



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

I Z T A C A L A

**EFFECTO DE LA LIDOCAINA SOBRE EL TRANSPORTE
INTRACELULAR DE ORGANELOS EN NEURONAS Y
SOBRE LA CICLOSIS DE CLOROPLASTOS
EN CELULAS VEGETALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

FRANCISCO GARCIA SIERRA



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX., MARZO DE 1990



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Dpto. de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Eugenio Frixione Garduño.

El estudiante tuvo apoyo económico durante el desarrollo del presente trabajo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de registro 57370).

DEDICO ESTA TESIS

Especialmente a mis padres: Juan Manuel García y María Sierra
de quienes he recibido siempre su apoyo para alcanzar
aquellas empresas que he decidido emprender.

A mis hermanos: Hugo, Hilda, Adriana, Juan Manuel y Ma. de Jesús
con quienes he compartido buenos y malos momentos sin
dejar de apoyarnos mutuamente.

A la memoria de mi tío Carlos Sierra.

A todas aquellas personas que de alguna manera me han alentado
siempre a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial al Dr. Eugenio Frixione Garduño por su valioso apoyo en el desarrollo de este trabajo, por sus enseñanzas, por sus consejos, por sus experiencias y por haberme conducido durante mis primeros pasos dentro del trabajo de investigación.

A la Dra. Martha Román del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, quien amablemente proporcionó los cultivos de células nerviosas empleados en este trabajo, así como a Carolina Miranda quien se encargó de la preparación de los mismos.

Al Dr. Marcelino Cerejido quien permitió el uso de su video-grabadora en nuestro sistema de video-microscopía.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Ma. de Lourdes,
Mercedes, Raúl, Leticia, Ofelia y Víctor Ramón con quienes
compartí momentos agradables y que de alguna manera
contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

RESUMEN, 1

INTRODUCCION, 3

- I. Motilidad intracelular, 3
- II. Transporte axonal, 4
- III. Corrientes citoplásmicas en células vegetales, 8
- IV. Anestésicos locales, 12
 - A. Mecanismo de acción anestésica, 13
 - B. Anestésicos locales y transporte axonal, 15
 - C. Sobre el efecto inhibitorio del transporte axonal por anestésicos locales, 16
- V. Video-microscopía por contraste acentuado electrónicamente, 19

OBJETIVOS GENERALES, 23

METAS PARTICULARES, 23

MATERIAL, 25

- I. Sistema de video-microscopía de alta resolución, 25
- II. Material biológico, 26
 - A. Preparaciones biológicas utilizadas como patrones de resolución, 26
 - B. Células nerviosas, 26
 - C. Células vegetales, 27
- III. Material químico, 27
 - A. Células nerviosas, 27
 - B. Células vegetales, 28

IV. Disección de tejidos vegetales, 28

V. Observación de las muestras, 28

A. Cámara de observación, 29

B. Sistema de perfusión, 29

MÉTODOS, 31

I. Preparación del material biológico para su observación, 31

A. Células nerviosas, 31

1. Obtención de la suspensión celular, 31

2. Cultivo de células neuronales, 31

3. Montaje de cultivos para observación, 32

B. Células vegetales, 33

1. Disección de tejidos, 33

2. Pretratamiento de tejidos, 34

3. Montaje de tejidos para su observación, 34

II. Observaciones microscópicas, 35

A. colocación de las muestras, 35

B. Iluminación de las muestras, 35

C. Observación de las muestras, 36

RESULTADOS, 38

I. Estimación de la capacidad resolutive del sistema de VM-CAE con preparaciones biológicas utilizadas como patrones de resolución, 38

A. Diatomeas, 38

B. Células bucoepiteliales, 38

II. Transporte intracelular en células nerviosas, 38

- A. Tamaño, edad y forma de neuronas, 39
- B. Dinámica intracelular de partículas, 40
 - 1. Direccionalidad de movimiento, 40
 - 2. Tamaño, forma y velocidad de partículas, 40
 - 3. Distribución y comportamiento, 42
- C. Efecto de la lidocaína sobre el transporte intracelular en neuronas, 45

III. Corrientes citoplásmicas en células vegetales, 46

- A. Dinámica citoplásmica y ciclosis de cloroplastos, 46
- B. Velocidad de migración de organelos, 48
- C. Efecto de la lidocaína sobre la velocidad de migración de cloroplastos, 49
- D. Efecto de la lidocaína (Astra Chemicals) sobre la ciclosis de cloroplastos en presencia de iones sodio, calcio, potasio y magnesio aumentados independientemente, aumentados conjuntamente y en ausencia de ellos en el medio APW, 53
- E. Efecto del medio APW (100X), agua desionizada, sacarosa (114 mM) y sodio (116 mM) sobre la ciclosis de cloroplastos, 54
- F. Efecto del pH sobre la ciclosis de cloroplastos,
- G. Efecto de la temperatura sobre la ciclosis de cloroplastos, 55

DISCUSION, 57

- I. Resolución con video-microscopía, 57**
- II. Transporte intracelular en células nerviosas, 59**
 - A. Dinámica intracelular de organelos, 59**
 - B. Efecto de la lidocaína sobre el transporte axonal de organelos, 61**
- III. Corrientes citoplásmicas en células vegetales, 63**
 - A. Efecto de la lidocaína sobre las corrientes citoplásmicas, 67**
 - B. Mecanismo de acción del efecto inhibitorio, 68**

CONCLUSIONES, 74

FIGURAS, 76

TABLAS, 116

BIBLIOGRAFIA, 124

RESUMEN

Los anestésicos locales son compuestos muy utilizados durante la práctica clínica, sin que se tenga conocimiento de posibles efectos colaterales durante su aplicación. Desde hace tiempo se demostró en forma indirecta que los anestésicos locales inhibían el proceso de transporte intracelular en células nerviosas, cuando eran empleados a ciertas concentraciones. Recientemente se encontró que estos compuestos inhiben algunos otros tipos de procesos de transporte intracelular, como es la migración de gránulos pigmentarios en células retinales, habiéndose propuesto una acción inhibitoria general de dichos compuestos sobre los procesos de transporte interno.

Utilizando un novedoso sistema de video-microscopía pudimos observar por primera vez como el tráfico intracelular de organelos en células nerviosas en cultivo es inhibido cuando son incubadas éstas en presencia del anestésico. Dicha inhibición se lleva a cabo a concentraciones muy por debajo de las usualmente ya reportadas.

La misma inhibición del flujo interno de organelos fue encontrada cuando el anestésico se aplicó a otro fenómeno de motilidad intracelular, como son las corrientes citoplásmicas de células vegetales. El efecto inhibitorio para ambos procesos de transporte fue dependiente de la concentración y al menos para células vegetales fue de tipo reversible.

El análisis del efecto del anestésico bajo diversas condiciones iónicas en el medio de incubación, mostró que en células vegetales

el efecto inhibitorio del proceso es independiente de la presencia o ausencia de las especies iónicas contenidas en el medio de incubación, lo que sugiere un efecto del anestésico más allá de la membrana plasmática, en este modelo celular en particular.

INTRODUCCION.

I. MOTILIDAD INTRACELULAR.

El transporte intracelular y las corrientes citoplásmicas son dos formas de movimientos internos de materiales en diversos tipos de células (Stebbing y Hyams 1979). La energía necesaria para que se lleven a cabo estos procesos proviene de la célula misma y ciertos iones intervienen en su regulación (Frixione y Mena 1986). En dichas formas de movimiento está involucrado el citoesqueleto celular, particularmente microfilamentos y microtúbulos, siendo estos últimos los que se encargan del transporte de una gran variedad de componentes celulares en diversos sistemas. Ejemplos de tales componentes son: gránulos de pigmento en cromatóforos, partículas en axopodios de protozoarios heliozoarios, ribosomas en ovarios de insectos, partículas en tentáculos suctorios, vesículas y organelos en axones de células nerviosas, etc. (véase Stebbings y Hyams 1979).

Las corrientes citoplásmicas se manifiestan como flujos masivos de citoplasma; en células vegetales es la principal forma de movimiento intracelular y presenta diversos patrones de flujo que dependen del organismo en particular. La forma más simple que se conoce es la agitación, un movimiento errático y al azar. El tipo más organizado, denominado rotacional, es característico de algas y plantas acuáticas. Los elementos del citoesqueleto que se encuentran principalmente relacionados con el proceso anterior son los microfilamentos (Stebbing y Hyams 1979).

Los mecanismos de regulación que operan en los procesos de motilidad intracelular aún son desconocidos en general.

II. TRANSPORTE AXONAL.

Las neuronas son células que responden a estímulos externos a través de cambios en el potencial eléctrico de la membrana plasmática, generando potenciales de acción que se propagan como impulsos nerviosos (Dyson 1978).

El movimiento de organelos en células nerviosas es un proceso que se lleva a cabo en forma más activa que en otros tipos de células eucariotas, puesto que la adecuada distribución de organelos a lo largo de sus delgadas prolongaciones citoplásmicas (axones y dendritas) requiere de un eficiente sistema de transporte (Dyson 1978).

En una neurona típica los ribosomas y el retículo endoplásmico rugoso son confinados casi totalmente al soma celular en la vecindad del núcleo, siendo entonces todas las proteínas sintetizadas en esta región. El aparato de Golgi, que es la fuente de membrana, también se ubica cerca del núcleo, aunque en algunos tipos de neuronas las terminales axonales contienen las enzimas necesarias para la síntesis de neurotransmisores y llevan a cabo un reciclaje de membrana (Alberts et al. 1983).

La distribución de proteínas, por tanto, se lleva a cabo desde su sitio de síntesis hasta cualquier punto dentro del axón. De la misma manera las vesículas secretorias deberán ser transportadas por enormes distancias desde donde son formadas hasta el sitio de exocitosis; en dirección opuesta son transportados materiales que

son endocitados o reciclados y destinados a degradación en el soma neural. Este modo de organización celular hace necesario un activo mecanismo de rápido transporte axonal (Alberts et al. 1983).

El transporte axoplásmico posee componentes rápidos y lentos. El transporte lento involucra movimientos de material proteínico que compone al citoesqueleto exportado desde el soma neural. Tubulina y proteínas de neurofilamentos se transportan a 1mm/día aproximadamente correspondiendo a la velocidad en la cual los microtúbulos se alargan por adición de monómeros de tubulina. El transporte rápido corresponde a la translocación de organelos y vesículas membranosas en forma bidireccional a una velocidad de 200 a 400 mm/día. Estos mecanismos de transporte axonal rápido y lento permiten a la célula renovar, mantener y reparar todas sus prolongaciones citoplásmicas manteniéndose una adecuada distribución de materiales entre el núcleo y las partes más lejanas de la célula (Alberts et al. 1983).

Aunque el transporte axonal tradicionalmente ha sido dividido en dos componentes, recientemente se han encontrado evidencias de que los elementos que componen al transporte axonal lento (elementos del citoesqueleto), también pueden ser distribuidos a través de transporte axonal rápido (Hollenbeck y Bray 1987).

Los componentes del transporte axonal rápido han sido identificados visualmente por medio de diversas técnicas de microscopía óptica y electrónica, en gran variedad de células nerviosas de diversos organismos (Forman 1982a). Se han utilizado axones mielinizados segmentados de anfibio (Cooper y Smith 1974), axones mielinizados intactos de anfibio (Hammond 1977), axones no mielinizados de crustáceo (Adams 1982), axones intactos de

mamífero (Tsukita e Ishikawa 1980), células nerviosas en cultivo (Breuer et al. 1975, Goldberg y Burmesteir 1986), etc.

El tamaño y forma de las partículas en movimiento va desde las esféricas muy pequeñas de 0.2 - 0.5 micras de diámetro, hasta las grandes de forma alargada con diámetros similares y longitud de hasta varias micras, identificadas como mitocondrias. La velocidad del movimiento para las partículas esféricas es de 0.5 - 1.5 micras/seg. Las partículas de forma alargada generalmente son más estacionarias y su movimiento es más lento (Cooper y Smith 1974, Hammond 1977, Breuer et al. 1975, Goldberg y Burmesteir 1986).

El transporte axonal rápido se lleva a cabo en forma bidireccional: a) en dirección anterógrada el flujo se dirige hacia el extremo distal del soma celular. b) en dirección retrógrada el flujo proviene del extremo distal hacia el soma celular.

Aparentemente existen diferencias en cuanto al tipo de partículas y a la velocidad de movimiento en ambas direcciones. La velocidad de movimiento parece ser más elevada en dirección anterógrada que en dirección retrógrada (Cooper y Smith 1974). El movimiento de partículas es predominante en dirección retrógrada (Adams y Bray 1983).

Algunos estudios de bloqueo axonal por congelamiento local han mostrado que, además de las mitocondrias, los componentes membranosos del transporte axonal pueden ser clasificados como: Retículo endoplásmico liso axonal y estructuras vesiculotubulares en dirección anterógrada, y cuerpos membranosos grandes en dirección retrógrada (Tsukita e Ishikawa 1980).

El transporte axonal rápido es un movimiento de organelos de

tipo saltatorio, el movimiento saltatorio es la principal forma de motilidad intracelular en células animales y se caracteriza como un movimiento discontinuo de partículas con desplazamientos en línea recta con pausas y cambios de dirección (Forman 1982b). Se ha demostrado que el movimiento de organelos es un proceso altamente dependiente de ATP (Adams 1982, Ochs 1974).

El citoesqueleto de las células nerviosas, compuesto principalmente por neurotúbulos y neurofilamentos (Schnap y Reese 1982), parece estar involucrado en el proceso de translocación interna puesto que se ha encontrado una estrecha asociación de estos elementos con organelos vesiculares y mitocondrias entre otros organelos (Miller y Lasek 1985). Se ha visto además que agentes desestabilizantes del citoesqueleto pueden inhibir el transporte de organelos (Hammond y Smith 1977, Brady et al. 1984).

El papel que juegan los microtúbulos en el transporte de organelos ha sido estudiado recientemente en un modelo experimental, en el cual se emplea axoplasma extruído de axon de calamar. Con este modelo se elimina la interferencia óptica que produce la membrana axonal y se facilita la aplicación de compuestos a la preparación (Brady et al. 1985). A través de este modelo experimental y con el empleo de una novedosa técnica en microscopía óptica en donde es acentuado el contraste electrónicamente se han observado microtúbulos individuales sobre los que ocurren movimientos bidireccionales de organelos, movimientos de organelos en filamentos disociados y movimientos propios de filamentos, todos promovidos por factores solubles del propio axoplasma (Vale et al. 1985a,b,c).

El transporte axonal rápido es un mecanismo dependiente de la

temperatura (Forman et al. 1977) y al parecer algunos cambios de pH (5.3 a 9.0), no tienen considerable efecto (Breuer et al. 1975, Lavoie 1982a). Sobre la regulación iónica del proceso se ha encontrado que el calcio es un componente esencial para que el proceso de transporte pueda llevarse a cabo (Chan et al. 1980).

III. CORRIENTES CITOPLASMICAS EN CELULAS VEGETALES.

En las células vegetales también se manifiesta un activo sistema de tráfico intracelular a través del citoplasma. Las células vegetales alargadas con delgadas expansiones de citoplasma que rodea una vacuola central, o las células vegetales de grandes tamaños, comunmente manifiestan activos flujos masivos de citoplasma que distribuyen materiales y componentes citoplásmicos (Alberts et al. 1983).

Kamiya determinó cinco diferentes patrones de corrientes citoplásmicas en células vegetales (véase Allen y Allen 1978 y Stebbings y Hyams 1979). Estos patrones no siempre son distintos unos de otros; puede haber variantes, mezclas o progresiones de un tipo a otro y no sólo se restringen a células vegetales, puesto que pueden estar presentes en varios protistas, animales y hongos. El patrón más sencillo considerado es la agitación ó desplazamientos en saltos, es un movimiento errático y al azar que consiste de excursiones curvas o rectilíneas de partículas en diversas direcciones rebasando la distancia esperada para un movimiento browniano, es el patrón menos organizado y quizá el más simple y común en las corrientes citoplásmicas. Otros tipos de corrientes con un grado de organización superior a la simple

agitación, son las corrientes en fuente (o fuente invertida), estriadas (o multiestriadas) y la circulación, donde el flujo de partículas se lleva a cabo sobre rutas definidas como hebras o canales transvacuolares de diversas características en forma unidireccional o bidireccional. El tipo más organizado de corrientes citoplásmicas es llamado rotacional donde el citoplasma gira en la periferia de la célula, rodeando a una vacuola central, no existen canales transvacuolares y el patrón de circulación es constante y unidireccional.

Las corrientes citoplasmáticas en células vegetales también se han clasificado de acuerdo a su origen. Corrientes que se manifiestan en forma continua, sin necesidad de que sean estimuladas han sido denominadas primarias, aquellas que pueden inducirse a través de estímulos químicos y fóticos se han considerado como secundarias (Yamauchi y Nagai 1981, véase Haupt 1982).

En las corrientes de tipo secundario estimuladas por luz, la orientación y movimiento de organelos como cloroplastos depende de la intensidad y dirección de la luz (Haupt 1982).

Un tipo de influencia consiste en cambios en la orientación y distribución de los organelos dependiendo principalmente de la dirección de la luz. Los cloroplastos se orientan en forma perpendicular a la dirección de la luz exponiendo una mayor superficie de absorción cuando la intensidad de iluminación es baja. Cuando la intensidad es elevada, la orientación es paralela a la dirección de la luz minimizando la superficie de exposición (Haupt 1982).

En otro tipo de influencia no es tan importante la dirección de

la luz, puesto que el movimiento de organelos sólo depende de la intensidad luminosa y la distribución de los mismos en estado de reposo no cambia con respecto al estado activo. Estas formas de distribución y movimiento como sistemas de protección o formas de optimización de la fotosíntesis son aún discutidas (Haupt 1982).

Se tiene conocimiento de la estructura y funcionamiento del sistema motor responsable de las corrientes citoplásmicas en células vegetales, sin embargo su regulación todavía no es lo bastante comprendida.

Los principales elementos del sistema motor involucrados en las corrientes citoplásmicas primarias y secundarias, parecen ser similares, aunque existen características propias de un modelo celular a otro.

La mayor parte de los estudios se han hecho en algas *Characeas*, las cuales manifiestan patrones de flujo primarios en forma rotacional. En dichas células el citoplasma está compuesto de una capa exterior estacionaria denominada ectoplasma y una capa endoplásmica mótil en el interior (Allen y Allen 1978). El ectoplasma contiene hileras de cloroplastos fijos y en el endoplasma se encuentran muchas partículas desplazándose en forma unidireccional (Allen y Allen 1978).

Se han encontrado fibrillas subcorticales compuestas de microfilamentos de actina en arreglo paralelo a las hileras de cloroplastos en la región de roce de ambas capas citoplásmicas (Nagai y Rebhun 1966, Palevitz y Hepler 1975, Williamson 1974) y se han propuesto varias teorías sobre el mecanismo responsable del flujo citoplásmico, principalmente basándose en algas *Characeas* (Allen y Allen 1978).

Al principio se pensó que la fuerza responsable del movimiento se generaba por el simple roce del ectoplasma o región cortical con el borde del endoplasma (interacción gel-sol) involucrando a las fibrillas subcorticales compuestas de microfilamentos de actina. Otra propuesta fue la teoría de torsión mecánica, donde movimientos torsionales de los paquetes de microfilamentos en la capa cortical propulsan la matriz citoplásmica. Por último con la aparición de filamentos endoplásmicos originados desde la región cortical se pensó que la ondulación de éstos podría ser el mecanismo activo que impulsara al endoplasma, encontrándose además que las partículas citoplásmicas se desplazaban a lo largo de estos filamentos endoplásmicos durante su ondulación (Allen y Allen 1978).

Se encontró además que la dirección de las corrientes citoplásmicas es determinada por la polaridad de la actina-F (Chen y Kamiya 1975, Kersey et al. 1976) y posteriormente se propuso que los organelos endoplásmicos están equipados con una proteína similar a miosina que permite que se desplacen a lo largo de los paquetes de microfilamentos de actina-F (Nagai y Hayama 1979a).

En células de las hojas de plantas superiores como *Elodea* y *Vallisneria* las corrientes secundarias internas son basadas también en interacciones entre actina y miosina. En el caso de *Vallisneria* al igual que en *Nitella* se presentan corrientes citoplásmicas secundarias unidireccionales sobre las paredes anticlinales de células epidermales y mesófilas. Se han encontrado paquetes de microfilamentos de actina de 6-7 nm de diámetro al borde de las paredes anticlinales, por debajo de la membrana plasmática en arreglo paralelo a la dirección de las corrientes

citoplásmicas (Yamaguchi y Nagai 1981, Takagi y Nagai 1983). En *Elodea densa* una proteína similar a miosina ha sido extraída y parcialmente purificada (Ohsuka e Inoue 1979). Parece ser que el flujo citoplásmico al igual que en algas *Characeas*, está mediado por elementos de la matriz citoplásmica y moléculas asociadas a organelos (Vale et al. 1984, Kachar 1985a). Algunos estudios utilizando drogas desestabilizantes de la matriz citoplásmica mostraron la misma inhibición del flujo citoplásmico, tanto en algas *Characeas* (Williamson 1972, Bradley 1973) como en *Vallisneria* (Ishigami y Nagai 1980).

