0.00	1.23	2.38
Na 0.5	*154.01	5.36	0.00	1.23	2.38
Na 0.25	*51.34	5.36	0.00	1.23	2.38
Na0/Ca0	* 0.00	5.36	0.00	1.23	0.00*
Ca 205	* 0.00	5.36	205.34	1.23	0.00*
Ca 10	* 0.00	5.36	135.10	1.23	0.00*
Ca 1	* 0.00	5.36	13.51	1.23	0.00*
Ca 0.1	* 0.00	5.36	1.35	1.23	0.00*
Ca0/Na0 Co/Cof	* 0.00	5.36	0.00	1.23	0.00*
Ca0/Na0 Co	* 0.00	5.36	0.00	1.23	0.00*
Co	205.34	5.36	0.00	1.23	2.38

ST solución Van Harreveld testigo

@ 4 mM de EDTA

* En todas las soluciones con reducción de la concentración de Na, la osmolaridad se ajustó a 420 mOsm con cloruro de colina.

• el NaHCO₃ se sustituyó por 2.38 mM de KHCO₃

‡ 2 mM de Cafeína, 2 mM de CoCl₂

‡‡ 2mM de CoCl₂

ó 13.5 mM de CoCl₂

RESULTADOS

Al descender el microelectrodo y atravesar la membrana de la célula retinular se obtuvo un potencial de membrana en reposo que por promedio fue de -31.72 ± 0.88 mV ($n = 147$). La estimulación con destellos luminosos produjo un PR el cual consta de una despolarización rápida o fase transitoria (FT) seguida de una despolarización sostenida o fase estable (FE) que antecede a la repolarización. En la figura número 3 se muestran los criterios utilizados para la medición de cada una de las fases del PR, su duración y los componentes que aparecen en la derivada. El cambio de potencial desde el valor del potencial de membrana hasta el pico máximo se consideró equivalente al valor de la FT; en nuestros experimentos tuvo un valor promedio de 9.23 ± 0.20 mV. La amplitud de la FE se consideró equivalente a la amplitud de la respuesta una vez transcurrido un tiempo igual a tres veces el tiempo que se requiere para que la FT alcance el 63% de su valor máximo; su valor promedio fue 8.15 ± 0.20 mV. El tiempo transcurrido desde el inicio de la respuesta hasta que la FE hubo disminuido en un 63% de su valor se consideró como la duración total de la respuesta (τ), en las condiciones de referencia tuvo un valor promedio de 266.12 ± 27 ms. Al medir la velocidad de despolarización y de repolarización del PR por medio de un diferenciador, se obtuvo un trazo en el que se encontraron tres componentes (Fig 3): la velocidad de despolarización ($DdV/dt = 29.67 \pm 0.6$ V/s); la velocidad de repolarización que antecede al inicio de la FE ($rdV/dt = 33.94 \pm 1$ V/s); y la velocidad de repolarización final ($RdV/dt = 3.91 \pm 0.13$ V/s).

Cuando el tallo ocular se mantuvo en solución salina de Van Harreveld, las características del PR fueron relativamente constantes durante el estado estable (Fig. 4a). Durante la

adaptación a la luz hubo una reducción cercana al 40% en la amplitud (FT y FE) y la duración (τ) del PR así como en las velocidades de despolarización y repolarización (DdV/dt , rdV/dt , $RdVdt$). La adaptación a la oscuridad significó un nuevo crecimiento de la respuesta que alcanzó una recuperación no menor al 80% en todas las variables medidas (Fig 5).

Figura 3. Método de medición de las fases y de la duración del PR (arriba) y de las componentes de la derivada del PR (abajo). El cambio de potencial desde el potencial de membrana en reposo hasta el pico máximo es el valor de la FT; t_1 marca el tiempo necesario para alcanzar el 63% del valor de la FT; t_2 marca un tiempo tres veces mayor el cual se asoció con el valor de la despolarización en ese momento y que correspondió al de la FE. El tiempo transcurrido desde el inicio de la respuesta hasta que la despolarización se hubo reducido en 63% del valor de la FE correspondió a la τ . La derivada del PR mostró tres componentes que se designaron como DdV/dt , rdV/dt y RdV/dt .

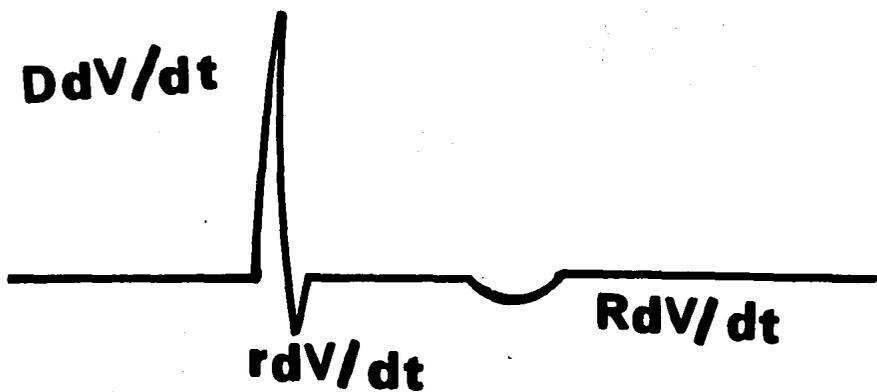
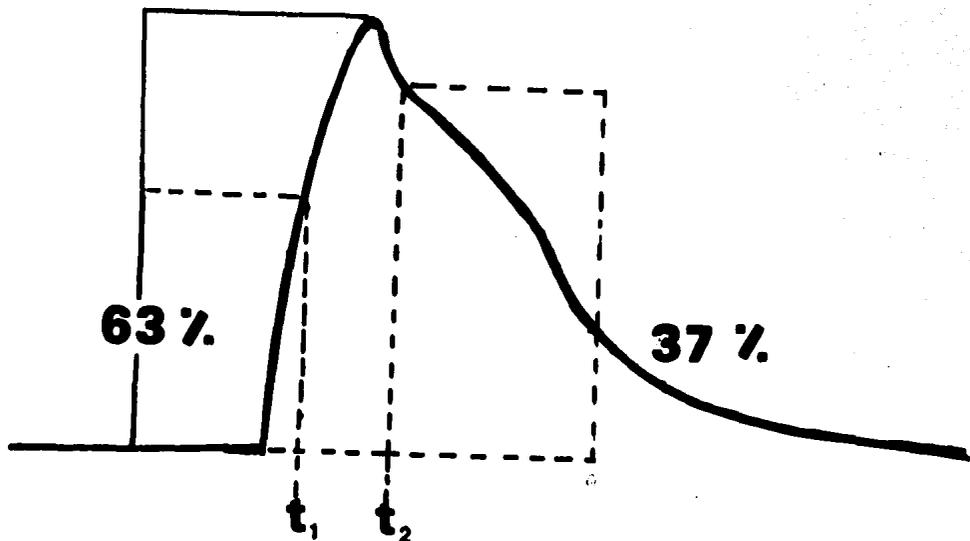


Figura 3.

En la figura 4 se muestran registros de PR y de su derivada obtenidos de tallos oculares veinte minutos después de iniciada la adaptación a la oscuridad, sumergidos en cada una de las soluciones experimentales que se detallan: en solución salina de Van Harreveld (Fig. 4a); en solución sin Ca^{2+} y con EDTA (Fig. 4b); sin Na^+ , sin Ca^{2+} y con EDTA (Fig. 4c); con 205 mM de Ca^{2+} en lugar de Na^+ (Fig. 4d); sin Na^+ sin Ca^{2+} , con 2 mM de Co^{2+} y 2 mM de cafeína (Fig. 4e). Notense los cambios en la amplitud de la FT en función de la disponibilidad de Ca^{2+} , y que esa dependencia se refleja también en la velocidad de despolarización en cada condición. Nótese también que la velocidad de repolarización es menor cuanto menos Ca^{2+} disponible hay.

Reducción de la concentración extracelular de calcio (Ca_e). (Grupo I)

La figura 4b muestra un registro típico del PR obtenido en solución salina sin Ca^{2+} y con 4 mM de EDTA, durante el estado estable. La figura 5 muestra las curvas correspondientes a los registros obtenidos en soluciones con bajo Ca^{2+} (Tabla 1). Durante el estado estable, 4 de las 6 variables consideradas (curvas 5a, 5b, 5c, 5e) mostraron un comportamiento similar al que se obtiene en la solución salina testigo; sólo la duración y la RdV/dt (curvas 5d y 5f) tuvieron un incremento significativo. Durante la adaptación a la luz, las preparaciones colocadas en solución con 50% de Ca^{2+} mostraron una menor caída en todas sus variables (excepto en la duración) que la que se observó en la solución salina testigo; no así las preparaciones colocadas en 0 Ca^{2+} + EDTA las cuales tuvieron una caída mayor que la correspondiente a la solución testigo. Durante la adaptación a la oscuridad la recuperación del PR fue equivalente en la solución con 50% de Ca^{2+} y en la solución testigo; excepto en lo que se refiere a la RdV/dt la cual se redujo y produjo el correspondiente aumento en la duración del PR. En la solución de 0 Ca^{2+} + EDTA, la DdV/dt alcanzó una recuperación de sólo el 50%; la RdV/dt se redujo más del 50% y la duración de la respuesta llegó al 200% del valor original. El regreso a la solución salina significó una tendencia a recuperar los valores de referencia en todas las variables.

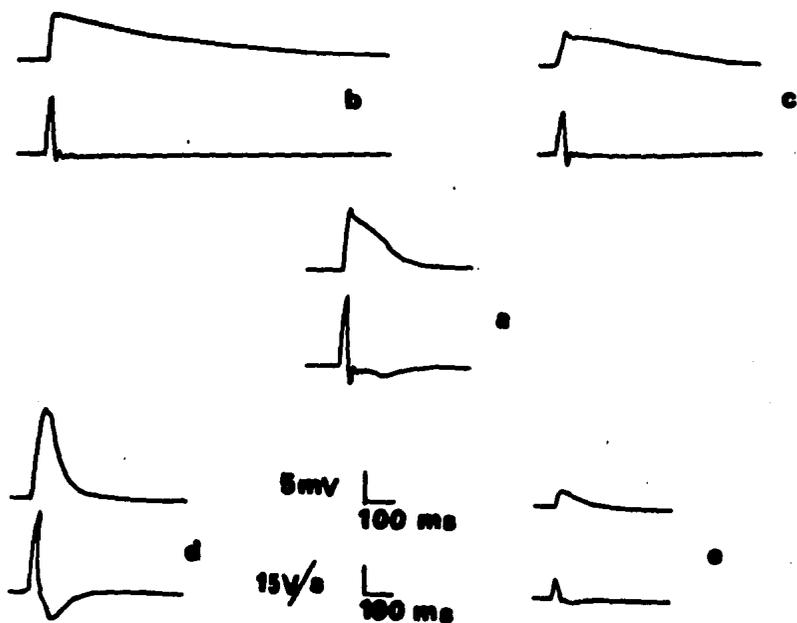


Figura 4. Potenciales de receptor, trazo superior, y su derivada, trazo inferior, obtenidos durante el estado estable en solución salina testigo (a); en solución sin Ca^{2+} y con EDTA (b); en solución sin Na^+ , sin Ca^{2+} y con EDTA (c); en solución sin Na^+ y con 205 mM de Ca^{2+} (d); y en solución sin Na^+ , sin Ca^{2+} , con 2 mM de cobalto y 2 mM de cafeína.

