

56
2e;



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE DIFERENTES ALCOHOLES DE CADENA
LARGA SOBRE LA RESPUESTA A LA LUZ DEL
FOTORRECEPTOR VISUAL DEL ACOCIL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ARACELI ERAZO MANZANO



Ciudad Universitaria

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCION	1
1.1 Organización estructural del tallo ocular	1
1.2 Registro de la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales del acoll	6
1.3 Uniones comunicantes	8
1.4 Regulación de las uniones comunicantes	13
1.5 Papel de algunos alcoholes de cadena larga (heptanol y octanol) sobre las uniones comunicantes	15
2. OBJETIVO	18
3. HIPOTESIS	18
4. MATERIAL Y METODOS	19
5. RESULTADOS	27
5.1 Experimentos extracelulares	27
5.1.1 Experimentos testigo del electrorretinograma (ERG)	29
5.1.2 Efecto del propanol sobre el ERG	33
5.1.3 Efecto del pentanol sobre el ERG	35
5.1.4 Efecto del hexanol sobre el ERG	37
5.1.5 Efecto del heptanol sobre el ERG	39
5.2 Experimentos intracelulares	41
5.2.1 Experimentos testigo del potencial de receptor (PR)	41
5.2.2 Efecto del propanol sobre el PR	44
5.2.3 Efecto del pentanol sobre el PR	48
5.2.4 Efecto del hexanol sobre el PR	50
5.2.5 Efecto del heptanol sobre el PR	52
6. DISCUSION	54
6.1 Efecto de los alcoholes de cadena larga sobre el ERG	56
6.2 Efecto de los alcoholes de cadena larga sobre el PR	59
7. BIBLIOGRAFIA	64

RESUMEN

La unidad funcional del ojo compuesto es la omatidia, estructura integrada por los distintos elementos que tienen a su cargo los mecanismos inherentes al proceso visual. La fototransducción, en particular, se lleva a cabo en el rabdómero el que está formado por la fusión de los rabdómeros de 7 de las 8 células retinulares que forman parte de una misma unidad. Desde hace más de dos décadas se ha propuesto que en el acocil, las células retinulares no sólo comparten el rabdómero sino que además están acopladas eléctricamente por medio de uniones comunicantes. Por razones de carácter técnico, esta proposición suscitó una fuerte controversia la que ha quedado, hasta ahora sin dirimir.

En años recientes se ha acumulado evidencia experimental a favor de que algunos alcoholes de cadena larga, el heptanol y el octanol, por ejemplo, desacoplan las uniones comunicantes en forma relativamente específica. En el presente trabajo se retomó el problema del posible acoplamiento eléctrico entre las células retinulares, el que se abordó por medio de la aplicación de alcanoles, entre ellos el hexanol y el heptanol, a tallos oculares seccionados de acocil de los cuales se registró en forma extracelular o intracelular la respuesta eléctrica a la luz. Los resultados obtenidos con el hexanol y con el heptanol, apoyan la proposición de que entre las células retinulares de una misma omatidia existe acoplamiento eléctrico.

1. INTRODUCCION

1.1 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL TALLO OCULAR.

El sistema visual del acocil se localiza en los tallos oculares pedunculados situados en ambos lados del rostro. Los tallos oculares son móviles y el ojo propiamente dicho se encuentra en el extremo distal del tallo; por abajo del ojo se encuentran diferentes neuropilos que conforman los lóbulos ópticos así como componentes del sistema neuroendocrino (Figura 1).

En los crustáceos se encuentran dos tipos de organización del sistema visual: el de ojos en los que el sistema dióptrico está formado por múltiples omatidias con rabdomos cortos, lo que permite que se formen en la retinula muchas imágenes que se superponen (ojos por superposición), y el que tiene ojos en los que las omatidias tienen rabdomos largos y la imagen se forma sólo en un punto de la retinula (ojos por aposición).

El ojo del acocil es un ojo compuesto que aunque funciona principalmente por superposición también puede funcionar por aposición cuando está totalmente adaptado a la luz. El ojo está formado por unidades visuales u omatidias, cada una de las cuales está formada, a su vez, por un sistema dióptrico, un sistema fotorreceptor y un sistema parareceptor.

El sistema dióptrico (Figura 2) lo constituyen la córnea y el cono cristalino. La córnea que es una versión transparente de la cutícula general del cuerpo, forma el límite óptico con el medio circundante, aire o agua por un lado y por el otro con el cono cristalino. Por lo general las omatidias se ven sobre la superficie del ojo como placas corneales repetidas, aunque en algunos ojos no hay una clara división entre ellas. El cono cristalino forma la unión entre la córnea y las células fotorreceptoras. Es una estructura acuosa transparente y puede estar directamente sobre el rabdomo fotosensible o estar conectado a las células fotorreceptoras por medio de extensiones citoplásmicas provenientes de las cuatro células que lo forman, dando lugar a una raíz que queda rodeada por las células

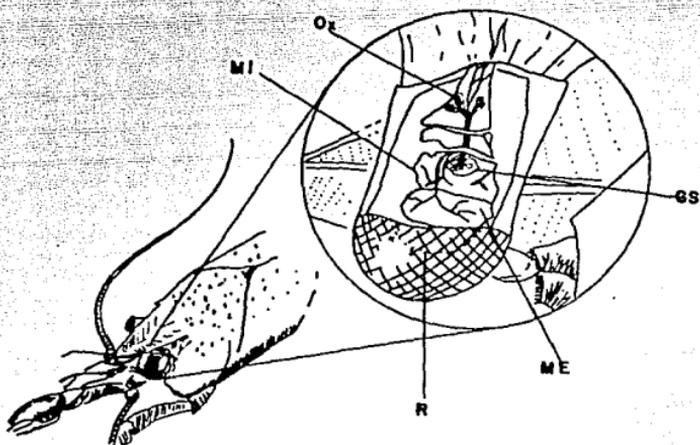


Figura 1. Localización de los neuropilos del lóbulo óptico y del sistema Órgano X-glándula sinusal en un ojo de acocil. R, retina (no se observa en el dibujo pero se encuentra aproximadamente en la región señalada con la línea punteada); ME, médula externa; GS, glándula sinusal; Ox, Órgano X; MI, médula interna. (Redibujado de Cooke y Sullivan, 1982).

retinulares.

El sistema fotorreceptor está formado por ocho células retinulares alargadas que forman una capa, la cual se encuentra 0.5 mm aproximadamente por debajo de la superficie corneal.

De las ocho células retinulares, siete presentan un arreglo cilíndrico alrededor del rabdomo el cual es una extensión de la superficie membranal (microvellosidades) de los fotorreceptores o células retinulares. En cada omatidia las microvellosidades de las siete células que forman el rabdomo se alternan y se orientan de manera ortogonal, es decir, tres células tienen sus microvellosidades orientadas en una dirección y las cuatro restantes están dispuestas de manera perpendicular a las primeras (ver Figura 2). La octava célula retinular es redonda y se encuentra separada de las demás, su tamaño es menor y sus microvellosidades no forman parte propiamente del rabdomo ya que se encuentra por encima de éste, aunque tiene un rabdómero pequeño que cubre la mayor parte de la estructura (Shaw y Stowe, 1982).

Después de pasar a través de la córnea y el cono cristalino, la luz es absorbida por el rabdomo. Hay evidencia de que es ahí justamente donde se localiza el pigmento fotosensible, que forma parte de las membranas de las microvellosidades y donde se lleva a cabo el proceso de la fototransducción.

La terminación inferior de la omatidia corresponde a la membrana basal que es el sitio donde se generan los paquetes de axones que proceden de las células retinulares y constituyen el nervio óptico (Shaw y Stowe, 1982).

El sistema pararreceptor lo forman estructuras anexas a los fotorreceptores que influyen sobre la llegada de luz a éstos. Las más importantes de estas estructuras son las células del pigmento distal que rodean al cono cristalino (Parker, 1891; 1897), el pigmento proximal contenido en las células retinulares y el pigmento reflector que se encuentra a la altura de la membrana basal (Hernández, 1984). La posición de los pigmentos distal y proximal depende de la cantidad y la calidad de iluminación que reciba el ojo (Loockwood, 1968), de tal manera que cuando éste es iluminado en forma directa los pigmentos distal y proximal se

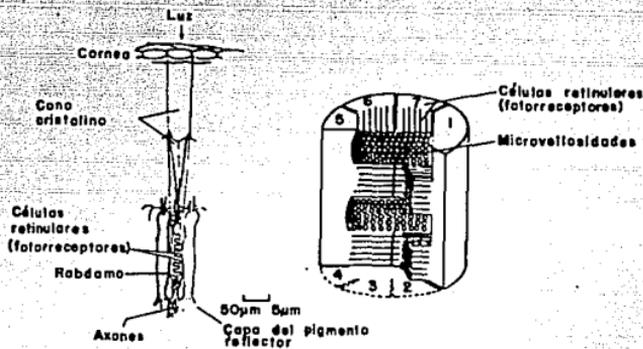


Figura 2. Esquema de una omatidia del ojo compuesto del acocil. El dibujo de la izquierda muestra las diferentes estructuras que forman los sistemas dióptrico y fototransductor. El dibujo de la derecha muestra un corte longitudinal del rabdomo formado por 7 de las 8 células retinulares que forman una omatidia. En el esquema están representados los túbulos (microvellosidades) dispuestos de manera alternada y orientados de manera ortogonal. Los números señalan las diferentes células de la omatidia (Redibujado de Parker, 1897 y Eguchi, 1965).

aproximan entre sí y cubren al rabdomo lo que implica que la luz sólo puede llegar al rabdomo por el eje longitudinal de la omatidia (estado de adaptación a la luz). En la oscuridad el pigmento distal se desplaza hacia la córnea y el pigmento proximal hacia la membrana basal por lo que el rabdomo queda descubierto y la luz llega a los fotorreceptores no sólo por el eje longitudinal sino también por cualquier punto del cono cristalino. En consecuencia estos pigmentos influyen sobre la capacidad de respuesta a la luz del ojo del artrópodo. La posición de estos pigmentos a los que se les ha dado el nombre de pigmentos accesorios determina el tamaño del área de reflexión de la luz en la córnea (Exner, 1889 y Stefanowska, 1890) conocida como pseudopupila, esto es, el área de la pseudopupila depende de cuanta luz pasa por el sistema dióptrico e incide sobre el pigmento de reflexión (Stavenga, 1979) éste queda cubierto por el pigmento proximal durante la adaptación a la luz y expuesto directamente a la luz cuando los pigmentos accesorios están en posición de adaptación a la oscuridad.

La migración de los pigmentos parece realizarse por una corriente citoplásmica, mediante la cual los gránulos se congregan o se dispersan; existen datos para suponer que la migración del pigmento distal está determinada por un reflejo neurohumoral iniciado desde la retina (Kleinholz, 1966), y que el movimiento del pigmento proximal, si bien puede estar bajo la influencia de algún reflejo, puede producirse por la acción directa de la luz sobre la célula retinular (Kleinholz, 1949).

El mecanismo determinante de la respuesta fótica de los pigmentos retinianos accesorios ha sido objeto de múltiples estudios en diversos grupos de crustáceos. Aunque entre los distintos autores existe acuerdo de que la luz es el estímulo que activa la migración de los pigmentos, aún se desconocen algunos de los mecanismos involucrados. La falta de inervación eferente a la retina, en muchos crustáceos por ejemplo, excluye la posibilidad de un gobierno visual directo de tipo reflejo. Por otra parte, el hecho de que un breve destello luminoso sea capaz de desencadenar una respuesta que dura minutos, sugiere la intervención de agentes hormonales (Kleinholz, 1961).

La vía de información hacia el sistema endocrino representado en esencia por el sistema órgano X-glándula sinusal, es decir, la parte neural de un posible reflejo neurohumoral no está aún demostrada y es posible que participen estructuras extraculares, como el ganglio cerebroide (Flores y cols; 1971). Además en el caso del pigmento proximal existen datos para suponer que responde directamente a la luz (Sandeen y Brown, 1952).

El problema de la migración de los pigmentos retinianos accesorios hacia la posición de adaptación a la oscuridad está aún menos estudiado. El hecho de que la luz provoque la liberación de hormonas desde la glándula sinusal que producen una migración de los pigmentos hacia la posición de adaptación a la luz, sugirió que el desplazamiento en sentido contrario sería un fenómeno pasivo. Sin embargo, Fingerman y cols (1958) encontraron en algunos crustáceos datos que permitieron sugerir la presencia de una hormona estimulante de la migración hacia la posición de adaptación a la oscuridad, si bien en el acocil aún no se ha identificado un principio semejante (Estrada, 1972).

1.2 REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE LOS FOTORRECEPTORES VISUALES DEL ACOCIL.

La respuesta eléctrica a la luz de grupos de fotorreceptores se puede medir por medio de un electrorretinograma (ERG). El ERG se registra en forma extracelular y mide la diferencia de potencial eléctrico que se desarrolla, como consecuencia de una señal luminosa, entre un electrodo activo colocado dentro del ojo y un electrodo indiferente colocado en algún sitio cercano.

En 1956 Naka y Kuwabara registraron el ERG del acocil en la superficie corneal y encontraron dos componentes: la HI que corresponde al encendido del estímulo y la HII la cual se mantiene todo el tiempo que dure el estímulo luminoso.

En 1959 estos mismos investigadores encontraron el origen de las componentes del ERG del acocil al insertar un microelectrodo a diferentes profundidades del ojo. Observaron que a medida que se cambia la posición del electrodo, cambia la forma del ERG. De

esta manera, en la parte de la capa receptora obtuvieron un registro bifásico con un potencial inicial positivo seguido de un potencial lento negativo. Llegaron a la conclusión de que el potencial positivo corresponde a la HI y que el potencial negativo, el cual está asociado tanto al encendido como al apagado del estímulo luminoso, corresponde a la HII.

El ERG bifásico parece ser producido como resultado de la diferencia de longitud de las estructuras responsables de la generación de la HI y de la HII. Estas consideraciones conducen a la conclusión de que las dos componentes se originan de diferentes estructuras en la capa receptora, probablemente del rabdomo y de la célula retinular, respectivamente (Naka y Kuwabara, 1959).

Cuando se realizan registros intracelulares, al atravesar la membrana de la célula retinular se observa una brusca caída de potencial, entre 20 y 30 mV. Esto indica que se ha penetrado una célula retinular cuyo potencial de membrana corresponde a estos valores de voltaje. Si en este momento se aplica un estímulo luminoso se obtiene un potencial de receptor el cual consta de dos fases: una despolarización rápida (fase transitoria) dependiente de la intensidad luminosa y una fase de despolarización lenta (fase estable), dependiente de la duración del estímulo luminoso.

Aunque hasta ahora no existen pruebas morfológicas de la existencia de uniones comunicantes entre las células fotorreceptoras del ojo del acocil, Muller en 1973 realizó experimentos con los que aportó pruebas fisiológicas en apoyo de la existencia de acoplamiento eléctrico entre estas células; este autor implantó dos microelectrodos en pares de células de la misma omatidia y pasó corriente en forma alternada por cada uno de los microelectrodos. Sus resultados mostraron evidencia de acoplamiento eléctrico entre unos pares de células (los formados por células sensibles al mismo plano de polarización de la luz, con sus microvellosidades orientadas en la misma dirección) ya que al inyectar corriente en cualquiera de las células se observó una modificación en el potencial de membrana de la otra célula implantada; y también se observó falta de acoplamiento eléctrico

entre otros pares de células (los formados por células sensibles a diferente plano de polarización de la luz, con sus microvellosidades orientadas en dirección ortogonal), ya que la inyección de corriente en cualquiera de las células era incapaz de modificar el potencial de membrana de la otra.