La regulación de las corrientes citoplásmicas primarias o secundarias, parece estar mediada por los mismos factores, dentro de los cuales el calcio intracitoplásmico es el principal (Kikuyama y Tazawa 1982, Takagi y Nagai 1986).

Los elementos involucrados en las corrientes citoplásmicas de células vegetales en general han sido identificados parcialmente, sin embargo la regulación del proceso no ha sido totalmente comprendida.

IV. ANESTÉSICOS LOCALES.

Los anestésicos locales son drogas que detienen el flujo de señales eléctricas a lo largo de la membrana plasmática en las prolongaciones citoplásmicas de células nerviosas.

Los anestésicos locales llevan a cabo su acción localmente en el lugar donde son aplicados, su sitio blanco son nervios periféricos mientras que los anestésicos generales normalmente actúan sobre

sistema nervioso central sin afectar nervios periféricos (De Jong 1977).

A. MECANISMO DE ACCION ANESTESICA.

Los anestésicos locales son comunmente aminas terciarias básicas, en estados ionizados las moléculas son polares consistiendo de un tallo hidrocarbonado que soporta en uno de sus extremos un grupo amino hidrofílico con carga y en el otro a un grupo aromático hidrofóbico (De Jong 1977, Feinstein 1964), son moléculas con elevados coeficientes de partición aceite/agua (véase Seelig 1987). Es contradictorio el sitio exacto en la membrana donde se inserta la molécula anestésica, en cualquier forma estructural en la que se encuentre. Se piensa que en su forma no cargada las moléculas parecen penetrar y permanecer en la parte central de la bicapa lipídica (teoría de la expansión) (De Jong 1977, véase Seelig 1987) y en su forma cargada permanecen en la superficie externa de la membrana interactuando electrostáticamente con los grupos polares lipídicos (teoría de carga de superficie) (De Jong 1977, véase Seelig 1987), aunque en esta última forma puede existir también una intercalación de las partes hidrofóbicas de la molécula entre las cadenas de ácidos grasos, mientras que el grupo amino terciario reside en el exterior de la membrana (De Jong 1977, véase Escudero y Gutiérrez-Merino 1987).

Sobre el mecanismo de acción anestésica se han propuesto varias teorías, de las cuales la más aceptada se explica en términos de alteraciones en la membrana plasmática. Tomando en cuenta que el

Calcio extracelular en células excitables proporciona estabilidad a la membrana (De Jong 1977) por unirse el catión divalente a los grupos aniónicos de los fosfolípidos, estabilizando la estructura y haciendo más difícil la difusión de otras especies iónicas (como sodio), los anestésicos locales con sus cargas positivas de la misma manera pueden unirse a los grupos fosfato y formar un complejo de mayor estabilidad electrostática que impida la difusión de sodio al interior de las células durante la depolarización de la membrana, inhibiéndose así la transmisión de señales eléctricas (De Jong 1977).

Se ha sugerido además que los anestésicos locales pueden bloquear la conducción nerviosa al incrementar la presión interna de la membrana axonal, cerrándose por consiguiente los canales a través de los cuales se lleva a cabo el intercambio de iones durante la depolarización (Véase Seelig 1987). Estas afirmaciones son resultado de experimentos en los cuales se ha encontrado que los anestésicos locales cambian la presión interna e incrementan la superficie de expansión (véase Seelig 1987) de membranas lipídicas artificiales.

Según otra interpretación, se piensa, que la anestesia puede resultar de un incremento no específico de la permeabilidad de membranas excitables a cationes fisiológicos (véase Escudero y Gutiérrez-Merino 1987), puesto que se ha observado como en vesículas aisladas de retículo endoplásmico los anestésicos locales incrementan la permeabilidad específica de calcio y magnesio (Escudero y Gutiérrez-Merino 1987), y se ha encontrado además una inhibición en la captación e incremento en la

liberación de calcio en retículo sarcoplasmático fragmentado (Kurebayashi 1982).

La base precisa de la anestesia inducida por anestésicos locales aún es muy discutida, sin embargo las diversas evidencias existentes parecen indicar que dicho estado es obtenido al inhibirse la depolarización de la membrana en las células nerviosas.

B. ANESTÉSICOS LOCALES Y TRANSPORTE AXONAL.

Se ha observado que los anestésicos locales aparte de su acción anestésica característica pueden tener otro tipo de efectos sobre células nerviosas. Se ha reportado que los anestésicos locales inhiben reversiblemente el transporte axonal rápido en este tipo de células (Fink et al. 1972, Byer et al. 1973, Lavoie 1982a,b, Byer et al. 1973).

En los primeros trabajos que se mostró el efecto inhibitorio del transporte intracelular en células nerviosas por anestésicos locales como la lidocaína, se empleó la técnica de aminoácidos marcados inyectados en el soma celular con medición de marcas radioactivas a lo largo del axón en presencia del anestésico (Fink et al. 1972).

En un estudio similar se mostró la misma inhibición del transporte intracelular por tetracaína, encontrándose que la potencia de inhibición era dependiente del pH y no fue modificada por variaciones en la concentración de calcio libre (Lavoie 1982a).

En estudios más detallados y con ayuda de la microscopía

electrónica se observaron los efectos de la lidocaína sobre la morfología de axones en diferentes intervalos de tiempo. Además de la inhibición de impulsos y del transporte axonal rápido, se mostraron efectos sobre algunas estructuras como el retículo endoplásmico liso y en particular se presentó depolimerización de microtúbulos. La reversibilidad del efecto también se estudió, con la recuperación total de las condiciones afectadas (Byer et al. 1973).

C. SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DEL TRANSPORTE AXONAL POR ANESTÉSICOS LOCALES.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la inhibición del transporte axonal rápido por anestésicos locales. Puesto que se ha encontrado que el transporte intracelular es un mecanismo dependiente del metabolismo oxidativo (Ochs y Hollinsworth 1971), puede ser que los anestésicos locales interfirieran con este último, bloqueando el suministro de energía metabólica necesario para que se lleve a cabo el proceso de transporte.

Los microtúbulos, principales componentes de la matriz citoplásmica en células nerviosas (Schnnap y Reese 1982, Hirokawa 1982), han sido involucrados directamente en el proceso de transporte interno de partículas, ya que en algunos estudios en axones tratados con anestésicos locales se han encontrado números reducidos de estas estructuras (Fink et al. 1972, Edstrom et al. 1973). Puede ser que el efecto inhibitorio del transporte intracelular sea producido por alteraciones en dichas estructuras (Hanson y Edstrom 1978, Samson et al. 1979).

Existen evidencias sobre la inhibición de procesos de transporte intracelular en algunos otros tipos de células, donde el efecto ha sido asociado con el transporte de ciertos iones a través de la membrana plasmática. Mondragón (1986) encontró en células retinales de crustáceo y de anfibio, que lidocaína inhibe la migración de gránulos pigmentarios en presencia de ciertos iones específicos en el medio de incubación, particularmente sodio. En dicho trabajo fue concluido que el efecto producido por el anestésico parecía involucrar principalmente una difusión de sodio hacia el interior de las células y que de alguna manera, la presencia de éste en el citoplasma interfería con el proceso de transporte. Drogas que estimulan la entrada de sodio a las células como Batracotoxina, han mostrado una inhibición comparable del transporte intracelular, cuando han sido aplicadas a células nerviosas (véase Chan et al. 1980).

En axones tratados con la hormona paratiroidea (PTH) se ha visto que el transporte axonal incrementa su velocidad en ambas direcciones; sin embargo, cuando estos axones son tratados además con agentes antagonistas de canales de calcio, como las dihidropiridinas (DHP) nifendipina y nitrendipina, este incremento en la velocidad es bloqueado totalmente. Cuando se administra BAYK644 una DHP agonista del canal de calcio, el transporte axonal se incrementa de manera similar a como lo hace la PTH, y este efecto es bloqueado también por nitrendipina. Parece ser, por tanto, que la entrada de calcio extracelular al interior de la célula estimula el tráfico intracelular de organelos (Breuer y Atkinson 1988).

Por otra parte, en algunos estudios empleando retículo

sarcoplasmático fragmentado se ha visto que los anestésicos locales reducen la capacidad de captación de calcio de dicha estructura, inhibiendo la actividad ATPasa de la bomba de calcio, observándose además que estos compuestos inducen la liberación de calcio en retículo sarcoplasmático precargado (Suko et al. 1976, Kurebayashi et al. 1982). Se ha encontrado también que los anestésicos locales producen un incremento en la permeabilidad pasiva de calcio, además de magnesio en vesículas aisladas de retículo endoplásmico (Escudero y Gutiérrez-Merino 1987). Estos resultados parecen indicar que debido a que los anestésicos locales incrementan la permeabilidad de membranas específica o inespecíficamente, el mecanismo de inhibición del transporte intracelular, posiblemente sea producido por una acción de este tipo en la membrana plasmática o en los receptores intracelulares del catión, si el anestésico fuera internalizado en la célula.

Si el efecto de los anestésicos locales es asociado a una elevación excesiva de la concentración de calcio intracitoplásmico, el incremento en la permeabilidad podría involucrar posiblemente alteraciones en los transportadores de calcio de alta (ATPasa bombeadora de calcio, de membrana plasmática y retículo endoplásmico) y baja afinidad (intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de membrana plasmática, con alta capacidad de transporte) presentes en células excitables.

Posiblemente, el efecto pudiera además relacionarse con algún mecanismo de inhibición de la actividad de la calmodulina, la cual ha sido involucrada en el proceso de transporte axonal (Edstrom et al. 1973, Ekstrom et al. 1982, Lavoie 1987, Tiberi y Lavoie 1984).

Se ha mostrado en diversos trabajos que los anestésicos locales

parecen tener una acción inhibitoria general para los fenómenos de transporte interno; sin embargo no es claro aún el mecanismo por el cual es producida ésta inhibición.

Además parece no existir alguna evidencia, donde haya sido investigado el efecto de la lidocaína sobre fenómenos de transporte interno de organelos en plantas, como es la ciclosis de cloroplastos en células mesófilas.

V. VIDEO MICROSCOPIA POR CONTRASTE ACENTUADO ELECTRONICAMENTE.

El trabajo microscópico con células vivas exige necesariamente el uso de luz visible, puesto que longitudes de onda fuera de este rango en el espectro electromagnético pueden alterar la integridad del material biológico. Por estas razones la resolución máxima de estructuras muy diminutas se restringe tan solo al límite teórico de resolución para la microscopía óptica (200 nm aprox.).

Al trabajar con células vivas el contraste obtenido en las imágenes resulta ser muy débil, debido a que la mayoría de las células son normalmente muy transparentes. Dicho inconveniente impide el adecuado examen morfológico del citoplasma en su estado natural. Se han utilizado diversas técnicas microscópicas para enfrentar este problema (contraste de fases, interferencia diferencial, campo oscuro), pero de alguna manera siempre es sacrificado el contraste o el poder de resolución, o se dificulta el registro de imágenes poco iluminadas.

Recientemente ha tenido lugar uno de los más espectaculares avances en el terreno de la microscopía óptica aplicada al estudio de procesos biológicos. La combinación de varios métodos de

microscopía por transiluminación con sistemas de video de alta sensibilidad ha permitido la observación directa, en células vivientes, de la actividad de estructuras que hasta principios de la presente década sólo eran visibles por medio de microscopía electrónica en células fijadas, es decir, en preparaciones estáticas ya sin vida.

En los primeros trabajos pioneros donde se uso el video, se obtuvieron imágenes con luz uv, sin embargo el daño fotoquímico imposibilitaba su aplicación al estudio de células vivas (Zworykin 1933, Flory 1951, Montgomery et al. 1956).

A finales de los 40s y comienzos de los 50s se realizaron observaciones con video en el rango de luz visible del espectro electromagnético.

Parpat (1951) observó migraciones de gránulos pigmentarios en huevos fertilizados de erizo de mar. Tales trabajos sólo servían para demostrar imágenes del microscopio a grupos de estudiantes, sin que produjeran información relevante o avances que contribuyeran determinadamente en la investigación biológica hasta nuestro tiempo.

Reynolds (1972) junto con biólogos del laboratorio de Biología Marina de Woods Hole, acoplaron a microscopios intensificadores de imágenes, para visualizar fenómenos luminiscentes de bajo nivel incluyendo bioluminiscencia.

Gilkey et al. (1978) pudieron grabar la propagación de una onda de aequorina luminiscente durante el proceso de fertilización. La luminiscencia de la fosfoproteína microinyectada fue colectada con un intensificador de imágenes demostrando así la propagación de calcio libre posteriormente a la fertilización.

En 1975 Dvorak et al. emplearon una cámara de video de cierta sensibilidad para registrar la invasión de un eritrocito humano por un merozoito de malaria. Este proceso fue observado por la combinación de una cámara de imagen orthicon, óptica de Nomarski (DIC) y equipo de videograbación. Los estudios pioneros utilizando equipos de video sofisticados requirió el esfuerzo combinado de biólogos e ingenieros en electrónica.

A finales de los 70s aparecieron cámaras de video con tubos de la familia vidicon y videograbadoras con la posibilidad de grabar en tiempo real y congelar imágenes. Posteriormente Inoué (1981) y Allen et al. (1981a,b), anunciaron un nuevo método en microscopía de luz, el cual consistió en acoplar avanzado equipo electrónico de video a diversas clases de microscopía óptica (DIC, Luz polarizada, contraste de fases) obteniéndose una excelente resolución y contraste en las imágenes resultantes. Objetos demasiado finos para ser vistos con simple microscopía óptica habitual o que produzcan muy bajo contraste en la imagen, pueden ser ahora visualizados y estudiados en células vivas con la ayuda de avanzado equipo de video. Con tal equipo puede ser incrementado considerablemente el contraste de la imagen del microscopio, sustrayendo electrónicamente la señal del campo de visión para darle una elevación al contraste por incrementar su ganancia análoga en la cámara de video, monitor o video-procesador. Con el contraste así incrementado se pueden usar objetivos de altas aperturas numéricas.

El trabajo con dicho equipo permite observar estructuras muchas veces más pequeñas que el límite de resolución de la microscopía óptica. Estos pequeños objetos forman imágenes difractadas en el

plano del campo donde las dimensiones de la imagen son determinadas por la apertura del objetivo y la lente condensadora, no por el diámetro real del objeto.

El análisis de estructuras o movimiento a nivel de nanómetros utilizando la distribución de la intensidad en imágenes difractadas ha comenzado a ser explorado a través de técnicas de incremento de contraste por video, con análisis y procesamiento de imágenes por computadora (Schnapp et al. 1988).

La video-microscopía por contraste acentuado electrónicamente es una técnica muy utilizada actualmente, que ha comenzado a proporcionar bastante información relevante de procesos de dinámica intracelular de organelos. Es previsible en poco tiempo la diversificación de su empleo en el estudio de diferentes procesos biológicos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Analizar el efecto de la lidocaína sobre el transporte intracelular en células nerviosas.
2. Investigar el efecto que tiene la lidocaína sobre la ciclosis de cloroplastos en células vegetales.

METAS PARTICULARES

1. Estimar la capacidad resolutive de un sistema de video-microscopia de contraste acentuado electrónicamente, para su utilización como herramienta en el estudio de fenómenos de motilidad intracelular de complicada observación.
2. Estandarizar la disección de células mesófilas de *Vallisneria sp.*, donde pudiera ser estudiada la ciclosis de cloroplastos.
3. Estandarizar las condiciones adecuadas para el mantenimiento de las células (células nerviosas y células vegetales) durante su observación (cámara de observación, sistema de perfusión, temperatura, oxigenación, etc.).

4. Estandarizar las condiciones ópticas adecuadas para la observación de los fenómenos de motilidad en estudio, a través de manipulaciones en el sistema de video-microscopía.

5. Realizar un análisis descriptivo del comportamiento normal de los fenómenos de motilidad intracelular de interés (tipos de organelos, formas, tamaños, velocidades, comportamiento etc.).

6. Probar el efecto de la lidocaína sobre los dos sistemas de transporte intracelular.

MATERIAL

1. SISTEMA DE VIDEO MICROSCOPIA DE ALTA RESOLUCION.

El sistema de video-microscopía de alta resolución se compone de los siguientes elementos:

1. Microscopio trinocular Reichert, con óptica corregida al infinito.
2. Cámara de video Dage-MTI NC-67M, equipada con un tubo newvicon y consola de control.
3. Monitor de alta resolución Panasonic WV-5350N,E, de >750 líneas y 21.5 cm de diagonal.
4. Videograbadora Panasonic NV-8030, de carrete abierto y cinta de 12.7 mm.
5. Cámara reflex automática Canon A-1 de 35 mm, provista con un lente macro FD 50 mm, 1:3.5.

El sistema de video-microscopía de alta resolución por contraste acentuado electrónicamente (VM-CAE) puede ser considerado como un sistema mixto que combina los implementos tradicionales de la microscopía óptica con equipo electrónico de video (fig 1).

La señal óptica que proviene del microscopio emerge por un ducto especial para fotomicrografía en el cabezal trinocular del microscopio, proyectando la imagen a través de una lente ocular de 10X hacia la cámara de video. La imagen inicial, convertida en señal electrónica, es conducida en paralelo desde la salida de la

consola de control de la cámara de video a la videograbadora y al monitor, donde es transformada en imagen visual, que puede ser registrada con la cámara fotográfica.

En el componente óptico del sistema se emplea como fuente de iluminación una lámpara de arco de mercurio de 50 vatios, de cuya emisión se separa la línea de 546 nm por medio de un filtro de interferencia. Se utilizó también una lámpara de halógeno de 12 vatios.

Los objetos se iluminan a través de un condensador aplanático-acromático con 1.3 de apertura numérica nominal, operado sin diafragma de apertura. Se tiene intercalado además un condensador de campo que desempeña una función crítica en el sistema y las observaciones se efectúan con objetivos planacromáticos con corrección al infinito.

II. MATERIAL BIOLÓGICO.

A. PREPARACIONES BIOLÓGICAS UTILIZADAS COMO PATRONES DE RESOLUCIÓN.

1. Preparación fija de algas diatomeas montada en bálamo de Canadá.
2. Células bucoepiteliales obtenidas directamente por raspado bucal.

B. CELULAS NERVIOSAS.

Se emplearon cultivos primarios de telencéfalo de embrión de

pollo de 8 días de incubación (línea Rodhe Island). Las células se sembraron sobre cajas de Petri de plástico calidad cultivo de tejido de 35 mm de diámetro, donde previamente se colocó una laminilla de vidrio, con el objeto de tener una monocapa de células adherida a éste.

La preparación de las células nerviosas, hasta antes de someterse a experimentación, fue amablemente realizada por la Dra. Martha Romano (CINVESTAV IPN).

C. CELULAS VEGETALES.

Para el estudio de las corrientes citoplásmicas se utilizó la planta acuática *Vallisneria sp.*. Los ejemplares fueron adquiridos comercialmente y se mantuvieron en un acuario habitual dentro del laboratorio, a temperatura ambiente.

El trabajo se realizó sobre las células internas del mesófilo en la parte media de la planta de *Vallisneria sp.*, requiriéndose de ciertas disecciones de tejido para llegar a esta zona interna ocupada por dichas células.

III. MATERIAL QUIMICO.

A. CELULAS NERVIOSAS.

Las células nerviosas se mantuvieron e incubaron durante los experimentos en solución salina fisiológica Hanks (tabla I).

Se utilizó el anestésico local lidocaína en su forma comercial como solución inyectable al 2 %, proveniente de ASTRA Chemicals.

B. CELULAS VEGETALES.

Se empleó como medio de disección e incubación solución fisiológica APW (agua de charco artificial) (Tabla II).

Se utilizó el anestésico local lidocaína tanto en su forma comercial, como en forma pura. En su forma comercial se empleó solución inyectable de lidocaína al 2 % de ASTRA Chemicals. El anestésico puro (clorhidrato de lidocaína) se obtuvo de Chemische Fabrik, por cortesía de productos Mavi.

IV. DISECCION DE TEJIDOS VEGETALES.

Para diseccionar tejidos de *Vallisneria sp.* que contuvieran células mesófilas se utilizó equipo habitual de disección (tijeras comunes, pinzas forceps, navaja, bisturí, alfileres, etc.), microscopio estereoscópico Stereo Star zoom 380 de American Optical, iluminándose con una fuente de luz BAUSCH & LOMB, que contenía un par de fibras ópticas equipadas con dos condensadores terminales. Como soporte base de los segmentos de tejido durante la disección se empleó una caja de petri de 9.5 cm de diámetro recubierta de una capa de material plástico inerte de color negro, como fondo contrastante.