Figura 5. Cambios en la FT (a), en la FE (b), en la DdV/dt (c), en la RdV/dt (d), en la rdV/dt (e) y en la τ (f) obtenidos de tallos oculares inmersos en solución testigo de Van Harreveld (x), en solución con 50% de Ca^{2+} (●) o en solución sin Ca^{2+} y con EDTA (o) durante el estado estable, la adaptación a la luz y la adaptación a la oscuridad. Nótese que con respecto a la solución testigo de Van Harreveld, la presencia del EDTA redujo todas las variables excepto la τ .

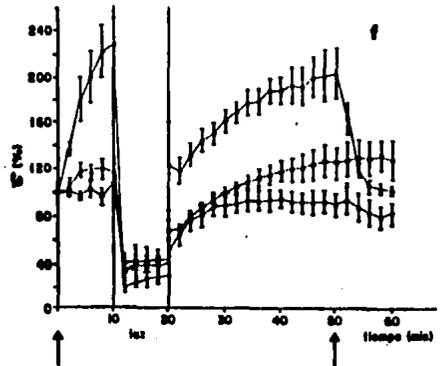
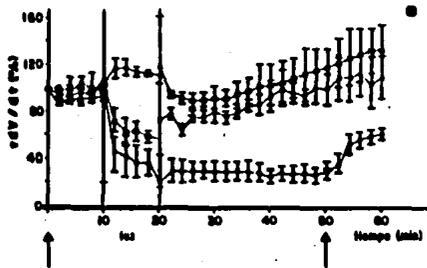
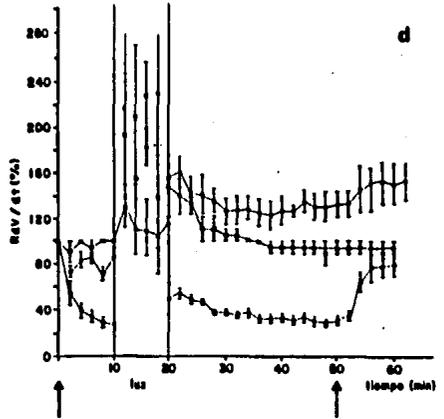
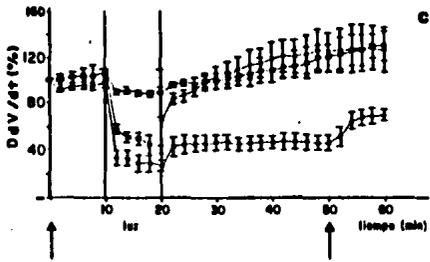
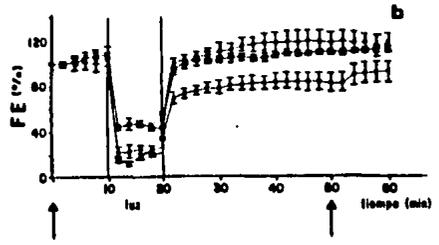
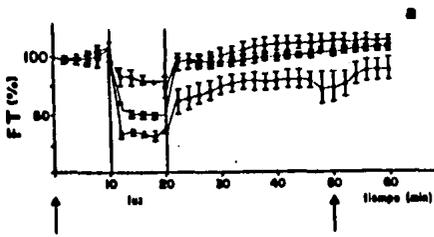


Figura 5.

En la figura 6 se muestra la relación entre la FT y la $[Ca^{2+}]_e$ y entre la τ y la $[Ca^{2+}]_e$ de respuestas obtenidas de tallos oculares colocados en las distintas soluciones con bajo Ca^{2+} y adaptadas a la oscuridad durante 20 minutos. Es evidente que la amplitud de la FT mantuvo una relación directamente proporcional con la $[Ca^{2+}]_e$ y que la τ mantuvo una relación inversa con respecto a esta misma situación experimental de tal manera que las respuestas más prolongadas (de hasta 800 ms) se obtuvieron en la solución en la que se llevó a cabo la sustitución equimolar de Ca^{2+} por Co^{2+} .

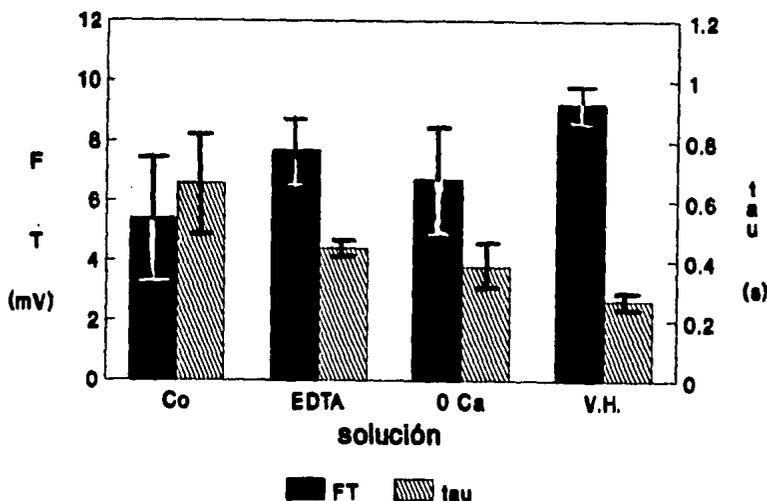


Figura 6. Valores promedio de la FT (barras oscuras) y de la τ (barras sombreadas) en soluciones salina normal (VH), sin Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$), sin Ca^{2+} y con EDTA (EDTA), y con cobalto como sustituto del Ca^{2+} (Co^{2+}) durante la adaptación a la oscuridad. Nótese la relación directamente proporcional entre la FT y la disponibilidad de Ca^{2+} y la relación inversa para la τ .

Reducción de la concentración del sodio (Na⁺) en soluciones con

reducción de la [Ca²⁺]. (Grupo 2)

En la solución sin Ca²⁺, con EDTA y con 50% de Na⁺, los resultados mostraron, durante el estado estable, poco cambio en todas las variables del PR excepto en la τ la cual mostró un notable incremento (Fig 7). Durante la adaptación a la luz todas las variables mostraron mayor reducción que en la solución testigo excepto la RdV/dt la cual tuvo una caída equivalente a la de la solución salina (Fig. 7d). Durante la adaptación a la oscuridad hubo poca diferencia entre las respuestas obtenidas en la solución salina y en las soluciones de prueba, solamente la reducción en la RdV/dt y el correspondiente aumento en la duración de la respuesta fueron significativos (Figs. 7d y 7f).

Cuando faltaron el Na⁺ y el Ca²⁺ en la solución de prueba, durante el estado estable (Fig. 4c) la respuesta decreció en todos sus parámetros excepto en la duración la cual mostró un aumento del 60% (Fig. 7f); la iluminación sostenida redujo los valores de todos los parámetros de la respuesta hasta en un 90%, aunque la duración apenas se redujo en un 30%. Durante la adaptación a la oscuridad se presentó un gran número de cambios; la FT mostró una recuperación del 60%; la DdV/dt apenas alcanzó un 30% de su valor de referencia; las velocidades de repolarización se redujeron mucho y la τ aumentó notablemente. La disparidad en la recuperación de la FT y la DdV/dt pudiera deberse a que cuando la DdV/dt es muy pequeña (es decir la respuesta es muy lenta) no es posible distinguir entre FT y FE; la dificultad para distinguir entre la FT y la FE también se puede asociar con la reducción de la rdV/dt; la reducción de la RdV/dt fue responsable del gran aumento en la duración de la respuesta, que en algunos casos llegó a ser de más de tres veces el valor de referencia (Figs. 7d y 7f). Cabe destacar la gran dispersión que se puede observar en los valores de la duración de la respuesta los cuales se llegaron a triplicar en algunas preparaciones mientras que en otras sólo se duplicaron. La heterosedasticidad que muestran valores tan

disparos, no impidió, sin embargo, que fueran significativamente diferentes con respecto a los obtenidos en la solución salina testigo. Cuando la preparación fue reintegrada a la solución salina testigo se presentó una tendencia a la recuperación de los valores de referencia, los que sin embargo, sólo se alcanzaron en la fase estable y en la duración (Figs. 7b y 7d).

El voltaje de la FT obtenido de preparaciones adaptadas a la oscuridad durante 20 minutos, sumergidas en soluciones carentes de Ca^{2+} , con EDTA y distintas concentraciones de Na^+ se muestra en la figura 8. No se encontró ninguna diferencia en las FT en las soluciones con 100% y 75% de Na^+ . Por otra parte, en la solución con 50% de Na^+ la FT tuvo un voltaje promedio del mismo orden que el que se registró en la solución salina testigo (compárense los valores de voltaje de las figuras 6 y 8) y que fue claramente mayor al de las dos soluciones anteriores. La amplitud de la FT registrada en la solución con 25% de Na^+ fue menor que la que se obtuvo en soluciones con el 75% y el 100% de Na^+ . La falta de Ca^{2+} mantuvo alargada la respuesta independientemente de los niveles de Na^+ (Fig. 8), lo que significó que la τ tuvo un valor cercano a los 400 ms en todas las soluciones del grupo 2.

Figura 7. Cambios en la FT (a), en la FE (b), en la DdV/dt (c), en la RdV/dt (d), en la rdV/dt (e) y en la r (f) durante el estado estable, la adaptación a la luz y la adaptación a la oscuridad obtenidos de tallos oculares inmersos en solución testigo de Van Harreveld (x) o en soluciones sin Ca^{2+} , con EDTA y 50% del Na^+ (●) o sin Na^+ (○). Nótese la reducción en todas las variables dependiendo de $[\text{Na}^+]$ y el gran aumento en la r que es máximo cuando faltan el Na^+ y el Ca^{2+} .

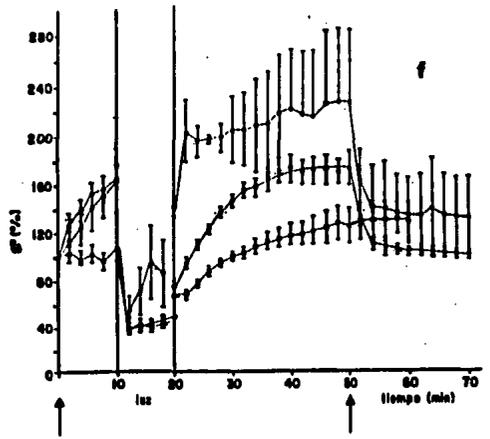
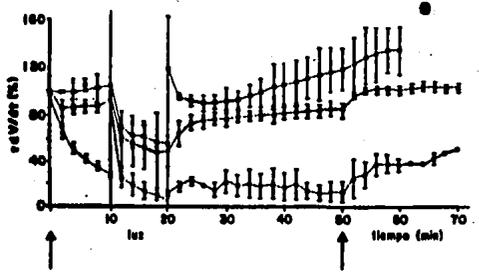
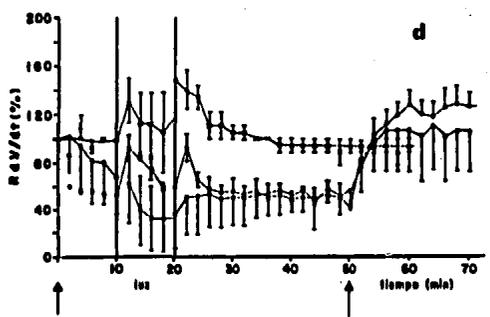
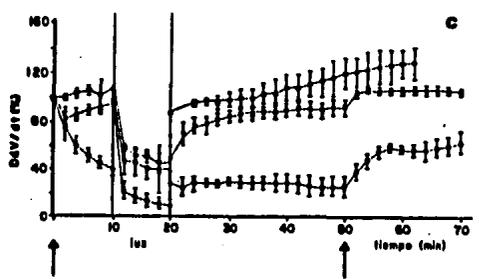
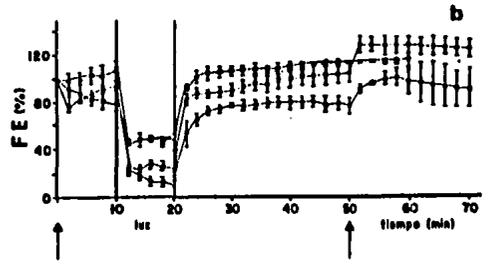
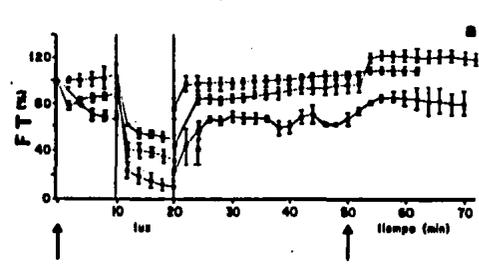


Figura 7.