1.3 UNIONES COMUNICANTES

Durante los últimos 15 años ha quedado claro que las células en tejidos organizados forman comúnmente sistemas interconectados que les permiten intercambiar parte de su contenido molecular. Las estructuras por medio de las cuales se realiza este intercambio son membranas con canales a través de los cuales las moléculas hidrofílicas pueden fluir directamente del interior de una célula al interior de otra contigua.

Durante las décadas de los años 40 y 50 estudios sobre la permeabilidad y ciertas mediciones eléctricas en células sanguíneas, gametos, células nerviosas y células de músculo esquelético mostraron que la superficie de estas células es una barrera de difusión alta; de aquí surgió la idea de la célula como "unidad autónoma periférica". Observaciones posteriores con el microscopio electrónico han revelado una aparente continuidad de la superficie de las membranas en toda clase de células por lo que la noción de la membrana celular como una barrera continua se extendió a todas las células.

En 1952 Weidmann trabajando con músculo cardíaco encontró que un cambio de voltaje en una célula causaba un cambio paralelo en la célula contigua, Furshpan y Potter encontraron en 1959 una situación similar entre células nerviosas que no estaban químicamente acopladas, así descubrieron la sinapsis eléctrica. Estos estudios revelaron un modo directo de transmisión de la señal eléctrica entre células y abrieron un capítulo importante en la neurobiología.

En 1964 Kanno y Loewenstein encontraron que no únicamente iones pequeños sino también grandes moléculas hidrofílicas como la fluoresceína (330 daltons) atravesaban la vía de unión entre las células. Estas moléculas eran mucho más grandes como para

pasar a través de los mismos canales. Esto generó la idea de un canal especializado que unía a las células. Los experimentos siguientes al descubrimiento de la permeabilidad a moléculas grandes establecieron que ésta no se limita a células cardiacas o nerviosas sino que también se encuentra en epitelios y glía, a pesar de que ninguna de estas estructuras transmite señales eléctricas.

En los años siguientes se hicieron estudios en los cuales moléculas hidrofílicas con componentes de absorción de luz de 300 a 1000 daltons mostraron pasar a través de uniones celulares (Kanno y Loewenstein, 1966) (Potter y cols., 1966). En trabajos posteriores se mostró que la membrana de las uniones permite una mayor permeabilidad de algunos iones y compuestos, comparada con la membrana que no forma parte de éstas. Esto hizo necesaria la idea de que el paso de sustancias sigue una ruta especial a través de la membrana celular hacia las uniones distinta a la de los canales iónicos ordinarios.

Para este tiempo fueron reconocidas otras tres propiedades de las uniones: 1) el puente de unión entre las células presenta tasas altas de flujo de moléculas hidrofílicas 2) existe un límite de tamaño molecular para permitir el paso de las moléculas y 3) aunque es evidente la aposición de 2 membranas celulares, el puente es a prueba de fugas al exterior pues está aislado eléctricamente del espacio extracelular ya que la utilización de un rastreador molecular intracelular no percibió fugas fuera de la unión (Kanno y Loewenstein, 1966; Simpson y cols., 1977; Loewenstein y Kanno, 1964).

La suma de estos factores llevó a la proposición de la hipótesis de que el puente de unión se compone de unidades de canal (Loewenstein, 1966). Cada unidad consiste de un par de elementos de membrana permeables, uno en cada célula, alineados y fuertemente unidos entre sí lo que genera una vía central acuosa aislada en la periferia del espacio extracelular. Se consideró que muchas de estas unidades en paralelo forman la vía de unión entera, pero no que dos unidades estuvieran mediadas por un compartimiento común. Las unidades de unión fueron propuestas entonces como entidades discretas de célula a célula o canales.

Al tiempo que la hipótesis se enriqueció, se hicieron propuestas acerca de la naturaleza química, la estructura y la dimensión de cada canal intercelular. El concepto general de los canales como entidades proteicas en las membranas no emergió sino hasta principios de los años setentas. La prueba directa de la existencia de canales se logró con la purificación de la proteína de las uniones comunicantes. El estudio de numerosas preparaciones por medio de criofractura y de cortes finos, muestra que las uniones comunicantes entre diversas células siguen un esquema general. Éste consiste en el agrupamiento de las estructuras interpretadas como canales en una forma más o menos hexagonal, con una separación entre ellas que varía según el tejido (8 a 20 nm) y que dejan una distancia entre las membranas de las células de 2 a 4 nm. Debido a estas características recibieron el nombre de gap-junctions o uniones con espacio (Revel y Karnovsky 1967). Cuando se observan las uniones comunicantes por medio de las técnicas de criofractura se pueden ver zonas más o menos extensas con partículas o con sus huellas dependiendo de la cara que se observe.

La estructura responsable de crear puentes citoplásmicos efectivos entre dos células se ha correlacionado con la imagen típica de una unión comunicante, es decir, un área pentagonal de contacto entre dos células conectadas funcionalmente (Revel y Karnovsky, 1967). Debido a la presencia de uniones comunicantes en muchos tipos de células y al papel que desempeñan como un mecanismo celular fundamental en la homeostasis y la comunicación celulares, se han hecho estudios de su fisiología, farmacología, bioquímica y sus propiedades estructurales en diversos sistemas celulares, tanto *in vivo* como *in vitro* (Loewenstein, 1981; Spray y Bennett, 1985; Peracchia y Girsch, 1985; Larsen y Risinger, 1985; Ramón y Rivera, 1986).

El estudio de la comunicación intercelular debida a las uniones comunicantes no puede hacerse por observación directa ya que estas uniones son estructuras de tamaño muy por debajo de la resolución de los microscopios de luz. Debido a ello, para su estudio se utilizan técnicas indirectas, a partir de cuyos resultados se infiere la presencia o ausencia de las uniones

comunicantes y en su caso, del estado funcional de los canales que las forman (Arellano, 1986).

Una de las técnicas de estudio de las uniones comunicantes más simples, consiste en la utilización de colorantes como el amarillo de Lucifer o la fluoresceína. En este caso el colorante es inyectado en una célula y por medio de microscopía de fluorescencia se observa el grado de difusión hacia las células adyacentes, el que también puede ser evaluado después que la preparación ha sido fijada (Bennett, 1973; 1977; Knowles y cols, 1982; Miller y Goodenough, 1985). Sin embargo, el uso de colorantes tiene restricciones, una de ellas, tal vez la más importante para el estudio de las uniones comunicantes es que los colorantes no pueden ser cuantificados con precisión. Debido a su lenta difusión tampoco proporcionan una gran resolución temporal por lo que no se utilizan en experimentos en los que se requiere mediciones en tiempos cortos.

Un método mejor para estimar el acoplamiento entre las células es la utilización de mediciones eléctricas, con las que se obtiene la resistencia (o la conductancia) que presentan las uniones comunicantes al paso de la corriente eléctrica. Durante estas mediciones es importante que la resistencia de la membrana que no forma parte de la unión permanezca constante, ya que de lo contrario los valores de acoplamiento obtenidos pueden ser falsos.

El cálculo de la resistencia de las uniones es relativamente fácil en células grandes, donde varios microelectrodos pueden ser introducidos intracelularmente para hacer las mediciones. Sin embargo, en células pequeñas o en experimentos donde se requiere de microelectrodos para otras mediciones o maniobras (inyección de sustancias, medición de pH o de Ca^{2+} , etc.), el cálculo de la resistencia de la unión se dificulta. A pesar de esto, es posible lograr una buena estimación del grado de comunicación intercelular con el cálculo del llamado "coeficiente de acoplamiento". Este se obtiene al inyectar corriente en una célula y medir los potenciales transmembranales provocados en la célula inyectada (V_1) y en la célula adyacente (V_2). Cuando las células se encuentran bien acopladas, V_1 y V_2 son muy parecidos y

la relación V_2/V_1 tiende a 1, mientras que durante el desacoplamiento la relación entre los dos voltajes es menor de 1 y tiende a 0 cuando hay un desacoplamiento muy marcado (Arellano, 1986).

Otro método utilizado para detectar la presencia de uniones comunicantes, principalmente en células pequeñas cultivadas en monocapas, consiste en inyectar corriente en una célula y medir el potencial transmembranal que se produce a diferentes distancias del sitio de la inyección. Con los valores de voltaje que se obtienen se construye una curva que relaciona la amplitud de los potenciales electrotonicos con la distancia del sitio de inyección, lo que cuantifica la disminución de los potenciales electrotonicos y que depende, entre otros parámetros, de la resistencia de la unión entre las células (Eisenberg y Johnson, 1970; Siegenbek y cols; 1972).

Otro método para estimar la comunicación intercelular por medio de uniones comunicantes consiste en calcular la resistencia que presentan las uniones al paso de una corriente eléctrica conocida que se aplica en forma alternada a cada una de las dos células que se supone que están eléctricamente acopladas. El cálculo de la resistencia se hace de acuerdo con los valores de los potenciales transmembranales los cuales cambian, en forma evidente, si las uniones están abiertas o cerradas.

En el estudio de la subestructura de los canales que constituyen a las uniones comunicantes se han logrado avances con la utilización de la técnica de difracción de rayos X (Makowski y cols; 1977; Caspar y cols; 1977) y la reconstrucción tridimensional de los canales. Estudios de este tipo realizados en células hepáticas (Zampighi y Unwin, 1979; Unwin y Zampighi, 1980) han permitido establecer que las partículas observadas en las membranas de las uniones son las proteínas que forman las paredes de los canales. Cada uno de estos canales está formado por las dos membranas de las células comunicadas. La unidad que proporciona cada una de las células se conoce con el nombre de conexión o hemicanal y está formado por seis subunidades idénticas cada una de aproximadamente 27 Kd de peso molecular, 2.5 nm de diámetro y 7.5 nm de largo. El conjunto de seis subunidades tiene

un diámetro de 6 nm con un poro central (el canal) de 2 nm de diámetro. Unwin y Zampighi (1980) también encontraron que las subunidades se encuentran inclinadas en su paso por la membrana; sin embargo, también se encuentran conexiones en las que la inclinación de las subunidades disminuye y el poro se interrumpe en su extremo citoplásmico. Estos dos estados de la proteína sugirieron que los canales pueden abrirse (subunidades inclinadas) y cerrarse (subunidades sin inclinación) debido a la rotación y el desplazamiento de las subunidades.

1.4 REGULACION DE LAS UNIONES COMUNICANTES

Actualmente se tienen datos concretos sobre la estructura, la conductancia eléctrica y la selectividad de las uniones comunicantes, pero se sabe poco sobre los procesos que modulan su actividad en condiciones fisiológicas. La modulación de las uniones comunicantes puede ser estudiada desde dos ángulos, uno que corresponde a los cambios de acoplamiento entre las células debido a la inserción y/o remoción de canales en la membrana de la unión y otro que se relaciona con los cambios de conductancia del canal (abierto-cerrado) que, como en otros canales de membrana, dependen de uno o de múltiples factores (Arellano, 1986).

Se sabe que las células que se encuentran acopladas pueden ser desacopladas por medio de diversas maniobras experimentales. Entre éstas se ha propuesto un cambio en la concentración intracelular de los iones de calcio o de hidrógeno (ver revisiones de Loewenstein, 1981; Spray y Bennett, 1985), cambios en el voltaje transunión (Spray y cols., 1981) o en el voltaje transmembrana (Obaid y cols., 1983).

La conducción a través de las uniones comunicantes puede ser controlada tanto natural como artificialmente. Cambios rápidos y reversibles en la conductancia sugieren que las uniones pueden sufrir un cambio conformacional que ocluye el canal. Estudios con microscopía electrónica muestran que la estructura fina de las uniones comunicantes puede permanecer virtualmente sin cambio cuando la conductancia de la unión es bloqueada (Hanna y cols.,

1985). Un modelo atractivo para explicar el cierre de las uniones comunicantes y de otros canales fue propuesto por Unwin (1989) con preparaciones de uniones comunicantes aisladas de hígado de rata, analizadas mediante técnicas de microscopía de baja densidad de electrones que permitieron la reconstrucción de imágenes, se observó que las subunidades del canal están más inclinadas en las soluciones que contienen concentraciones elevadas de calcio que en las que contienen bajas concentraciones de este ion. Es posible que el estado de inclinación de las subunidades corresponda a la posición de cierre del canal.

La conductancia de las uniones comunicantes está regulada por el voltaje. En la primera descripción de uniones eléctricas, la sinapsis rectificante del acocil, la despolarización del lado presináptico incrementa la conductancia de la unión (Purshpan y Potter, 1959; Giaume y cols., 1987). Una dependencia simétrica con respecto al voltaje la presentan algunas uniones homoméricas de varios tipos. En blastómeros de anfibios, el cambio en el voltaje transunión ya sea despolarizante o hiperpolarizante reduce la conductancia de la unión (Harris y cols., 1981). El efecto es completamente independiente del potencial entre el interior de la célula y el exterior.

Una forma diferente de sensibilidad al voltaje se observa en las glándulas salivales de la mosca de la fruta (Obaid y cols., 1983; Verselis y cols., 1991). En este caso, la despolarización de las dos células que se comunican por medio de las uniones reduce la conductancia, mientras que la hiperpolarización la incrementa. Probablemente un sensor de voltaje detecta el potencial entre el interior de la célula o el canal de la unión y el espacio extracelular que contiene a la unión, permitiendo el acceso al canal de los iones pequeños. Cambios moderados en el potencial de reposo afectan significativamente la conductancia transunión y podrían desempeñar un papel fisiológico en el acoplamiento. También se ha encontrado que una diferencia grande en el voltaje transunión produce un considerable decremento en la conductancia del canal.

El incremento en el citoplasma de H^+ o Ca^{2+} disminuye rápidamente la conductancia de las uniones comunicantes con un

grado variable de reversibilidad. Alcoholes de cadena larga como el heptanol y el octanol y anestésicos como el halotano bloquean muchas de las uniones estudiadas (Spray y Bennett, 1985; Burt y Spray, 1989). Estos agentes parecen actuar a través de ambientes lipídicos de la unión o por intercalación dentro de regiones no polares a través de sitios de la membrana donde predominan los conexones.

1.5 PAPEL DE ALGUNOS ALCOHOLES DE CADENA LARGA (HEPTANOL Y OCTANOL) SOBRE LAS UNIONES COMUNICANTES.

Los efectos desacoplantes de los alcoholes, primeramente descritos por Johnston y cols. (1980) en axones septados de acocil, fueron rápidamente confirmados en todos los vertebrados y probados en sistemas de invertebrados (Déléze y Hervé, 1983; Bernardini y Peracchia, 1984; Heda y cols., 1986). Johnston y Ramón (1981) propusieron un sitio extracelular para la acción de los alcoholes ya que el desacoplamiento se provoca únicamente con su aplicación extracelular.

El heptanol y el octanol tienen efectos sobre varios parámetros que dependen de la presencia de uniones comunicantes en los tejidos. Así, en el músculo ventricular de perro incrementan la resistencia longitudinal (Wojtczak, 1985), en la aurícula de rata reducen la constante de espacio λ (Déléze y Hervé, 1986), en el músculo epicardíaco de la oveja bloquean la propagación del impulso (Delmar, 1987).