V. OBSERVACION DE LAS MUESTRAS.

Para observar las preparaciones por VM-CAE, se necesitó montar éstas en una cámara de observación acoplada a un sistema de perfusión que permitiera mantener a las células en condiciones

adecuadas para su estudio y poder administrar los compuestos y soluciones deseadas.

A. CAMARA DE OBSERVACION.

La cámara de observación se compone de un portaobjetos común sobre el cual van colocados lateralmente dos segmentos de vidrio muy delgados. Estos segmentos situados paralelamente a los márgenes de mayor longitud del porta, actúan como escalones marginales; cuando es situado un cubreobjetos encima de ellos forman una pequeña cámara con aberturas laterales. Dicha cámara puede ser llenada con solución fisiológica y mantenerse en ella algún tipo de preparación biológica. A través de las aberturas laterales es posible administrar soluciones experimentales al acoplar un sistema de perfusión.

B. SISTEMA DE PERFUSION.

La perfusión de solución fisiológica (fig 2) sobre la cámara de observación se realizó a través de una manguera de hule (a) conectada por sus extremos a dos tubos de vidrio terminados en punta. Un extremo se introducía por un tapón de hule a un matraz Erlenmeyer (b) conteniendo la solución fisiológica, hasta ser inmerso en ésta. El otro extremo hacía contacto sobre una de las aberturas laterales de la cámara de observación (c). Sobre la manguera, en una zona muy cercana a este extremo, se conectaba un regulador de flujo (d). Una segunda manguera (e) encargada de desalojar el fluido que atravesaba por la cámara de observación se

conectaba a la otra abertura lateral por uno de sus extremos, introduciéndose el opuesto a éste en un recipiente colector de fluido (f). En el interior de la segunda manguera se introducía un doble segmento de hilo bastante grueso que sobresalía por los extremos, haciendo contacto con la abertura lateral de la cámara, para desalojar el fluido por capilaridad.

Una tercera manguera (g) que llevaba en uno de sus extremos un tubo de vidrio, se introducía en el matraz que contenía la solución fisiológica hasta la zona libre de medio, el otro extremo de la manguera se conectaba a una fuente de aire u oxígeno.

METODOS

I. PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA SU OBSERVACION.

A. CELULAS NERVIOSAS.

1. OBTENCION DE LA SUSPENSION CELULAR.

Se usaron telencéfalos de embrión de pollo Rodhe Island de 8 días de edad. Se obtuvieron los embriones en condiciones de esterilidad y se depositaron en una solución salina balanceada libre de calcio y magnesio. Se disecaron los telencéfalos lavándolos repetidamente con la solución salina balanceada, la que afloja la unión de las células permitiendo que el tejido se disgregue fácilmente. Los telencéfalos se colocaron en Medio de Cultivo Completo, en proporción de 4 telencéfalos por 1 ml. Se disgregaron mecánicamente mediante repetidos pasajes a través de una pipeta Pasteur. Una vez lograda una suspensión de células, en forma de esferas aisladas, se tomaron alícuotas que se sembraron en las cajas de petri previamente preparadas.

2. CULTIVO DE CELULAS NEURONALES.

Las cajas de petri se incubaron por 24 horas con una solución de poli-L-lisina en amortiguador de boratos a una concentración de 1 mg/100 ml. Posteriormente las cajas recibieron 3 lavados de 10 min cada una con agua bidestilada estéril. Se agregaron 2 ml de

medio de cultivo completo y 100 μ l de la suspensión celular aproximadamente 10 células. Para los experimentos se utilizaron cultivos celulares de 3-6 días de edad.

3. MONTAJE DE CULTIVOS PARA OBSERVACION.

Las laminillas de vidrio que contenían monocapas de células nerviosas se extraían de las cajas de cultivo y se colocaban en la cámara de observación, orientando hacia abajo la cara que soportaba a la monocapa de células. La cámara de observación previamente se llenaba con medio fisiológico Hanks y se sellaba herméticamente recubriendo con silicona (grasa inerte) la zona de contacto entre la laminilla y los escalones marginales de la misma. Una vez colocada la muestra, el medio se reciclaba a través del sistema de perfusión (fig 2).

La temperatura a la cual se mantuvieron las células fue de 36 °C, inyectando aire u oxígeno al matraz que contenía al medio para mantener una adecuada oxigenación de las células.

El aire inyectado ejerce presión sobre el líquido que comienza a subir por el tubo conectado a la manguera de suministro. Con el regulador se ajusta un flujo adecuado del medio que penetra por una de las aberturas laterales de la cámara. El medio circula a través de la preparación y se desaloja por capilaridad sobre la manguera de desagüe, conectada en la otra abertura lateral. Cuando era necesario mantener un flujo de solución más rápido se conectaba la manguera de desagüe a un sistema de vacío que succionaba potentemente el medio (fig 2).

B. CELULAS VEGETALES.

1. DISECCION DE TEJIDOS.

Se utilizaron plantas sanas de *Vallisneria sp.* mantenidas en el laboratorio bajo periodos de luz artificial durante el día y oscuridad durante la noche. Se diseccionaron tejidos de la parte media de la planta, por ser ésta la zona que corresponde a las células de nuestro interés; así mismo, es la zona de mayor diámetro y que menos daños presenta.

Se cortaron con tijeras segmentos de la planta de 5 cm de longitud y se transportaron a la caja de petri que contenía solución fisiológica APW. Los segmentos de forma rectangular se fijaron por sus extremos a la superficie de goma de la caja de petri por medio de alfileres.

Ya fijados los segmentos de tejido en la caja de petri, se empleó el microscopio estereoscópico con su fuente de iluminación para eliminar las capas externas de tejido, hasta llegar a la zona interna de células del mesófilo. Las disecciones de tejido bajo el microscopio se realizaron con aumentos de entre 15X y 60X.

Con la ayuda de unas pinzas aprisionando en la punta un segmento de navaja en forma de pala, se eliminaron segmentos del tejido epidermal externo que recubre la zona de tejido del mesófilo. Las células mesófilas se encuentran además rodeadas de burbujas de aire que quedan atrapadas al quitar el tejido epidermal, teniendo que ser desalojadas delicadamente con la misma navaja para no dañar el tejido interno que se encuentra hasta este momento totalmente expuesto.

El segmento resultante de la disección contenía ya solo dos capas de células; las del mesófilo que lograban ser expuestas con este procedimiento y por debajo de ellas una capa de células epidermales que servían de soporte.

El segmento inicial se subdividió en segmentos de 2 cm de longitud antes de ser colocado en la cámara de observación.

2. PRETRATAMIENTO DE TEJIDOS.

Para asegurar la obtención de células mesófilas que presentaran adecuadamente el fenómeno de flujo citoplásmico, los tejidos recibieron un pretratamiento estimulatorio después de su disección que simplemente consistió en dar varios pulsos cortos de luz intensa, con un período posterior de reposo (30 minutos mínimo) bajo iluminación habitual del laboratorio.

3. MONTAJE DE TEJIDOS PARA OBSERVACION.

Los segmentos de tejido ya disecados se tomaron con unas pinzas fórceps y se colocaron entre los dos escalones marginales de la cámara de observación. En dicha cámara previamente se colocaron unas gotas de solución fisiológica y el tejido fue inmerso en ellas con la cara que correspondía a las células del mesófilo orientada hacia arriba. Las orillas de los escalones marginales se recubrieron con silicona y se colocaba una laminilla de vidrio sobre éstos, la cámara quedaba sellada herméticamente y el fluido solo podía salir por las aberturas laterales. Se llenó

completamente la cámara con solución y se conectó al sistema de perfusión.

Se bañó a las células con solución fisiológica APW a temperatura ambiente (24° C aprox.). Para estimular la perfusión de solución sobre la cámara se inyectó aire en el matraz que contenía al medio (fig 2).

II. OBSERVACIONES MICROSCOPICAS.

A. COLOCACION DE LAS MUESTRAS.

Las preparaciones biológicas que no fueron destinadas a someterse a cierto tratamiento o que no necesitaron de perfusión de medio fisiológico, se colocaron de la manera habitual en laminillas de vidrio sobre el carro de la platina. Las preparaciones que necesitaron ser mantenidas o destinadas a alguna incubación, se montaron en la cámara de observación y se colocaron en la platina del microscopio, conectándose al sistema de perfusión.

B. ILUMINACION DE LAS MUESTRAS.

Se aplicó un método de contraste por iluminación asimétrica en el cual se hicieron incidir rayos de luz oblicuos sobre los objetos, generando una iluminación en gradiente, por este motivo la fuente de iluminación se orientó excéntricamente.

C. OBSERVACION DE LAS MUESTRAS.

Una vez colocada la preparación biológica en el microscopio, se procedió a realizar las observaciones de las estructuras o fenómenos de interés de la siguiente manera:

Las observaciones se realizaron en dos fases: la primera de ellas consistió en observar las preparaciones bajo microscopía óptica de campo claro, para detectar a los especímenes o situarse en alguna zona de ellos que fuera de interés. Las observaciones se hicieron con inmersión homogénea en aceite cuando se utilizaron aperturas numéricas superiores a 1.

En la segunda fase de la observación, la imagen de la zona elegida se condujo de los oculares del microscopio hacia el ducto para fotomicrografía, donde dicha imagen se proyectó sobre la cámara de video.

La distancia entre el ocular proyectivo y la placa frontal del tubo de video se ajustó de tal manera que la imagen final en el monitor correspondiera a un incremento del aumento original del objetivo por un factor de 100X.

Al hacer incidir la imagen del microscopio sobre la cámara, se abrieron todos los diafragmas, se quitaron los filtros de densidad neutros y se aumentó la potencia de la fuente de iluminación cuando era necesario.

La imagen que apareció en el monitor se orientó de la manera más conveniente, rotando la platina giratoria y ajustando la excentricidad de la fuente de iluminación, para que las estructuras de interés adquirieran un contraste y relieve

adecuados, producto de los gradientes de luz generados por la iluminación asimétrica.

El condensador de campo situado cerca de la fuente de iluminación también se ajustó, para hacer incidir eficazmente los rayos oblicuos sobre la muestra de la manera más favorable para cada objeto en particular.

El contraste de la imagen se aumentó extraordinariamente con manipulaciones de los controles de ganancia y balances tonales en la consola de control de la cámara de video y con los controles de contraste y brillantez del monitor.

Las imágenes elegidas para registro se fotografiaron directamente de la pantalla del monitor o se grabaron en cinta magnética para su posterior análisis. La videgrabadora permitió detener a voluntad las imágenes durante su reproducción para ser igualmente fotografiadas del monitor.

Las video-micrografías se obtuvieron en película de 125 de ASA (Kodak Plus-X) a una velocidad de obturador de 1/8 de segundo y con diafragma variable.

RESULTADOS.

I. ESTIMACION DE LA CAPACIDAD RESOLUTIVA DEL SISTEMA DE VM-CAE CON PREPARACIONES BIOLÓGICAS UTILIZADAS COMO PATRONES DE RESOLUCION.

A. DIATOMEAS.

Se observó por VM-CAE el exoesqueleto calcáreo del alga unicelular *Pleurosigma angulatum*. Las imágenes encontradas revelaron con absoluta nitidez el típico arreglo que adquieren los forámenes en estas células (fig 3). La distancia encontrada entre dos de estas unidades fue de 0.60 micras aproximadamente.

B. CELULAS BUCOEPITELIALES.

Fue observada por VM-CAE a diferentes aumentos la topografía membranal de células de epitelio bucal estratificado. Las imágenes revelaron el típico patrón corrugado de la membrana plasmática, definiéndose claramente las crestas y hoyuelos que son producto de su plegamiento (fig 4). Se encontró que estos pliegues membranales poseen una anchura de 0.3 micras aproximadamente.

II. TRANSPORTE INTERCELULAR EN CELULAS NERVIOSAS.

Se estudió el transporte intracelular de partículas en la red de neuritas de células nerviosas de pollo cultivadas in vitro. Se

observó el continuo tráfico intracelular de organelos existente en dichas células.

A. TAMAÑO, EDAD Y FORMA DE NEURONAS.

El tamaño de las células nerviosas oscilaba desde varias decenas hasta algunos cientos de micras de longitud. Los cuerpos neuronales alcanzaban sólo dos a tres decenas de micras y el resto de la longitud total de la célula era ocupada por las prolongaciones citoplásmicas (axones y dendritas) denominadas neuritas en general. El diámetro de las neuritas en las que se realizó todo el trabajo varió entre 1 y 5 micras a todo lo largo de la estructura, incrementándose por algunas unidades en la entrada del soma neural o del cono de crecimiento cuando se presentaba éste. El estudio se realizó tanto en células que presentaban el cono de crecimiento como en aquellas que ya habían hecho contacto con algún sitio blanco.

La mayor parte del trabajo fue realizado en células individuales con bajo grado de desarrollo, es decir, células en las cuales el axoplasma fuera bastante transparente sin muchas estructuras estáticas internas. Tales condiciones facilitan sobre todo la observación de los organelos de diámetros muy diminutos; por tal razón, la edad de los cultivos utilizados fue de cuatro a siete días de haber sido sembrados; en este lapso de tiempo se pueden encontrar células con diversos grados de desarrollo. En cultivos de edad más avanzada los axones incrementan su diámetro, aparecen muchas estructuras fijas y pueden formar paquetes,

haciendo más dificultosa la observación del tráfico intracelular de partículas.

B. DINAMICA INTRACELULAR DE PARTICULAS.

1. DIRECCIONALIDAD DEL MOVIMIENTO.

Observaciones por VM-CAE mostraron la dinámica de los componentes internos en células nerviosas cultivadas in vitro. Se observó un continuo tráfico de partículas a lo largo de la red de neuritas en forma bidireccional, es decir en dirección anterógrada (el movimiento es originado en el soma neural dirigiéndose hacia el sitio de inervación o al cono de crecimiento) y en dirección retrógrada (el flujo proviene de la terminación nerviosa hacia el soma neural, fig 5).

2. TAMAÑO, FORMA Y VELOCIDAD DE PARTICULAS.

Tipos, formas y velocidades de las diferentes partículas que migran internamente fueron estudiadas en relación a su transporte en ambas direcciones dentro de la célula. Esta parte del trabajo se llevó a cabo en cultivos con baja densidad de población de células con el objeto de identificar satisfactoriamente los sitios de origen e inervación celular, puesto que cuando existe una red muy densa de neuritas se dificulta mucho esta tarea.

Se encontraron cuatro diferentes tipos de partículas migrando internamente en ambas direcciones, clasificándose como tales de acuerdo a su tamaño, forma y velocidad.

El primer grupo está compuesto por las partículas más pequeñas que se encontraron; su diámetro aparente registrado fue de 0.3 micras, normalmente su forma fue esférica y son las más veloces de todas las encontradas, promediando una velocidad de casi 3 micras/seg, en ambas direcciones. Estas partículas fueron las que más dificultad presentaron para su observación, tanto por su tamaño como por su velocidad, y resultó muy difícil congelar su imagen en movimiento. De hecho su presencia sólo es vista cuando están desplazándose. Se les clasificó como tipo CH (fig 6).

El segundo grupo, clasificado como tipo M de forma esférica, incluye todas aquellas partículas de diámetros comprendidos entre 0.4 y 0.5 micras, su velocidad de migración en ambas direcciones resulta ser menor en comparación al grupo anterior por casi el doble. Sin embargo son éstas las que más comunmente se encuentran migrando dentro de la célula. La cantidad presente de éstas supera a todas las demás, se detectan más fácilmente y se puede lograr congelar su imagen en movimiento sin ningún problema (fig 6).

El tercer grupo compuesto por las partículas de tipo G, comprende a las más grandes encontradas durante el estudio, su diámetro fue de 0.6 micras en adelante y presentaban forma circular u oval; la mayoría de éstas son lentas, pero algunas viajan muy rápidamente. La velocidad promedio registrada en ambas direcciones fue de casi 1.2 micras/seg (fig 6).

La última clase de partículas encontradas fueron las Mt, compuesta exclusivamente de partículas que presentan la clásica forma alargada (salchicha) de las mitocondrias; su diámetro fue de 0.3 a 0.4 micras y su longitud de 1 micra o más. Gran cantidad de estos organelos son estáticos, pero cuando se desplazan alcanzan

una velocidad comparable a los dos grupos anteriores, aproximadamente 1.5 micras/seg en ambas direcciones (fig 6).

En forma general las partículas encontradas se pueden dividir de acuerdo a su velocidad en dos clases:

Una clase compuesta exclusivamente de las partículas de tipo CH, las cuales presentan una velocidad superior por casi dos veces a los demás grupos, y una segunda clase compuesta por el resto de las partículas incluyendo los tipos M, G, y Mt, sin que existan diferencias de velocidad entre ellos, pero sí con respecto al tipo de partículas incluidas en la clase anterior. No se encontraron diferencias en cuanto al tipo y cantidad de partículas migrando en ambas direcciones (fig 7).

3. DISTRIBUCION Y COMPORTAMIENTO.

El movimiento interno de partículas en células nerviosas no es visto como un flujo de organelos en masa, sino que presenta ciertos patrones específicos de comportamiento que lo hacen diferente. El movimiento de organelos parece seguir ciertas rutas que se establecen de acuerdo a la disponibilidad de espacio libre dentro de la célula, puesto que estructuras estáticas dentro de la misma actúan como barrera limitante deteniendo o retardando el tráfico de aquellos. De la misma manera, la variabilidad de velocidades existente entre los componentes, así como su migración en sentidos opuestos, traen consigo la aparición de colisiones y aglomeraciones entre ellos, cuando el tránsito es excesivo.

En ocasiones cuando dos partículas migran en sentidos opuestos sobre un mismo "carril" ambas pierden velocidad durante su

interacción, incrementándose esta posteriormente al seguir su trayecto; se observaron además en algunas neuritas estructuras filamentosas estáticas de gran longitud, que quizás pudieran estar involucradas en el proceso de transporte.

Aunque el movimiento de organelos parece depender de la disponibilidad de espacio según lo anterior, puede ser que existan rutas específicas de transporte, puesto que alguna vez se vió en una neurita cómo una partícula de tipo G durante su trayecto desplazó a dos mitocondrias que se movían lentamente en dirección opuesta (fig 8). En tal neurita el axoplasma era casi totalmente limpio de organelos estáticos y de estructuras fijas, lo que facilitaba el desplazamiento de las partículas en movimiento por cualquier punto; sin embargo, la interacción que hubo entre éstos, sugiere la existencia de rutas fijas de transporte a lo largo de la célula, al menos para partículas de tipo G.

El desplazamiento de los organelos presentó el típico patrón saltatorio descrito para este tipo de transporte intracelular. Según nuestras observaciones describimos cuatro tipos de desplazamientos que pueden incluir al típico patrón saltatorio o variantes de éste. La descripción de estos desplazamientos se hizo de acuerdo a lo observado en una distancia de 18 micras de longitud dentro de la neurita, distancia que abarcaba la imagen en la pantalla del monitor.

El primer tipo de desplazamiento observado fue un movimiento constante de partículas, migrando en forma continua desde que aparecen en pantalla, sin detenerse y a gran velocidad, durante su trayecto sufren oscilaciones de diferentes intensidades. Todos los tipos de partículas descritas pueden comportarse así, sin embargo,

parece ser la única forma en que viajan las partículas de tipo CH (fig 9).

En el segundo tipo de movimiento denominado de "arranque y frenado", la partícula inicia de una posición casi estática y comienza a desplazarse repentinamente para luego frenar bruscamente en un punto no muy lejano, pasa de nuevo por un instante de tiempo estática y reanuda su movimiento posteriormente. Los desplazamientos continuos son generalmente más cortos y todos los tipos de partículas presentan este comportamiento a excepción de las partículas de tipo CH que esporádicamente lo hacen (fig 9).

El tercer tipo de movimiento denominado de "arrepentimiento" es similar al descrito anteriormente, salvo que ahora la partícula puede cambiar de dirección durante su desplazamiento. De la misma manera las partículas de tipo CH esporádicamente hacen esto (fig 9).

La última forma de movimiento encontrada fue de tipo dudoso, en la cual las partículas guardan una posición casi estática, pero sufren ligeras oscilaciones constantes que poco a poco producen un desplazamiento que no es muy cuantificable. Este comportamiento pudiera quizás enmascarar cierto movimiento browniano. Muchos organelos estáticos y algunas estructuras citoplásmicas fijas pueden comportarse de esta manera (fig 9).

Se observaron además algunos otros movimientos de interés, independientes al transporte intracelular, como retorcimientos de filopodios axonales y movimientos de lamelipodios en conos de crecimiento axonal, así como leves ondulaciones de las neuritas, sobre todo cuando presentan bajo grado de desarrollo.

C. EFECTO DE LA LIDOCAINA SOBRE EL TRANSPORTE INTRACELULAR EN NEURONAS.

Se probó el efecto de lidocaína a diferente concentración sobre el transporte intracelular en la red de neuritas de células nerviosas de pollo cultivadas in vitro (Tabla III). La droga se administró en la solución fisiológica Hanks con la que fue mantenido el cultivo. Se registró el número de partículas que atravesaron por un punto con respecto al tiempo de incubación con la droga, independientemente a la dirección de flujo (fig 10).