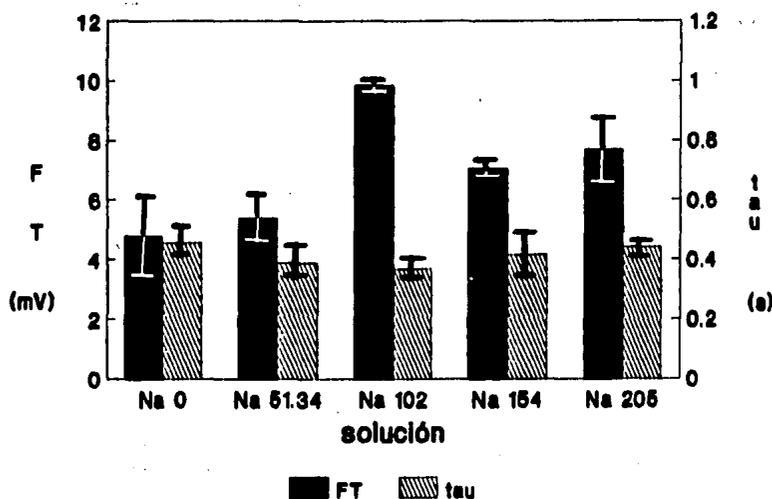


Figura 8. Valores de la FT (barras oscuras) y de la τ (barras sombreadas) en soluciones sin Ca^{2+} y con EDTA y con 205.34 mM de Na^+ (Na^+ 205), 154.01 mM de Na^+ (Na^+ 154), 102.67 mM de Na^+ (Na^+ 102), 51.34 mM de Na^+ (Na^+ 51.34), y sin Na^+ (Na^+ 0) durante la adaptación a la oscuridad. Nótese que el valor de la FT en la solución Na^+ 102 es equivalente al obtenido en la solución salina testigo.

Incremento en la [Ca] en soluciones sin Na⁺ (Grupo 3)

En la figura 9 se muestran los efectos de modificar la [Ca²⁺]_e en soluciones carentes de Na⁺. Nótese el gran parecido de las respuestas que se obtuvieron en las soluciones salina, 0 Na⁺/0.1 Ca²⁺ y 0 Na⁺/1 Ca²⁺. La presencia de Ca²⁺, aun en una décima parte de su concentración normal mantuvo, dentro de límites relativamente normales, las características de las respuestas durante el estado estable. Concentraciones de Ca²⁺ diez veces mayores a las de la solución salina no solo mantuvieron la respuesta sino que incrementaron en forma notable los valores de la FT, de la DdV/dt, de la FE y de las velocidades de repolarización; en forma concomitante con la RdV/dt, se redujo la duración de la respuesta. La sustitución equimolar de Na⁺ por Ca²⁺, con un incremento de la osmolaridad del 35%, mantuvo el PR, incrementó notablemente la FT, la DdV/dt, la FE la rdV/dt y la RdV/dt; sólo la duración de la respuesta presentó una reducción de 70%. Durante la iluminación sostenida, las respuestas casi desaparecieron excepto en la solución 0 Na⁺/1 Ca²⁺, en la que se observó que la respuesta se preservó aun cuando solo tuvo una décima parte de las características originales y una duración mayor que la que mostrara antes de la iluminación (Fig. 9).

Durante la adaptación a la oscuridad, en todas las soluciones se observó una recuperación del orden del 80% en todos los parámetros que se midieron excepto en la duración de la respuesta la que fue menor que en la solución salina testigo; la respuesta en la solución en la que el Ca²⁺ sustituyó al Na⁺ (205 mM) mostró una recuperación entre el 60% y el 70% (Figs. 9a, 9b, 9c y 9e). Sin embargo, la RdV/dt se mantuvo en valores de por lo menos el doble de los de referencia, lo que significó una duración del orden del 30% de la inicial (Figs. 9d y 9f). El regreso a la solución salina testigo incrementó los valores de la FT, de la FE y de la DdV/dt (Figs. 9a, 9b y 9c) en todas las soluciones de este grupo; no hubo cambios importantes en los valores de la rdV/dt, de la RdV/dt ni de la τ (Figs. 9d, 9e y 9f).

La capacidad del Ca^{2+} para mantener la respuesta fotorreceptora en soluciones carentes de Na^+ se puso de manifiesto al medir el valor de la FT después de que el ojo hubo permanecido en la oscuridad durante 20 minutos (Fig. 10). Bastaron 1.3 mM de Ca^{2+} en la solución para mantener la amplitud de la FT; por su parte, 130 mM de Ca^{2+} produjeron respuestas de amplitud equivalente a la de la solución salina testigo; la sustitución de la totalidad del Na^+ por Ca^{2+} (205 mM) mantuvo las respuestas en niveles inferiores a los de referencia pero no las hizo desaparecer (Fig 10). En forma concomitante a las modificaciones en la FT se produjeron los cambios en la τ ; con 1.3 mM de Ca^{2+} en la solución de prueba sin Na^+ , la τ no aumentó durante la adaptación a la oscuridad y al incrementar la concentración de Ca^{2+} la duración se redujo cada vez más hasta tener valores menores a los 150 ms en la solución en la que el Ca^{2+} sustituyó por completo al Na^+ (Fig. 10).

Figura 2. Cambios en la FT (a), en la FE (b), en la DdV/dt (c), en la RdV/dt (d), en la rdV/dt (e) y en la τ (f) durante el estado estable, la adaptación a la luz y la adaptación a la oscuridad obtenidos de tallos oculares inmersos en solución testigo de Van Harreveld (x), en solución sin Na^+ y con 0.13 mM de Ca^{2+} (●); sin Na^+ y con 130 mM de Ca^{2+} (○); o sin Na^+ y con 205 mM de Ca^{2+} (Δ). Notese el crecimiento en todas las variables, excepto en la τ , durante el estado estable en particular en la solución con 205 mM de Ca^{2+} .

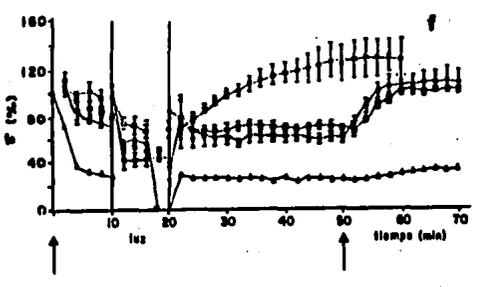
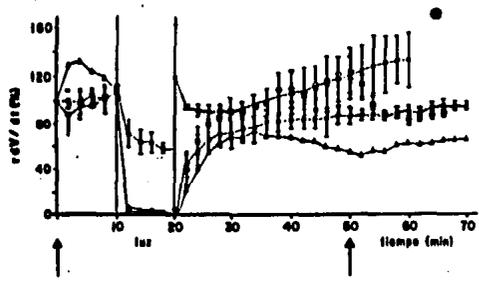
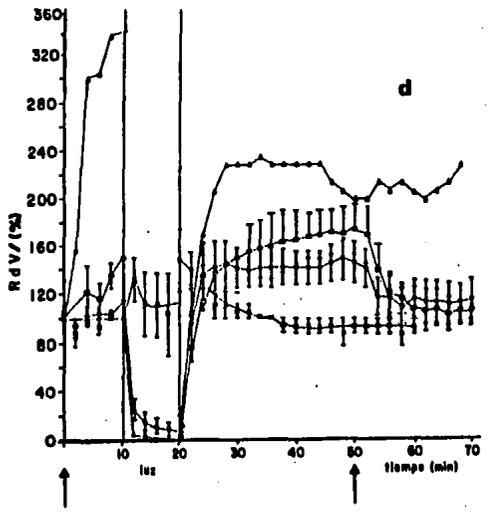
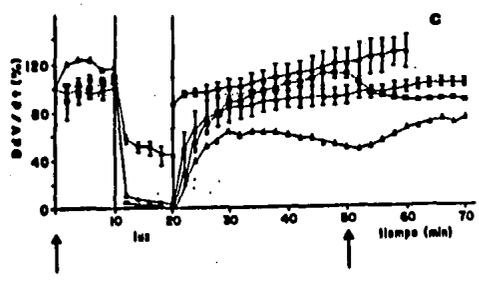
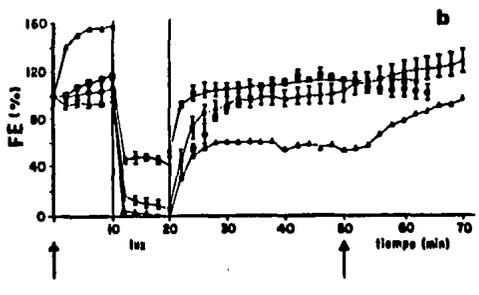
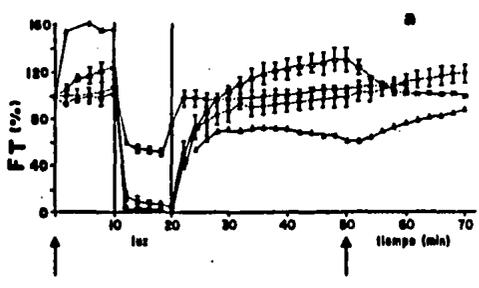


Figura 2.

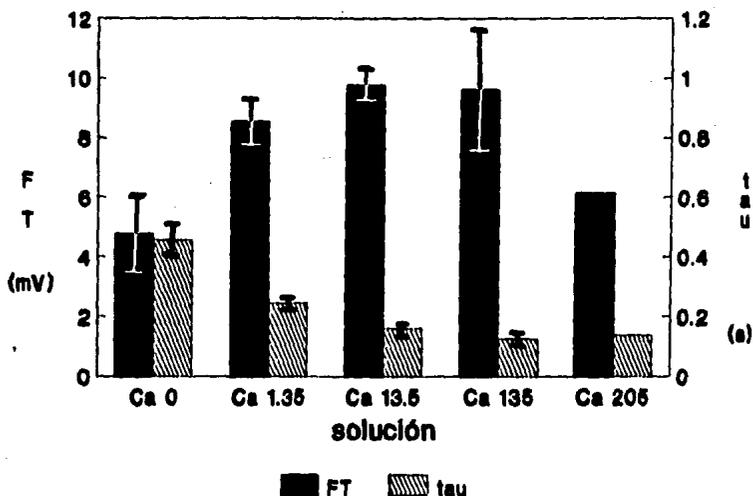


Figura 10. Valores de la FT (barras oscuras) y de la τ (barras sombreadas) en soluciones sin Na^+ y con 205.34 mM de Ca^{2+} (Ca^{2+} 205), 135.1 mM de Ca^{2+} (Ca^{2+} 135), 13.51 mM de Ca^{2+} (Ca^{2+} 13.5), 1.35 mM de Ca^{2+} (Ca^{2+} 1.35), y sin Ca^{2+} y con EDTA (Ca^{2+} 0) durante la adaptación a la oscuridad. Nótese que en ausencia de Na^+ bastan 1.35 mM de Ca^{2+} para mantener la respuesta. Obsérvese también la relación inversamente proporcional entre la τ y la concentración extracelular de Ca^{2+} .