El heptanol también se ha utilizado como un desacoplador celular para estudiar el decremento de la conducción en preparaciones cardíacas. Así, Nelson y Makielski en 1991 describieron por primera vez el efecto del heptanol sobre corrientes de sodio bajo fijación de voltaje en células de Purkinje cardíacas. En todos los experimentos los autores aplicaron el heptanol o el octanol en el exterior de la célula y comprobaron que a concentraciones milimolares, el alcohol bloqueó las corrientes de sodio. También comprobaron que los efectos del heptanol ocurrieron a partir de los dos minutos de iniciado el cambio de solución a heptanol. La recuperación de las corrientes

de sodio frecuentemente era incompleta sobre todo después de que la preparación había estado expuesta al heptanol durante tiempos prolongados. Estos estudios demostraron que el heptanol tiene efectos importantes sobre las corrientes cardíacas de sodio pues parece modificar la actividad de canales iónicos. Resultados similares se han obtenido con el octanol, aunque en este caso se requirió el uso de concentraciones menores a las del heptanol para lograr una supresión equivalente en la corriente. Estos datos sugieren que estos alcoholes pueden ejercer sus efectos por un mecanismo general de acción, quizá por la alteración de las lipoproteínas de estos canales. Esta interpretación podría estar relacionada con la naturaleza hidrofóbica de los alcoholes alifáticos de cadena larga así como con el efecto que tienen los alcoholes, análogo al de los anestésicos generales. También estos alcoholes han mostrado bloquear las corrientes de entrada lenta de calcio en miocitos de cobayo lo que produce el desacoplamiento de pares de células en este tejido (Rüdigsüli y Weingart, 1989).

Llinás y Yarom (1986) usaron alcoholes con diferente peso molecular, desde el metanol hasta el decanol, para estudiar los canales de calcio en neuronas de cobayo y encontraron que los alcoholes de cadena larga producen un bloqueo específico de canales de calcio.

En 1985 Hirche estudió el efecto del octanol sobre nervios mielinizados de rana y encontró un bloqueo de los canales de sodio. Por otra parte se ha descrito un incremento de la resistencia de la unión en células cardíacas de perro por la aplicación de ouabaína, similar al efecto que provoca el heptanol sobre dicha resistencia (Spach y cols. 1982). Se ha observado también que el heptanol produce un bloqueo de la conducción transversa en las células ventriculares del conejo, así como una modificación en las propiedades eléctricas pasivas de la membrana de estas células (Brugada y cols., 1991). En trabajos realizados por Pott y Mechmann (1990) se apoya la idea de la presencia de canales de alta conductancia que representan la actividad de hemicanales de uniones comunicantes en miocitos cardíacos de cobayo adulto. Estos autores observaron que al perfundir externamente una célula con octanol, en presencia de cafeína, hay

una reducción de la actividad de canales de alta conductancia de alrededor del 10% del valor inicial. Aplicaron también β adrenérgicos que estimulan la apertura de los canales de calcio, y comprobaron que ésta se bloquea ante la presencia de octanol. Asimismo comprobaron que este efecto es reversible. Con esta base, propusieron que el alcohol reduce la probabilidad de que el canal se encuentre en un estado abierto.

Se ha encontrado que el heptanol, el octanol y el nonanol son los únicos alcoholes de cadena larga con los que se logra el desacoplamiento entre las células acinares pancreáticas; además, son los únicos que pueden inducir un aumento en la liberación de amilasa. Se observó también que por lo menos el heptanol actúa de manera aditiva en la liberación de amilasa estimulando su liberación por secretagogos que por sí solos no bloquean la comunicación intercelular. Estos datos apoyan la posibilidad de que la secreción pancreática está influida por el desacoplamiento de las células acinares. (Chanson y cols., 1989).

2.OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es apoyar, en su caso, la idea de un acoplamiento eléctrico, por medio de las uniones comunicantes, entre las células fotorreceptoras visuales del acocil. Para ello se emplearon alcoholes de cadena larga, en particular el heptanol, de los cuales se sabe que actúan como desacopladores de las uniones comunicantes. Así, las características de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores antes, durante y después de la aplicación de los alcoholes, se interpretaron como índice de la presencia de uniones comunicantes entre las células registradas en su posición abierta o cerrada.

3.HIPOTESIS

Si existen uniones comunicantes entre las células retinulares o entre éstas y otras estructuras del tallo ocular del acocil, entonces la aplicación al tallo ocular de alcoholes de cadena larga de los cuales se conoce su acción desacoplante, producirá cambios detectables en la respuesta a la luz de las células retinulares.

4. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron tallos oculares aislados de acocil de la especie Procambarus diqueti. Los acociles fueron recolectados en el municipio de Zamora Michoacán. Una vez en el laboratorio fueron colocados bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se les daba de comer 3 veces por semana y su alimentación consistía de vegetales y huevo cocido. Los organismos utilizados para experimentación fueron machos jóvenes, maduros sexualmente con una talla de 8.5 cm medidos del rostro al telson y un peso de 11.5 g en promedio. Antes de iniciar cada experimento y como control del estado funcional de los ojos se buscaba, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, la presencia de pseudopupila, si ésta no era evidente a pesar de que el animal hubiera estado algunos minutos previamente en la oscuridad el ojo no era utilizado para el experimento por considerarse lesionado.

Los organismos eran anestesiados por enfriamiento durante 15 ó 20 minutos dependiendo de su tamaño. Para aislar el tallo se insertaba una tijera de punta fina sobre el tejido blando en la base del tallo ocular. Una vez seccionado el tallo se procedía a hacer un corte con una navaja de rasurar para retirar la córnea de la parte superior del ojo procurando dañarlo lo menos posible. El propósito de retirar una porción de la córnea era facilitar el acceso del electrodo de registro a la zona donde se ubican las células retinulares.

Se hicieron dos tipos de experimentos, registros extracelulares (electrorretinograma, ERG) e intracelulares (potencial de receptor, PR). En los dos casos el ojo se colocaba en una cámara de perfusión, la cual contenía aproximadamente 5 cm³ de solución de Van Harreveld (VH) (Van Harreveld, 1936) a temperatura ambiental y con pH de 7.2 a 7.4. Las soluciones empleadas llegaban a la cámara por medio de tubos de plástico conectados a jeringas que servían para almacenarlas. El paso de las soluciones era regulado mediante una llave de tres vías. El dispositivo descrito se colocaba dentro de una jaula de Faraday

con el fin de aislarlo eléctricamente; la jaula estaba totalmente cubierta para evitar la entrada de luz a la preparación.

Una vez que se colocaba el tallo en la cámara, con la ayuda de un micromanipulador se insertaba un electrodo para registro extracelular o intracelular; para cerrar el circuito se colocaba dentro de la cámara un electrodo de referencia. La preparación se dejaba en oscuridad constante durante 10 minutos antes de comenzar el registro.

Para los registros del ERG se utilizaba un electrodo de acero inoxidable, cuya punta tenía un diámetro de 2 a 5 μm . La señal del electrodo de registro era enviada a un polígrafo (Grass, Mod. 7) y amplificada (preamplificador de CD Grass, Mod. 7P1 y amplificador Grass, Mod. 7DA) para su registro gráfico, y después de amplificada era enviada a una tarjeta convertidora analógico-digital para su conversión y almacenamiento en una computadora. (Ver figura 3).

Para los registros del PR se usaba un microelectrodo de vidrio cuya punta tenía un diámetro de 0.2 μm , lleno con una solución de KCl 2.7 M y con una resistencia eléctrica de 20 a 30 M Ω . El electrodo se conectaba a un preamplificador de alta impedancia (WPI, Mod. M701), la señal que salía de éste era enviada a un osciloscopio de rayos catódicos (Hewlett Packard, Mod. 1201B) y después hacia un polígrafo (Grass Mod. 7) en donde era amplificada (preamplificador de CD Grass, Mod. 7P1 y amplificador Grass, Mod. 7DA) para su registro gráfico, la señal amplificada era enviada a un diferenciador (Grass, Mod. 7P20) para obtener la derivada de la respuesta y su registro gráfico. Tanto el PR amplificado como su derivada se mandaban a una tarjeta convertidora analógico-digital para su conversión y almacenamiento en una computadora (Ver Figura 4). El momento en que el microelectrodo penetraba la célula retinular era determinado por la observación de un cambio de potencial de aproximadamente -30 mV, el cual corresponde al potencial de membrana en reposo de las células fotorreceptoras. Tanto el ERG como el PR se obtenían por la aplicación a la preparación de destellos luminosos de 1800 lux de intensidad y 15 μs de duración, procedentes de un fotoestimulador (Grass, Mod. PS22).

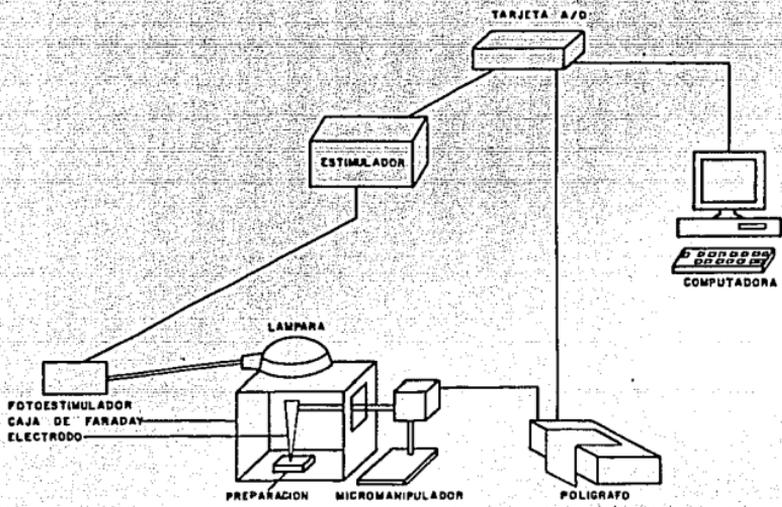


Figura 3. Dispositivo experimental para registrar el electroretinograma (Ver detalles en el texto).

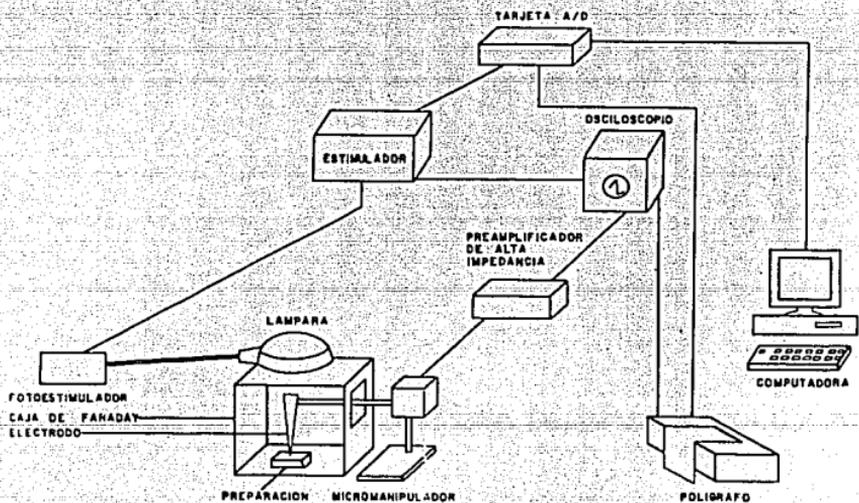


Figura 4. Dispositivo experimental para registrar el potencial de receptor (Ver detalles en el texto).

El diseño experimental fue el mismo para los registros de ERG y de PR. Después de los 10 minutos iniciales en oscuridad, las células fotorreceptoras se estimulaban cada 3 minutos. Las respuestas eran registradas en solución VH durante 30 minutos (respuestas control). Pasado este tiempo la solución salina era sustituida por una solución que contenía un alcohol (solución de prueba). El registro se mantenía durante 30 minutos más. Una vez transcurrido este tiempo se volvía a cambiar la solución de prueba por la solución salina de VH y el registro de ERG o de PR se prolongaba durante los últimos 30 minutos del experimento. Con el fin de asegurarnos de que los cambios observados durante los experimentos no se debieran a fallas en el dispositivo o al deterioro de la preparación, se realizaron experimentos testigo tanto para los registros del ERG como del PR; durante las tres etapas de que constaban los experimentos se aplicaba únicamente solución de VH.

Las soluciones de prueba empleadas fueron la solución de VH más uno de los siguientes alcoholes para el caso de registros extracelulares: 1-propanol (162 mM), 1-pentanol (18 mM), 1-hexanol (6 mM) y 1-heptanol (2 mM). Mientras que para los registros intracelulares fueron: 1-propanol (81 mM), 1-pentanol (9 mM), 1-hexanol (3 mM) y 1-heptanol (1 mM). Las concentraciones del propanol, pentanol y hexanol fueron equivalentes a la molaridad del heptanol considerando su actividad a partir de su solubilidad en las membranas celulares (Seeman, 1972).

La solución salina que se empleó fue la propuesta por Van Harrevelde (1936) para crustáceos de agua dulce, con una modificación: el bicarbonato fue reemplazado por HEPES, debido a que es un mejor amortiguador (Ver Tabla 1).

Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	205
KCl	5
CaCl ₂	13
MgCl ₂	2
HEPES	5

Tabla 1. Composición de la solución salina modificada de la propuesta por Van Harrevelde (1936) para crustáceos de agua dulce.

Para el análisis de resultados se diseñó un programa que permitía obtener, en el caso del ERG, el valor de voltaje máximo de la componente HI, el valor de voltaje máximo de la componente HII, la duración de HI (en ms) y el tiempo (en ms) que tarda la respuesta en alcanzar el 63% del voltaje máximo (τ) (Ver figura 5).

En lo que se refiere a los registros intracelulares, el programa utilizado para analizar los resultados permitía obtener, en milivoltios, la amplitud de la fase transitoria (considerada ésta desde el inicio de la respuesta hasta el momento en el que el voltaje alcanzaba su valor máximo), cabe mencionar que el valor de la fase transitoria es equivalente al valor máximo de la amplitud de la respuesta; el valor de la fase estable en milivoltios (determinado por el punto del trazo del potencial de receptor correspondiente al punto en el trazo de la derivada en el que no hay cambios de voltaje con respecto al tiempo); y la duración (en ms) del potencial de receptor (considerada como el tiempo transcurrido desde el inicio de la respuesta hasta que ésta alcanzaba el valor del 37% de la fase estable) (Ver figura 6).

Los valores obtenidos para los diferentes parámetros tanto del ERG como del PR, fueron normalizados y promediados con el fin de comparar sus variaciones durante todo el tiempo que duraba el experimento. El número mínimo de experimentos para cada tratamiento fue de ocho.

Los datos fueron analizados por la prueba estadística de Scheffé. El empleo de esta técnica permite determinar qué tan significativas son, desde el punto de vista estadístico, las diferencias de los valores obtenidos con los distintos tratamientos experimentales, cuando tales valores se comparan entre sí y con respecto a la solución testigo.

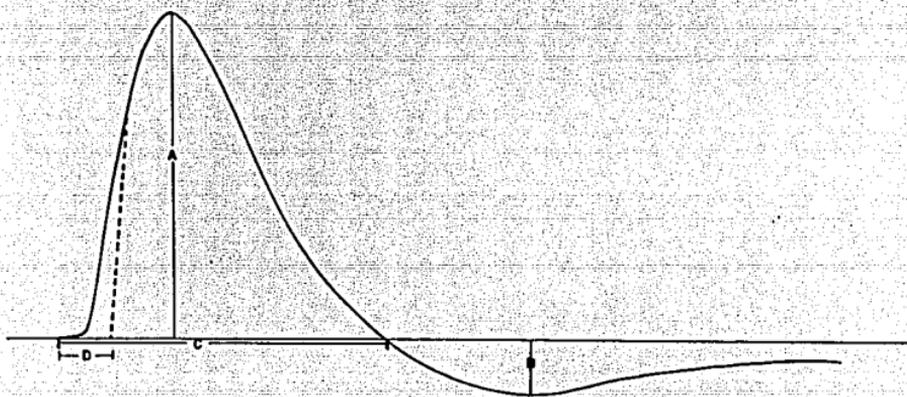


Figura 5. Parámetros utilizados para evaluar el electroretinograma. A, voltaje máximo de la HI; B, voltaje máximo de la HII; C, duración de la HI; D, tiempo que tarda la respuesta en alcanzar el 63% del voltaje máximo (τ , τ).