La lidocaína a una concentración de 0.1 mM produjo una disminución del 50 % en el número de organelos que atravesaron por un punto a los 6 minutos de incubación con la droga. La inhibición total del proceso se obtuvo al mantener las células por 12 minutos en el medio conteniendo al fármaco. Cuando se incubaron las células a una concentración más baja de anestésico (0.01 y 0.07 mM) el número de partículas que atravesaron por un punto disminuyó a casi un 25 %, durante 24 minutos después de haber sido administrado el fármaco (solo se hicieron registros hasta este tiempo, pero el movimiento continuó presentándose por un rato más). Al ser expuestas las células a una concentración del anestésico de 1 mM se observaron daños celulares de inmediato, inhibiéndose el transporte intracelular al instante. Se trató de lavar la droga del medio a todas las concentraciones utilizadas para observar la recuperación del proceso; sin embargo a ninguna concentración empleada pudo reactivarse el fenómeno a sus niveles ordinarios de flujo.

Concomitantemente con el efecto anterior se presentó una disminución de la velocidad de migración de todos los organelos en general. La lidocaína 0.1 mM produjo una disminución de la velocidad a 1/3 aproximadamente de la velocidad inicial, en 9 minutos de tratamiento. Después de este tiempo en presencia de la droga el proceso se inhibió totalmente (fig 11). La lidocaína 0.07 mM solo redujo ligeramente la velocidad de migración en los 24 minutos que duró la incubación con la droga presente (fig 11). El efecto de la lidocaína se manifestó por igual en todos los organelos presentes sin importar la dirección de flujo, no habiendo por tanto selectividad en este aspecto.

III. CORRIENTES CITOPLASMICAS EN CELULAS VEGETALES.

A. DINAMICA CITOPLASMICA Y CICLOSIS DE CLOROPLASTOS.

Se incubaron tejidos vegetales preestimulados en medio APW por una hora. Se grabó y analizó a diferentes horas del día el comportamiento normal del fenómeno de flujo citoplásmico en células mesófilas. Se realizó una descripción morfológica de éste y se registró la velocidad de migración de cloroplastos. Los registros se obtuvieron sobre los tramos horizontales casi rectos en las paredes anticlinales de las células del mesófilo.

La observación de la corrientes citoplásmicas por VM-CAE mostró el típico patrón de movimiento como cinturón citoplásmico dinámico rodeando una zona clara que corresponde al sitio ocupado por la vacuola central. La masa fluyente de citoplasma en cada célula arrastra consigo gran cantidad de organelos siempre en una sola

dirección, migrando a favor o en contra de las manecillas del reloj.

Los organelos que se encontraron migrando en el citoplasma fueron en su mayoría de muy diminuto tamaño y de forma esférica, algunos de forma más alargada posiblemente fueron mitocondrias, estos organelos diminutos no presentan un patrón de desplazamiento de tipo saltatorio, más bien parecen ser arrastrados por la corriente, y en algunas ocasiones las mitocondrias detenían su marcha producto de lo congestionado en organelos que es la masa de citoplasma fluyente.

Una observación crítica que se hizo fue la presencia de gran cantidad de filamentos de pequeños diámetros (0.66 micras) y con varias micras de longitud. Tales filamentos a veces parecían empaquetarse o enrollarse ligeramente pero siempre en continuo movimiento; no fue posible identificar dichas estructuras exactamente (fig 12).

El núcleo de la célula se vió casi siempre comigrar con la masa de citoplasma, aunque en forma más lenta que los demás organelos. Otros organelos que acompañan el flujo de citoplasma son los cloroplastos, el movimiento de estos organelos alrededor de las paredes celulares es conocido como ciclosis y el número de cloroplastos presentes varía dependiendo del tamaño de la célula (fig 13).

El flujo de citoplasma y cloroplastos en su máximo estado de activación se mantiene constante sobre las paredes anticlinales exclusivamente, adquiriendo casi siempre los cloroplastos una posición perpendicular a ellas, es decir, su forma de disco aplanado es vista lateralmente (fig 14). Algunas veces se

encuentran en el tejido células que se acomodan en diferente posición a las demás y las paredes anticlinales pueden ser vistas frontalmente, permitiendo observar la cara circular de los cloroplastos y con mayor claridad los demás organelos y filamentos ya descritos. En ocasiones se vieron migrar a los cloroplastos en cúmulos, normalmente uno por célula. Tales cúmulos no parecen ser sólo una aglutinación, sino más bien un paquete compacto de organelos que resulta difícil de disgregarse, aunque esto llega a suceder.

Algunas veces se encontraron movimientos fuera del patrón normal de flujo, observándose en ocasiones movimientos y giros de núcleos y cúmulos de cloroplastos en una sola región de la célula en forma independiente a las corrientes citoplásmicas ya establecidas. Otro movimiento anormal fue la tendencia a girar de algunos cloroplastos durante su trayecto o migrar muy por debajo del nivel de las corrientes, dejando a veces esta zona para situarse en la región de la pared periclinal manteniendo solo algunos movimientos oscilatorios. Estos extraños movimientos fueron más comunes en células con corrientes citoplásmicas muy lentas, lo cual era un indicio de un mal estado fisiológico de la célula; puesto que al poco tiempo el fenómeno se inactivaba, estas células no fueron tomadas en cuenta durante el trabajo.

B. VELOCIDAD DE MIGRACION DE ORGANELOS.

Se registró la velocidad de migración de organelos como parámetro cuantitativo del proceso, siendo para cloroplastos individuales de 16,34 micras/seg (S.D.= 4, n= 90). La medición se

realizó en 90 células diferentes de varios segmentos de tejidos vegetales disecados e inmersos en medio APW.

La velocidad de migración de grupos de cloroplastos no muy numerosos y aun de algunos cúmulos caen dentro de este valor promedio. Las mediciones se realizáron sobre tramos rectos en las paredes anticlinales horizontales de las células, sitio en el cual los organelos adquieren su máxima velocidad y existen menos aglomeraciones. Sólo se obtuvieron registros de la velocidad de cloroplastos por las facilidades que esto representaba, pero las velocidades de todos los demás organelos no es muy diferente siempre y cuando el fenómeno esté en su máximo estado de activación.

C. EFECTO DE LA LIDOCAINA SOBRE LA VELOCIDAD DE MIGRACION DE CLOROPLASTOS.

Se trató de observar el efecto de la lidocaína sobre la ciclosis de cloroplastos en células mesófilas. Se realizaron incubaciones de tejidos en medio APW conteniendo lidocaína pura de Chemische Fabrik y lidocaína de Astra Chemicals a diversas concentraciones (Tabla IV). Los experimentos consistieron en incubar células que presentaran el fenómeno en forma normal en medio APW con lidocaína durante 15 minutos. Al llegar a este tiempo la droga se lavaba del tejido con solución pura APW durante tiempo indefinido.

Se encontró que el fármaco producía una inhibición de la migración de cloroplastos con una disminución en su velocidad dependiendo de la concentración utilizada, para ambas

presentaciones del anestésico. Cuando la droga se eliminó del medio de incubación (a los 15 minutos de tratamiento) se observó una recuperación casi total del proceso para la mayoría de las concentraciones investigadas, lo que indica reversibilidad en el efecto.

La lidocaína pura proveniente de Chemische Fabrik (fig. 15) fue más potente que la lidocaína de Astra Chemicals (fig 16) puesto que se necesitaron concentraciones más elevadas de esta última presentación que igualaran el efecto producido por la lidocaína de Chemische Fabrik.

La figura 15 ilustra cómo la lidocaína de Chemische Fabrik disminuyó la velocidad de migración de cloroplastos dependiendo de la concentración utilizada, con recuperación casi total del fenómeno cuando se eliminó el fármaco de la preparación (concentraciones por encima de 5 mM produjeron un efecto irreversible).

La misma disminución de la velocidad de migración de cloroplastos se encontró con la lidocaína proveniente de Astra Chemicals (fig 16). Dicho efecto también fue dependiente de la concentración (aunque con esta presentación se necesitó de concentraciones más elevadas de fármaco) y el proceso se reactivó a los niveles iniciales de flujo cuando se eliminó el anestésico de la preparación (15 minutos de tratamiento con la droga). A una concentración de 20 mM del anestésico se encontró una disminución por casi dos tercios de la velocidad normal de migración.

El resto del trabajo se realizó únicamente con lidocaína de Astra Chemicals, puesto que resultó difícil disponer del anestésico proveniente de Chemische Fabrik.

Observaciones cualitativas del proceso bajo la acción del fármaco (lidocaína de Astra Chemicals) revelaron que los cloroplastos durante su migración, aparte de disminuir su velocidad, sufren en algunas ocasiones desorganización en el patrón normal de flujo dependiendo de la concentración de fármaco presente. Esto es manifiesto principalmente a concentraciones elevadas, cuando se observa a los cloroplastos migrar dando volteretas y con cierta tendencia a ocupar las paredes periclinales de las células. Concentraciones por encima de 20 mM inhiben totalmente el flujo y los cloroplastos quedan fijos en las paredes anticlinales o en las periclinales cuando han salido del cinturón de flujo citoplásmico. Esto último lo realizan normalmente en forma individual aunque en grupos pequeños también es muy común.

El núcleo al igual que los cloroplastos puede migrar muy lentamente o quedarse fijo en cualquier punto de la célula. Los organelos de muy diminuto tamaño que acompañan al flujo citoplásmico normalmente son los últimos en dejar de migrar, aún cuando todos los demás organelos lo hayan hecho ya. Durante la etapa de reactivación del proceso, al ser lavado el fármaco estos últimos organelos son los primeros en comenzar a migrar paulatinamente o incrementar su velocidad cuando las corrientes no han sido inhibidas totalmente. Una vez que esto ha sucedido y las corrientes han sido restablecidas parcialmente, los cloroplastos comienzan a migrar de su posición fija en la pared anticlinal o comienzan a incorporarse al flujo desde su posición en la pared periclinal alcanzando en poco tiempo su velocidad normal; lo mismo sucede para los núcleos.

Los eventos secuenciales del efecto de la lidocaína sobre las corrientes citoplásmicas fueron los siguientes:

1. Alteración en el patrón normal de flujo de cloroplastos, migrando en diferente posición o dando volteretas.
2. Disminución de la velocidad de las corrientes citoplásmicas.
3. Velocidad muy lenta de cloroplastos y núcleo o inhibición del movimiento de ambos, con algunas migraciones de organelos hacia la pared periclinal.
4. Velocidad muy lenta de partículas diminutas o inhibición total del proceso en general.

Cuando se eliminó la droga del medio de incubación la reactivación del fenómeno se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Incremento inicial en la velocidad de partículas diminutas.
2. Incremento o inicio del movimiento de cloroplastos y núcleos sobre corrientes parcialmente establecidas con migración e incorporación de organelos perdidos hacia la zona de flujo.
3. Normalización del proceso de migración de todos los organelos citoplásmicos.

Aunque la reactivación del proceso se cumple casi normalmente de acuerdo al patrón anterior, es común encontrar que no todos los organelos reactivan su movimiento y pueden observarse organelos fijos dentro de la célula después del tratamiento. Se eligió 20 mM como una concentración óptima en que se produjera un efecto de consideración sobre el proceso sin que dañara a la célula y que

permitiera valorar variaciones del mismo bajo diferentes tratamientos

D. EFECTO DE LA LIDOCAINA (Astra Chemicals) SOBRE LA CICLOSIS DE CLOROPLASTOS EN PRESENCIA DE IONES SODIO, CALCIO, POTASIO Y MAGNESIO AUMENTADOS INDEPENDIENTEMENTE, AUMENTADOS CONJUNTAMENTE Y EN AUSENCIA DE ELLOS EN EL MEDIO APW.

El aumento individual, el aumento global y la ausencia de los cationes contenidos en el medio APW en presencia del anestésico no introdujeron variaciones de consideración en el patrón normal de inhibición del proceso (Tablas V, VI).

El efecto parece agudizarse ligeramente al llevarse a cabo las modificaciones anteriores en el medio de incubación, obteniéndose una ligera disminución en la velocidad de migración de los organelos (fig 17).

La etapa de inhibición del proceso (15 minutos de incubación con el anestésico) parece mantenerse constante independientemente de las modificaciones realizadas en el medio; sin embargo el periodo de recuperación del proceso parece sufrir un retardo cuando estas se llevan a cabo, principalmente al elevar en forma global la composición iónica del medio. Bajo las diversas condiciones iónicas ensayadas siempre se obtuvo la recuperación casi total del proceso, aunque en algunos casos se requirió de mayor tiempo (principalmente con el aumento en la concentración iónica global).

E. EFECTO DEL MEDIO APW (100X), AGUA DESIONIZADA, SACAROSA (114 mM) Y SODIO (116 mM) SOBRE LA CICLOSIS DE CLOROPLASTOS.

Por otra parte, se observó el efecto de medios de elevada (APW 100X, sacarosa 114 mM y sodio 116mM) y reducida (agua desionizada) fuerza iónica y osmótica con respecto al medio APW, sobre la ciclosis de cloroplastos (Tabla VII).

Registros de la velocidad de migración de cloroplastos bajo las condiciones anteriores, demostraron que ninguna de éstas fue capaz de alterar la velocidad normal de migración de dichos organelos ni el patrón normal de flujo (fig 18).

El efecto inhibitorio de la lidocaína 20 mM sobre la ciclosis de cloroplastos de células vegetales, de acuerdo a todos los resultados anteriores, parece ser independiente de la presencia o ausencia de los iones extracelulares más relevantes contenidos en el medio externo de este tipo de células. El patrón normal de inhibición del fenómeno por el anestésico en el medio APW normal (fig 16), es muy similar al patrón de inhibición cuando la concentración de cada ión específico fue elevada 100 veces, así como cuando todos los iones fueron elevados en conjunto ó cuando fueron eliminados del medio totalmente (fig 17). La única diferencia encontrada con la variación de las composiciones iónicas en presencia del anestésico fue en el período de reactivación del proceso, cuando la droga fue lavada a los 15 minutos de tratamiento. Durante este periodo se puede observar que la recuperación del fenómeno se logró casi totalmente cuando se variaron ciertos iones específicos o cuando fueron eliminados

todos del medio. Sin embargo, cuando todos los iones fueron aumentados en conjunto, se pudo observar una recuperación más lenta del proceso. Además el fenómeno no fue afectado por el aumento y disminución de la fuerza iónica y osmótica del medio de incubación (fig 18).

F. EFECTO DEL pH SOBRE LA CICLOSIS DE CLOROPLASTOS.

Se trató de observar el efecto que tiene el pH sobre la ciclosis de cloroplastos en células vegetales (Tabla VIII).

El pH fue modificado con el propio amortiguador del medio APW normal (TRIS-MALEATO). La variación del pH se hizo de dos unidades por encima y dos unidades por debajo del pH del medio APW normal (pH 7). Se incubaron las células en soluciones con un pH ácido de 5 y con un pH básico de 9. Registros de la velocidad de migración realizados a diferentes etapas (15 y 27 minutos), para los dos valores de pH mostraron que el fenómeno no fue afectado bajo estas condiciones, manteniéndose una velocidad normal de migración durante todo el tratamiento (fig 18). La ciclosis de cloroplastos parece ser independiente del pH, en el intervalo que estudiamos.

G. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CICLOSIS DE CLOROPLASTOS.

Se estudió el efecto que tiene la temperatura sobre la ciclosis de cloroplastos de células vegetales (fig 19). Fueron realizadas variaciones de 10 °C por encima y por debajo de la temperatura ambiente (25 °C), a la que se realizaron la mayoría de los experimentos. Se siguió el efecto durante casi 1 hora de

tratamiento para cada valor de temperatura ensayado. Se observó una disminución continua del proceso, adquiriendo una velocidad de migración de 0.7 micras/seg a los 30 minutos de tratamiento cuando la temperatura fue elevada por 10° C. Es decir, a una temperatura de 35° C el proceso se inhibe casi totalmente sin que se recupere cuando se regresa a la temperatura ambiente.

Este mismo efecto de disminución continua de la velocidad se encontró cuando la temperatura se disminuyó por 10° C, alcanzando un promedio de 3.6 micras/seg, sin que se recupere el proceso cuando se regresa a la temperatura ambiente (fig 19). Bajo las dos condiciones anteriores no se llega a la inhibición total del proceso por lo menos en 1 hora de tratamiento.

Temperaturas más extremas al intervalo anterior provocaron una inhibición del proceso en tiempos mucho más cortos y produciendo además algunos daños morfológicos en las células.

DISCUSION

I. RESOLUCION CON VIDEO-MICROSCOPIA.

Las algas unicelulares diatomeas tradicionalmente se han utilizado en microscopía óptica como patrón de resolución, aprovechando el típico arreglo regular que presenta su esqueleto externo compuesto de sílice.

Dicho arreglo ha sido estupendamente revelado cuando se ha observado a través de diversos sistemas de video-microscopía (Inoué 1981, Kachar 1985b). Las observaciones de Inoué (1981) quien utilizó el mismo espécimen (*Pleurosigma angulatum*) indican que dichas estructuras se encuentran separadas por una distancia aparente de 0.65 micras. Kachar (1985b) reportó una distancia de 0.41 micras entre cada forámen de la diatomea *Suriella gamma*. Nuestras observaciones revelaron que cada unidad constituyente o forámen se encuentra separada de otra por una distancia de 0.6 micras.

Otro patrón estructural muy empleado para estimar la resolución microscópica es la topografía membranal de células epiteliales. La membrana plasmática de este tipo de células presenta plegamientos a manera de aumentar su superficie externa. Por microscopía electrónica de barrido se ha reportado que los pliegues membranales en estas células tienen un diámetro de 0.1-0.2 micras (véase Kessel y Kardon 1979). Este patrón corrugado, también puede ser revelado extraordinariamente con sistemas de video aplicados a métodos tradicionales de microscopía óptica. Nuestras

observaciones de tales especímenes con VM-CAE e iluminación asimétrica (Kachar 1985b) indican que cada micropliegue posee una anchura de 0.3 micras. Las observaciones de Allen (1981a,b) quien utilizó luz polarizada y contraste por interferencia diferencial (AVEC-POL y AVEC-DIC) revelan una anchura de 0.27 micras. De acuerdo a las observaciones de Kachar (1985b) la anchura de tales estructuras es aproximadamente de 0.22 micras.

Como se puede notar, los diámetros de los micropliegues obtenidos por video microscopía son muy similares a los reportados por microscopía electrónica. Esto parece indicar que a través de sistemas de video microscopía se puede alcanzar el límite de resolución de la microscopía óptica, sin que represente un problema el contraste de la imagen.

La diferencia encontrada en el diámetro de los pliegues membranales entre las imágenes provenientes de microscopía electrónica y de video microscopía, puede ser debida a que con este último sistema de observación se obtienen imágenes producto de la difracción de estructuras, cuando se trabaja sobre el límite de resolución del sistema de observación (microscopía óptica en este caso). Por esta razón estructuras de dimensiones por debajo del límite de resolución cuando son detectadas no poseen sus dimensiones reales, aparecen con dimensiones acentuadas.

Si consideramos que con nuestro sistema de observación estructuras con diámetros reales de 0.15 micras aparecen con un diámetro aparente de 0.3 micras, posiblemente nuestro sistema incrementa por un factor de 2 el diámetro real de estas, cuando se trabaja sobre el límite de resolución. Esto nos indica que objetos de dimensiones menores a 0.3 micras observados en nuestro sistema,

posiblemente poseen dimensiones reales que rebasan el límite de resolución para la microscopía óptica.

II. TRANSPORTE INTRACELULAR EN CELULAS NERVIOSAS.

A. DINAMICA INTRACELULAR DE ORGANELOS.

Nuestras observaciones del flujo interno de partículas en la red de neuritas de células nerviosas en cultivo, revelaron los mismos elementos dinámicos que componen el transporte rápido axonal de células nerviosas (Alberts et al. 1983). Se observó que dichos componentes se transportaron tanto en dirección retrógrada como en dirección anterógrada tal y como fue descrito previamente (Cooper y Smith 1974, Adams y Bray 1983). El tamaño y la forma de las partículas que observamos coincide con los datos reportados para transporte intraxonal en diversos tipos de axones (Cooper y Smith 1974, Hammond 1977, Breuer et al. 1975). Sin embargo si consideramos el fenómeno de difracción de campo cercano (Hecht 1974) detectado en nuestro sistema de observación (por este efecto las estructuras aparecen infladas o aumentadas de tamaño por cierto factor, cuando no pueden ser resueltas con el sistema óptico de trabajo) posiblemente las partículas más diminutas que reportamos (0.3 micras de diámetro aprox.) tengan diámetros reales más pequeños, quizás por debajo del límite de resolución de la microscopía óptica. Previamente se ha reportado que la velocidad de movimiento de partículas esféricas (que son las más comunes) en diversas clases de axones es de 0.5-1.5 micras/seg (Cooper y Smith 1974, Hammond 1977, Breuer et al. 1975, Goldberg y Burmeister

1986), mismo que corresponde a la velocidad promedio que registramos para la mayoría de las partículas encontradas (fig 6). Por otra parte, partículas tan veloces como del tipo CH observadas (3 micras/seg aprox.) han sido escasamente reportadas, debido quizás a que no siempre se les ha podido detectar en los diversos tipos de axones estudiados.