*Adición de cobalto en soluciones previamente modificadas en su
concentración de calcio o de calcio y sodio (Grupo 4)*

Se sabe que el Co^{2+} es un bloqueador del ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana celular. Al sustituir el Ca^{2+} por cobalto en una solución sin modificaciones en la $[\text{Na}^+]_o$, durante el estado estable se redujeron la FT, la Ddv/dt , la rdv/dt y la Rdv/dt (Figs. 11a, 11c, 11e y 11f); la FE no sufrió cambio alguno (Fig. 10b), pero la duración de la respuesta se incremento en poco mas del 100% (Fig. 11d). Durante la iluminación sostenida todas las variables del PR se redujeron en forma importante sin llegar a desaparecer (Fig. 11). Durante la adaptación a la oscuridad, la presencia del Co^{2+} significó un fuerte bloqueo de la FT, la que se recuperó en un 100%; el bloqueo fue mas evidente en la Ddv/dt la que apenas alcanzo un 40% de recuperación (Figs. 11a y 11c), la recuperación de la FE fue del orden del 70% (Fig. 11b). Las velocidades de repolarización se redujeron en forma notable (Figs. 11e y 11f) y la duración de las respuestas se incremento en un 100% (Fig. 11d). Los efectos antes descritos para el estado estable, la iluminación y la oscuridad se acentuaron cuando a la solución sin Ca^{2+} y con Co^{2+} se le eliminó todo el Na^+ (Fig. 11a a 11f). Cabe destacar que cuando a la solución sin Na^+ y sin Ca^{2+} se agregaron mas de 2mM de CoCl_2 , el PR se redujo notablemente aun antes de aplicar la iluminación sin que se pudiera encontrar respuesta alguna al término de la etapa de adaptación a la luz. De hecho, en los recuadros de la figura 11 solamente se muestran las curvas con solución salina y con Co^{2+} sustituyendo al Ca^{2+} ya que en las otras dos soluciones no fue posible encontrar respuesta.

Se sabe que la cafeína, al igual que otras metilxantinas, reduce la efectividad de los sistemas de secuestro de Ca^{2+} , hacia

los compartimentos intracelulares lo que significa que bajo su acción se incrementa la $[Ca^{2+}]_i$. Cuando la solución salina fue sustituida por una solución sin Na^+ , sin Ca^{2+} , con 2mM de $CoCl_2$ y con 2 mM de cafeína, la respuesta se redujo en todos sus parámetros durante el estado estable. La iluminación sostenida hizo desaparecer la respuesta, la que no se registró aun dos minutos después de iniciada la oscuridad. Durante la adaptación a la oscuridad hubo una recuperación mínima que consistió en pequeñas despolarizaciones, muy lentas y de gran duración (Figs. 11a a 11f). El regreso a la solución salina significó una recuperación lenta pero continua la que, sin embargo, apenas alcanzo el 60% veinte minutos después de reiniciada la perfusión con solución salina de Van Harreveld (Fig. 11).

La reducción en el ingreso de Ca^{2+} originada por el bloqueo por cobalto produjo respuestas cuya FT, medida después que el ojo hubo permanecido durante veinte minutos en la oscuridad fue muy baja (del orden de los 5 mV) y que se redujo aún mas cuando no hubo ni Na^+ ni Ca^{2+} en la solución de prueba; los efectos de la cafeína aunados a los del cobalto en soluciones sin Na^+ ni Ca^{2+} se tradujeron en una mayor reducción de los valores de la FT (Fig. 12). En estas mismas soluciones, la duración de la respuesta llegó a ser hasta de 650 ms en la solución con Co^{2+} en sustitución del Ca^{2+} y en la solución con 2 mM de Co^{2+} , 2 mM de cafeína, sin Na^+ y sin Ca^{2+} ; en la solución sin Na^+ y sin Ca^{2+} y con 2 mM de Co^{2+} , el valor absoluto de la τ no fue diferente al de la solución salina de Van Harreveld; sin embargo, proporcionalmente tuvo un incremento del orden del 35% con respecto a las respuestas obtenidas al inicio del registro (Figs. 11 y 12).

Figura 11. Cambios en la FI (a), en la FE (b), en la DdV/dt (c), en la RdV/dt (d), en la rdV/dt (e) y en la τ (f) durante el estado estable, la adaptación a la luz y la adaptación a la oscuridad obtenidos de tallos oculares inmersos en solución testigo de Van Harreveld (x); en solución sin Ca_2^+ y con 13 mM de cobalto (●); en solución sin Na_2^+ , sin Ca_2^+ y con 2 mM de cobalto (○); o en solución sin Na_2^+ , sin Ca_2^+ , con 2 mM de cobalto y 2 mM de cafeína (Δ). Durante la adaptación a la oscuridad prevaleció la acción del cobalto sobre la de la cafeína.

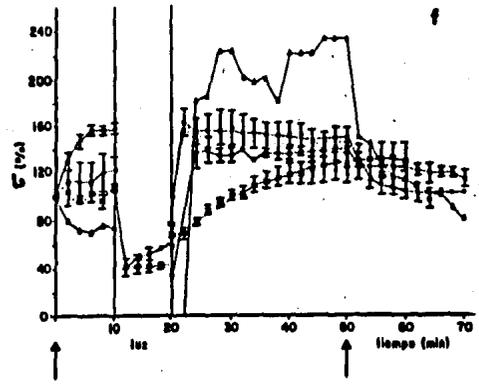
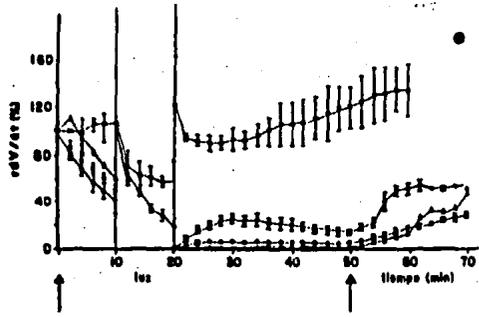
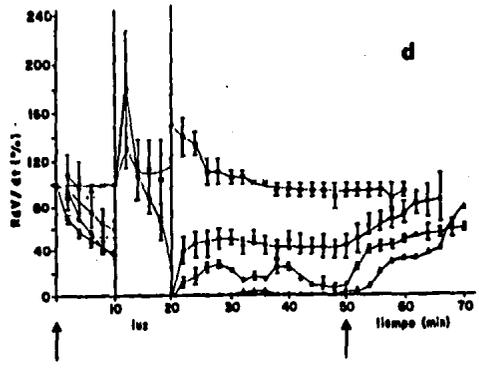
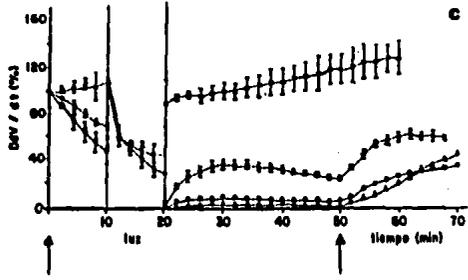
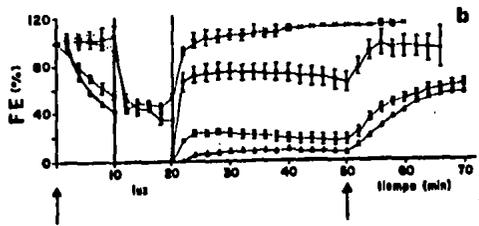
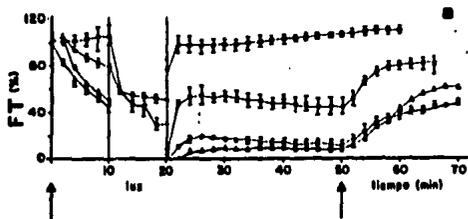


Figure 11.

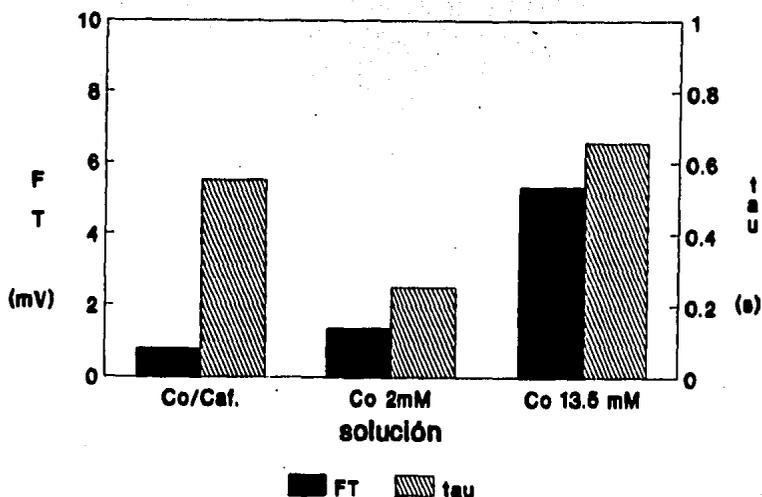


Figura 12. Valores de la FT (barras oscuras) y de τ (barras sombreadas) en soluciones sin Na^+ , sin Ca^{2+} , con 2 mM de cobalto y 2 mM de cafeína (Co/Caf); sin Na^+ , sin Ca^{2+} y con 2 mM de cobalto (Co^{2+} 2mM) y sin Ca^{2+} y con 13.5 mM de cobalto (Co^{2+} 13.5 mM) durante la adaptación a la oscuridad. Obsérvese que el efecto de la cafeína fue revertido durante esta etapa pues prevaleció el efecto de la falta de Ca^{2+} y del cobalto.

El PR de las células retinulares del acocil es una despolarización que resulta de la isomerización de la rodopsina presente en el rabadomo de las propias células. El cambio de la forma 11-cis a la trans parece desencadenar la apertura de canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del tipo lento, si consideramos solamente la velocidad de despolarización encontrada (dV/dt) cuyos valores corresponden a los reportados para células en las que se encuentran este tipo de canales (Sperelakis y cols. 1988). Aunque no se trata de un estudio de fijación de voltaje los resultados encontrados apuntan con toda claridad hacia la presencia de canales de este tipo o de tipos similares.

Parámetros de Medición:

=====

En la mayor parte de los trabajos hechos sobre el PR de diferentes fotorreceptores se han aplicado estímulos luminosos cuya duración es del orden de los 100 ms. Hay solo algunos estudios en los que la duración de los destellos de prueba es de 10 ms (Baumann, 1968; Hochstrate y Hamdorf, 1985). En cualquier caso resulta evidente que a menor duración del estímulo habrá menor posibilidad de afectar con él la dinámica del fotorreceptor el cual requiere que haya un cierto tiempo entre un estímulo y otro, para recuperar su capacidad de respuesta. El estímulo de 14 μs empleado en nuestros experimentos permite asegurar que los cambios que se observan en los componentes del PR durante las distintas etapas del experimento corresponden, en efecto, a los cambios iónicos generados como consecuencia de las distintas soluciones de prueba, durante el estado estacionario, la adaptación a la luz o la adaptación a la oscuridad. Por otra parte, resulta sorprendente que las células retinulares del acocil sean capaces de responder a destellos de prueba de tan corta duración con respuestas que duran unas 20 000 veces más que el estímulo (ya que la duración del PR es, en las células

sumergidas en solución salina de Van Harreveld del orden de los 200 ms). Esto significa que el PR se origina por mecanismos cuya activación ocurre en tiempos muy cortos (menores a los 14 μ s) pero cuyas consecuencias persisten durante periodos muy prolongados.