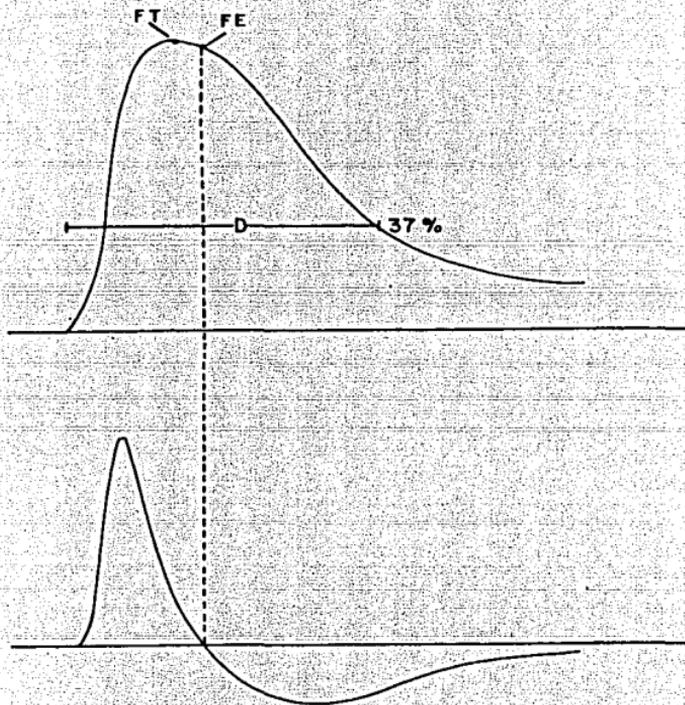


Figura 6. Parámetros utilizados para evaluar el potencial de receptor. FT, fase transitoria (el valor de la fase transitoria es equivalente al valor máximo de la amplitud de la respuesta); FE, fase estable, determinada por el punto en el potencial de receptor (trazo superior) correspondiente al punto de la derivada (trazo inferior) en el que no hay cambios de voltaje con respecto al tiempo; D, duración del potencial de receptor (considerado como el tiempo transcurrido desde el inicio de la respuesta hasta que ésta alcanza el valor del 37% de la fase estable)

5. RESULTADOS

5.1 REGISTROS EXTRACELULARES

Al colocar un electrodo extracelular sobre la córnea del acocil y aplicar un destello luminoso sobre esa misma región, se puede observar una respuesta característica a la luz que es un electrorretinograma (ERG). La figura 7 muestra una respuesta típica de ERG tal y como se obtuvo al inicio de los experimentos.

Tanto los registros testigo como los experimentales mostraron muy pocas modificaciones entre la primera respuesta y la obtenida 30 minutos después, es decir la respuesta número 10, o respuesta control, lo que no es de extrañar si se toma en consideración que durante ese tiempo las condiciones fueron equivalentes en todos los registros. A partir de ese tiempo se hacía llegar a la preparación nueva solución de Van Harreveld en los registros testigo o la solución de prueba en los registros experimentales. El tiempo que permanecía la preparación en contacto con la nueva solución era de otros 30 minutos y la siguiente medida considerada fue la respuesta número 20, la cual se designó como respuesta de prueba. Es evidente que los cambios producidos por las distintas soluciones empleadas se registraron precisamente en esta etapa. Transcurrido el tiempo señalado la preparación era lavada con solución salina, solución con la que permanecía en contacto durante otros 30 minutos, tiempo que se encontró que era el adecuado para que la preparación se recuperara del posible efecto que hubiera tenido la solución de prueba a la que previamente había sido sometida.

Durante las primeras 10 respuestas en todos los registros, los valores de amplitud de las componentes HI y HII la constante de tiempo (τ) y la duración de HI se mantuvieron sin cambios notables, por lo que los resultados se describen a partir de lo que se observó en las preparaciones una vez realizado el cambio de solución (respuesta 20) y después de haberse realizado el lavado (respuesta 30).

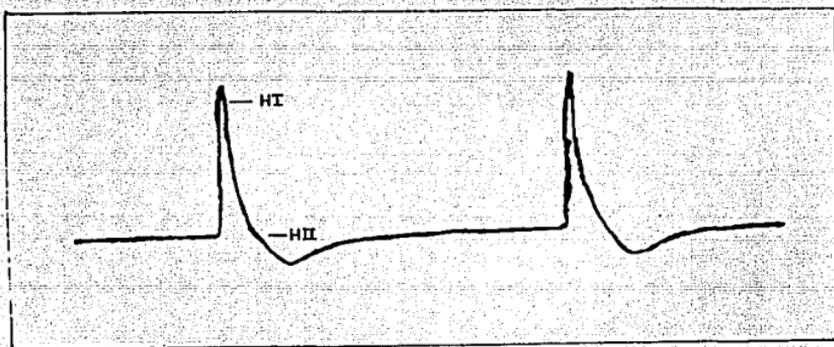


Figura 7. Trazo típico de un electroretinograma de acocil.

5.1.1 EXPERIMENTOS TESTIGO DEL ELECTORRETINOGRAMA (ERG).

En la figura 8 se muestra los trazos de las respuestas 10, 20 y 30 del ERG de un registro testigo. Puede comprobarse que en ninguno de los parámetros utilizados para caracterizar el electroretinograma, es decir la amplitud de la componente HI, la duración de la componente HI, la amplitud de la componente HII y la τ hubo diferencias marcadas entre las respuestas control (-), de prueba (--) o la que se obtiene después del lavado (-.-).

En la Tabla 2 se muestran los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos, obtenidos del promedio de todos los experimentos. En el caso de los experimentos testigo se puede observar que la amplitud y la duración de la componente HI mostraron un descenso gradual cercano al 15% desde la respuesta 10 hasta la respuesta 30; que la amplitud de la componente HII se redujo en forma más evidente al caer cerca de un 20% durante ese mismo intervalo y que la τ se mantuvo con valores constantes, relativamente, durante todo el experimento.

El análisis estadístico que se utilizó nos permitió comparar cada uno de los tratamientos experimentales con el tratamiento testigo. Sin embargo, como las primeras diez respuestas fueron equivalentes en todos los experimentos, ya que se obtenían antes de que se efectuara el primer cambio de solución, la comparación se hizo entre las respuestas obtenidas una vez que se había inducido, en su caso, algún efecto por la solución problema (respuestas número 20) y entre las respuestas que medían el grado de recuperación dependiente de la fase de lavado (respuestas número 30). La prueba estadística que se aplicó fue la prueba de Scheffé la cual permite establecer comparaciones entre distintos grupos experimentales. En todos los casos se trabajó con un coeficiente de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$) (Ver Tabla 3).

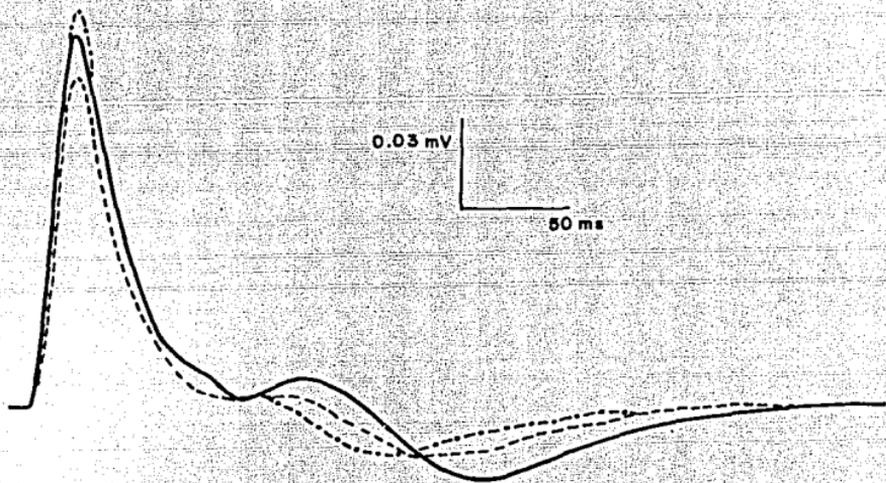


Figura 8. Registro testigo del electroretinograma durante distintos momentos del experimento. Se muestra los trazos correspondientes a las respuestas 10, 20 y 30 de un registro de ERG obtenido de una preparación que se mantuvo en solución salina de Van Harreveld durante todo el experimento. La respuesta 10 corresponde al periodo control (-), la respuesta 20 al periodo de prueba (--) y la respuesta 30 al periodo después del lavado (-.-). Es evidente la ausencia de cambios importantes en los parámetros utilizados para caracterizar al electroretinograma; es decir, la amplitud de la componente HI, la amplitud de la componente HII, la duración de la componente HI y la tau (τ).

TRATAMIENTO	VOLTAJE MAX.(H1) (%)			VOLTAJE MAX.(H11) (%)			DURACION (H1) (%)			TAU (%)		
	R10	R20	R30	R10	R20	R30	R10	R20	R30	R10	R20	R30
TESTIGO	100	90.03	84.51	100	95.36	79.12	100	89.74	85.55	100	102.07	99.19
PROPANOL	100	108.21	101.2	100	103.20	92.46	100	88.30	86.70	100	97.47	95.15
PENTANOL	100	105.22	104.8	100	107.47	106.73	100	89.53	93.12	100	89.85	92.29
HEXANOL	100	54.08	97.90	100	39.32	95.78	100	56.22	79.36	100	90.53	99.85
HEPTANOL	100	54.31	70.38	100	45.21	82.51	100	63.81	76.86	100	92.46	104.32

Tabla 2. Valores porcentualizados de las respuestas 10, 20 y 30 de cada uno de los parámetros medidos para caracterizar el ERG obtenidos de todos los experimentos.

TRATAMIENTO	VOLTAJE MAX. (H1) VALORES PROMEDIO		VOLTAJE MAX. (H11) VALORES PROMEDIO		DURACION (H1) VALORES PROMEDIO		TAU VALORES PROMEDIO	
	R20	R30	R20	R30	R20	R30	R20	R30
TESTIGO	88.73	76.14	92.95	73.59	87.43	80.80	102.06	98.18
PROPANOL	109.98	101.23	102.19	92.46	88.30	86.70	97.46	95.14
PENTANOL	105.21	104.81	107.46	106.72	89.53	93.12	89.85*	92.29
HEXANOL	54.07*	97.90	39.32*	95.78	56.21*	79.35	90.52*	99.85
HEPTANOL	54.31*	70.38	45.20*	82.51	63.80*	76.66	92.46	104.32

Tabla 3. Valores promedio obtenidos por la prueba de Scheffé de las respuestas 20 y 30 de cada uno de los parámetros medidos para caracterizar el ERG. Coeficiente de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$). * Diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento testigo.

5.1.2 EFECTO DEL PROPANOL SOBRE EL ERG.

En la figura 9 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa el efecto del propanol sobre cada uno de los parámetros antes mencionados. Los símbolos empleados para designar cada trazo son los mismos que se utilizaron en la figura 8. Es evidente que durante la respuesta 20 tanto la amplitud de la componente HI como la de la componente HII muestran un pequeño aumento con respecto a la etapa control (respuesta 10). Una vez efectuado el lavado se produce un ligero aumento por arriba de los valores control (respuesta 30). Ni la duración de HI ni la τ se vieron afectadas por la acción del propanol, lo que significa que sus valores se mantuvieron prácticamente constantes durante todo el experimento. La tabla 2 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos, se puede observar que por lo que se refiere a la amplitud de HI, al agregar el alcohol hubo un incremento cercano al 8% en la respuesta 20 con respecto a los valores control (respuesta 10) y que una vez que se hubo lavado la preparación, se recuperó el valor inicial del 100%. En cuanto a la amplitud de HII sucedió básicamente lo mismo que con la amplitud de HI, sin embargo, el incremento atribuible al propanol fue sólo del 3%. En la duración de HI se observó un decremento del 12% cuando se añadió el alcohol y una ligera recuperación después del lavado. La τ permaneció prácticamente constante durante todo el tiempo del experimento.

El análisis estadístico utilizado (tabla 3) puso de manifiesto que en la solución de propanol, el voltaje máximo de la componente HI en la respuesta 20 y en la respuesta 30 no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo. Algo semejante sucedió con la amplitud de la componente HII, la duración de la componente HI y el valor de τ , ya que los valores de estos parámetros durante las respuestas 20 y 30, es decir, las respuestas en las que se detecta la acción del alcohol y el resultado del lavado, respectivamente, no difirieron en forma significativa de los valores que se obtuvieron con la

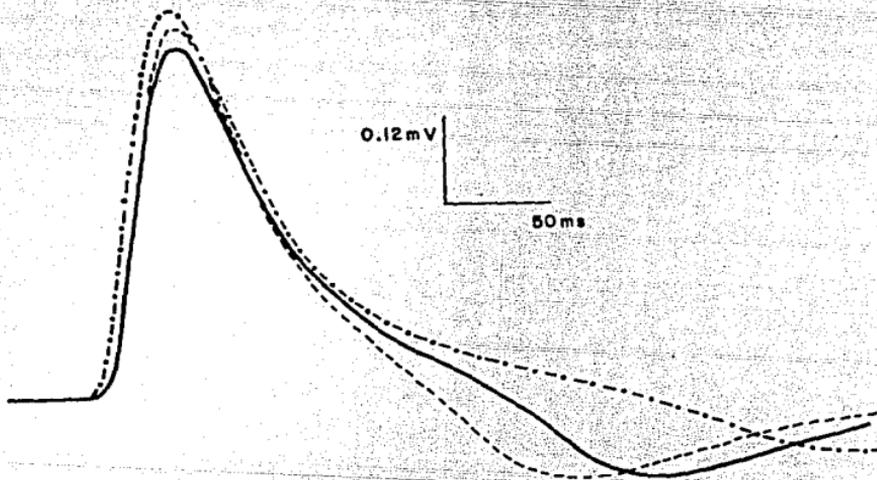


Figura 9. Efecto del 1-propanol sobre el ERG. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de ERG, que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--) y al periodo de lavado (-.-), respectivamente. El registro del ERG en presencia del 1-propanol (162 mM) no muestra cambios significativos con respecto al ERG control (respuesta 10) o al ERG después del lavado (respuesta 30).

solución testigo, lo que implica que este alcohol no tuvo ningún efecto detectable sobre las características del ERG.

5.1.3 EFECTO DEL PENTANOL SOBRE EL ERG.

En la figura 10 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en el que se aplicó pentanol como solución de prueba. Los resultados de estos experimentos fueron similares a los obtenidos con el propanol ya que, como puede observarse en la figura, ninguno de los parámetros medidos mostró diferencias evidentes con respecto al electroretinograma registrado en condiciones control. La tabla 2 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos hechos con pentanol. Se puede observar que ni la amplitud de HI ni la amplitud de HII mostraron mayores diferencias con respecto a los valores control (respuesta 10). Sólo en la duración de la HI se observó un pequeño descenso del 10% con respecto a los valores control al agregar el pentanol. En cuanto a la τ , ésta tuvo un decremento del 10% en la respuesta 20 y una recuperación hasta un 92% comparada con la respuesta control.

El análisis estadístico utilizado (tabla 3) mostró que en lo que se refiere al voltaje máximo de la componente HI, al voltaje máximo de la componente HII y a la duración de la componente HI, todos ellos medidos en la respuesta 20, no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo. Tampoco en la respuesta 30 estos mismos parámetros presentaron diferencias importantes con respecto al testigo. Sólo en lo que se refiere a la τ la prueba estadística mostró diferencias significativas en la respuesta 20 entre el tratamiento con pentanol y el tratamiento testigo, diferencias que desaparecieron una vez que se hubo practicado el lavado, esto es, en la respuesta 30. Esto significa que el pentanol redujo la velocidad de despolarización de las células retinulares (tabla 2), aunque como resultado del lavado las células recuperaron sus características iniciales.