Con respecto a la direccionalidad del movimiento se ha reportado que existen diferencias en los tipos, velocidades y cantidad de organelos transportados (Cooper y Smith 1974, Adams y Bray 1983, Tsukita e Ishikawa 1980). Sin embargo, según nuestros resultados no hay diferencias entre el transporte de organelos en dirección retrograda y en dirección anterógrada en neuritas en cultivo (figs 6, 7).

Pensamos que esto puede deberse al bajo grado de desarrollo que manifiestan las células nerviosas en cultivo en la edad en que se hicieron los experimentos. Aunque ya existen proyecciones citoplásmicas que manifiestan transporte axonal, quizás algunas propiedades de éste sean diferentes a los de una célula madura, donde los procesos de crecimiento han concluido y la célula se encuentra en un estado funcionalmente distinto.

Las diversas formas de desplazamientos de organelos que encontramos (constante, arranque y frenado, de arrepentimiento, dudoso) (fig 9), son características del clásico movimiento saltatorio descrito para el transporte de partículas axonales (Forman 1982b).

De acuerdo a nuestros resultados y a los datos reportados previamente parece existir una correlación entre tamaño, velocidad y facilidad de desplazamiento de organelos, puesto que entre más

pequeño sea éste, mayor velocidad adquiere y se dificulta menos su desplazamiento. Como ejemplo podemos citar a las partículas de tipo CH, que son las más pequeñas, las más rápidas y las que manifiestan casi siempre un patrón de desplazamiento de tipo constante.

B. EFECTO DE LA LIDOCAINA SOBRE EL TRANSPORTE AXONAL DE ORGANELOS.

Desde hace tiempo se observó que los anestésicos locales, aparte de su acción bloqueadora sobre la transmisión de señales eléctricas en células nerviosas, podían tener efectos sobre otros procesos, como el transporte interno de materiales (Fink et al. 1972). El efecto sobre este proceso se manifiesta como una inhibición del transporte interno dependiendo de la dosis de fármaco presente y del pH en el cual se encuentre la molécula (Fink et al. 1972, Lavoie 1982a). Estas observaciones provienen de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* en los cuales se comprobó en forma indirecta la inhibición del proceso de transporte; es decir, con registros de marcas radioactivas a lo largo de axones en células que previamente habían sido inyectadas con aminoácidos marcados en el soma neural y expuestos posteriormente al anestésico local (Fink et al. 1972, Lavoie 1982a). Sin embargo, no existía algún estudio en el cual fuera comprobado en forma directa el efecto inhibitorio sobre el transporte intracelular de organelos en células nerviosas.

De acuerdo a nuestros resultados (figs 10, 11), comprobamos por vez primera en forma visual que la lidocaína produce una inhibición del transporte bidireccional de organelos en células

nerviosas, efecto que depende de la dosis de fármaco empleada. En nuestro modelo celular de trabajo (neuritas en cultivo) el efecto se obtuvo con dosis bastante menores (figs 10, 11) a las reportadas en otros modelos celulares de transporte axonal (Fink et al. 1972, Lavoie 1982a,b). Sin embargo, el efecto inhibitorio encontrado fue irreversible para todas las concentraciones estudiadas a lo largo del tiempo total del experimento. Esta irreversibilidad puede ser debida a que el tiempo de lavado de la droga (1 hora) haya sido insuficiente para eliminarla de sus sitios de anclaje en la membrana, suponiendo que sea éste su sitio de acción, puesto que en algunos otros modelos celulares de transporte axonal se ha obtenido la recuperación del proceso después de varias horas de lavado del anestésico (Aesheim et al. 1974, Fink y Kish 1976, Fink et al. 1972).

Nuestras observaciones del efecto inhibitorio revelaron cómo el tránsito bidireccional interno de partículas fue arrestado sin que haya selectividad del efecto en cuanto al tipo de organelo o a la dirección de flujo en particular. En ambas direcciones de transporte la disminución en la velocidad de migración de los organelos en presencia del anestésico fue dependiente de la concentración y no hay selectividad en el efecto para los diversos tipos de organelos encontrados (fig 11).

Durante la etapa de inhibición del proceso de transporte intracelular, pudimos observar en forma cualitativa cómo los organelos paulativamente van perdiendo velocidad y disminuye el número de ellos en movimiento, cesando casi por completo con el paso del tiempo los desplazamientos de tipo constantes, y predominando preferencialmente desplazamientos lentos de arranque

y frenado; se aprecia una mayor dificultad en el movimiento de organelos, como si encontrarán mayor resistencia durante su desplazamiento, hasta que se llega finalmente a mantener cierto movimiento de tipo dudoso o a la inhibición total del fenómeno.

Aunque describimos algunos aspectos cuantitativos y cualitativos del efecto de los anestésicos locales, es necesario realizar estudios más detallados sobre la inhibición ya confirmada del proceso, que proporcionen mayor información al respecto.

Los resultados obtenidos confirman la inhibición del transporte axonal producido por anestésicos locales como un efecto independiente a su acción anestésica. Dicho efecto se suma así a las tantas evidencias existentes sobre una acción bloqueadora general de diversos procesos de motilidad celular por anestésicos locales (Fink et al. 1972, Lavoie 1982a,b, Mondragón 1986).

III. CORRIENTES CITOPLASMICAS EN CELULAS VEGETALES.

Las células mesófilas de *Vallisneria sp.* resultan ser un excelente modelo biológico para el estudio de las corrientes citoplásmicas; la facilidad con que se pueden obtener estas células y las ventajas que ofrece el trabajar con ellas, como se describió en los resultados, favorece el análisis directo de dicho fenómeno.

En nuestros experimentos la inducción del fenómeno se hizo en forma fotocinética, aunque ha sido reportado que la estimulación puede ser quimiocinética (Takagi y Nagai 1983, Yamaguchi y Nagai 1981). Nuestras observaciones del flujo citoplásmico revelaron la mayoría de los organelos y estructuras que se encuentran

involucrados en las corrientes citoplásmicas de células vegetales en general. Se observaron cloroplastos, núcleos, mitocondrias y partículas endoplásmicas como lo hicieron Takagi y Nagai (1983), Yamaguchi y Nagai (1981), con microscopía óptica y electrónica en células mesófilas y epidermales de *Vallisneria gigantea* respectivamente. Observamos además una gran cantidad de filamentos motiles de 0.66 micras de diámetro que acompañan al flujo citoplásmico, dichas estructuras en movimiento no habían sido descritas en células de *Vallisneria sp.*

Elementos del citoesqueleto como paquetes de microfilamentos de actina, vistos en *Vallisneria* por microscopía electrónica (Takagi y Nagai 1983, Yamaguchi y Nagai 1981) y en otros tipos de células vegetales como *Nitella* (Nagai y Rebhun 1966, Palevitz y Hepler 1975, Nagai y Hayama 1979a, Palevitz et al. 1974) y *Acetabularia* (Dazy et al. 1981) no pudieron ser observadas con nuestro sistema de videomicroscopía.

Se pensó al principio que los filamentos delgados que encontramos podrían ser paquetes de microfilamentos, debido a su estrecha asociación con los demás organelos que acompañan el flujo citoplásmico. Sin embargo, esta idea inicial se descartó de acuerdo a los hallazgos de Allen (1981), Allen y Allen (1983) quienes encontraron redes filamentosas de características muy similares en células epidermales de cebolla, empleando microscopía AVEC-DIC.

Estas redes filamentosas han sido observadas también inmediatamente debajo de la membrana plasmática en el citoplasma de células de *Acetabularia*, proponiéndose que podrían ser cisternas de retículo endoplásmico (RE), (Allen 1983). El último

hallazgo de Allen y Brown (1988) sugiere que dichas redes filamentosas al emitir fluorescencia en presencia de clorotetraciclina (CTC) presumiblemente contienen calcio, lo que indica seguramente que estas estructuras funcionan como reservorios intracelulares del catión, papel que normalmente es desempeñado por el RE. Estas observaciones confirmaron la existencia de una dinámica red filamentososa (FEN) de RE en células vegetales. Con estos hallazgos y las observaciones de Yamaguchi y Nagai (1981) quienes encontraron cisternas de RE en células de *Vallisneria gigantea* por microscopía electrónica, podemos pensar que los filamentos motiles que observamos, más que posibles elementos del citoesqueleto, deberían ser redes filamentosas dinámicas (FENs) de RE, similares a las encontradas en células epidermales de cebolla (Allen y Brown 1988). Dicha afirmación solo será confirmada cuando se realicen mayores estudios para su exacta identificación.

La velocidad de flujo citoplásmico en células vegetales muestra gran variación de un tipo celular a otro. Para *Nitella* se ha encontrado que en el endoplasma mótil subcortical muchas partículas incluyendo el núcleo migran a una velocidad de 100 micras/seg en forma unidireccional (Stebbins y Hyams 1979, Allen y Allen 1978). Sin embargo en estas mismas células partículas exógenas unidas covalentemente a miosina e introducidas directamente a la célula exhiben movimiento unidireccional a una velocidad de 2 micras/seg (Vale et al. 1984). En células filamentosas como *Tradescatia*, *Urtica*, *Gloxinia*, *Cucurbita*, *Campanula*, y *Saxifraga* las velocidades de flujo van desde un movimiento levemente perceptible hasta una velocidad de 40

micras/seg (Allen y Allen 1978). En células cultivadas de tejidos de *Euphobia* se realiza un movimiento unidireccional y bidireccional de organelos a una velocidad de 0-19 micras/seg (Allen y Allen 1978); en *Caulpera* filas de cloroplastos se mueven circadianamente a una velocidad de 3-5 micras/seg (Allen y Allen 1978).

Organelos como cloroplastos, mitocondrias y otras partículas se transportan a una velocidad de 1-10 micras/seg en *Acetabularia* (Allen y Allen 1978). En células epidermales de cebolla partículas esféricas y mitocondrias migran a una velocidad de 3-5 micras/seg (Allen y Brown 1988). En células mesófilas de *Vallisneria*, Takagi y Nagai (1985) reportaron que el flujo de núcleos, cloroplastos y partículas citoplásmicas se realizaba a una velocidad de 10-20 micras/seg.

La gran variación en el grado de velocidad de las corrientes citoplásmicas en general descrita anteriormente, puede deberse a características específicas de cada organismo, puesto que los datos mostrados corresponden a diversos patrones de flujo - corrientes rotacionales; circulatorias, multiestriadas, etc. (Allen y Allen 1978)- a factores tales como pigmentos encargados en la percepción de la señal luminosa (Haupt 1982), a características propias del endoplasma, organelos, y a la estructura del aparato motor en particular. Los elementos involucrados en la regulación del proceso pueden ser también responsables de esto.

Nuestros resultados obtenidos sobre la migración de cloroplastos en células mesófilas de *Vallisneria sp.* indican que la velocidad registrada (16.34 micras/seg SD= 4, n= 90)

corresponde al intervalo reportado anteriormente en *Vallisneria gigantea* (Takagi y Nagai 1985), la velocidad de los demás organelos que se encontraron -núcleos, mitocondrias, partículas esféricas-, aunque no se muestra, fue similar o ligeramente más lenta que la registrada para cloroplastos.

A. EFECTO DE LIDOCAINA SOBRE LAS CORRIENTES CITOPLASMICAS.

La lidocaína es un anestésico local que inhibe la transmisión de señales eléctricas en células nerviosas (De Jong 1977). El anestésico actúa a nivel de membrana plasmática interfiriendo con los flujos iónicos producidos durante la depolarización de la misma (De Jong 1977). Este efecto no es el único que produce el fármaco; se ha encontrado que puede afectar otros procesos celulares independientemente de su acción anestésica, como el transporte rápido intracelular en células nerviosas (Fink et al. 1972). Al aplicar el anestésico en otros modelos intracelulares de transporte, como la migración de gránulos pigmentarios en células retinales (Mondragón 1986), se encontró la misma inhibición del transporte interno tal como la describió Fink et al. (1972). Nuestros experimentos concuerdan con estos resultados, puesto que al aplicar lidocaína a células mesófilas de *Vallisneria sp.*, similarmente se inhibieron las corrientes internas dependiendo de la concentración de fármaco utilizada. Dicha inhibición fue reversible, como mostró Fink et al. (1972) y Mondragón (1986) cuando la droga es eliminada del medio de incubación. La inhibición del proceso por tanto, no es debida a una acción tóxica

del fármaco puesto que la reversibilidad de éste nos indica que el efecto puede ser específico en forma transitoria (figs 15, 16).

La observación anterior es la primera evidencia existente de la inhibición de las corrientes citoplasmáticas en células mesófilas de *Vallisneria* por anestésicos locales.

Los resultados obtenidos se suman así a las muchas evidencias existentes de una posible acción bloqueadora general de los anestésicos locales sobre los fenómenos intracelulares de transporte.

B. MECANISMO DE ACCION DEL EFECTO INHIBITORIO.

Por los antecedentes que se tenían del modo de acción del fármaco en otros modelos celulares, como se mencionó anteriormente, la estrategia seguida para esclarecer el mecanismo de acción del efecto inhibitorio encontrado sobre la ciclosis de cloroplastos fue evaluar el efecto del anestésico bajo diversas condiciones iónicas en el medio de incubación. Como los resultados lo indican (fig 17) la respuesta encontrada fue siempre constante y tanto la variación selectiva, como la ausencia o la acción conjunta de las principales especies iónicas (K^+ , Mg^{++} , Na^+ , Ca^{++}) no introdujeron alguna variación de consideración en el patrón normal de inhibición producido por lidocaína 20 mM (fig 16).

Sólo se observaron algunas diferencias durante la etapa de recuperación del fenómeno cuando la droga era eliminada del medio, retardándose ligeramente el reestablecimiento del proceso. Este efecto se encontró principalmente cuando se elevaron los niveles iónicos en forma global.

El efecto inhibitorio de la lidocaína no puede ser debido a una acción plasmolizante de la célula, producto de la adición del fármaco ó de la elevación de la composición iónica, puesto que al incubarlas solo en medio APW (100X), en Sacarosa 114 mM y Sodio 116 mM (para una fuerza iónica y osmótica muy superior al medio APW normal) se mantuvieron inafectadas las corrientes citoplásmicas durante mucho tiempo (> 1 hora), (fig 18). De la misma manera, posibles estados de turgencia por incubación de las células en agua desionizada durante bastante tiempo (> 1 hora) no afectaron el patrón normal de flujo citoplásmico (fig 18).

Efectos debidos a una variación del pH producto de la adición del anestésico son improbables, puesto que la solución final siempre fue ajustada al pH fisiológico del medio normal APW (7.0). Nuestros resultados además indican que variaciones de pH, al menos en el rango que probamos (5.0-9.0), no tienen efectos de consideración sobre el patrón normal de flujo citoplásmico (fig 18).

El mecanismo de acción del anestésico sobre las corrientes citoplásmicas en este modelo celular parece ser independiente de la presencia o ausencia de las especies iónicas más relevantes del medio de incubación, descartando así la posibilidad que ha sido propuesta (Mondragón 1986) de que el efecto del anestésico se asocia a un flujo selectivo de iones hacia el interior de la célula. Dicho influjo podría tener alguna acción reguladora sobre el fenómeno de transporte internó, papel que en muchos casos ha sido adscrito al calcio, por su labor de segundo mensajero. En estas células en particular, se ha reportado que dicho ión parece ser uno de los principales agentes reguladores del proceso, puesto

que cuando su concentración intracitoplásmica se eleva por encima de 10^{-4} M produce un efecto inhibitorio (Takagi y Nagai 1986). Si el anestésico hubiera tenido una acción permeabilizante sobre la membrana, cuando elevamos la concentración externa de calcio en presencia del fármaco, hubieramos obtenido este último efecto; sin embargo, para ningún ión específico ocurrió tal cosa.

Lo anterior nos hace pensar que en nuestro modelo de estudio en particular, el anestésico no actúa a nivel de membrana plasmática como agente desestabilizante. De acuerdo a los resultados obtenidos, posiblemente su sitio de acción sea más allá de la membrana plasmática, radicando quizás en alguna o algunas estructuras intracitoplásmicas. Con los antecedentes existentes acerca de las propiedades fisicoquímicas de la molécula anestésica, su alto grado de liposolubilidad (De Jong 1977) y la existencia de posibles sitios de alojamiento ó receptores de ésta en la membrana plasmática (De Jong 1977), puede ser que el efecto inhibitorio encontrado no sea asociado a la desestabilización de esta estructura, sino más bien puede ser producto de la activación o desactivación de algunos otros componentes asociados, como proteínas constitutivas de la membrana u otros elementos que funcionen como segundos mensajeros o que sirvan de anclaje a otras estructuras citoplásmicas como los elementos del citoesqueleto, que en estas células en particular se encuentran en una región inmediata a la membrana plasmática (Takagi y Nagai 1983, Yamaguchi y Nagai 1981). Este efecto sería de consideración si tomamos en cuenta que la matriz citoplásmica constituida principalmente de filamentos de actina en gran variedad de células vegetales, ha sido involucrada directamente como componente esencial del aparato

de propulsión de organelos y partículas (Yamaguchi y Nagai 1981, Ishigami y Nagai 1980, Nagai y Fukui 1981, Takagi y Nagai 1983, Allen y Brown 1988, Vale et al. 1984). La desestabilización de dichas estructuras posiblemente traería consigo el desensamblaje del aparato motor llevando a la inhibición del proceso. Ishigami y Nagai (1980) encontraron que al aplicar citocalasina B a células de *Vallisneria* las corrientes citoplásmicas se inhibían, y la dirección inicial de flujo en ocasiones se invertía cuando el proceso se reestablecía al lavar la droga del medio. Esta inversión de la dirección de flujo, según ellos, se debía a que posiblemente los filamentos de actina llegaban a despolimerizarse totalmente mientras estuviera presente la droga. Cuando se lavaba ésta del medio, los filamentos podían repolimerizarse en cualquier sentido y en algunas células la dirección inicial de flujo podría invertirse al cambiar el sentido de la repolimerización. De acuerdo a esto la posible desestabilización del citoesqueleto como explicación que damos del efecto inhibitorio del fenómeno motil, no llega a un grado de depolimerización del citoesqueleto, puesto que nunca observamos inversión de la dirección inicial de flujo durante los tratamientos.

Si consideramos la posibilidad de que el anestésico se introdujera al interior de la célula, los sitios más probables de acción podrían ser primeramente los elementos que constituyen el aparato motor, como serían los paquetes de microfilamentos de actina, que parecen ser la estructura guía por la cual los organelos y partículas son desplazadas (Vale et al. 1984, Kachar 1985a) o a los organelos y vesículas que son arrastradas en

asociación con los filamentos fijos de la matriz (Vale et al. 1984, Kachar 1985a).

Por los antecedentes que existen sobre la acción reguladora que tiene el calcio citoplásmico sobre el fenómeno de transporte en este tipo de células (Takagi y Nagai 1983, 1985, 1986) y en otras más (Kikuyama y Tazawa 1982, Vale et al. 1984, Fukui y Nagai 1985, Kachar 1985a), podemos considerar que aunque aparentemente la acción inhibitoria del fármaco no fue producto de un flujo masivo de calcio hacia el interior de la célula, si pudo haber sido por una liberación interna de calcio, por parte de algunas estructuras que funcionan como reservorios intracelulares del catión, principalmente el tonoplasto (Kikuyama y Tazawa 1982) y de los posibles elementos filamentosos motiles observados, si los consideramos como posibles FENs de RE (Allen y Brown 1988). Esta afirmación no sólo se basa en nuestras observaciones, puesto que se han visto cisternas de RE previamente en el citoplasma de *Vallisneria gigantea*, a través de microscopía electrónica (Yamaguchi y Nagai 1981).

Los fenómenos de dinámica intracitoplásmica en general dependen dramáticamente del aporte energético interno de la célula (Adams 1982, Vale et al. 1984, Kachar 1985a, Ochs 1974, Ochs y Hollingsworth 1971). Cabe la posibilidad de que el efecto inhibitorio del flujo que se encontró, sea producto de una interferencia con el metabolismo celular, viéndose comprometido el aporte de energía metabólica que requiere el proceso para llevarse a cabo (véase Fink y Kish 1976, Lavoie 1982a,b, Fink et al. 1972).

La dependencia metabólica se confirma al inhibirse el proceso cuando la temperatura es disminuida (fig 19). De la misma manera

el aumento de ésta inhibe el proceso de transporte, posiblemente por la inactivación o desnaturalización de ciertos componentes esenciales del aparato motor (fig 19).