La medición sistemática de las velocidades de cambio de voltaje (dV/dt , rdV/dt y RdV/dt) nos permitió tener una mejor aproximación del curso temporal de la respuesta durante las distintas etapas del experimento. Las condiciones experimentales en las que se trabajó permitieron estudiar el PR de las células retinulares del acocil en tres estados funcionales diferentes, el estado estable, la iluminación sostenida (adaptación a la luz) y la adaptación a la oscuridad. Durante cada una de estas condiciones las preparaciones se mantuvieron inmersas en solución salina de Van Harreveld o en alguna de las soluciones modificadas, lo que permitió que cada preparación fuera su propio testigo ya que las comparaciones se hicieron siempre con respecto a la respuesta en solución salina de Van Harreveld (Fig. 4a).

Estos tres estados funcionales permitieron estudiar la participación del Na^+ y del Ca^{2+} en ellos y el estudio experimental progresivo de cuatro condiciones que fueron la reducción en la $[Ca^{2+}]_e$ (grupo 1), la reducción en la $[Na^+]_e$ en condiciones de muy baja $[Ca^{2+}]_e$ (grupo 2), el aumento en la $[Ca^{2+}]_e$ en soluciones con muy baja $[Na^+]_e$ (grupo 3), y por último la acción del cobalto en soluciones con muy baja $[Ca^{2+}]_e$ y $[Na^+]_e$ (grupo 4). Los registros poligráficos que se incluyen en la figura 4 muestran los distintos tamaños y formas que llega a alcanzar el PR después de haber mantenido la preparación en la oscuridad y con cada uno de los cuatro tipos de soluciones empleados. Este tipo de registro mantiene una gran linealidad con respecto a los registros oscilográficos (Hernández Falcón, 1984). Sin embargo, en los obtenidos con el diferenciador, se presenta una oscilación de alta frecuencia al final de la componente rdV/dt en las (figuras 4a, 4b y 4c). Esta oscilación podría haber sido causada por una mala compensación del preamplificador de alta impedancia que originaría una sobrecompensación de la señal; sin embargo, dada la linealidad que existe entre los registros poligráfico y oscilográfico así como la ausencia de oscilaciones

en el registro de voltaje debemos descartar al preamplificador como la causa de la oscilación del diferenciador. De acuerdo con el dispositivo de registro que se muestra en la figura 3, otra posibilidad es que sea en el diferenciador donde exista la sobre o subcompensación, ya que la señal que se deriva procede del propio polígrafo. En este sentido hay que señalar que se hicieron diversas pruebas aumentando o reduciendo el filtrado de las señales en la etapa de amplificación del diferenciador con lo que se lograba amortiguar e incluso hacer desaparecer la oscilación. Sin embargo estas maniobras traían también como consecuencia que se redujeran e incluso desaparecieran los trazos de la repolarización. Por ello se decidió tener la señal completa aunque muy probablemente sobreestimada, lo que significa que los valores de la velocidad de cambio de voltaje podrían ser en realidad menores a los encontrados.

En la solución testigo (Figs. 4a y 5), el poco cambio en la amplitud de la FT, de la FE y de la r durante el estado estable se puede interpretar como el reflejo de un equilibrio en los niveles iónicos intracelulares; la pequeña cantidad de luz recibida por la célula retinular hace que, por una parte se degrade una cantidad de rodopsina suficientemente pequeña como para que pueda ser sintetizada en cantidades equivalentes y por otra, origina que los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ estén bajos pero relativamente constantes. De ahí la poca variación en la velocidad a la que se genera cada respuesta. Durante la adaptación a la luz la FT y la FE reducen progresivamente su amplitud y su duración, lo cual pone de manifiesto que estos dos procesos están íntimamente vinculados. En la baja amplitud de los dos componentes del PR se pone de manifiesto la destrucción progresiva del pigmento fotosensible (Wald, 1968) así como un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Brown y Blinks, 1974). El aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ resulta tanto del ingreso de Ca^{2+} desde el medio extracelular favorecido por la reducción de la resistencia de entrada de la membrana durante la iluminación (Muijser, 1979) como de la salida del ion desde los depósitos intracelulares hacia el citosol, fenómeno que se asocia, durante la iluminación, con la producción de un segundo mensajero que más que inhibir los mecanismos de recaptura de Ca^{2+} por parte de los organelos

celulares correspondientes (retículo endoplásmico y mitocondria), provoca el eflujo activo de Ca^{2+} hacia el citosol, procedente del retículo endoplásmico (Brown y Rubin, 1984; Brown y cols., 1984; Burgess y cols., 1984; Payne y cols., 1986; Corson y Fein, 1987). Si por otra parte, consideramos que el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se asocia con el estado de adaptación a la luz del fotorreceptor (Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Bader y cols., 1976; Lo y cols., 1980; Payne, Corson y Fein, 1986; Payne y cols., 1986) resulta claro que durante la iluminación sostenida se logra incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la célula retinular con todas las consecuencias que se derivan de ello. El incremento en el Ca^{2+}_i parece implicar que los mecanismos que determinan la terminación de la FT y el inicio de la repolarización, se alcanzan con mayor rapidez. En otras palabras, esto equivale a decir que la reducción en el $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ a través de la membrana celular es la causa de que se alcance el nivel de Ca^{2+} interno que dispara ambos procesos. El que la célula retinular se mantenga despolarizada durante la estimulación luminosa sostenida, aunque los valores de despolarización se reduzcan en forma continua, parece indicar que es el balance entre el ingreso de Ca^{2+} y la salida de potasio el que mantiene despolarizada a la célula retinular, durante el tiempo que persiste la activación de la rodopsina.

Durante la adaptación a la oscuridad, hay un crecimiento continuo en la amplitud y la duración del PR hasta llegar de nuevo al estado de equilibrio. Estos hechos parecen ser el resultado de un incremento progresivo en la cantidad de rodopsina y de una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, asociados con la oscuridad y que son la contraparte a los fenómenos que analizamos en el párrafo anterior, es decir que hay una expulsión del Ca^{2+} citosólico hacia el exterior y que los sitios de almacenamiento intracelular de Ca^{2+} recuperan su capacidad de acumulación activa del ion. También es probable que durante la adaptación a la oscuridad, el Na^+ sea expulsado de la célula. En estas condiciones la amplitud de la respuesta ante cada destello es mayor pues los gradientes de Na^+ y de Ca^{2+} a través de la membrana aumentan hasta que se alcanza un nuevo estado de equilibrio el cual se expresa porque la amplitud de la respuesta

ya no crece y la duración de la misma se incrementa.

REDUCCION DE LA CONCENTRACION DE CALCIO EXTRACELULAR.

Parece existir un acuerdo general con respecto a los efectos que la reducción del Ca^{2+} tiene sobre las características del PR de diferentes células fotorreceptoras, de tal manera que gran número de autores acepta que la baja $[Ca^{2+}]_e$ induce un incremento en la amplitud y en la duración de la respuesta (Järvilehto, 1979) (Fig. 4b). Es evidente que estos efectos están en contra de la posibilidad de que en la generación del PR participe el Ca^{2+} como acarreador de corriente durante la FT o en cualquier otro momento de la respuesta. De hecho pareciera que la entrada de Ca^{2+} desde el exterior determina sólo el momento en que finaliza la respuesta (Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976; Muijser, 1979; Stieve y Claßen-Linke, 1980; Hochstrate y Hamdorf, 1985). Sin embargo hay autores que han expresado sus dudas acerca de que ésta sea la única o la principal participación del Ca^{2+} en la fotorrespuesta y han propuesto la posibilidad de que el Ca^{2+} participe directamente en los procesos de excitación como un acarreador de corriente (Fulpius y Baumann, 1969; Bader y cols., 1976; Muijser, 1979; Bolsover y Brown, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986; Payne y cols., 1986). En apoyo de esta proposición algunos autores han manifestado la posibilidad de que la reducción del Ca^{2+} signifique un crecimiento sólo de la fase estable (la que determinaría la τ) pero una caída continua en la magnitud de la fase transitoria (Fuentes-Fardo y cols., 1984).

Los resultados obtenidos de nuestros experimentos con baja $[Ca^{2+}]_e$ (Figs. 4b y 5) ponen de manifiesto que este ion participa, en efecto, en el proceso de excitación por luz del fotorreceptor como un acarreador de corriente o como el "gatillo" que inicia la apertura de los canales lentos de Na^+ . Sólo con alguna de estas premisas se puede explicar la relación entre la $[Ca^{2+}]_e$ y la pequeña amplitud de la FT (Figs. 4b, 5 y 6) así como el pequeño valor de la DdV/dt cuando la preparación se mantiene

en la solución sin Ca^{2+} y con EDTA (Fig. 5c). Sin embargo, la relación directamente proporcional que existe entre la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ y la amplitud de la FT parece confirmar el papel que desempeña el ingreso de Ca^{2+} en la generación del PR. Por otra parte la fuerte reducción de la RdV/dt (Fig. 5d) cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ llega a valores mínimos ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$), indica que éstos son los responsables del gran incremento en la duración total de la respuesta; es decir, cuanto menos Ca^{2+} es capaz de ingresar a través de la membrana de la célula retinular menor es la velocidad de repolarización y por ello se prolonga la duración de la respuesta como se muestra en la figura 6; de esta manera la reducción en la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ parece mimetizar, desde el punto de vista de la τ , la adaptación a la oscuridad.

Es posible que el EDTA haya lesionado la membrana de la célula retinular o las postuladas uniones que comunican eléctricamente a las células retinulares (Tritthart y cols., 1973; Muller, 1973); sin embargo el restablecimiento del PR al regresar a la solución testigo va en contra de esta posibilidad. En resumen cuando el tallo ocular es colocado en soluciones con bajo Ca^{2+} , hay un menor ingreso de este ion a la célula que se traduce en respuestas que muestran una pequeña amplitud de la FT, de la DdV/dt y de la RdV/dt , esta última asociada con un gran incremento de la duración.

REDUCCION DE LA CONCENTRACION DE SODIO EN SOLUCIONES SIN CALCIO.