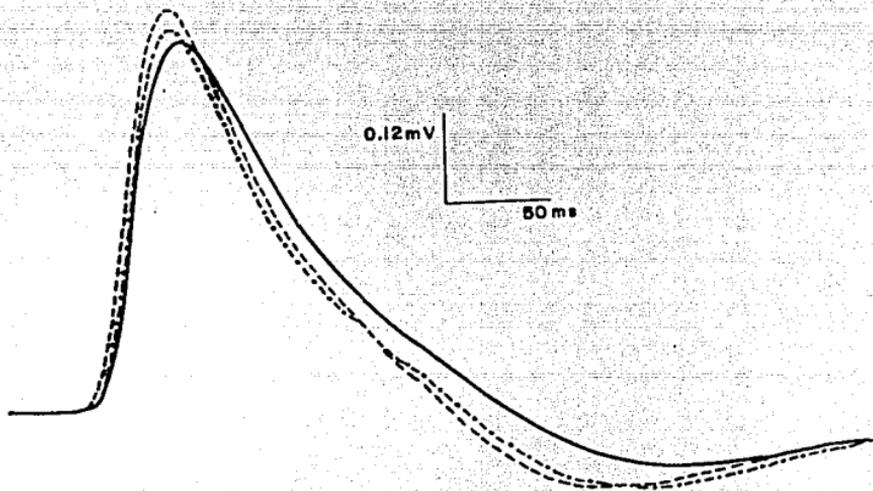


Figura 10. Efecto del 1-pentanol sobre el ERG. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de ERG que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--) y al periodo de lavado (-.-), respectivamente. El registro del ERG en presencia de 1-pentanol (18 mM) no muestra cambios significativos con respecto al ERG control (respuesta 10) o al ERG después del lavado (respuesta 30).

5.1.4 EFECTO DEL HEXANOL SOBRE EL ERG.

En la figura 11 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en el que se aplicó hexanol como sustancia experimental. El efecto del hexanol fue una drástica reducción en todos los parámetros del ERG. A diferencia de lo que se observa con el propanol y el pentanol, el hexanol sí produjo cambios significativos pues la amplitud de las componentes HI y HII en la respuesta 20 se ven disminuidas con respecto a la etapa control (respuesta 10). Sin embargo, la recuperación después del lavado fue notable. La duración de la componente HI también se vio reducida en la respuesta 20 con respecto a la respuesta 10, aunque al igual que las amplitudes HI y HII se recuperó de manera notable al realizar el lavado; sólo la τ no se vio afectada por el alcohol. La tabla 2 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros obtenidos del promedio de todos los experimentos. Se puede observar que en lo que se refiere a la amplitud de la HI, al agregar el alcohol hubo un descenso gradual que se manifestó en la respuesta 20 con una reducción de aproximadamente el 46% de los valores en la etapa control. Una vez removido el alcohol se obtuvo una recuperación gradual hasta la respuesta 30 en la que la amplitud alcanzó un valor del 97% con respecto al valor de la respuesta 10. En cuanto a la amplitud de HII se observó un descenso gradual hasta un 60% en la respuesta 20 comparada con la respuesta control. Los valores de la duración de HI mostraron una reducción gradual del 44% en la respuesta 20 con respecto a los valores control. A consecuencia del lavado (respuesta 30), la duración de la HI se recuperó hasta el 79% del valor de la respuesta 10. La de la respuesta 20 sólo se redujo un 10% con respecto a la de la respuesta 10 y alcanzó en la respuesta 30 los mismos valores de la respuesta control.

El análisis estadístico utilizado (tabla 3) mostró que en lo que se refiere al voltaje máximo de HI y HII, en la respuesta 20, hubo diferencias significativas con respecto al testigo, sin embargo en la respuesta 30 las diferencias ya no se presentaron, lo que significa que el hexanol redujo la amplitud de la HI y la

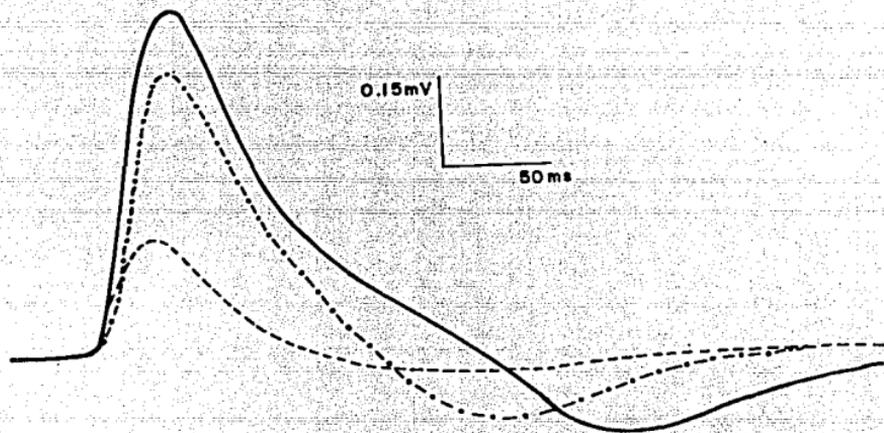


Figura 11. Efecto del 1-hexanol sobre el ERG. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de ERG que corresponden al periodo control(-), al periodo de prueba (--) y al periodo de lavado (-.-), respectivamente. Por la acción del 1-hexanol el ERG muestra una clara disminución de los parámetros utilizados para caracterizarlo (respuesta 20), en relación con la respuesta control (respuesta 10). La acción del hexanol es, sin embargo, reversible, ya que después del lavado los parámetros del ERG recuperan los valores iniciales (respuesta 30).

HII, pero que su acción fue reversible. La duración de la HI y la de la respuesta 20 también tuvieron diferencias significativas con respecto al testigo, aunque en la respuesta 30 estas diferencias desaparecieron; lo que significa que en la respuesta 20 el hexanol tuvo un claro efecto sobre estos parámetros el cual desapareció en la respuesta 30, como resultado del lavado.

5.1.5 EFECTO DEL HEPTANOL SOBRE EL ERG.

En la figura 12 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa el efecto del heptanol sobre cada uno de los parámetros antes mencionados. Al igual que con el hexanol se observa que tanto la amplitud de la componente HI como la de la HII de la respuesta 20 se ven disminuidas con respecto a la etapa control (respuesta 10), y que como consecuencia del lavado, tuvieron una notable recuperación. También la duración de HI se muestra reducida en comparación con la del control aunque al igual que las amplitudes de HI y HII se recupera de manera evidente al realizar el lavado. Por lo que respecta a la τ , ésta se vio sólo ligeramente reducida por la acción del heptanol con una recuperación completa después del lavado. La tabla 2 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos. Se puede observar que en lo que se refiere a la amplitud de la HI, al agregar el alcohol hubo un descenso gradual del 46% comparado con la respuesta control. Una vez removido el alcohol se observó una recuperación, igualmente gradual, hasta la respuesta 30 la que llegó al 70% de los valores control. En cuanto a la amplitud de la HII ocurrió básicamente lo mismo, con una caída en la respuesta 20 hasta un 55% del valor de la respuesta 10 y una recuperación, después del lavado, al 82% del valor de la respuesta 10. Los valores de la duración de la HI mostraron una reducción gradual hasta un 40% en la respuesta 20 y su recuperación en la respuesta 30 después de realizar el lavado, también fue gradual hasta alcanzar el 76% del valor control. Los valores de la τ tuvieron un decremento gradual hasta la respuesta 20 del 8% con respecto a los valores control, una vez que se hubo

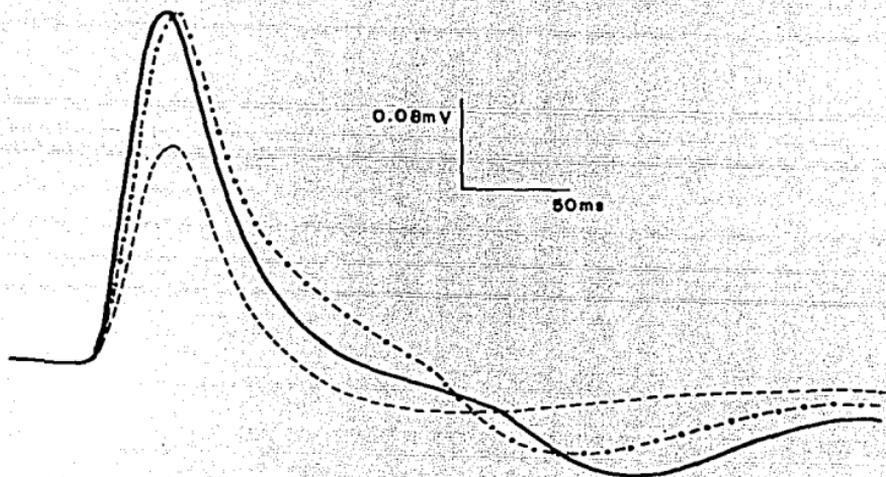


Figura 12. Efecto del 1-heptanol sobre el ERG. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de ERG que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--) y al periodo de lavado (-.-). El registro del ERG en presencia de 1-heptanol (2 mM) (respuesta 20) muestra una clara disminución de los parámetros utilizados para caracterizar el ERG en relación con la respuesta control (respuesta 10), aunque al realizar el lavado hay una recuperación de las características originales del ERG, lo que pone de manifiesto el carácter reversible de la acción del heptanol.

lavado la preparación, la respuesta se recuperó ligeramente por arriba del valor control del 100%.

El análisis estadístico utilizado (tabla 3) mostró que en lo que se refiere a la amplitud de la HI, la amplitud de la HII y la duración de la HI en la respuesta 20, sí hubo diferencias significativas con respecto al testigo, diferencias que desaparecieron en la respuesta 30. Esto significa que el heptanol produjo una clara reducción de los valores de estos tres parámetros y que tal acción desapareció como consecuencia del lavado, lo que pone de manifiesto el carácter reversible del efecto que produce el heptanol sobre estas características del ERG. En cuanto a la τ en la respuesta 20, no mostró diferencias significativas con respecto al testigo. Tampoco difirió de éste en la respuesta 30 lo que implica que el heptanol no tuvo ninguna acción significativa sobre este parámetro.

5.2 REGISTROS INTRACELULARES

Al introducir un electrodo intracelular en la célula retinular se observa una brusca caída de potencial de -30 mV aproximadamente y que representa el potencial de membrana de la célula. Si en estas condiciones se aplica un destello luminoso se registra un potencial de receptor (PR) el cual consta de dos fases: una despolarización rápida, transitoria, cuya magnitud parece depender de la intensidad del estímulo, seguida por una despolarización lenta, sostenida, la cual se ha asociado con la duración del estímulo luminoso. Por lo general se les designa como fases transitoria y estable, respectivamente. La figura 13 muestra un registro típico del PR tal y como se obtenía al inicio de los experimentos.

5.2.1 EXPERIMENTOS TESTIGO DEL POTENCIAL DE RECEPTOR (PR)

En la figura 14 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa que la fase transitoria no sufre cambios al realizar el primer cambio de solución y en el segundo cambio de solución varía muy poco. En cuanto a la fase

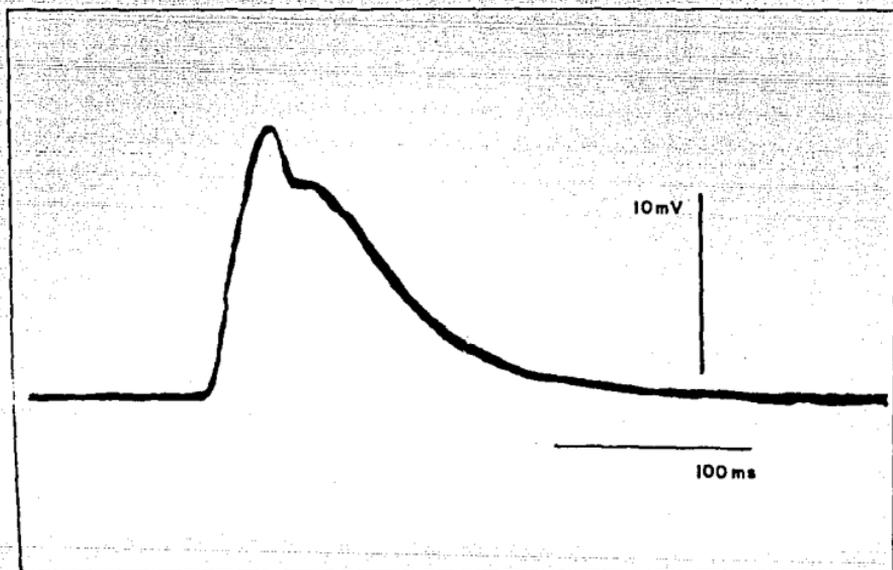


Figura 13. Respuesta típica de un potencial de receptor en una célula retinular del acocil. Nótese la diferencia de amplitud entre las fases transitoria y estable.

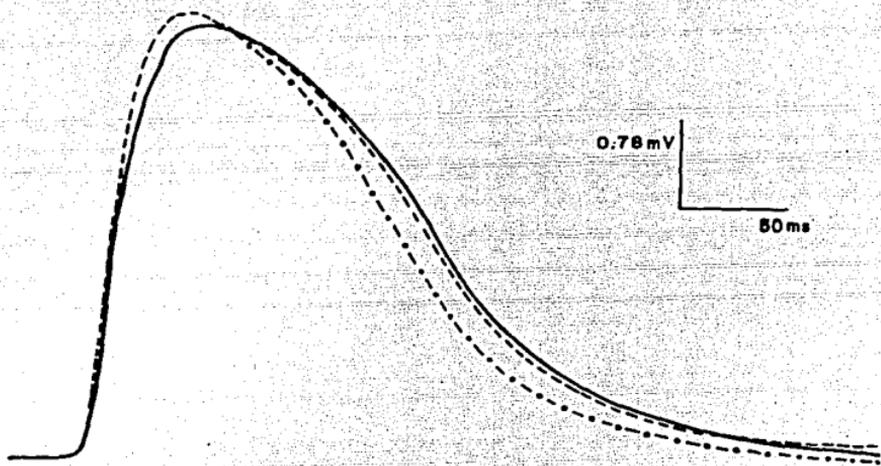


Figura 14. Registro testigo del PR durante distintos momentos del experimento obtenido de una preparación que estuvo sumergida en solución salina de Van Harreveld durante todo el experimento. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--) y al periodo después del lavado (-.-), respectivamente. Es evidente la ausencia de cambios importantes en los parámetros utilizados para caracterizar el PR, es decir, el valor de la amplitud de la fase transitoria, la fase estable y la duración de la respuesta durante cada etapa del experimento.

estable tampoco se modificó al realizar el primer cambio de solución y al igual que la fase transitoria, sólo sufrió pequeños cambios durante el segundo cambio de solución. La duración de la respuesta tampoco se modificó al realizar el primer cambio de solución pero sí disminuyó durante el segundo cambio. La tabla 4 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos. Se puede observar que en lo que se refiere a los valores de la fase transitoria, en la respuesta 20 hubo un decremento de aproximadamente el 4% y que en la respuesta 30 estos valores alcanzaron un 89% de los valores control. En cuanto a los valores de la fase estable al igual que los de la fase transitoria tuvieron un decremento en la respuesta 20 del 4%, pero a diferencia de los valores de la fase transitoria, en la respuesta 30 alcanzaron un 90% de los valores control. Por lo que respecta a los valores de la duración de la respuesta, estos no sufrieron cambios evidentes durante los cambios de solución.

El análisis estadístico utilizado (tabla 5) nos permitió comparar cada uno de los tratamientos con el tratamiento testigo. Como la respuesta 10 equivale al 100% en todos los tratamientos utilizados incluyendo al testigo, sólo se compararon las respuestas número 20 es decir la que se obtiene después de que la preparación estuvo bajo el efecto del alcohol y las respuestas número 30 que son aquéllas que se registraron una vez que la preparación fue lavada.