La última posibilidad que consideramos sobre el efecto inhibitorio del fenómeno por anestésicos locales es a nivel de pigmentos fotoreceptores, puesto que como proceso fotocinético (Haupt 1982) la estimulación del flujo citoplásmico involucra la percepción de la señal luminosa, traducción y procesamiento de las mismas, interviniendo cambios en las moléculas receptoras (Haupt 1982) principalmente fitocromos (Takagi y Nagai 1985). La interferencia en alguna etapa del proceso general fotoinductor traería consigo alteraciones en la señal de traducción que estimula y controla el aparato motor.

CONCLUSIONES

1. El sistema de video-microscopía de contraste acentuado electrónicamente, empleando iluminación asimétrica, resulta ser una excelente herramienta para el estudio de fenómenos celulares de complicada observación.
2. Comprobamos en forma directa el efecto inhibitorio que tiene la lidocaína sobre el transporte intracelular en células nerviosas. El efecto inhibitorio depende de la concentración del anestésico utilizada y fue de tipo irreversible en los tiempos ensayados.
3. La lidocaína produce una inhibición de la ciclosis de cloroplastos en células vegetales. La inhibición del proceso depende de la concentración empleada del anestésico y es de tipo reversible.
4. La inhibición de la ciclosis de cloroplastos por lidocaína es independiente de la presencia o ausencia de las especies iónicas contenidas en el medio de incubación (APW).
5. La inhibición de la ciclosis de cloroplastos por lidocaína, parece ser debida a una posible acción intracelular de la molécula, más que una acción sobre la membrana plasmática.
6. La ciclosis de cloroplastos es sensible a la temperatura y no

es afectada por cambios de pH o por variaciones de la fuerza iónica y osmótica del medio de incubación.

Fig. 1. Sistema de video-microscopía de alta resolución.

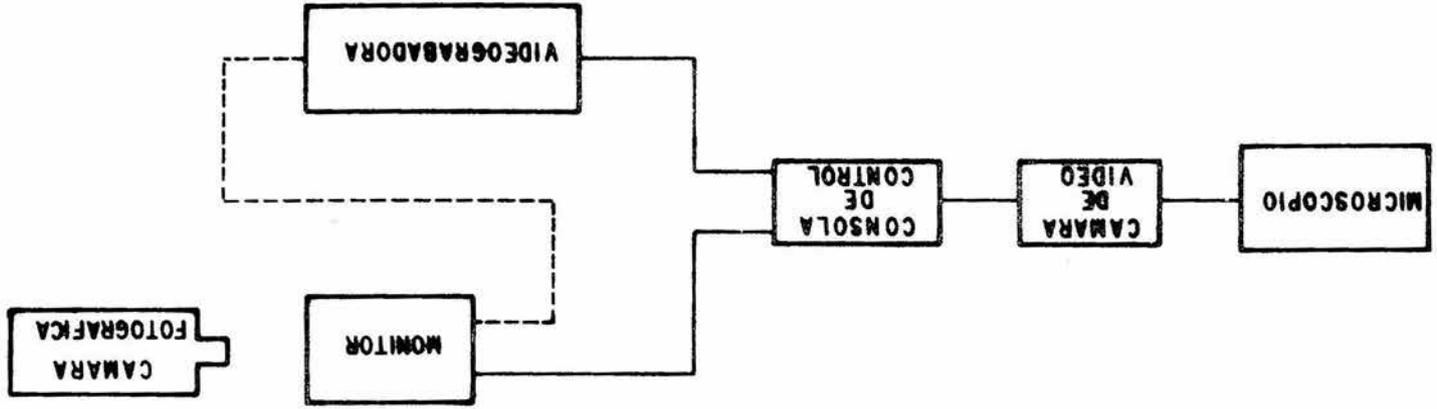


Fig. 2. Esquema del sistema de perfusión.

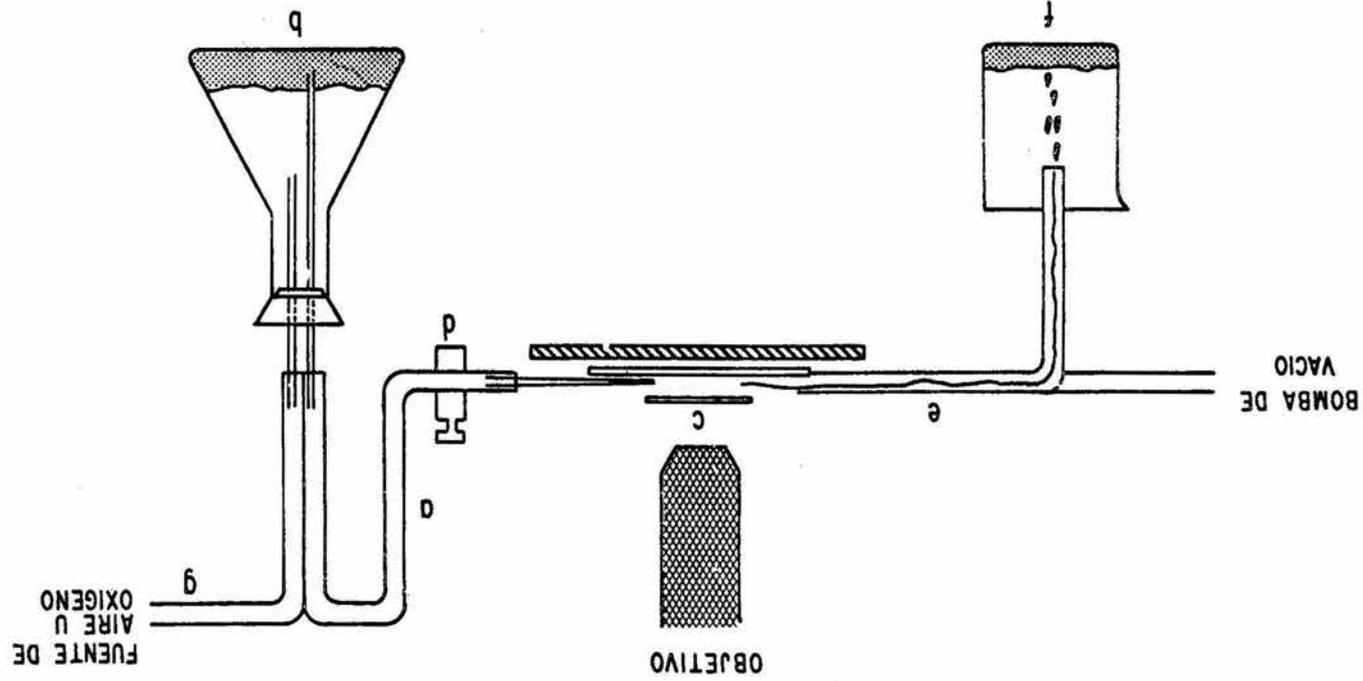


Fig. 3. Video-micrografías del alga *Pleurosigma angulatum*.
Observaciones realizadas con un objetivo 40X, AN= 0.66,
2600X. Bar. 5 micras

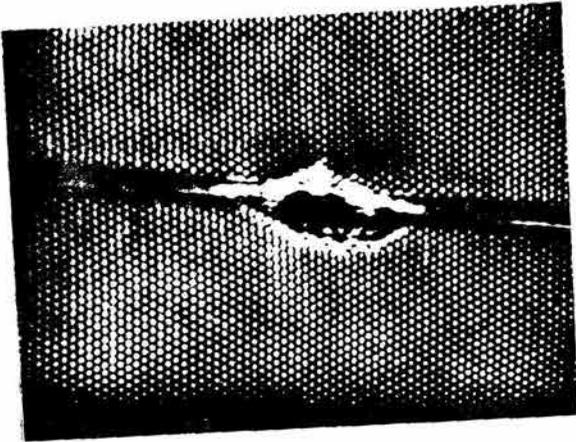
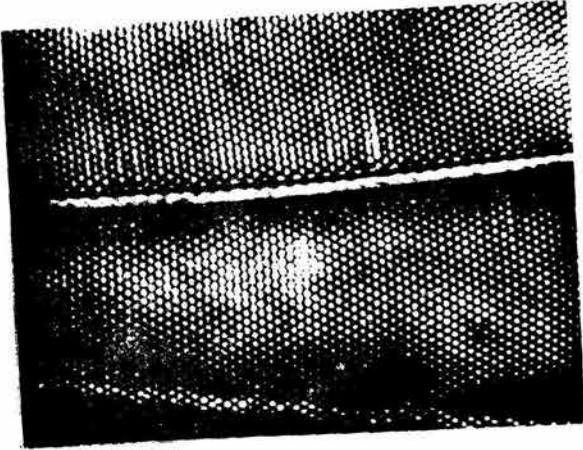


Fig. 4. Video-micrografías de células de epitelio bucal humano. Observaciones realizadas con un objetivo 40X, AN= 0.46, 2800X. Bar. 5 micras en (a). Con un objetivo 100X, AN= 1.25, 6500X. Bar. 2 micras en (b) y (c).

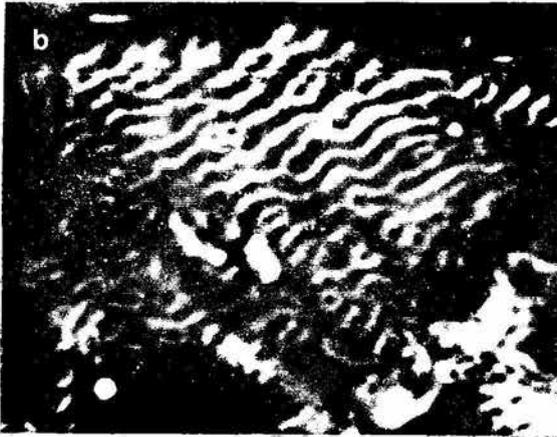
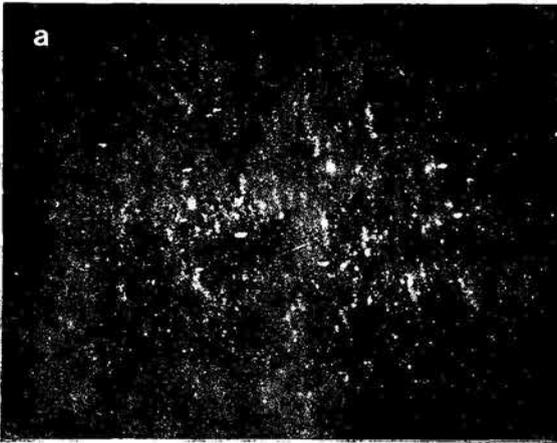


Fig. 5. Secuencias de video-micrografías que ilustran el movimiento de organelos en neuritas de células nerviosas de ave cultivadas *in vitro*. En la secuencia (a)-(e) se muestra como se desplaza un organelo esférico (flecha negra) con respecto a otro organelo esférico estático (flecha blanca) en la más superior de un grupo de neuritas. La secuencia (1)-(3) ilustra como un organelo de forma alargada u oval migra con respecto a un organelo estático de forma esférica en la neurita central de la imagen. Las secuencias (a)-(e) y (1)-(3) se obtuvieron con un objetivo 100X, AN= 1.25, 7500X.



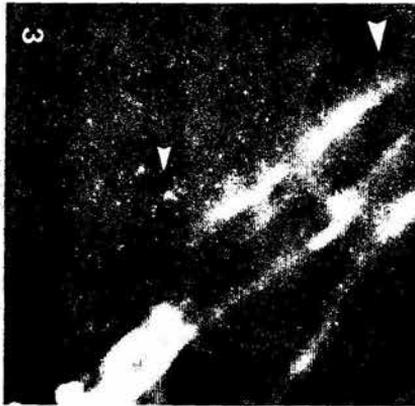
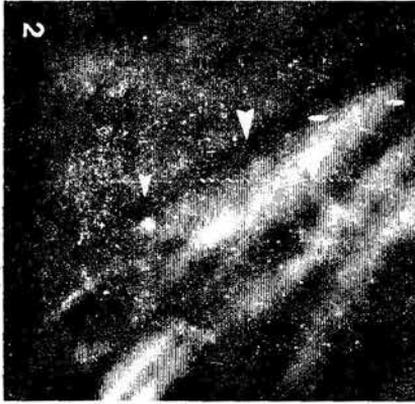


Fig. 6. Tipos, formas y velocidades de partículas migrando internamente en la red de neuritas de células nerviosas de ave cultivadas *in vitro*. Se puede apreciar que no existen diferencias en cuanto al tipo y velocidad de los organelos con respecto a las dos direcciones de flujo, y parece existir una correlación entre tamaño y velocidad de los organelos.

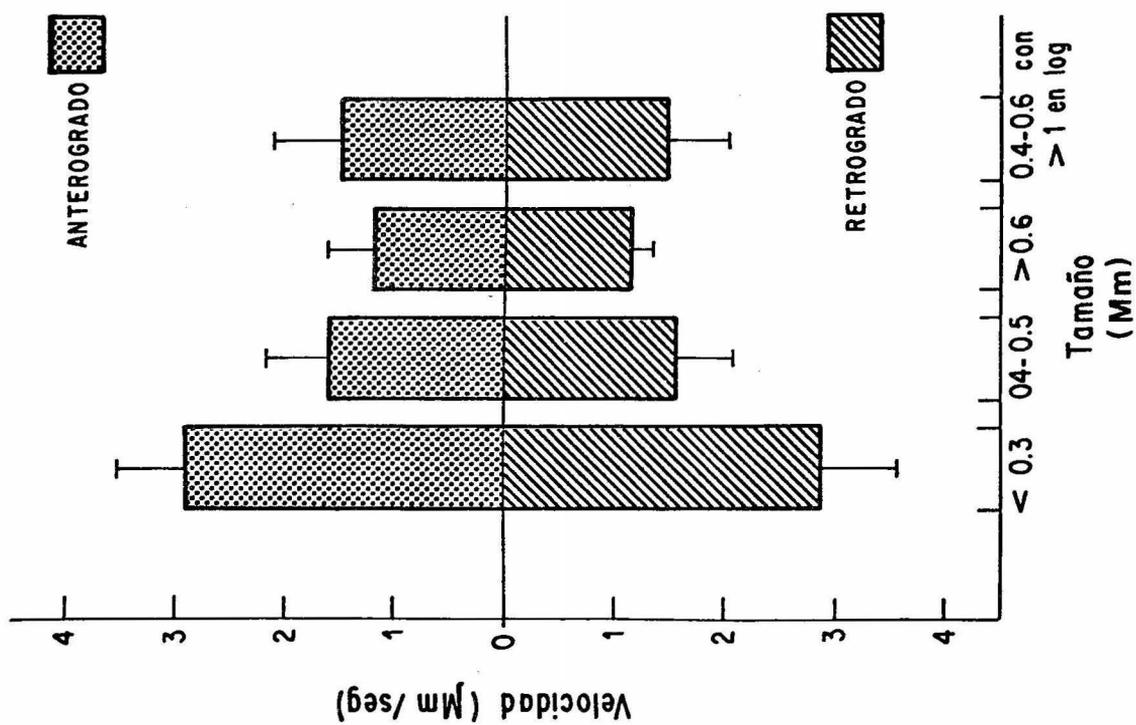


Fig. 7. Distribución del transporte de organelos con respecto a la dirección de flujo en células nerviosas en cultivo. Los datos están expresados en porcentajes del número total de organelos estudiados.

TIPO DE PARTICULA	DIRECCION	
	ANTEROGRA DA	RETROGRADA
CH	7.4	12.6
M	25.8	24.7
G	6.8	9.1
Mt	5.1	8.0
TOTAL	45.3	54.5

Fig. 8. Secuencia de video-micrografías que ilustran el transporte intracelular bidireccional simultáneo en neuronas de ave cultivadas *in vitro*. El lapso total comprendido entre los cuadros (a) y (f) es de 12.5 segundos, de acuerdo a la siguiente cronometría: (a) 0; (b) 1; (c) 1.3; (d) 3; (e) 5; (f) 12.5. La gran estructura alargada que aparece en el campo es una prolongación de una célula nerviosa o neurita de sólo 2.4 micras de ancho, dentro de la que pueden distinguirse varios organelos intracelulares. Hay dos organelos que permanecieron estacionarios durante el periodo de observación; una vesícula o partícula situada cerca del borde inferior en todas las micrografías, y una larga varilla sobre el margen derecho de la neurita, que probablemente representa a uno o dos microtúbulos. Otros tres organelos -dos mitocondrias (flechas blancas) y una vesícula o partícula (flecha negra)- se desplazaron longitudinalmente en sentidos opuestos durante este mismo lapso. Obsérvese como la partícula desciende rápidamente a lo largo de la neurita, y a su paso aparta y deforma a la mitocondria que viaja con menor velocidad en el mismo sentido. Al mismo tiempo, la otra mitocondria migra con relativa lentitud en sentido contrario hasta encontrarse con la partícula descendente. En ambos casos las mitocondrias parecen ceder "derecho de paso" a la partícula, que no se aparta de la vecindad del microtúbulo marginal. Un

segundo microtúbulo, que parece inmóvil en las primeras fases de la secuencia, ha ascendido y se curva ligeramente hacia la izquierda en (f). La secuencia se obtuvo con un objetivo 100X, AN= 1.25, 7500X.

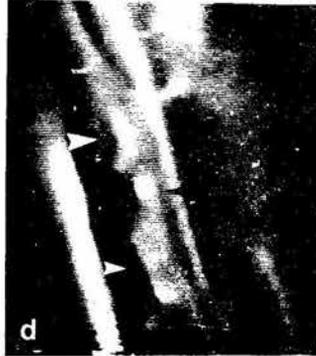
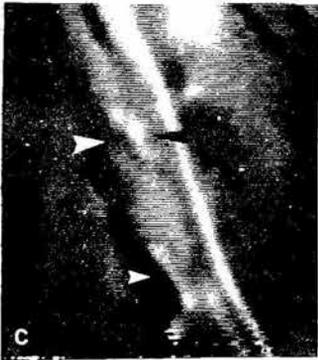
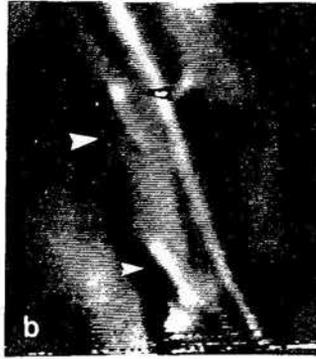


Fig. 9. Tipos de desplazamientos de organelos observados en células nerviosas en cultivo:

a) Movimiento constante. Es un trayecto continuo de partículas, sin que detengan su marcha por una gran distancia.

b) Movimiento de arranque y frenado. Se compone de desplazamientos continuos con etapas de tiempo en que permanecen estáticas.

c) Movimiento de arrepentimiento. Con las características del movimiento anterior, involucrando además cambios en la dirección de flujo.

d) Movimiento dudoso. Leves desplazamientos no muy perceptibles al oscilar las partículas lateralmente.

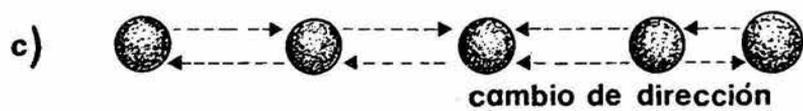
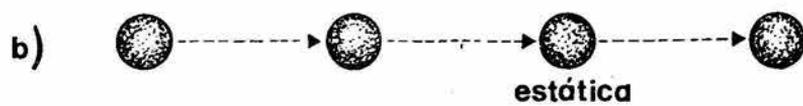
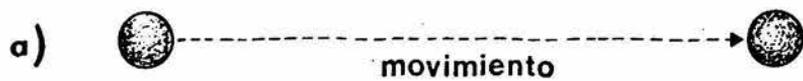


Fig. 10. Efecto de lidocaína sobre el transporte intracelular en neuronas. Podemos apreciar que la lidocaína produce una disminución en el número de organelos que atraviesan por un punto a lo largo de la neurita. Dicho efecto es dependiente de la concentración de fármaco empleada.

Aunque el anestésico se lavó a los cinco minutos, cuando se ensayó a una concentración de 0.1 mM, o a los quince minutos cuando se ensayó a una concentración de 0.01 mM, nunca se obtuvo la recuperación del proceso. La gráfica fue normalizada expresando en porcentaje el número de partículas.