La reducción en la $[\text{Na}^+]_e$ en condiciones de muy baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ($3 \times 10^{-7} \text{ M}$) tuvo por objeto reducir el ingreso iónico hasta un punto en que desapareciera el PR, lo que demostraría que se requiere de ambos iones para la generación de la FT. El movimiento de Ca^{2+} y de Na^+ a través de la membrana de la célula retinular se pudo reducir hasta un punto tal que se puso de manifiesto la acción cooperativa de ambos iones en la generación del PR. Como cabía esperar, la reducción en el movimiento transmembranal de ambos iones se acompañó de respuestas de baja amplitud en la FT y en la FE que mostraron además un alargamiento notable en la τ (Fig. 4c). A estas situaciones, sin embargo, se

llega sólo cuando la solución de prueba se consideró "libre" de Na^+ (es decir soluciones a las que no se les agregó Na^+ en ninguna forma). De hecho, en la solución sin Ca^{2+} , con EDTA y 50% de Na^+ el PR se mantiene con valores similares a los de la solución normal (Figs. 7 y 8); es posible que esto se deba a que las características de la fotorrespuesta dependan, en esencia, no de los valores absolutos de concentración de estos iones sino más bien de que las actividades extracelulares de Na^+ y de Ca^{2+} sea constante y equivalente a la que existe en la solución salina normal. Si en la generación de la FT participan el ingreso a la célula de Na^+ y de Ca^{2+} , tendríamos derecho a proponer que la ausencia de ambos iones en el medio extracelular reduciría el PR hasta su desaparición. En nuestros experimentos la falta de Na^+ y de Ca^{2+} no hizo desaparecer la respuesta; sólo produjo una gran reducción en todos sus parámetros, excepto en la τ la cual se incrementó en forma notable (Figs. 7 y 8). Es posible que estos efectos se deban a lo difícil que es lograr que en torno a la célula registrada desaparezcan todos los iones, sobre todo si se toma en cuenta la organización estructural de la omatidia y de las células retinulares del acocil (Eguchi, 1965; Fernández y Nickel, 1976; Roach, 1976; Schröder y cols., 1979; Hafner y cols., 1982; Shaw y Stowe, 1982; Meyer-Rochow y Eguchi, 1984). No se puede tampoco descartar la posibilidad de que en el PR estén implicados además del Na^+ y del Ca^{2+} , otros iones, como el magnesio por ejemplo, los que se mantuvieron constantes en nuestros experimentos y de los que no se conoce hasta ahora su participación en el potencial de receptor. De hecho para evitar la interferencia que sobre el PR pudiera tener la ausencia de los cloruros al retirar el Na^+ de la solución de prueba, el NaCl se sustituyó con cloruro de colina. Por otra parte y ya que la falta de Na^+ en las soluciones de prueba no garantiza su ausencia de la región fototransdutora, es posible que la reducción del PR que se observa en la solución que carece de Na^+ y de Ca^{2+} obedezca, por una parte, a la disminución neta de carga asociada con la reducción del Na^+ , y por otra, a que los hipotéticos (hasta ahora) canales mixtos de Na^+ y Ca^{2+} sean dependientes de voltaje. De darse esta situación, la reducción de cargas asociada con la baja $[\text{Ca}^{2+}]_e$ los mantendría cerrados, siendo esta otra razón para

explicar porqué la FT tiene un tamaño tan pequeño en esta situación experimental. Por otro lado, existe la posibilidad de que en las células retinulares se encuentren intercambiadores electrogenéticos de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ como los que se han descrito para otras células fotorreceptoras (O'Day y Gray-Keller, 1989) que ante la fuerte reducción en la $[\text{Na}^+]_i$ le hiperpolaricen a la célula retinular reduciendo así la posibilidad de que los postulados canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (dependientes de voltaje) se abran lo que se traduciría en una menor amplitud y velocidad de la FT (Jacob y cols., 1987).

La fuerte reducción en el PR observada cuando la preparación se coloca en una solución sin Ca^{2+} y sin Na^+ hace evidente que en el estado estable es indispensable el ingreso de los dos iones para mantener la respuesta. Durante la adaptación a la luz la destrucción del fotorpigmento se suma a la falta de ingreso iónico a través de la membrana celular; sin embargo, es probable que el nivel intracelular de Ca^{2+} haya aumentado durante la iluminación sostenida a juzgar por la reducción en la duración de las respuestas durante esta etapa (Fig. 7f); es decir, el nivel intracelular de Ca^{2+} depende tanto del ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana celular como de su liberación desde los depósitos intracelulares.

La ausencia de Na^+ y de Ca^{2+} de la solución de prueba provocó un ingreso mínimo de estos iones a la célula retinular, este hecho y la ausencia de modificaciones en el potencial de membrana durante los cambios iónicos hace pensar que ambos iones desempeñan una papel determinante en el origen del PR. Por un lado cooperan en la generación de la FT de manera que éste se puede imaginar compuesta en una proporción, la mayor, por el ingreso de Na^+ , y otra, la menor, por la entrada de Ca^{2+} . La amplitud y la terminación de la FT dependerían de la cantidad de iones que ingresaron; también resulta plausible que el Ca^{2+} sea el activador de los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y que la amplitud de la FT dependa ante todo del flujo de Na^+ . Por otro lado el ingreso de Ca^{2+} debe provocar una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tal que se llega al valor necesario para que se de término a la fase de despolarización e inicio a la de repolarización, de otra manera no sería explicable el gran aumento en la τ observado siempre que

se reduce el Ca^{2+} extracelular (Figs. 6 y 8).

INCREMENTO DEL CALCIO EN SOLUCIONES SIN SODIO

Son muchos los trabajos experimentales en los que se muestra que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ se acompaña de reducción de la amplitud y de la duración del PR (Járviletho, 1979). Sin embargo un aumento en el movimiento del Ca^{2+} a través de la membrana que se acompaña de una brusca reducción en el movimiento de Na^+ (que resulta de su ausencia en la solución de prueba), debería producir respuestas en las que la amplitud de la FT estaría reducida si ésta dependiera sólo del ingreso de Na^+ , pero que se mantendría dentro de límites aceptables si existiera la acción cooperativa de ambos iones discutida en párrafos anteriores. Más aun, si este fuera el caso debería esperarse además, un aumento en la FE y en la velocidad de repolarización, así como una reducción importante en la τ . De hecho, estas predicciones se cumplen como se puede comprobar del notable restablecimiento del PR en soluciones sin Na^+ y con una concentración de Ca^{2+} diez veces mayor que la de la solución normal (Fig. 9).

En ausencia de Na^+ en la solución de prueba, los efectos del exceso de Ca^{2+} son duales; durante la primera etapa de oscuridad, mantiene la respuesta dentro de límites "normales" e incluso es capaz de incrementarla antes de la iluminación sostenida, en forma que parece poner de manifiesto que ahora es un ion divalente, esto es un mayor acarreador de corriente, el que constituye la corriente generadora de la FT (Figs. 4d, 9 y 10). Por otra parte, el brusco ingreso de Ca^{2+} a la célula pareciera ser rápidamente expulsado fuera de ella, como ha sido propuesto para *Calliptora* (Muijser, 1979), puesto que las velocidades de repolarización están francamente aumentadas y la τ muy disminuida. Estas condiciones cambian con la iluminación sostenida, ya que durante ella la sensibilidad de la respuesta se reduce hasta casi desaparecer; la destrucción de la rodopsina durante la iluminación (Wald, 1967; Hamdorf, 1979) y el exceso de Ca^{2+} dentro de la célula, resultado del exceso de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ y de la

probable liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares reduce al mínimo el PR (Brown y Blinks, 1972; Lisman y Brown, 1972; Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Payne y Fein, 1986). Durante la adaptación a la oscuridad y mientras el exceso de Ca^{2+} aún puede ser manejado por la célula retinular la amplitud de la respuesta crece aunque en forma lenta. Esta explicación aún es válida cuando el Ca^{2+} sustituye por completo al Na^+ (205 mM), condición en la que el voltaje de la FT se incrementa: antes de la iluminación sostenida, hasta un valor del 50% al 60% por arriba del que se tiene en solución normal (Figs. 4d y 9). Una posible explicación a este hecho es que en ausencia del Na^+ , el Ca^{2+} se mueva libremente a través de los canales que usualmente comparte con el ion monovalente lo que aunado a su elevada concentración externa produciría una corriente entrante mayor. El aumento de las rdV/dt y RdV/dt junto con la correspondiente reducción de la τ , en la solución en la que el Ca^{2+} sustituye por completo al Na^+ (Figs. 4d, 4e y 4f) refuerza la posibilidad de la rápida expulsión del Ca^{2+} hacia el exterior de la célula retinular. Resulta interesante que durante la iluminación sostenida, la sensibilidad de la célula se reduce hasta que el PR prácticamente desaparece, lo que se explica por la destrucción de la rodopsina (Wald, 1967; Hamdorf, 1979) y por el exceso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que resulta de la elevada $[\text{Ca}^{2+}]_e$, más la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Brown y Blinks, 1972; Lisman y Brown, 1972; Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Payne y Fein, 1986). Ante esta elevación del Ca^{2+}_i , que según algunos autores puede llegar a valores de 2.5 mM (Lo y cols., 1979), los sistemas de expulsión resultan ineficientes y el gradiente de Ca^{2+} a través de la membrana celular se reduce lo que implica una disminución en la velocidad y en la magnitud del ingreso de calcio hacia el citosol. Es evidente que el tiempo que permaneció la preparación en oscuridad no fue suficiente para que los mecanismos de expulsión de Ca^{2+} desde el citosol permitieran que se recuperara el gradiente de Ca^{2+} inicial, lo que explicaría la falta de recuperación del PR cuando la preparación se sumergía en la solución con 205 mM de Ca^{2+} y no en la solución con 130 mM de Ca^{2+} . La relación entre la concentración extracelular de Ca^{2+} , en

soluciones carentes de Na^+ , y la amplitud de la FT o la τ hace más clara la idea de la participación del Ca^{2+} en la excitación del fotorreceptor, la acción cooperativa entre el Na^+ y el Ca^{2+} y el papel que tiene el Ca^{2+} como regulador de la duración del PR a través de la regulación de la velocidad de repolarización (Fig. 10).

En párrafos anteriores se ha mencionado la posibilidad de que la falta de Ca^{2+} en la solución de prueba no se acompañe de una reducción de este ion de igual magnitud en torno a la célula retinular y que los efectos observados se deban a una reducción en el número de canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependientes del voltaje; en este sentido el exceso de Ca^{2+} en la solución de prueba podría funcionar como un fuerte activador de los canales mixtos, suponiendo que la cantidad de Na^+ alrededor de la célula sea suficiente para mantener la amplitud de la FT; así, el aumento en esta componente que se observa cuando se decuplica la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ o se sustituya al Na^+ reflejaría una mayor apertura de canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y la reducción en la τ resultaría del gran ingreso de Ca^{2+} al citosol.

ADICION DE COBALTO

=====

La presencia del cobalto sustituyendo al Ca^{2+} en la solución asegura un ingreso mínimo de este ion hacia la célula (Kohlhardt, 1973); esto se traduce en una notable reducción en la capacidad que tiene la célula para recuperar las características iniciales del PR. En la figura 12 se muestra cómo se reduce la amplitud de la FT cuando se agrega cobalto a las distintas soluciones y de ella resulta claro que cuando no hay Na^+ ni Ca^{2+} pero 2 mM de Co^{2+} , la amplitud de la FT es mínima; es decir, en la generación de la FT es indispensable el ingreso de Na^+ y de Ca^{2+} . Si comparamos, durante la adaptación a la oscuridad, las respuestas en la solución en la que el cobalto sustituye al Ca^{2+} con las que se observan en la solución $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$ (Tabla 1) (Figs. 7 y 11), comprobamos que en este caso la capacidad de recuperación de la

celula es todavia menor lo que apunta, otra vez y en forma evidente, hacia la participaci3n del Ca^{2+} en la generaci3n del PR. Debido a ello, no es de extrañar que en la soluci3n $0Na^+ / 0Ca^{2+} / 0Co^{2+}$ (Fig. 11) la reducci3n de la respuesta durante el estado estable haya llegado a ser mucho mayor y que durante la adaptaci3n a la luz haya sido imposible registrar el PR desde el inicio de la iluminaci3n. Evidentemente, en la soluci3n sin Na^+ y con sustituci3n del Ca^{2+} por cobalto fue imposible el registro del PR pr3cticamente desde que la c3lula retinular entro en contacto con la soluci3n lo cual puede interpretarse en el sentido de que bajo estas condiciones, se logr3 la reducci3n total en el ingreso de los iones de Na^+ y de Ca^{2+} a trav3s de la membrana de la c3lula retinular.