5.2.2 EFECTO DEL PROPANOL SOBRE EL PR.

En la figura 15 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa que no hay cambios significativos por efecto del propanol sobre el potencial de receptor ya que la fase transitoria, la fase estable y la duración se vieron muy poco modificadas una vez que se agregó el alcohol, y después de realizar el lavado de la preparación. La tabla 4 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos.

TRATAMIENTO	FASE TRANSITORIA (FT) (%)			FASE ESTABLE (FE) (%)			DURACION DE LA RESPUESTA (%)		
	R10	R20	R30	R10	R20	R30	R10	R20	R30
TESTIGO	100	96.73	89.69	100	96.39	90.07	100	101.56	95.82
PROPANOL	100	93.20	83.59	100	93.13	83.89	100	91.77	92.98
PENTANOL	100	98.40	84.39	100	100.75	86.92	100	86.11	87.62
HEXANOL	100	31.64	71.03	100	31.14	74.01	100	41.65	86.46
HEPTANOL	100	25.98	58.67	100	26.92	61.06	100	59.91	68.00

Tabla 4. Valores porcentualizados de las respuestas 10, 20 y 30 de cada uno de los parámetros medidos para caracterizar el PR obtenidos de todos los experimentos.

TRATAMIENTO	FASE TRANSITORIA (FT) VALORES PROMEDIO		FASE ESTABLE (FE) VALORES PROMEDIO		DURAC. DE LA RESP. VALORES PROMEDIO	
	R20	R30	R20	R30	R20	R30
TESTIGO	96.72	89.69	96.39	90.06	101.56	95.82
PROPANOL	93.19	83.59	93.12	83.88	91.76	92.98
PENTANOL	98.40	84.39	100.74	86.92	86.11	87.62
HEXANOL	31.64*	71.03	31.14*	74.01	49.09*	86.45
HEPTANOL	25.97*	70.73	26.92*	61.05	69.90*	84.99

Tabla 5. Valores promedio obtenidos por la prueba de Scheffé de las respuestas 20 y 30 de cada uno de los parámetros medidos para caracterizar el PR. Coeficiente de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$). * Diferencias estadísticamente significativas con relación al tratamiento testigo.

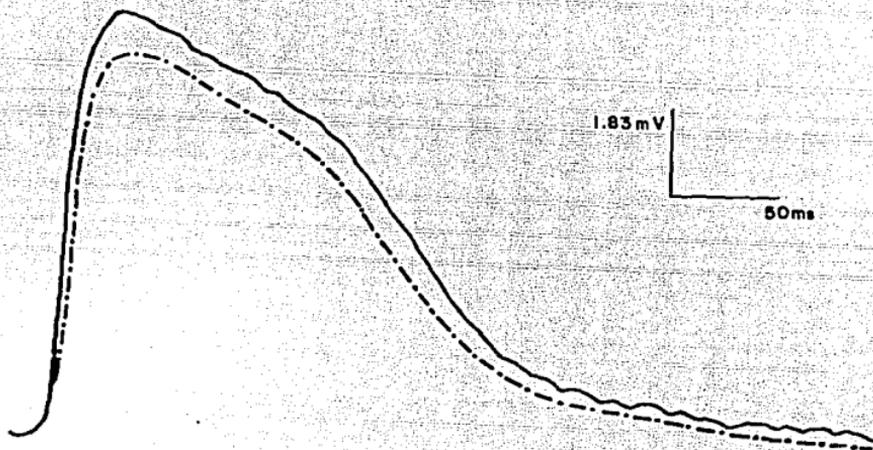


Figura 15. Efecto del 1-propanol sobre el PR. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de PR que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--), (no se muestra en el dibujo ya que se sobrepone con el periodo después del lavado) y al periodo después del lavado (-.-), respectivamente. El registro del PR en presencia de 1-propanol (81 mM) (respuesta 20) no muestra cambios significativos con respecto al PR control (respuesta 10) o al PR después del lavado (respuesta 30).

Se puede observar que en lo que se refiere a los valores de la fase transitoria y de la fase estable, al agregar el alcohol mostraron una leve reducción del 7% con respecto a los valores control (respuesta 10). Al realizarse el lavado mostraron otro decremento y alcanzaron un valor del 83% del valor control. En cuanto a la duración el PR mostró una reducción del 10% en la respuesta 20 con respecto a los valores control (respuesta 10) y así se mantuvo hasta el final de los experimentos (respuesta 30).

El análisis estadístico (tabla 5) puso de manifiesto que en lo que se refiere a la fase transitoria, la fase estable y la duración, en las respuestas 20 y 30, estos parámetros no mostraron diferencias significativas con respecto al testigo. Esto significa que el propanol no produjo ningún efecto sobre estas características del potencial de receptor.

5.2.3 EFECTO DEL PENTANOL SOBRE EL PR.

En la figura 16 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa que con la aplicación de pentanol ocurrió lo mismo que con el propanol ya que la fase transitoria, la fase estable y la duración se vieron muy poco afectadas por él y al realizar el lavado tampoco hubo cambio en estos tres parámetros. En la tabla 4 se muestran los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos. Se puede observar que como consecuencia de la aplicación del pentanol la fase transitoria se redujo en un 2% con respecto a los valores control y al realizar el lavado disminuyó más hasta alcanzar un valor del 84% con respecto a los valores control (respuesta 10). En lo que se refiere a la fase estable este alcohol no tuvo efecto alguno sobre este parámetro (respuesta 20) aunque al realizar el lavado se observó un decremento de los valores hasta alcanzar un 86% (respuesta 30) con respecto a los valores control. En cuanto a la duración se observó una reducción de manera gradual hasta en un 15% en la respuesta 20, y así se mantuvo durante todo el tiempo del experimento.

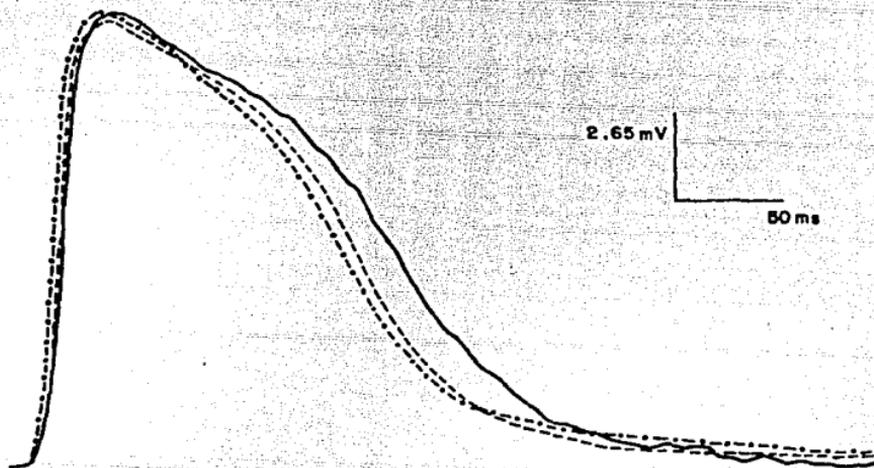


Figura 16. Efecto del 1-pentanol sobre el PR Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de PR que corresponden al periodo control(-), al periodo de prueba (--) y al periodo después del lavado (-.-), respectivamente. El registro del PR en presencia de 1-pentanol (9 mM) (respuesta 20) no muestra cambios significativos con respecto al PR control (respuesta 10) o al PR después del lavado (respuesta 30).

El análisis estadístico utilizado (tabla 5) mostró que en lo que se refiere a la fase transitoria y la fase estable, en la respuesta 20, no hubo diferencias significativas entre los valores del testigo y los valores obtenidos por la aplicación del pentanol; sin embargo, en la duración de la respuesta si se observaron diferencias significativas. En la respuesta 30, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros entre los valores del testigo y los experimentales.

5.2.4 EFECTO DEL HEXANOL SOBRE EL PR.

En la figura 17 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa que a diferencia de lo que sucede con el propanol y el pentanol los tres parámetros se ven afectados de manera clara por la aplicación del hexanol ya que muestran una clara disminución en relación con la respuesta control. Al realizar el lavado los tres parámetros se recuperaron y mostraron características similares a las que presentaron en la respuesta control (respuesta 10). La tabla 4 muestra los valores porcentualizados para cada uno de los parámetros medidos obtenidos del promedio de todos los experimentos. Se puede observar que en lo que se refiere a los valores de la fase transitoria y de la fase estable, al agregar el alcohol hubo un notable descenso gradual de un 70% con respecto a los valores de la etapa control en la respuesta 20, una vez removido el alcohol hubo una recuperación igualmente gradual hasta alcanzar el 70% del valor de la respuesta control en la respuesta 30. En lo que se refiere a la duración, al agregar el alcohol se observó una reducción gradual en un 50% de los valores control y con el lavado una recuperación hasta el 86% de los valores control.

El análisis estadístico utilizado (tabla 5) mostró que en lo que se refiere a la fase transitoria, la fase estable y la duración de la respuesta 20, hubo diferencias significativas entre los testigos y los experimentales, diferencias que desaparecieron en la respuesta 30. Esto significa que el hexanol tiene un efecto reversible en las características del PR.

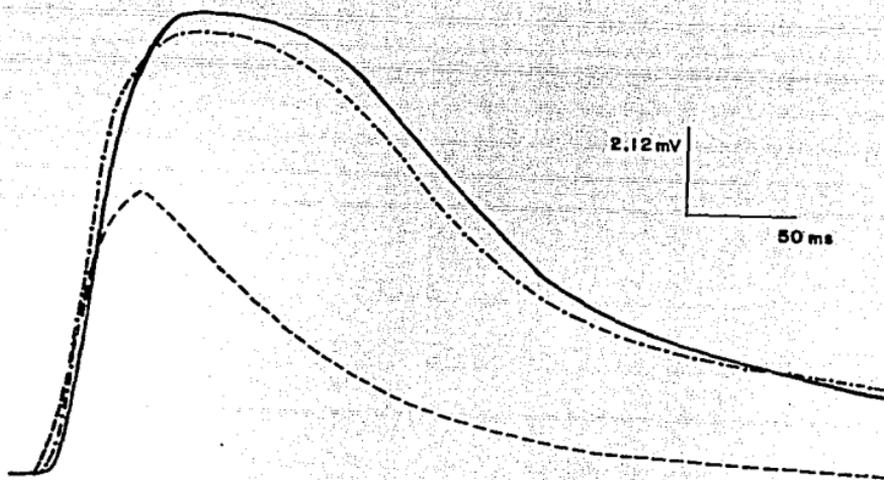


Figura 17. Efecto del 1-hexanol sobre el PR. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de PR que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (- -) y al periodo después del lavado (-.-), respectivamente. El registro del PR en presencia de 1-hexanol (3 mM) (respuesta 20) muestra una clara disminución de los parámetros utilizados para caracterizarlo en relación con la respuesta control (respuesta 10) aunque al realizar el lavado estos parámetros se recuperan y sus características son muy similares a las que presenta el control (respuesta 30).

5.2.5 EFECTO DEL HEPTANOL SOBRE EL PR.

En la figura 18 se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico en donde se observa que, al igual de lo observado con hexanol, los tres parámetros que se están midiendo (FT, FE y duración) están considerablemente disminuidos en relación con la respuesta control como resultado de la aplicación del heptanol. Al hacerse el lavado del alcohol y regresar la preparación a la solución de Van Harreveld se observó, en la respuesta 30, una clara recuperación de los parámetros con respecto a los valores control (respuesta 10). La tabla 4 muestra los valores porcentualizados obtenidos del promedio de todos los experimentos. En lo que se refiere a los valores de la fase transitoria y de la fase estable, al agregar el alcohol mostraron un notable descenso gradual desde la respuesta 10 hasta la respuesta 20 ya que en ésta alcanzaron el 25% del valor de la respuesta control. Una vez removido el alcohol se observó una recuperación igualmente gradual hasta la respuesta 30 aun cuando ésta sólo alcanzó el 60% de los valores control. Por lo que se refiere a la duración, el alcohol produjo una reducción gradual hasta un 40% de los valores control y al realizar el lavado mostró una recuperación que la llevó a alcanzar, aproximadamente, el 68% de los valores control.

El análisis estadístico que se empleó (tabla 5) mostró que los tres parámetros del potencial de receptor medidos en la respuesta 20 de las preparaciones puestas en heptanol, difirieron en forma significativa comparados con los valores de los parámetros del experimento testigo en la respuesta 20. No sucede lo mismo cuando los mismos parámetros se miden en la respuesta 30, es decir, después del lavado, ya que en este caso, los valores que muestran son prácticamente iguales si la preparación recibió heptanol o si se mantuvo todo el tiempo en solución salina. Es evidente que estos hechos tienen su explicación en una acción reversible del heptanol sobre las características fundamentales del potencial de receptor.

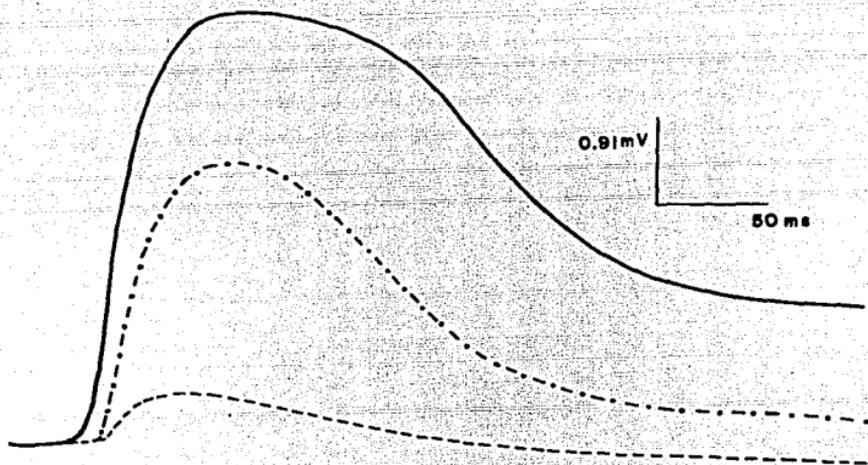


Figura 18. Efecto del 1-heptanol sobre el PR. Se muestra los trazos 10, 20 y 30 de un experimento típico de PR que corresponden al periodo control (-), al periodo de prueba (--) y al periodo después del lavado (-.-), respectivamente. El registro del PR en presencia del 1-heptanol (1 mM) (respuesta 20) muestra una clara disminución de los tres parámetros que se están midiendo en relación con la respuesta control (respuesta 10). Una vez realizado el lavado el PR recupera sus características iniciales lo que pone de manifiesto el carácter reversible de la acción del heptanol sobre el PR.

6. DISCUSION

La permeabilidad de las uniones comunicantes puede reducirse hasta el desacoplamiento total entre las dos células, por medio de una gran variedad de tratamientos que incluyen el daño celular, la inhibición del metabolismo, el incremento de la acidez del medio, etc. El efecto desacoplante de estos tratamientos ha sido atribuido a la participación del calcio y de los hidrogeniones sobre las proteínas que forman parte del canal de la unión comunicante. Sin embargo debe señalarse que la aplicación de algunas sustancias eléctricamente neutras como los alcoholes y otros tipos de anestésicos también producen desacoplamiento de las uniones comunicantes sin que se conozca cuál es el mecanismo por medio del que actúan.