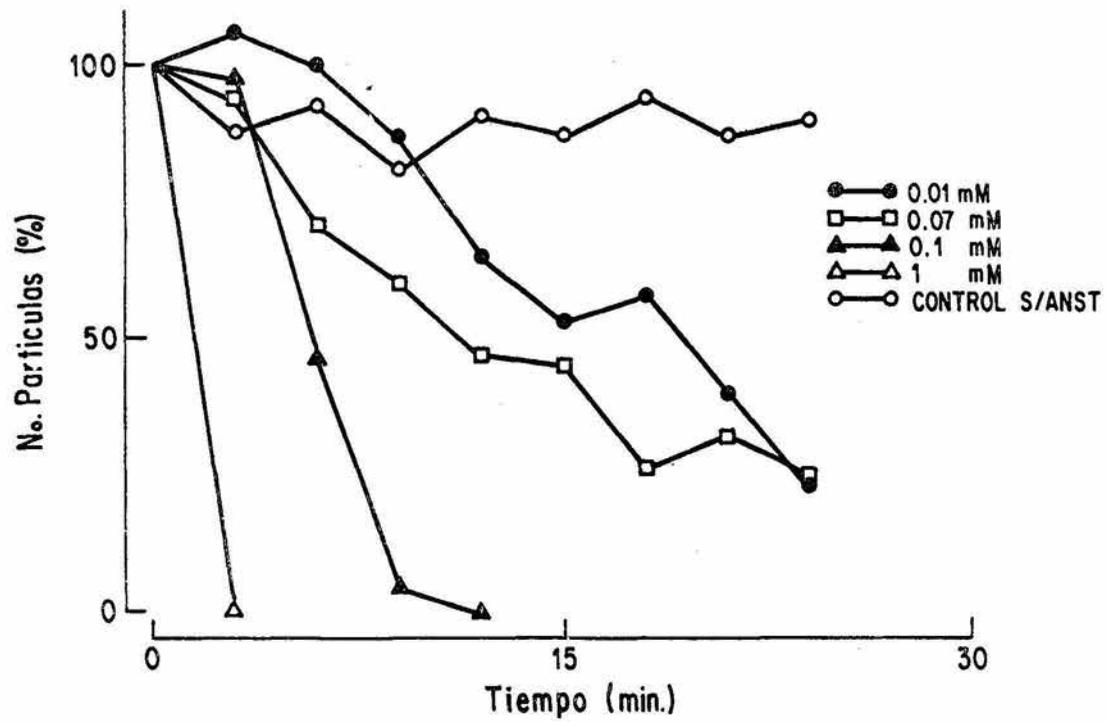


Fig. 11. Efecto de la lidocaína sobre la velocidad de migración de organelos en neuritas en cultivo. Se puede apreciar una disminución en la velocidad de migración de organelos dependiendo de la concentración de fármaco empleada y no existe selectividad en la disminución de la velocidad para los diferentes organelos. Aunque no se muestra en la gráfica, el fenómeno nunca se recuperó al lavar el anestésico.

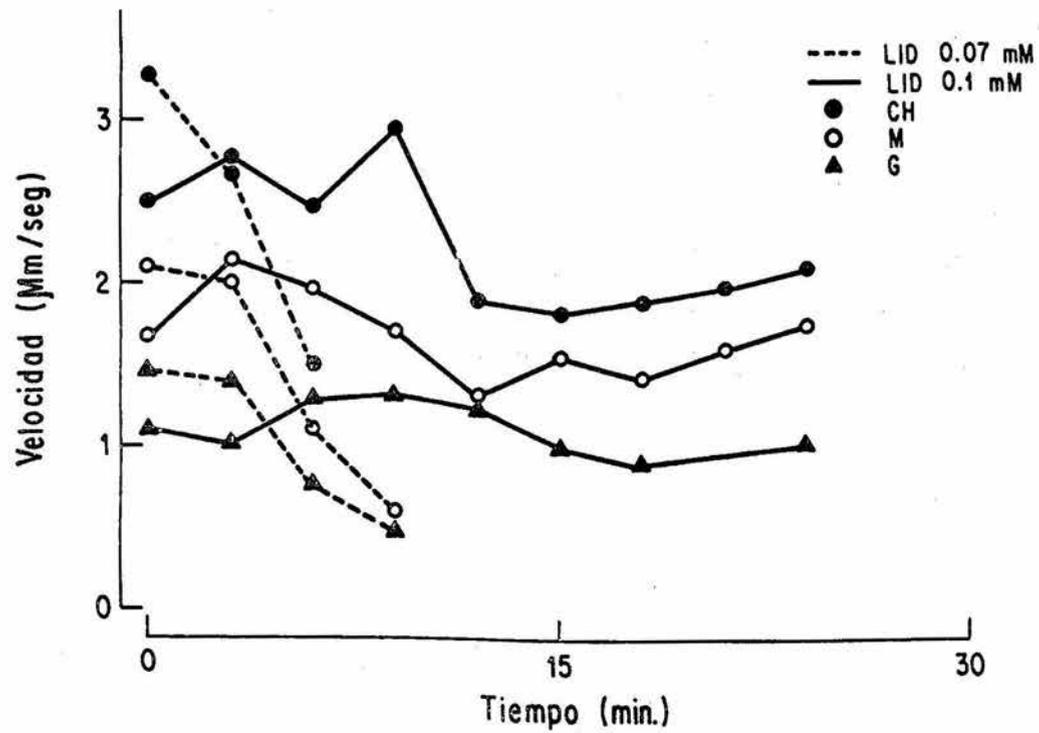


Fig. 12. Filamentos citoplásmicos (flechas) comigrando con cloroplastos en células mesófilas. Observación realizada con un objetivo 20X, AN= 0.5, 1500X.



Fig. 13. Secuencia de video-micrografías donde se pueden apreciar cloroplastos desplazándose sobre la pared celular de células vegetales. La flecha negra señala a un grupo de cloroplastos de diferente tamaño migrando velozmente a lo largo de la pared celular y rebasando a un cloroplasto individual (flecha blanca) que migraba más lentamente en la misma dirección.

La dirección de flujo fue hacia la derecha en la célula inferior, mientras que en la célula superior fue en dirección opuesta. Observaciones realizadas con un objetivo 20X, AN= 0.50, 1500X. Bar. 10 micras en (a), (b) y (c).



Fig. 14. Ubicación de las paredes anticlinales y periclinales en células mesófilas (a) Plano anticlinal; (b) Plano periclinal.

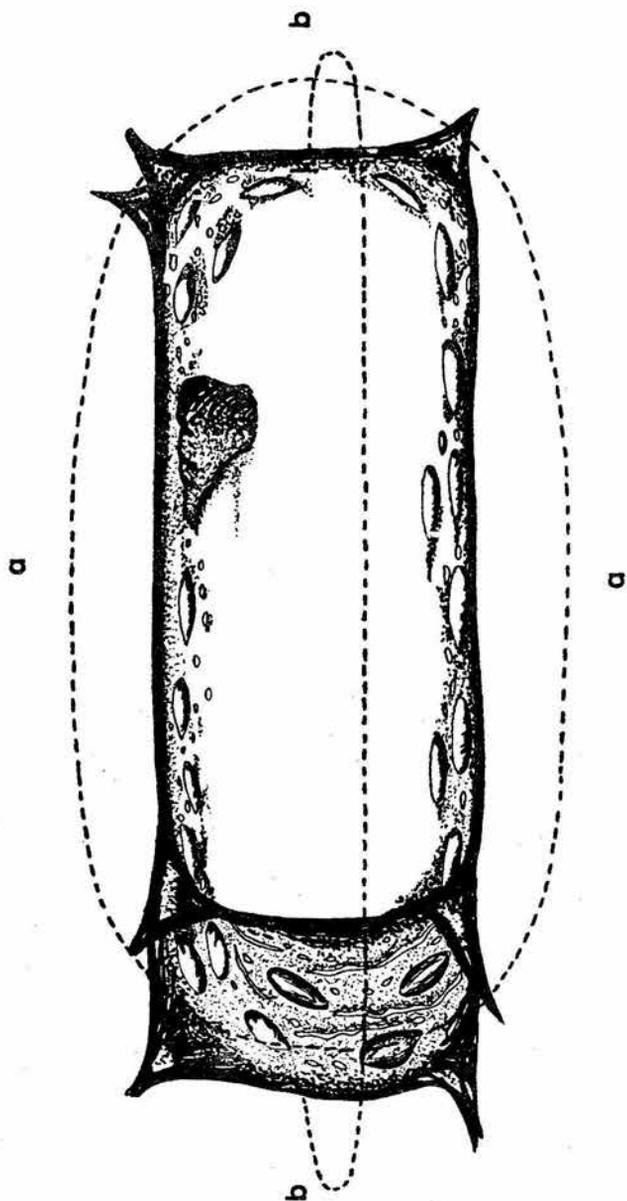


Fig. 15. Efecto de la lidocaína (Chemische Fabrik) sobre la velocidad de migración de cloroplastos. La lidocaína produjo una disminución en la velocidad de migración de cloroplastos dependiendo de la concentración de fármaco empleada. Dicho efecto fue revertido cuando la droga se eliminó del medio de incubación. Cuando se utilizaron concentraciones del fármaco de 3 y 5 mM, dicho efecto fue revertido al eliminar el anestésico a los 15 minutos de haber sido administrado. Si el fármaco no era eliminado de las células el efecto no se revertía. Concentraciones más elevadas del anestésico (10 y 20 mM) inhibían por completo la migración de cloroplastos, sin que se revirtiera este efecto al ser eliminada la droga del medio de incubación.

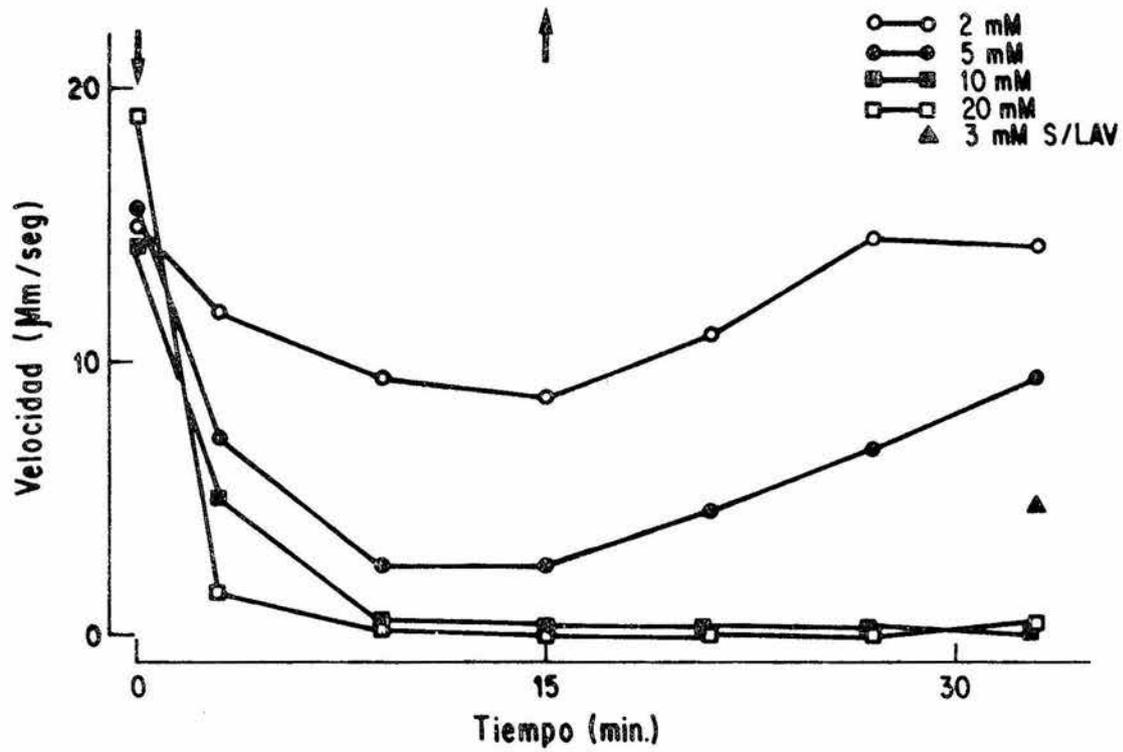


Fig. 16. Efecto de la lidocaína (Astra chemicals) sobre la velocidad de migración de cloroplastos. Se puede observar un patrón de inhibición similar al producido por el anestésico proveniente de Chemische Fabrik, con la recuperación de la velocidad inicial casi por completo al ser lavada la droga. Sin embargo, la lidocaína de Chemische Fabrik parece producir el efecto a concentraciones más bajas que el anestésico de Astra Chemicals.

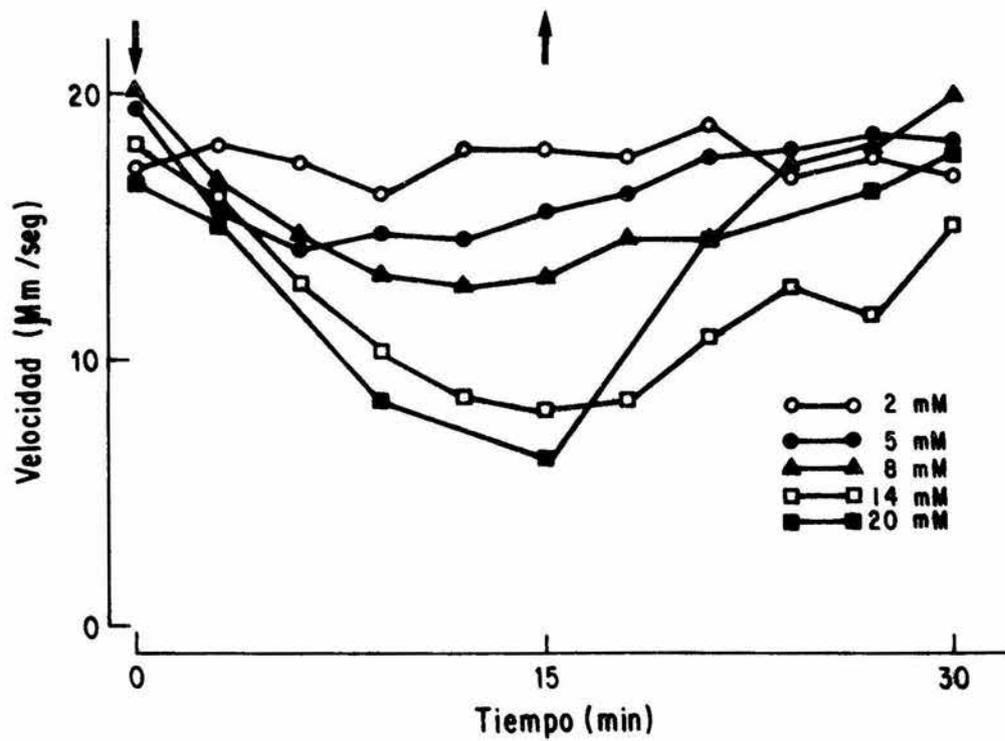


Fig. 17. Efecto de la lidocaína (Astra Chemicals) sobre la velocidad de migración de cloroplastos bajo diversas condiciones iónicas en el medio de incubación. La variación en la composición iónica no introdujo modificaciones en el patrón normal de inhibición del proceso, sin embargo durante el periodo de recuperación de éste cuando fue lavada la droga, se puede observar cierto enlentecimiento, aunque la velocidad parece alcanzar sus niveles normales de flujo con el paso del tiempo.

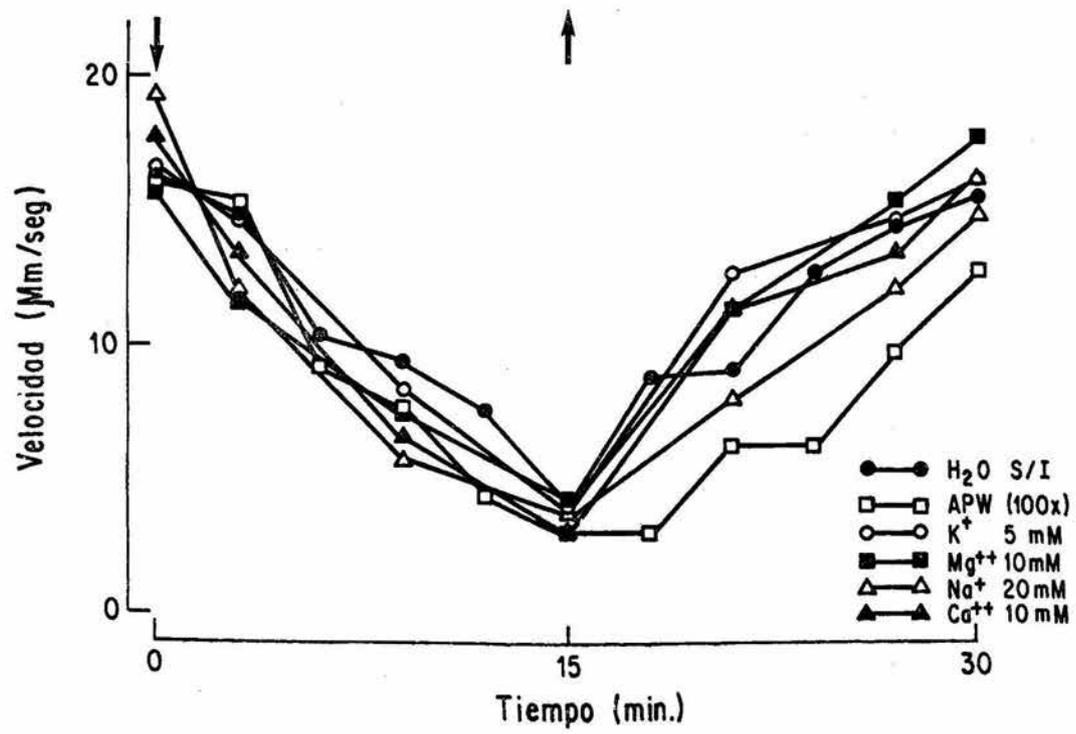


Fig. 18. Efecto del pH y medios de diversa composición iónica sobre la velocidad de migración de cloroplastos. La velocidad de migración parece no ser afectada por cambios de pH y por variaciones de la fuerza iónica y osmótica en el medio de incubación, al menos durante casi 30 minutos de tratamiento bajo estas condiciones.

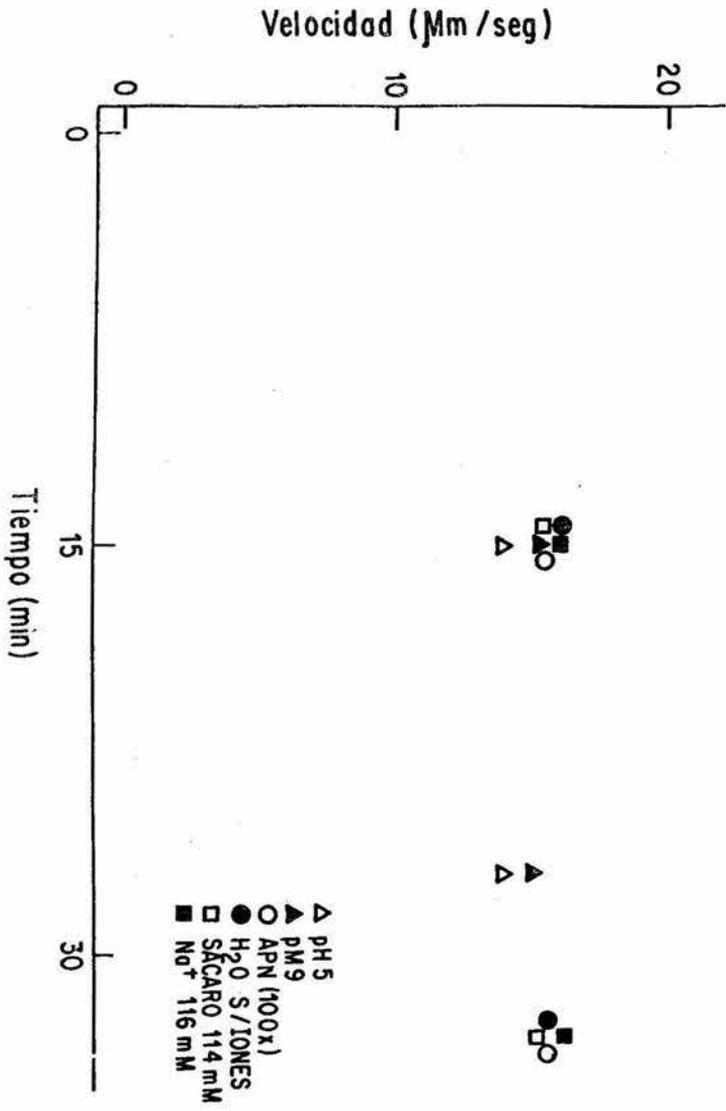


Fig. 19. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de migración de cloroplastos. Variaciones de 10° C por encima y por debajo de la temperatura normal disminuyeron la velocidad de migración e inhibieron el proceso de transporte por completo al prolongarse por casi 30 minutos la incubación de las células bajo estas condiciones. Al regresar a la temperatura normal 30 minutos después del tratamiento, es imposible reestablecer el fenómeno.