La falta de captura de Ca^{2+} citos3lico hacia los dep3sitos intracelulares producida por la cafeina, tiene efectos que parecen depender de la cantidad de luz recibida (Fig 11). As3, durante el estado estable, se observa una reducci3n en la duraci3n del PR que va de acuerdo con un incremento del Ca^{2+} (Figs. 11f y 12). Sin embargo, durante la adaptaci3n a la oscuridad hay un alargamiento de la respuesta que parece reflejar que durante esta etapa los sistemas de expuls3n de Ca^{2+} de la c3lula han recuperado su capacidad de mantener bajo el Ca^{2+} , como el cobalto impide el ingreso desde el exterior, la amplitud de la respuesta es muy baja y la duraci3n muy prolongada siendo este el efecto prevalente; cabe tambien la posibilidad que la acciones de la cafeina sobre los sistemas de captura del reticulo endopl3smico hayan desaparecido durante la iluminaci3n sostenida y durante la adaptaci3n a la oscuridad prevalezcan los efectos relacionados con la reducci3n i3nica y la presencia del cobalto (Weber y Herz, 1968; Weber, 1968; Lakata y cols., 1985). Cuando se regresa a la soluci3n testigo, la duraci3n de la respuesta adquiere valores similares a los de referencia, lo que refuerza la idea de que el efecto de la cafeina fue revertido desde que empez3 la fase de adaptaci3n a la oscuridad y que el efecto del cobalto fue solo parcialmente reversible. En otras palabras, la cafeina mimetiza la adaptaci3n a la luz, mediante el aumento en los niveles de Ca^{2+} , durante periodos cortos y su acci3n es reversible en forma espont3nea.

En resumen se puede decir que la FT del PR depende del ingreso de Na^+ y de Ca^{2+} en una relación de actividades iónicas constante. El nivel intracelular de Ca^{2+} depende de su ingreso desde el exterior y de su salida desde los depósitos intracelulares; durante la iluminación, el Ca^{2+} aumenta como resultado de los dos procesos mencionados; durante la oscuridad, el nivel de Ca^{2+} se reduce como consecuencia de su ingreso a los depósitos intracelulares y de su expulsión activa hacia el exterior. Del nivel intracelular de Ca^{2+} depende en forma directa la RdV/dt y en forma inversa la amplitud de la fase estable y la duración de la respuesta.

El PR de las células retinulares se puede ajustar entonces a un modelo en el que para una sola respuesta y como resultado de la isomerización del fotopigmento se reduce la resistencia de la membrana celular; en forma simultánea aumenta la permeabilidad al Na^+ y al Ca^{2+} , los que ingresan a la célula desde el exterior (probablemente por un canal lento, mixto de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Es este ingreso iónico el generador de la fase transitoria, la que termina en el momento en que se alcanza un nivel intracelular de Ca^{2+} tal que permite el cese en la entrada de Na^+ ("umbral" para la terminación de la FT); el ingreso de Ca^{2+} a través de la membrana se mantiene durante la fase estable y es el responsable de la misma. La entrada de Ca^{2+} al citosol desencadena la activación de un segundo mensajero mediador de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, el cual, sumado al Ca^{2+} procedente del exterior, alcanza un nivel que activa los mecanismos de repolarización (probablemente la salida de potasio y tal vez de Ca^{2+}) de la célula retinular ("umbral" para la repolarización) con lo que termina la respuesta.

REFERENCIAS

- Adolph, A. (1964). Spontaneous slow potential fluctuations in the *Limulus* photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, 48: 297:322.
- Arellano, O. R. (1986). Efecto del aumento intracelular de hidrógeno y calcio en la comunicación intercelular mediada por uniones comunicantes. Tesis, CINVESTAV, IPN, México.
- Autrum, H. (1979). Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates. I: Invertebrate photoreceptors. Introduction. In: *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. VII/6A *Vision in Invertebrates*. Edited by: Autrum, H. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 1-22.
- Bacigalupo, J., Chinn, K. and Lisman, J. E. (1986). Ion channels activated by light in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, 87, 73-89.
- Bader, C. R., Baumann, F. and Bertrand, D. (1976). Role of intracellular calcium and sodium in light adaptation in the retina of the honey bee drone *Apis mellifera*. *J. Gen. Physiol.*, 67: 475-491.
- Baumann, F. (1968). Slow and spike potential from reticular cells of the honey-bee drone in response to light. *J. Gen. Physiol.*, 52: 855-875.
- Baumann, F. and Mauro, A. (1974). Effets de l'hipoxie et de la ouabaine sur le potentiel recepteur de la cellule retinienne du faux-bourdon. *J. Physiol. (Paris)*, 69: 187A.
- Berridge, M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.*, 220: 345-360.
- Berridge, M. J. and Irvine, R. (1984) Inositoltrisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.*, 312: 315-321.
- Behbehani, M. and Srebro, R. (1974). Discrete waves and phototransduction in voltage-clamped ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, 64: 186-200.

- Bolsover, S. R. and Brown, J. E. (1985). Calcium ion an intracellular messenger of light adaptation, also participates in excitation of *Limulus* photoreceptors. *J. Physiol.*, **364**: 381-393.
- Borsellino, A., Fuortes, M. G. F. and Smith, T. G. (1963). Responses to single photons in visual cells of *Limulus*. *J. Physiol.*, **196**: 507-539.
- Brindley, G. S. and Gardner-Melwin, A. R. (1966). Origin of early receptor potential of the retina. *J. Physiol.*, **182**: 185-194.
- Brown, H. M. and Meech, R. W. (1976). Intracellular pH and light adaptation in barnacle photoreceptors. *J. Physiol.*, **263**: 218P.
- Brown, J. E. and Blinks, J. R. (1972). Changes in Ca^{2+} of *Limulus* ventral photoreceptors measured with aequorin. *Biol. Bull.*, **143**: 456.
- Brown, J. E. and Blinks, J. R. (1974). Changes in intracellular calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin, *J. Gen. Physiol.*, **64**: 643-665.
- Brown, J. E., Brown, P. K. and Pinto, L. H. (1977). Detection of light induced changes of intracellular ionized calcium concentration in *Limulus* ventral photoreceptors using Arsenazo III. *J. Physiol.*, **267**: 299-320.
- Brown, J. E. and Lisman, J. E. (1972). An electrogenic sodium pump in *Limulus* ventral photoreceptor cells. *J. Gen. Physiol.*, **59**: 720.
- Brown, J. E. and Lisman, J. E. (1975). Intracellular calcium modulates sensitivity and time scale in *Limulus* ventral photoreceptors. *Nature (Lond.)*, **258**: 252-253.
- Brown, J. E. and Rubin, L. J. (1984). A direct demonstration that inositol trisphosphate induces increase in intracellular calcium in *Limulus* photoreceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**: 113-142.

- Brown, J. E., Rubin, L. J., Ghalayini, A. J., Tarver, A. P., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Anderson, R. E. (1984). myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptors. **Nature**, **311**: 160-162.
- Brown, K. T. and Murakami, M. (1964). A new receptor potential of the monkey retina with no detectable latency. **Nature**, **201**: 626-628.
- Burgess, G. M., Godfrey, P. P., McKinney, J. S., Berridge, M. J., Irvine, R. F. and Putney Jr., J. W. (1984). The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. **Nature**, **309**: 63-66.
- Cone, R. A. (1967). Early receptor potential: photoreversible charge displacement in rhodopsin. **Science**, **155**: 1128-1131.
- Cone, R. A. (1973). The internal transmitter model for visual excitation: some quantitative implications. In: **Biochemistry and Physiology of visual pigments**. Edited by Langer, H. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Corson, D. W. and Fein, A. (1987). Inositol 1,4,5-trisphosphate induces bursts of calcium release inside *Limulus* ventral photoreceptors. **Brain Research**, **423**: 343-346.
- Corson, D. W., Fein, A. and Payne, R. (1984). Detection of an inositol 1,4,5-trisphosphate induced rise in intracellular free calcium with aequorin in *Limulus* ventral photoreceptors. **Biol. Bull.**, **167**: 524.
- Cummins, D. R. and Goldsmith, T. H. (1986). Responses of crayfish photoreceptor cells following intense light adaptation. **J. Comp. Physiol.**, **158A**: 35-42.
- Chinn, K. S. and Gillary, H. L. (1985). Light-evoked depolarizations in the retina of *Strombus*: role of sodium and potassium ions. **Comp. Biochem. Physiol.**, **80A**: 233-2345.
- Davis, H. (1961). Some principles of sensory receptor action. **Physiol. Rev.**, **41**: 391-416.
- Durell, J., Garland, J. T. and Friedel, R. D. (1969). Acetylcholine actions: biochemical aspects. **Science**, **165**: 862-866.
- Eakin, R. M. (1966). Evolution of photoreceptors. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, **30**: 363-370.

- Eakin, R. M. (1971). Structure of invertebrate photoreceptors. In: **Handbook of Sensory Physiology**, Vol. VII/1. Edited by Dartnall, H. J. A. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 625-684.
- Eguchi, E. (1965). Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells. **J. Cell. comp. Physiol.**, **66**: 411-429.
- Eguchi, E. and Waterman, T. (1967). Changes in retinal fine structure induced in the crab *Libinia* by light and dark adaptation. **Z. Zellforsch.**, **79**: 209-229.
- Eguchi, E. and Waterman, T. (1976). Freeze-etch and histochemical evidence for cycling in crayfish photoreceptor membranes. **Cell Tiss. Res.**, **169**: 419-434.
- Exner, S. (1889). Durch licht bedingte Verschiebungen des Pigmentes in Insektenauge und deren physiologische Bedeutung. **Ebenda**, **983**: 143-151. (Citado por Parker, 1932).
- Farias, S. J. M. (1989). Participación del calcio en la regulación del potencial de receptor de las células retinulares del acodil. Tesis, Facultad de Medicina, UNAM, México.
- Fein, A., Payne, R., Corson, D. W., Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1984). Photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate. **Nature (Lond.)**, **311**: 157-160.
- Fuentes-Pardo, B., Hernández-Falcón, J. and Noguero, I. (1984). Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty-four hour Comp. **Biochem. Physiol.**, **78A**: 723-727.
- Fernández, H. R. and Nickel, E. E. (1976). Ultrastructural and molecular characteristics of crayfish photoreceptors. **J. Cell. Biol.**, **69**: 721-732.
- Fulpius, B. and Baumann, F. (1969). Effects of sodium, potassium and calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptors. **J. Gen. Physiol.**, **53**: 541-561.
- Glantz, R. M. (1968). Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish *Procambarus clarkii*. **Vision Res.**, **8**: 1407-1421.
- Goldsmith, T. H. (1958). The visual system of the honey bee. **Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)**, **44**: 123-126.

- Goldsmith, T. H. (1975). Photoreceptor processes: some problems and perspectives. *J. Exp. Zool.*, **104**: 89-101.
- Goldsmith, T. H. and Warner, L. T. (1964). Vitamin A in the vision of insects. *J. Gen. Physiol.*, **47**: 433-441.
- Hafner, G. S., Tokarski, T and Hammond-Soltis, G. (1982). Development of the crayfish retina: A light and electron microscopic study. *J. Morphol.*, **173**: 101-118.
- Hagins, W. A. and McLaughly, R. E. (1967) Molecular and thermal origin of fast photoelectric effects in squid retina. *Science*, **157**: 813-816.
- Hamdorf, K. (1979). The physiology of invertebrate visual pigments. In: **Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/6A, Vision in Invertebrates**. Edited by Autrum, H. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 145-224
- Hartline, H. K. (1928). A quantitative and descriptive study of the electrical response to illumination of the arthropod eye. *A. J. Physiol.*, **83**: 466-483.
- Hartline, H. K., Wagner, H. G. and MacNichol Jr., E. E. (1952). The peripheral origin of nervous activity in the visual system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **17**: 125-141.
- Hateren, J. H. van (1986). Electrical coupling of neuro-ommatidial photoreceptor cells in the blowfly. *J. Comp. Physiol. A*, **158**: 795-811.
- Hernández Falcon, J. (1984). Estudio del potencial de receptor en células retinulares de acocil durante el nictámero. Tesis, **Fac. Med. UNAM**, México.
- Hillman, F., Dodge, I. A., Hochstein, S., Knight, B. W. and Minke, B. (1973). Rapid dark recovery of the invertebrate early receptor potential. *J. Gen. Physiol.*, **62**: 77-86.
- Hochstrate, P. and Hamdorf, K. (1985). The influence of extracellular calcium on the photoresponse of fly photoreceptors. *J. Comp. Physiol.*, **156**: 53-64.
- Hokin, M. R. and Hokin, L. E. (1953). Enzyme secretion and the incorporation of F^{32} into phospholipids of pancreas slices. *J. Biol. Chem.*, **203**: 967-977.