El registro extracelular de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma, ERG) de los fotorreceptores visuales del acocil que empleamos en la primera parte experimental de este trabajo, muestra algunas ventajas que vale la pena destacar. En efecto, junto con la facilidad de su obtención desde el punto de vista técnico, el registro del ERG tiene la ventaja de proporcionar información directa acerca del efecto que ejerce la maniobra experimental que se lleve a cabo sobre las células fotorreceptoras del ojo del acocil ya que depende de la activación de ellas, sin participación alguna de otras estructuras del ojo. Aunque en otras especies de artrópodos se ha encontrado que el ERG depende de los fotorreceptores y de otras estructuras neurales (Parker, 1932) no es el caso del acocil (Naka y Kuwabara, 1959). Las dos componentes del ERG del acocil, las llamadas HI y HII, son el resultado de la activación de los rhabdomos y de las células retinulares, respectivamente (Naka y Kuwabara, 1959).

El ERG es un potencial de campo que resulta de la activación simultánea del conjunto de células fotorreceptoras que forman parte del ojo del acocil; es decir, de la suma de los potenciales de receptor (PR) de cada una de las células estimuladas por la luz. Entonces, las características de amplitud y duración del ERG

dependen, en principio, de las propias células fotorreceptoras, de sus posibilidades de acoplamiento, así como de la ubicación del electrodo de registro. Por otro lado, el empleo de estímulos breves (15 μ s) e intensos (1800 lx) que abarcan el ojo en toda su extensión, permite la activación simultánea del conjunto de células fotorreceptoras que forman el ojo. Entonces, el empleo del registro del ERG permite el análisis del comportamiento conjunto de las células fotorreceptoras.

Por otro lado, en la segunda etapa de este trabajo se empleó como herramienta el análisis del PR de los fotorreceptores visuales. Hay que destacar algunos aspectos importantes en torno al PR pues son los puntos de comparación que nos permiten asegurar que nuestros registros proceden de células retinulares. El PR de las células retinulares del acocil tiene esencialmente las mismas características que se encuentran en los fotorreceptores de otras especies de invertebrados. Es una respuesta graduada que consiste de una despolarización rápida, la fase transitoria (FT), cuya amplitud mantiene una relación logarítmica con respecto a la intensidad del estímulo aplicado, seguida de una despolarización sostenida, la fase estable (FE), que antecede a la repolarización. Las características del PR dependen de la duración del estímulo, del estado de adaptación a la luz o a la oscuridad y de la disponibilidad de algunos iones intra y extracelulares (Naka y Kuwabara, 1959; Eguchi, 1965; Glantz, 1968; Muller, 1973; Stieve y Claßen-Linke, 1980; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Cummins y Goldsmith, 1986; Picones y Aréchiga, 1990; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991). No se conoce nada acerca de los mecanismos inherentes a la repolarización.

La entrada del electrodo a la célula pone de manifiesto un cambio brusco en el trazo oscilográfico que marca una despolarización alrededor de los -30 mV aproximadamente la cual corresponde al potencial de membrana de las células retinulares. La amplitud de las respuestas que se registraron para este trabajo se encuentra entre los 8 y los 10 mV, la duración de los trazos registrados fue de 400 ms aun cuando la duración de las respuestas generalmente era mayor a este tiempo; en los trazos

son evidentes las dos fases del PR, la FT y la FE así como la fase de repolarización (Fig. 13). Estos datos son coincidentes con los reportados por otros autores por lo que podemos afirmar que nuestros resultados tienen su origen en las células retinulares.

6.1 EFECTO DE LOS ALCOHOL DE CADENA LARGA SOBRE EL ERG

El método empleado para analizar los efectos de los alcanos se diseñó para obtener una condición inicial en la que la constancia en la amplitud y en la duración del ERG asegurara la viabilidad de la preparación. La técnica de perfusión permitió la difusión del alcohol desde la base del tallo ocular hasta la región fotorreceptora y el lavado con la solución de VH al cabo de treinta minutos. Así, cada preparación era su propio control. La llegada del alcohol desde la base del tallo ocular aseguraba que sus acciones se efectuarían sobre la mayor parte de las células retinulares.

La amplitud y la duración de un potencial de campo dependen de la suma en el espacio y en el tiempo de los cambios de voltaje de los elementos celulares que en él participan. Por ejemplo, la descarga simultánea de grandes grupos de neuronas produce la sincronización del electroencefalograma (el ritmo α); la descarga de grupos de neuronas activadas durante la epilepsia produce una desincronización que reduce en forma importante tanto el voltaje como la duración de las ondas registradas (el llamado ritmo β); la amplitud y la duración de un electrograma de superficie de miocardio dependen del acoplamiento entre las células que componen el tejido, de tal manera que un aumento en la resistencia de unión (R_j) entre las uniones comunicantes reduce ambas, la amplitud y la duración del electrograma (Spear y cols., 1990).

El ERG del acocil resulta de la respuesta sincrónica de las células fotorreceptoras. La amplitud y las componentes del trazo dependen de la posición del electrodo y del número y la sincronía en la descarga de las células retinulares. Como cada registro que se realizó presentó las dos componentes del ERG (la HI y la HII)

es plausible proponer que la posición del electrodo fue siempre equivalente, por lo que los resultados observados se pueden atribuir a la presencia de los alcoholes empleados. Dada una posición fija del electrodo de registro y una iluminación constante del ojo, la amplitud y la duración del ERG deben mantenerse constantes. Si las células retinulares se encuentran comunicadas entre sí mediante uniones comunicantes, ello implicaría que un aumento en la amplitud y la duración del ERG podría estar asociado con la apertura de un mayor número de canales de unión; y el cierre de las uniones se podría asociar con una reducción en la amplitud y la duración del ERG.

El propanol y el pentanol no produjeron cambios detectables en ninguno de los parámetros medidos del ERG (figuras 9 y 10, tabla 2). Los alcoholes de cadena corta (entre 1 y 5 carbonos) producen cambios de tipo inespecífico sobre la mayoría de las células estudiadas (Spray y Bennet, 1985); estos efectos, que dependen de la concentración empleada, se han asociado con la destrucción de membranas celulares y son irreversibles en el corto plazo. La falta de efecto encontrado en nuestros experimentos nos permite aseverar que las concentraciones empleadas no produjeron daños en las membranas celulares de las células retinulares ni tampoco modificaron la organización funcional del tallo ocular.

La adición de hexanol o de heptanol redujo en forma importante la amplitud y la duración de la respuesta. El origen de estos efectos se puede ubicar dentro de la retina o sobre alguna de las estructuras del tallo ocular. En el primer caso, la reducción en la respuesta podría deberse al bloqueo de las postuladas uniones comunicantes entre las células retinulares de una misma omatidia (Muller, 1973); el desacoplamiento de estas uniones implicaría un incremento en la resistencia entre ellas y, por tanto, una disminución en la amplitud y en la duración del potencial de campo registrado. En fibras ventriculares de perro, el heptanol aumenta la resistencia transversal, la resistencia longitudinal y la constante de tiempo de las membranas (Spear y cols., 1990), lo que resulta en una disminución en el electrograma de superficie de las fibras. Efectos similares del

heptanol sobre las uniones comunicantes, se han observado en otros tipos de células que incluyen desde blastómeros hasta neuronas (Johnston y cols., 1980; Spray y Bennet, 1985; Chanson y cols., 1989; Meda y cols., 1990; Spear y cols., 1990; Brugada y cols., 1991). Cabe destacar en estos momentos que aunque en algunos artrópodos y moluscos parece haber uniones que permiten la comunicación eléctrica entre las células de una misma omatidia, éstas no se han identificado en el acocil (Lasansky, 1967; Eakin, 1971). Sin embargo, si parecen existir uniones de otro tipo como desmosomas en banda que, justo a un lado del rabdomo, rodean la omatidia y parecen mantener la estructura de la misma (Shröder y cols., 1979; Shaw y Stone, 1982). También se han encontrado uniones entre las células de los conos cristalinos las cuales también parecen desempeñar el papel de sustentadoras de la estructura de la omatidia (Roach, 1976). Es decir, desde el punto de vista anatómico no se cuenta con evidencias relacionadas con el intercambio de información entre las células retinulares a través de uniones comunicantes de una misma omatidia, lo que no invalida, sin embargo, la posibilidad de que la reducción reversible en la amplitud y en la duración del ERG observada con hexanol y con heptanol se deban al bloqueo de las uniones postuladas por Muller (1973).

Otra posibilidad, que se discutirá con mayor amplitud en relación a los registros intracelulares, reside en las acciones que los alcanoles de cadena larga tienen directamente sobre diferentes tipos de canales iónicos membranales. Debido a que los alcoholes empleados difundieron desde la base del tallo ocular hasta la región retinular no es posible descartar que los efectos del hexanol y del heptanol se originen de modificaciones directas sobre otra, u otras estructuras del tallo ocular. No está descrita una regulación eferente sobre las células retinulares del acocil; sin embargo, en algunos insectos se ha demostrado la presencia de comunicación eléctrica entre axones de células retinulares de una misma omatidia o de diferentes omatidias a nivel de la lámina ganglionar (Van Hateren, 1986).

Dentro de estas mismas consideraciones, hay que señalar una estructura de capital importancia en la regulación de un buen

número de funciones del acocil, el sistema órgano X-glándula sinusal. En esta última se ha descrito, recientemente, la presencia de uniones comunicantes entre los axones que la conforman (Aréchiga, 1993). El bloqueo de tales uniones por parte del heptanol podría resultar en un incremento en la liberación de hormonas, como ocurre en otras estructuras secretoras (Chanson y cols., 1989; Heda y cols., 1990). De las hormonas liberadas por la glándula sinusal, la dispersora del pigmento distal (HDPD) mueve el pigmento distal hacia la posición de adaptación a la luz y reduce la magnitud del ERG (Kleinholz, 1966; Moreno-Sáenz y cols., 1987). En el tallo ocular aislado los pigmentos retinianos accesorios muestran poca capacidad para migrar (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) por lo que los efectos producidos por el hexanol y el heptanol no se pueden atribuir a cambios en la posición del pigmento retiniano distal. Sin embargo, si estos alcoholes al bloquear la uniones comunicantes de la glándula sinusal incrementan la liberación de HDPD, la magnitud del ERG, así como su duración, se reducirían por acción directa de la hormona sobre las células retinulares (Hernández-Falcón y cols., 1987).

6.2 EFECTO DE LOS ALCANOLES SOBRE EL PR

Las características de los PR registrados se encuentran dentro de lo reportado por diversos autores (Eguchi, 1965; Fuentes-Pardo y cols. 1984). El método de estudio fue equivalente al empleado para el ERG, es decir, 30 minutos en solución VH, 30 minutos más en la solución con alcohol y un mínimo de 30 minutos más después del lavado con solución VH.

De las dos componentes del PR de las células retinulares, la fase transitoria (FT) determina la amplitud de la respuesta y la fase estable (FE) la duración de la misma. Por tanto, la FT está relacionada con la intensidad del estímulo, mientras que la FE lo está con la duración del mismo. La amplitud y la duración de las fases del PR se modifican en función del estado de adaptación a la luz o a la oscuridad a la que se haya sometido a los fotorreceptores. La iluminación de la célula retinular reduce el

voltaje y la duración del PR y esta reducción se ha asociado, al igual que en otros tipos de fotorreceptores de invertebrado, con una elevación en los niveles de calcio libre intracelular. La adaptación a la oscuridad o la disminución en la disponibilidad de calcio tienen efectos opuestos a los que ocurren por la presencia de luz; es decir, incrementan la amplitud y la duración del PR (Lisman y cols., 1975; Bader y cols., 1976; Payne y cols., 1986; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991).

La adición de propanol o de pentanol no produjo cambio alguno sobre el PR registrado, lo cual indica, nuevamente, que a las concentraciones empleadas no hubo daño celular ni funcional. Los efectos del hexanol y del heptanol son equivalentes; en ambos casos la respuesta se redujo en amplitud y en duración y hubo reversibilidad de la acción. Los cambios observados como resultado de la adición de estos dos alcoholes tienen semejanza con los que se obtienen por iluminación de las células retinulares. Es decir, hay una reducción de la amplitud de las dos fases del PR así como disminución en la duración total de la respuesta. El efecto es más marcado con el heptanol que con el hexanol.

El bloqueo de las uniones comunicantes no modifica por sí mismo las características del potencial de acción en los axones septados del acocil (Johnston y Ramón, 1980; Paracchia y Girsch, 1985), solamente reduce la capacidad de transmisión del cambio de voltaje a través del septo. Otros bloqueadores de las uniones comunicantes como el octanol tienen propiedades similares y tampoco afectan en forma sustancial los potenciales de acción ni las velocidades de despolarización (Brugada y cols., 1991; Paracchia y Girsch, 1985). Por ello, es difícil adjudicar los cambios encontrados en el PR al bloqueo de uniones comunicantes a niveles fuera de la retina. Sería más congruente asociar la reducción que se observa en el PR a efectos del hexanol y del heptanol producidos directamente sobre la membrana de la célula retinular o sobre los canales iónicos que participan en la generación del cambio de voltaje. Hasta la fecha no se han reportado registros con fijación de voltaje de las células retinulares del acocil; sin embargo, se cuenta con evidencias

indirectas de que en la generación del PR participan la entrada de iones de sodio y de calcio que serían los responsables de la FT y de la FE, respectivamente (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991).

En diversos trabajos se han demostrado acciones directas de varios alcoholes (heptanol y octanol, principalmente) sobre distintos tipos de canales iónicos entre los que se incluyen canales rápidos de sodio (Oxford y Swanson, 1979; Hirche, 1985; Brugada y cols., 1991; Nelson y Maklanski, 1991), canales lentos de calcio (Llinás y Yarom, 1986; Pott y Meckmann, 1990) y canales de potasio (Moore y cols., 1964; Paternostre y Pichon, 1981). En la mayoría de los casos los efectos son de inhibición sobre la cinética de cierre y apertura del canal, de inactivación completa del mismo o de canales vecinos; también se ha descrito un efecto bloqueador que se potencia cuando existe algún grado de lesión membranal (Brugada y cols., 1991). Algunas de las estructuras en las que se ha demostrado esta acción de los alcoholes son los miocitos cardíacos aislados, las células acinares, las fibras nerviosas mielinizadas, etcétera. Por ello, es muy probable que la reducción en las características del PR que se observa al agregar el hexanol o el heptanol obedezca a la acción directa de estos alcoholes de cadena larga sobre los canales iónicos de la membrana de la célula retinular. El supuesto bloqueo de los canales de calcio daría lugar a una disminución en la entrada de sodio y de calcio a la célula, lo que reduciría la amplitud y la duración del PR. La recuperación observada con el lavado estaría orientada en el mismo sentido ya que se ha reportado que el lavado retira casi por completo el alcohol empleado, a pesar de que sus efectos persisten durante unos 20 minutos después del lavado (Johnston y Ramón, 1981).

Otra línea de interpretación de nuestros resultados se encuentra en las llamadas acciones inespecíficas de los alcoholes, las cuales son compartidas por otras sustancias como algunos aldehídos y anestésicos. Tales acciones consisten en cambios que se han explicado de diversas formas que incluyen modificaciones en la fluidez de la membrana, en los potenciales de dipolo, en la tensión superficial, en el espesor o en la

distribución de cargas en la superficie de las membranas, etcétera (Johnston y cols., 1980; Haydon y cols., 1984). Estas acciones producen cambios en algunas propiedades de la membrana como la constante de longitud, la resistencia transmembrana y la velocidad de conducción (Johnston y Ramón, 1981; Spear y cols., 1990), lo que se refleja en la disminución de la amplitud y la duración de las respuestas electrotónicas. Así, un aumento en la resistencia o en la constante de longitud de la membrana de la célula retinular podría ser la causa de la disminución de la amplitud y la duración del PR.

Evidentemente las acciones inespecíficas de los alcoholes de cadena larga sobre algunas propiedades celulares, en particular sobre las propiedades de membrana, pueden dar como resultado la reducción de la amplitud del PR de cada célula fotorreceptora con la consiguiente reducción en el ERG.