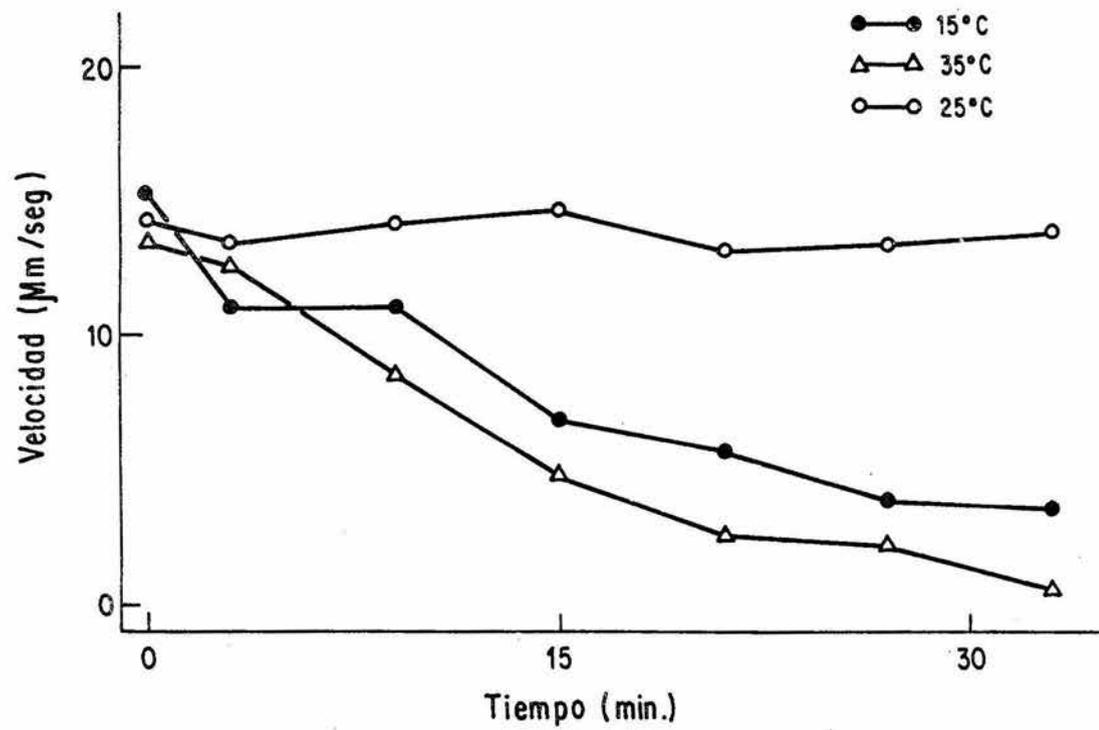


TABLA I. Composición iónica de la solución Hanks para células nerviosas.

COMPUESTO	CONCENTRACION (%)
NaCl	0.8
KCl	0.04
CaCl ₂	0.014
MgSO ₄	0.01
MgCl ₂	0.01
Na ₂ HPO ₄	0.006
KH ₂ PO ₄	0.006
GLUCOSA	0.1
ROJO DE FENOL	0.002
NaHCO ₃	0.035

* ajustando a pH 7.2-7.4 la solución final

TABLA II. Composición iónica del medio APW para células vegetales.

COMPUESTO	CONCENTRACION (mM)
KCl	0.05
NaCl	0.2
Ca(NO ₃) ₂	0.1
Mg(NO ₃) ₂	0.1
TRIS-MALEATO	0.02

* ajustando a pH 7 la solución final

TABLA III. Concentraciones de lidocaína ensayadas en
 solución Hanks de células nerviosas

COMPUESTO	CONCENTRACION (%)			
	*SOL 1	*SOL 2	*SOL 3	*SOL 4
NaCl	0.8	"	"	"
KCl	0.04	"	"	"
CaCl ₂	0.014	"	"	"
MgSO ₄	0.01	"	"	"
MgCl ₂	0.01	"	"	"
NaHPO ₄	0.006	"	"	"
KH ₂ PO ₄	0.006	"	"	"
GLUCOSA	0.1	"	"	"
ROJO DE FENDL	0.002	"	"	"
NaHCO ₃	0.035	"	"	"
LIDOCAINA	°0.01	°0.07	°0.1	°1

* ajustando a pH 7.2-7.4

° concentración milimolar

IV. Concentraciones de lidocaína ensayadas en medio APW de células vegetales.

ANESTESICO DISUELTO EN MEDIO APW

CONCENTRACION (mM)

SOLUCIONES CON LIDOCAINA

DE ASTRA CHEMICALS	2	5	8	14	20
--------------------	---	---	---	----	----

SOLUCIONES CON LIDOCAINA

DE CHEMISCHE FABRIK	2	5	10	20
---------------------	---	---	----	----

TABLA V. Ensayo de lidocaína aumentando (100X) las concentraciones iónicas del medio APW en forma individual.

COMPUESTO	CONCENTRACION (mM)			
	*SDL 1	*SDL 2	*SDL 3	*SDL 4
KCl	5	r	-	-
NaCl	-	20	-	-
Ca (NO ₃) ₂	-	-	10	-
Mg (NO ₃) ₂	-	-	-	10
TRIS-MALEATO	0.02	0.02	0.02	0.02
LIDOCAINA	20	20	20	20

* ajustando a pH 7

TABLA VI. Ensayo de lidocaína aumentando las concentraciones iónicas del medio APW en forma general (SOL 1) y excluyendo por completo los iones existentes (SOL 2).

COMPUESTO	CONCENTRACION (mM)	
	*SOL 1	*SOL 2
KCl	5	-
NaCl	20	-
Ca (NO ₃) ₂	10	-
Mg (NO ₃) ₂	10	-
TRIS-MALEATO	0.02	-
LIDOCAINA	20	20

* ajustando a pH 7

TABLA VII. Ensayo de soluciones de diferente fuerza iónica
y osmótica

ELEVADA FUERZA IONICA Y OSMOTICA					
*SOL 1		*SOL 2		*SOL 3	
Medio APW (100X)		SACAROSA	114 mM	NaCl	116 mM
KCl	5 mM	TRIS- MALEATO	0.02 mM	TRIS- MALEATO	0.02 mM
NaCl	20 mM				
Ca(NO ₃) ₂	10 mM				
Mg(NO ₃) ₂	10 mM				
TRIS- MALEATO	0.02 mM				

REDUCIDA FUERZA IONICA Y OSMOTICA

SOL 4

AGUA DESIONIZADA

* ajustando a pH 7

TABLA VIII. Variación del pH en el medio APW de células vegetales.

COMPUESTO	CONCENTRACION (mM)	
	SOL 1 (pH 5)	SOL 2 (pH 9)
KCl	0.05	0.05
NaCl	0.2	0.2
Ca(NO ₃) ₂	0.1	0.1
Mg(NO ₃) ₂	0.1	0.1
BUFFER DE MALEATO	11.4	-
BUFFER DE TRIS	-	11

BIBLIOGRAFIA

- Adams R.J. (1982). Organelle movement in axons depends on ATP. *Nature* 297: 327-329.
- Adams R.J., Bray D. (1983). Rapid transport of foreign particles microinjected into crab axons. *Nature* 303: 5919, 718-720.
- Aesheim G., Raymond B., Middaugh B.A. (1974). Inhibition of rapid axoplasmic transport by procaine hydrochloride. *Anesthesiology* 41: 549-553.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robert K., Watson J. (1983). *Molecular biology of the cell*. Cap. 18 y 19. Garland Publishing. Nueva York.
- Allen N.S. (1981). Filamentous networks and particle movements in some plant cells. *J Cell Biol* 302a.
- Allen N.S. (1983). Cytoplasmic streaming in plant cells and its relation to the cytoskeleton. En Earnshaw J.C. and Steer M.W. (eds): "The application of laser light scattering to the study of biological motion". Nueva York: Plenum. 529-543.
- Allen N.S., Allen R.D. (1978). Cytoplasmic streaming in green plants. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 497-526.

- Allen N.S., Brown D.T. (1988). Dynamics of the endoplasmic reticulum in living onion epidermal cells in relation to microbules, microfilaments, and intracellular particle movement. *Cell Motility and the cytoskeleton* 10: 153-163.
- Allen R.D., Allen N.S. (1983). Video-enhanced microscopy with a computer frame memory. *J Microscopy* 129: 3-18.
- Allen R.D., Allen N.S., Travis J.L. (1981a). Video-enhanced contrast differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil* 1: 291-302.
- Allen R.D., Travis J.S., Allen N.S., Yilmaz M. (1981b). Video-enhanced contrast polarization (AVEC-PoL) microscopy: A new applied to the detection of birefringence in the motile reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil* 1: 275-289.
- Allen R.D., Weiss D.G., Hayden J.H., Brown D.T., Fujiwake H., Simpson M. (1985). Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: Evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J Cell Biol* 100: 1736-1752.
- Bradley E.G. (1973). Microfilaments and cytoplasmic streaming: Inhibition of streaming with cytochalasin. *J Cell Sci* 12: 327-343.

- Brady S.T.,Lasek R.J.,Allen R.D. (1985). Video microscopy of fast axonal transport in extruded axoplasm: A new model for study of molecular mechanism. *Cell Motility* 5: 81-102.
- Brady S.T.,Lasek R.J.,Allen R.D.,Yin M.L.,Stossel T.P. (1984). Gelsolin inhibition of fast axonal transport indicates a requirement for actin microfilaments. *Nature* 310: 56-58.
- Breuer A.C., Atkinson M.B. (1988). Fast axonal transport alterations in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and in parathyroid hormone (PTH)-treated axons. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 10: 321-330.
- Breuer A.C.,Christian C.N.,Menkart M.,Nelson P.G. (1975). Computer analysis of organelle translocation in primary neuronal cultures and continuous cell lines. *J Cell Biol* 65: 562-576.
- Byer R.M.,Fink.,Kennedy R.D.,Middaugh M.E.,Hendrichson A.E. (1973). Effects of lidocaine on axonal morphology, microtubules and rapid transport in rabbit vagus nerve in vitro. *J of Neurobiol* 4: 2, 125-143.
- Chan S.Y.,ochs S.,Worth R.M. (1980). The requirement for calcium ions and the effect of other ions on axoplasmic transport in mammalian nerve. *J Physiol (london)* 301: 477-504.

- Chen J.C., Kamiya N. (1975). Localization of miosin in the internodal cell of *Nitella* as suggested by differential treatment with N-Ethylmaleimide. *Cell Struct Funct* 1: 1-9.
- Cooper P.D., Smith R.S. (1974). The movement of optically detectable organelles in myelinated axons of *Xenopus laevis*. *J Physiol* 242: 77-97.
- Dazy A.C., Neubrun M.D., Sauron M.E. (1981). Evidence for actin in the marine alga *Acetabularia mediterranea*. *Biol Cell* 41: 235-238.
- De Jong R.H. (1977). Local anesthetics. Charles C. Thomas. E.U.
- Dvorak J.A., Miller L.M., Whitehouse W.C., Shiroishi T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 187: 748-750.
- Dyson R.D. (1978). Cell Biology. Cap. 9. Allyn and Bacon, Inc. E.U.
- Edstrom A., Hansson H.A., Norstrom A. (1973). Inhibition of axonal transport *in vitro* in frog sciatic nerves by chlorpromazine and lidocaine. *Z-Zellforsch.* 143: 53-69.
- Ekstrom P., Kanje M., Edstrom A. (1982). Effects of phenothiazines and dibenzazepines on axonal transport and microtubule assembly *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.* 116: 121-125.

- Escudero B., Gutierrez-Merino C. (1987). Effects of local anesthetics on the passive permeability of sarcoplasmic reticulum vesicles to Ca^{++} y Mg^{++} . *Biochimica et Biophysica Acta* 902: 374-384.
- Feinstein M.P. (1961). Reaction of local anesthetics with phospholipids. *J Gen Physiol* 48: 357-374.
- Fink B.R., Kennedy R.D., Hendrickson A.E., Hiddaugh M.E. (1972). Lidocaine inhibition of rapid axonal transport. *Anesthesiology* 36: 13-20.
- Fink B.R., Kish S.J. (1976). Reversible inhibition of rapid axonal transport *in vivo* by lidocaine hydrochloride. *Anesthesiology* 44: 139-146.
- Flory L.E. (1951). The television microscope. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 16: 505-509.
- Forman D.S. (1982a). Microscopic methods for the observation of axonal transport in living axons. In *axoplasmic transport*. Weiss D.G., Berlin. 424-240.
- Forman D.S. (1982b). Saltatory organelle movement and the mechanism of fast axonal transport. In *Axoplasmic transport*. Weiss D.G., Berlin. 234-240.

- Forman D.S., Padjen A.L., Siggins G.R. (1977). Effect of temperature on the rapid retrograde transport of microscopically visible intraxonal organelles. *Brain Res* 136: 215-226.
- Frixione E., Mena R. (1986). Motilidad. En temas selectos de biología celular. SEP/CoSNET/CINVESTAV. México.
- Gilkey J.C., Jaffe L.F., Ridgway E.B., Reynolds G.T. (1978). A free calcium wave traverses the activating egg of medaka, *oryzias latipes*. *J Cell Biol* 75: 448-466.
- Goldberg D.J., Burmeister D.W. (1986). Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using Video-enhanced Contrast-Differential Interference Contrast Microscopy. *J Cell Biol* 103: 1921-1931.
- Hammond G.R. (1977). The movement of optically detectable particles in intact myelinated axons. *J Physiol (London)* 269: 74-76.
- Hammond G.R., Smith R.S. (1977). Inhibition of the rapid movement of optically detectable axonal particles by colchicine and vinblastine. *Brain Res* 128: 277-242.
- Haupt W. (1982). Light-mediated movement of chloroplast. *Ann. Rev. Plant Physiol* 33: 205-233.

- Hecht E. (1976). Difracción, en optica. McGraw Hill, México.
159-190.
- Hirokawa N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. J Cell Biol 94: 129-142.
- Hollenbeck P.J., Bray D. (1987) Rapidly transported organelles containing membrane and cytoskeletal components: Their relation to axonal growth. J Cell Biol 105: 2827-2835.
- Inoué S. (1981). Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization based microscopy. J Cell Biol 89: 346-356.
- Ishigami M., Nagai R. (1980). Motile apparatus in *Vallisneria* leaf cells II. Effects of citochalasin B an lead acetate on the rate and direction of streaming. Cell Struct Funct 3:13-20.
- Kachar B. (1985a). Direct visualization of organelle movements along actin filaments dissociated from *Characean* algae. Science 227: 1355-1357.
- Kachar B. (1985b). Asymmetric ilumination contrast: a method of image formation for video light microscopy. Science 227:

Kersey Y.M., Hepler P.K., Palevitz B.A., Wessels N.K. (1976).

Polarity of actin filaments in characean algae. Proc Nat Acad Sci (USA) 73: 165-167.

Kessel R.G., Kardon R.H. (1979). Tissues and organs: a text-atlas of scanning electron microscopy. W.H. Freeman and company. San Fco. E.U..

Kikuyama M., Tazawa M. (1982). Ca²⁺ ion reversibly inhibits the cytoplasmic streaming of *Nitella*. Protoplasma 113: 241-243.

Kurebayashi N., Ogawa Y., Harafuji M (1982). Effect of local anesthetics on calcium activated ATPase and its partial reaction with fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog and rabbit skeletal muscle. J Biochem 92: 915-920.

Lavoie P.A. (1982). Inhibition of fast axonal transport *in vitro* by tetracaine: an increase in potency at alkaline pH, and no change in potency in calcium-depleted nervs. Can J Physiol 60 : 1715-1720.

Lavoie P.A. (1982b). Block of fast axonal transport *in vitro* by local anesthetics dibucaine and etidocaine. J Pharm Exp Ther 223: 251.

Lavoie P.A. (1987). Penfluridol, Chlorprothixene, and haloperidol block fast axonal transport in an order of potency consistent

with a mechanism related to inhibition of calmodulin.

Neuropharmacology 26: 9, 1359-1365.

Miller R.M., Lasek R.J. (1985). Cross-bridges mediate anterograde and retrograde vesicle transport along microtubules in squid axoplasm. J Cell Biol 101: 2181-2193.

Mondragón S. (1986). Efecto y posible mecanismo de acción de la lidocaína sobre la migración de organelos en células retinales durante la adaptación a la luz y a la oscuridad. Tesis de licenciatura. 91 pags. FESC UNAM.

Montgomery F. o., Roberts F., Bonner W. (1956). The flying spot monochromatic ultra-violet television microscope. Nature 177: 1172.

Nagai R., Fukui S. (1981). Differential treatment of *Acetabularia* with cytochalasin B and N-ethylmaleimide with special reference to their effects on cytoplasmic streaming. Protoplasma 109: 79-89.

Nagai R., Hayama T. (1979a). Ultrastructure of the endoplasmic factor responsible for cytoplasmic streaming in *Chara* internodal cells. J Cell Sci 36: 121-136.

Nagai R., Rebhun L.I. (1966). Cytoplasmic microfilaments in streaming *Nitzschia* cells. J Ultrastruct Res 14: 571-589.

- ochs S. (1974). Energy metabolism and supply of P to the fast axoplasmic transport mechanism in nerve. *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 33: 1049-1058.
- ochs S., Hollingsworth D. (1971). Dependence of fast axoplasmic transport in nerve on oxidative metabolism. *J Neurochem* 18: 107-114.
- ohsuka K., Inoue A. (1979). Identification of myosin in a flowering plant, *Egeria densa*. *J Biochem* 85: 375-378.
- Palevitz B.A., Hepler P.K. (1974). Actin in the green alga *Nitella*. *Proc Natn Acad Sci USA* 71, 363-366.
- Palevitz B.A., Hepler P.K. (1975). Identification of actin *in situ* at the ectoplasm-endoplasm interface of *Nitella*. Microfilament-chloroplast association. *J Cell Biol.* 65: 29-38.
- Parpat A.K. (1951). Televised microscopy in biological research. *Science* 113: 483-484.
- Reynolds G.T. (1972). Image intensification applied to biological problems. *Q. Rev. Biophys.* 5: 295-347.
- Seelig A. (1987). Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 899: 196-204.

- Schnapp B.J., Gelles J., Sheetz M.P. (1988). Nanometer-scale measurements using video light microscopy. *Cell Motility and the cytoskeleton* 10: 47-53.
- Schnapp B.J., Reese T.S. (1982). Cytoplasmic structure in rapid-frozen axons. *J Cell Biol* 94: 667-679.
- Schnapp B.J., Vale R.D., Sheetz M.P. (1985). Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40: 455-462.
- Schroer T.A., Brady S.T., Kelly R.B. (1985). Fast axonal transport of foreign synaptic vesicles in squid axoplasm. *J Cell Biol* 101: 568-572.
- Smith R.S. (1980). The short term accumulation of axonally transported organelles in the region of localized lesions of single myelinated axons. *J Neurocytol* 9: 39-65.
- Stebbing M., Hyams J.S. (1979). *Cell Motility*. Longman. New York.
- Suko J., Winkler F., Scharinger B., Hellmann G. (1976). Aspects of the mechanism of action of local anesthetics on the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 443: 571-586.
- Takagi S.R., Nagai R. (1983). Regulation of cytoplasmic streaming in *Vallisneria spiralis* cells. *J Cell Sci* 62: 385-405.

- Takagi S.R., Nagai R. (1985). Light-controlled cytoplasmic streaming in *Vallisneria* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 26 (5): 941-951.
- Takagi S.R., Nagai R. (1986). Intracellular Ca^{2+} concentration and cytoplasmic streaming in *Vallisneria* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol* 27 (6): 953-959.
- Tiberi M., Lavoie P.A. (1984). Inhibition of the retrograde axonal transport of acetylcholinesterase by the anti-calmodulin agents amitriptyline and Desipramine. *J of Neurobiol* 16: 3, 245-248.
- Tsukita S., Ishikawa M. (1980). The movement of membranous organelles in axon: electron microscopic identification of anterogradely and retrogradely transported organelles. *J Cell Biol* 84: 513-530.
- Vale R.D., Schnapp B.J., Mitchison T., Steuer E., Reese T.S., Sheetz M.P. (1985a). Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules *in vitro*. *Cell* 43: 623-632.
- Vale R.D., Schnapp B.J., Reese T.S., Sheetz M.P. (1985b). Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. *Cell* 40: 449-454.

Vale R.D., Schnapp B.J., Reese S.T., Sheetz M.P. (1985c). organelle, bead and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 40: 559-569.

Vale R.D., Szent-Gyorgy A.G., Sheetz M.P. (1984). Movement of scallop myosin on *Nitella* actin filaments: regulation by calcium. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 81: 6775-6778.

Williamson R.E. (1972). A light microscope study of the action of cytochalasin B on the cells and isolated cytoplasm of the characeae. *J Cell Sci* 10: 811-819.

Williamson R.E. (1974). Actin in the alga, *Chara corallina*. *Nature, Lond* 248: 801-802.

Yamaguchi Y., Nagai R. (1981). Motile apparatus in *Vallisneria* leaf cells I. organization of microfilaments. *J Cell Sci* 48: 193-205.

Zworykin V.K. (1933). Description of an experimental television system and the kinescope. *Proc. IRE* 21: 1655-1673.