- Horridge, G. A. and Barnard, P. B. T. (1965). Movement of palisade in locust retinula cell when illuminated. *Quart. J. micr. Sci.*, **106**: 131-135.
- Hubbard, R. and St. George, R. C. C. (1958). The rhodopsin system of the squid. *J. Gen. Physiol.*, **41**: 501-528.
- Jacob, R., Lieberman, M. and Liu, S. (1987). Electrogenic sodium-calcium exchange in cultured embryonic chick heart cells. *J. Physiol.*, **387**: 567-588.
- Järvilehto, M. (1979). Receptor potentials in invertebrate visual cells. In: *Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/6A, Vision in Invertebrates*. Edited by: Autrum, H. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 315-356.
- Kleinholz, L. H. (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. In: *The functional organization of the compound eye*. Edited by: Bernard, C. G. Pergamon Press, New York, USA. pp. 89-101.
- Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H and Fleckenstein, A. (1973). Selective inhibition of the transmembrane calcium conductivity by Ni, Co, and Mn ions. *Pflügers Arch.*, **338**: 115-123.
- Lakata, E. G., Capogrossi, M. C., Kort, A. A. and Stern, M. D. (1985). Spontaneous myocardial calcium oscillations: overview with emphasis on ryanodine and caffeine. *Fed. Proc.*, **44**: 2977-2983.
- Lasansky, A. (1967). Cell junction in ommatidia of *Limulus*. *J. Cell Biol.*, **33**: 365-383.
- Levy, S. and Fein, A. (1985). Relationship between light sensitivity and intracellular free calcium concentration in *Limulus* ventral photoreceptors. A quantitative study using Ca-sensitive microelectrodes. *J. Gen. Physiol.*, **85**: 805-841.
- Lisman, J. E. and 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.
- Lisman, J. E. and Brown, J. E. (1975). Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **66**: 489-506.

- Lo, M-V. C., Wong, F. and Pak, W. L. (1980). Increase in intracellular free calcium concentration of *Limulus* photoreceptors cause by a metabolic inhibitor. *Vision Res.*, **20**: 539-544.
- Meyer-Rochow, V. B. (1975). Axonal wiring and polarization sensitivity in the eye of the rock lobster. *Nature (Lond.)*, **254**: 522- 523.
- Meyer-Rochow, V. B. and Eguchi, E. (1984). The effects of temperature and light on particles associated with crayfish *Procambarus clarki* visual membrane: a freeze-fracture analysis and electrophysiological study. *J. Neurocytol.*, **13**: 935-960.
- Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta.*, **415**: 81-147.
- Millecchia, R. and Mauro, A. (1969a). The ventral photoreceptor cells of *Limulus* II: The basic photoresponse. *J. Gen. Physiol.*, **54**: 310-330.
- Millecchia, R. and Mauro, A. (1969b). The ventral photoreceptor cells of *Limulus* III: a voltage clamp study. *Limulus J. Gen. Physiol.*, **54**: 331-351.
- Muijser, H. (1979). The receptor potential of retinular cells of the blowfly *Calliphora*: The role os sodium, potassium and calcium ions. *J. Comp. Physiol.*, **132**: 87-95.
- Muller, J. K. (1973). Photoreceptors in crayfish compound eye: Electrical interactions between cells as related to polarized-light sensitivity. *J. Physiol.*, **232**: 573-595.
- Naka, K. I. and Eguchi, E. (1962). Spike potentials recorded from the insect photoreceptor. *J. Gen. Physiol.*, **45**: 663-680.
- Naka, K. I. and Kuwabara, M. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exptl. Biol.*, **36**: 51-61.
- Nässel, D. R. (1976). The retina and retinal projection on the lamina ganglionaris of the crayfish *Facifastacus leniusculus* Dana. *J. Comp. Neurol.*, **167**: 341-360.
- O'Day, P. M. and Gray-Keller, M. P. (1989). Evidence for electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **93**: 473-494.

- Parker, G. H. (1891). The compound eyes in crustaceans. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, **21**: 45-142. (Cited for Parker, 1932).
- Parker, G. H. (1932). The movements of the retinal pigment. *Ergeb. Biol.*, **9**: 239-291.
- Fayne, R., Corson, D. W. and Fein, A. (1986). Pressure injection of calcium both excites and adapts *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.*, **88**: 107-126.
- Fayne, R. and Fein, A. (1986). The initial response of *Limulus* ventral photoreceptors to bright flashes. Released calcium as a synergist to excitation. *J. Gen. Physiol.*, **87**: 243-269.
- Fayne, R., Fein, A. and Corson, D. W. (1984). A rise in intracellular calcium is necessary and perhaps sufficient for photoreceptor excitation and adaptation by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biol. Bull.*, **167**: 531.
- Fayne, R. and Howard, J. (1981). Response of an insect photoreceptor: a simple log-normal model. *Nature (Lond)*, **290**: 415-416.
- Ribi, W. A. (1978). Gap junctions coupling photoreceptor axons in the first optic ganglion of the fly. *Cell Tiss. Res.*, **195**: 299-308.
- Roach, J. L. M. (1976). Junctional structures in the crystalline cone of the crayfish compound eye. *Cell Tiss. Res.*, **173**: 309-314.
- Rushton, W. A. H. (1965). Visual adaptation. *Proc. R. Soc. B.*, **162**: 20-46.
- Schröder, W., Stieve, H. and Claßen-Linke, I. (1979). Accessibility of extracellular space in the rhabdom of living isolated retina in crayfish. *Z. Naturforsch., C. Biosci.*, **34C**: 136-142.
- Seyfred, M. A. and Wells, W. W. (1984). Subcellular site and mechanism of vasopressin-stimulated hydrolysis of phosphoinositides in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7666-7672.
- Shaw, S. R. and Stowe, S. (1982). Photoreception. In: *The biology of crustacea. V3, Neurobiology: Structure and function.* Edited by Bliss, D. E., Atwood, H. L. and Sandeman, D. C. Academic Press, New York, USA. pp. 291-367.

- Smith, T. G., Steel, W. K. and Brown, J. E. (1968). A role for the sodium pump in photoreception in *Limulus*. **Science**, **162**: 456-458.
- Sperelakis, N., Bakaly, G., Sada, H and Kojima, M. (1988). Development of conduction and contraction systems in the heart. In: **Fetal and neonatal development heart and cardiovascular control**. Edited by Jones, C. T. Perinatology Press, New York, USA. pp. 113-124.
- Srebro, R. and Behbehani, M. (1971). A stochastic-model for discrete waves in the *Limulus* photoreceptor. **J. Gen. Physiol.**, **58**: 267-286.
- Srebro, R. and Behbehani, M. (1972). The thermal origin of spontaneous activity in the *Limulus* photoreceptors. **J. Physiol.**, **224**: 349-361.
- Stavenga, D. G. (1974). Dark regeneration of invertebrate visual pigments. In: **Photoreceptor optics**. Edited by Snyder, A. W. and Menzel, R. Springer, Berlin, Germany.
- Stavenga, D. G. (1979). Pseudopupils of compound eyes. In : **Handbook of Sensory Physiology, Vol. VII/6A Vision in invertebrates**. Edited by Autrum, H. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 358-429.
- Stefanowska, M. (1890). La disposition histologique du pigments dans les yeux des arthropodes sous l'influence de la lumiere et de l'obscurité complete. **Rec. Zool. Suisse**, **5**: 151-200. (Citado por Parker, 1932).
- Stieve, H. and Bruns, M. (1980). Dependence of bump rate and bump size in *Limulus* ventral nerve photoreceptor on light adaptation and calcium concentration. **Biophys. Struct. Mech.**, **6**: 271-285.
- Stieve, H. and Bruns, M. (1981). Calcium deficiency in *Limulus* photoreceptors causes a change in the latency distribution of bumps. **Biophys. Struct. Mech.**, **7**: 344.
- Stieve, H. and Bruns, M. (1983). Bump latency distribution and bump adaptation of *Limulus* ventral nerve photoreceptor in varied extracellular calcium concentrations. **Biophys. Struct. Mech.**, **9**: 329-339.

- Stieve, H. and Claßen-Linke, I. (1980). The effect of changed extracellular calcium and sodium concentration on the electroretinogram of the crayfish retina. *Z. Naturforsch.*, **35C**: 308-318.
- Stryer, L. (1987). The molecules of visual excitation. *Scientific American*, **257**: 32-41.
- Szczawinska, W. (1890). Contribution à l'étude des yeux de quelques crustacés et recherches expérimentales sur les mouvements du pigment granuleux et des cellules pigmentaires sous l'influence de la lumière et de l'obscurité dans les yeux des crustacés et des arachnides. *Archives de Biol.*, **10**: 523-566. (Citado por Parker, 1932).
- Tsien, R. and Rink, T. J. (1980). Neutral carrier ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular free calcium. *Biochem. Biophys. Acta.*, **599**: 623-638.
- Tritthart, H. Macleod, D. P., Stierle, H. E. and Krause, H. (1973). Effects of Ca-free and EDTA-containing tyrode solution on transmembrane electrical activity and contraction in guinea pig papillary muscle. *Pflügers Arch.*, **338**: 361-376.
- Tsutsumi, V., Frixione, E. and Aréchiga, H. (1981). Transformations in the cytoplasmic structure of crayfish retinula cells during light and dark-adaptation. *J. Comp. Physiol.*, **145A**: 179-189.
- Van Harrevelde, A. (1936). A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **34**: 428-432.
- Wald, G. (1967). Visual pigments of crayfish. *Nature*, **215**: 1131-1133.
- Wald, G. (1968). Single and multiple visual systems in arthropods. *J. Gen. Physiol.*, **51**: 125-156.
- Wald, G. and Hubbard, R. (1957). Visual pigments of a decapod crustacean: the lobster. *Nature (Lond.)*, **180**: 278-280.
- Washizu, Y. (1964). Electrical activity of single retinular cells in the compound eye of the blowfly *Calliphora erythrocephala* (Meig.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **12**: 369-387.
- Wever, A. (1968). The mechanism of the action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.*, **52**: 760-772.

- Waver, A. and Herz, R. (1968) The relationships between the caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. *J. Gen. Physiol.*, 52: 750-760.
- Welsh, J. H. (1939). The action of eyestalk extracts on retinal pigment migration in the crayfish *Cambarus bartoni*. *Biol. Bull.*, 77: 119-128.
- White, R. H. and Lord, H. (1975). Diminution and enlargement of the mosquito rhabdom in light and darkness. *J. Gen. Physiol.*, 65: 583-598.
- Wong, F. and Knight, B. W. (1980a). Adapting-bump model for eccentric cells of *Limulus*. *J. Gen. Physiol.*, 76: 539-557.
- Wong, F., Knight, B. W. and Dodge, F. A. (1980b). Dispersion of latencies in photoreceptors of *Limulus* and the adapting bump model. *J. Gen. Physiol.*, 76: 517-537.
- Wong, F., Lantz, R. C. and Mauro, A. (1979). The role of calcium ions in the suppression of the photoresponse during anoxia and application of metabolic inhibitors. *Vision Res.*, 19: 251-254.
- Yeandle, S. (1958). Electrophysiology of the visual system. Discussion. *Amer. J. Ophthalmol.*, 46: 82-87.