Las técnicas más empleadas para poner en evidencia la presencia de uniones comunicantes son el paso de colorantes intracelulares entre el par de células supuestamente acoplado; el paso de corriente de una célula a otra; la acción de diferentes tipos de sustancias, como los alcoholes de cadena larga, sobre la comunicación intercelular; y el estudio histológico detallado, con técnicas de criofractura. Ninguna de estas técnicas asegura, por sí misma y de manera aislada, que las uniones sean funcionales.

Debido a la compleja organización de la omatidia del ojo compuesto del acocil, las técnicas de paso de colorante y de paso de corriente entre pares de células retinulares son difíciles de emplear.

En consecuencia, recurrimos al empleo de sustancias de reconocida acción desacoplante de las uniones comunicantes, con el fin de demostrar su presencia en los fotorreceptores visuales del acocil. Los datos que presentamos indican que dos de los alcoholes empleados, el hexanol y el heptanol, tienen efectos evidentes y reversibles sobre el ERG y el PR de estas células. Nuestros resultados apoyan dos tipos de acción de los alcoholes sobre las células retinulares: por un lado un efecto desacoplante de las uniones a nivel de la omatidia, de las estructuras

reguladoras extrarretinianas (el sistema Organo X-glándula sinusal) o de ambas; y por otro lado una acción directa específica sobre los canales iónicos de la membrana de la célula retinular, o una acción inespecífica, sobre las características de la membrana de la célula en estudio.

Discernir entre estos dos tipos de acciones u otros no determinados, requiere, evidentemente, de más experimentación, y sobre todo del empleo de técnicas que, hasta ahora, han sido muy difíciles de aplicar a las células visuales del acocil. No obstante, consideramos que los resultados que presentamos pueden contribuir al esclarecimiento de la organización anatómico funcional y de los mecanismos de regulación del sistema visual del acocil.

7. BIBLIOGRAFIA

Aréchiga, H. (1993) Comunicación personal.

Arellano, R. (1986). Modulación de las uniones comunicantes. Tesis de maestría. CINVESTAV. IPN.

Bader, C.R., F. Baumann y D. Bertrand. (1976). Role of intracellular calcium and sodium in light adaptation in the retina of the honey bee drone *Apis mellifera*. *J. Gen. Physiol.* 67: 475-491.

Bennett, H.V.L. (1973). Permeability and structure of electrotonic junctions and intercellular movement of tracers. En: *Intracellular staining techniques in Neurobiology* (S. Katar y C. Nicholson, eds.) Springer-Verlag, New York. pp 115-133.

Bennett, H.V.L. (1977). Electrical transmission: a functional analysis and comparison to chemical transmission. En: *Cellular Biology of Neurons, Handbook of Physiology of the Nervous System* (E. Kandel, ed.), Williams y Wilkins, Baltimore. 1: 357-416.

Bernardini, G y L.L. Peracchia. (1984). Reversible effects of heptanol on gap junction structure and cell-to-cell electrical coupling. *Eur. J. Cell Biol.* 34: 307-312.

Brugada, J., L. Mont., L. Boersma., C. Kirchhof y A. Allesie. (1991). Differential Effects of Heptanol, Potassium, and Tetrodotoxin on Reentrant Ventricular Tachycardia Around a Fixed Obstacle in Anisotropic Myocardium. *Circulation.* 84: 1307-1318.

Burt, J.M y D.C. Spray. (1989). Volatile anesthetics block intercellular communication between neonatal rat myocardial cells. *Circ. Res.* 65: 829-837.

Caspar, D.L.D., D.A. Goodenough., L. Makowski y W.C. Phillips (1977). Gap junction structures. 1. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J. Cell. Biol.* 74: 605-628.

Chanson, M., R. Bruzzone., D. Bosco y P. Meda. (1989). Effects of n-Alcohols on junctional coupling and amylase secretion of pancreatic acinar cells. *J. Cell. Physiol.* 139: 147-156.

Cummins, D.R. y T. H. Goldsmith. (1986). Responses of crayfish photoreceptor cells following intense light adaptation. *J. Comp. Physiol.* 158A: 35-42.

Dèléze, J y J.C. Hervé. (1983). Effect of several uncouplers of cell-to-cell communication on gap junction morphology in mammalian heart. *J. Membr. Biol.* 74: 203-215.

Dèléze, J y J.C. Hervé. (1986). Quantitative gap junction alterations in mammalian heart cells quickly frozen or chemically fixed after electrical uncoupling. *J. Membr. Biol.* 93: 11-21.

Delmar, M., D.C. Michaels., T.T. Johnson y J. Jalif. (1987). Effects of increasing intracellular resistance on transverse and longitudinal propagation in sheep epicardial muscle. *Circ. Res.* 60: 780-785.

Eakin, R.M. (1971). Structure of invertebrate photoreceptors. En: *Handbook of sensory physiology*, (H.J.A. Dartnall ed) Springer Verlag, Berlin, Germany. VII. 1: 625-684.

Eguchi, E. (1965). Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66: 411-429.

Eisenberg, R.S. y E.A. Johnson. (1970). Threedimensional electric field problems in physiology. En: *Progress in biophysics and molecular biology*, (J.A.V. Sitter y D. Noble, eds.). Oxford. 10: 1-65.

Estrada, L.Y. (1972). Cambios en la dinámica retiniana por efecto de la privación prolongada de luz en el acocil *Procambarus bouvieri*. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAH., México.

Exner, S. (1889). Durch licht bedingte Verschiebungen des Pigmentes in Insektenauge und deren physiologische Bedeutung. *Ebenda*; 983: 143-151. Citado por Parker, G.H. (1932).

Fingerman, M., M.E. Lowe y B.I. Sundararaj. (1958). Direct evidence for a distal retinal pigment dark adapting hormone in *Palaemonetes vulgaris*. (Abstract) *Biol. Bull.* 115: 351.

Flores, R., B. Fuentes, B. Barrera y H. Aréchiga. (1971). Análisis de la dinámica de las células pigmentarias accesorias de la retina del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann). XIV Congr. Nal de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec, Mor; Mex.

Fuentes-Pardo, B., J. Hernández-Falcón e I. Noguero. (1984). Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty-four hour. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 723-727.

Furshpan, E.J y D.D. Potter. (1959). Transmission at the giant motor synapses of crayfish. *J. Physiol.* (London). 145: 289-325.

Glaume, C., Kado, R.T y H. Korn. (1987). Voltage clamp analysis of a crayfish rectifying synapse. *J. Physiol.* 386: 91-112.

Glantz, R. M. (1968). Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish *Procambarus Clarki*. *Vision Res.* 8: 1407-1421.

Hanna, R.B., R.L. Ornberg y T.S. Reese. (1985). Structural details in rapidly frozen gap junctions. En: *Gap junctions*. (M.V.L. Bennett y D.C. Spray, eds.) Cold Spring Harbor, New York. pp. 23-32.

Harris, A.L., D.C. Spray y M.V.L. Bennett. (1981). Kinetic properties of a voltage-dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol.* 77: 95-117.

Hernández Falcon, J. (1984). Estudio del potencial de receptor en células retinulares de acocil durante el nictámero. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, UNAH., México.

Hernández-Falcón, J., E. Moreno-Sáenz, J. Farias y B. Fuentes-Pardo (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity-I. pseudopupil circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* B74:111-118.

Hernández-Falcón, J. y B. Fuentes-Pardo (1991). Crayfish retinular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 823-832.

Hirche, G. (1985). Blocking and modifying actions of octanol on Na channels in frog myelinated nerve. *Pflügers Arch.* 405: 180-187.

Johnston, M.F., S.A. Simon y F. Ramón. (1980). Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature.* 285: 498-500.

Johnston, M.F. y F. Ramón. (1981). Electrotonic coupling in internally perfused crayfish segmented axons. *J. Physiol.* 317: 509-518.

Kanno, Y. y W.R. Loewenstein. (1964). Intercellular diffusion. *Science.* 143: 959-960.

Kanno, Y. y W.R. Loewenstein. (1966). Cell to cell passage of large molecules. *Nature.* (London). 212: 629-630.

Kleinholz, L.H. (1949). Responses of the proximal retinal pigment of the isolated crustacean eyestalk to light and to darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 35: 215-218.

Kleinholz, L.H. (1961). Pigmentary effectors. En: The physiology of Crustacea, (T.H. Waterman ed.) New York Acad. Press. II. 4: 133-169.

Kleinholz, L.H. (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. En: The functional organization of the compound eye, (Bernhard, C.G. ed). Pergamon Press. 89-101.

Knowles, W.D., P.G. Funch y P.A. Shwartzkroin. (1982). Electrotonic and dye coupling in hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. Neuroscience. 7: 1713-1722.

Larsen, W.J. y M.A. Risinger. (1985). The dynamic life histories of intercellular membrane protein. Mod. Cell. Biol. 4: 151-216.

Lasansky, A. (1967). Cell junction in ommatidia of *Limulus*. J. Cell. Biol. 33: 365-383.

Lisman, J.E. y J.E. Brown. (1975). Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. J. Gen. Physiol. 66: 489-506.

Llinás, R. y Y. Yarom. (1986). Specific blockage of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. Society for Neuroscience Abstracts. 12(1): 174.

Loewenstein, W.R. y Y. Kanno. (1964). Studies on an epithelial (gland) cell junction. I. Modifications of surface membrane permeability. J. Cell Biol. 22: 565-586.

Loewenstein, W.R. (1966). Permeability of membrane junctions. Ann. NY. Acad. Sci. 137: 441-472.

Loewenstein, W.R. (1981). Junctional Intercellular Communication: The cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev. 61: 829-913

Lockwood. (1968). Aspects of the Physiology of Crustacea. Oliver

y Boyd, Edinburgh y London. 8: 242.

Makowski, L., D.L.D. Caspar., D.A. Goodenough y W.C. Phillips. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J. Cell Biol.* 74: 629-645.

Meda, P., R. Bruzzone, S. Knodel y L. Orci. (1986). Blockage of cell-to-cell communication within pancreatic acini is associated with increased release of amylase. *J. Cell Biol.* 103: 475-483.

Meda, P., D. Bosco., M. Chanson., E. Giordano., L. Vallar., C. Wollheim y L. Orci. (1990). Rapid and reversible secretion changes during uncoupling of rat insulin-producing cells. *J. Clin. Invest.* 86: 759-768.

Miller, T.M. y D.A. Goodenough. (1985). Gap junction structures after experimental alteration of junctional channel conductance. *J. Cell Biol.* 101: 1741-1748.

Moreno-Sáenz, E., J. Hernández-Falcón y B. Fuentes-Pardo (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity-II ERG circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 119-125.

Moore, J.W., W. Ulbricht y M. Takata. (1964). Effect of ethanol on the sodium and potassium conductances of the squid axon membrane. *J. Gen. Physiol.* 48: 279-295.

Muller, K.J. (1973). Photoreceptors in the crayfish compound eye: Electrical interactions between cells as related to polarized-light sensitivity. *J. Physiol.* 232: 573-595.

Naka, K. y M. Kuwabara. (1956). The component analysis of the e.r.g. from the compound eye of *Cambarus*. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. E*, 2: 75-86.

Naka, K., y M. Kuwabara. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 36: 51-61.

Nelson, W.L. y J.C. Makielski. (1991). Block of sodium current by heptanol in voltage clamped canine cardiac Purkinje cells. *Circ. Res.* 68: 977-983.

Obaid, A.L., S.J. Socolar y B. Rose. (1983). Cell-to-cell channels with two independent regulated gates in series; analysis of junctional channel modulation by membrane potential, calcium and pH. *J. Membr. Biol.* 73: 69-89.

Oxford, G.S y R.P. Swenson. (1979). n-Alkanols potentiate sodium channel inactivation in squid axon. *Biophys. J.* 26: 585-590.

Parker, G.H. (1891). The compound eyes in crustaceans. *Bull. Mus. Comp. (Harvard)*. 21: 45-140.

Parker, G.H. (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment cells in *Palaeomonetes* and their relation to the central nervous system. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harv.* 30: 275-300.

Parker, G.H. (1932). The movements of the retina pigment. *Ergeb. Biol.* 9:239-291.

Paternostre, M y Y. Pichon. (1981). Effects of n-alcohols on sodium channel inactivation in squid giant axons. *Biophys. J.* 26: 585-590.

Payne, R., D.W. Corson y A. Fein. (1986). Pressure injection of calcium both excites and adapts *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 88: 107-126.

Peracchia, C. y S.J. Girsch. (1985). Functional modulation of cell coupling: evidence for a calmodulin-driven channel gate. *Am. J. Physiol.* 248: H765-H782.

Picones A. y H.Aréchiga. (1990). Electrophysiological properties of crayfish retinal photoreceptors. *J. Exp. Biol.* 150: 111-122.

Pott, L y S. Mechmann. (1990). Large-conductance ion channel measured by whole-cell voltage clamp in single cardiac cells: modulation by α -adrenergic stimulation and inhibition by octanol. J. Membr. Biol. 117: 189-199.

Potter, D.D., E.J. Furshpan y E.S. Lennox. (1966). Connections between cells of the developing squid as revealed by electrophysiological methods. Proc. Natl. Acad. Sci. 55: 328-339.

Prieto, J. (1992). Papel de la glándula sinusal en la sincronización por la luz del ritmo circadiano de amplitud del electroretinograma en el acocil. Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM., México.

Ramón, F y A. Rivera. (1986). Gap junction channel modulation a physiological viewpoint. Prog. Biophys. Molec. Biol. 48. 127-153.

Revel, J.P y M.J. Karnovsky. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. J. Cell. Biol. 33: c7-c12.

Roach, J.L.M. (1976). Junctional structures in the crystalline cone of the crayfish compound eye. Cell. Tiss. Res. 173: 309-314.

Rödsälli, A. y R. Weingart. (1989). Electrical properties of gap junction channels in guinea-pig ventricular cell pairs revealed by exposure to heptanol. Pflügers Arch. 415: 12-21.

Sánchez, A y B. Fuentes-Pardo (1977). Circadian rhythm in the amplitude of ERG in the isolated eyetalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 56: 601-605.

Sandeén, H.I. y F.A. Brown. (1952). Responses of the distal pigment of *Palaeomonetes* to illumination. Physiol. Zool. 25: 222-230.

- Schröder, W., H. Stieve & I. Claßen-Linke. (1979). Accessibility of extracellular space in the rhabdom of living isolated retina in crayfish. *Z. Naturforsch., C. Biosci.* 34C: 136-142.
- Seeman, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* 24: 583-655.
- Shaw, S.R. y S. Stowe. (1982). Photoreception. En: *The Biology of Crustacea* (Ed. por D.E. Bliss) Vol. 3 *Neurobiology: Structure and function* (Ed. por H.L. Atwood y C.D. Sandeman) Academic Press, New York, USA. III. 291-367.
- Siegenbeck Van Henkelom, J., J.J.D. Van Der Gon y F.J.A. Proy. (1972). Model approaches of evaluation of cell coupling on monolayers. *J. Membr. Biol.* 7: 88-110.
- Simpson, I., B. Rose y W.R. Loewenstein. (1977). Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science*. 195: 294-296.
- Spach, M.S., J.M. Kootsey y J.D. Sloan. (1982). Active modulation of electrical coupling between cardiac cells of the dog: A mechanism for transient and steady state variation in conduction velocity. *Circ. Res.* 51: 347-362.
- Spear, J., W. Balke., M. Lesh., A. Kadish., J. Levine y E. Moore. (1990). Effect of cellular uncoupling by heptanol on conduction in infarcted myocardium. *Circ. Res.* 66: 202-217.
- Spray, D.C., A.L. Harris y M.V.L. Bennett. (1981). Equilibrium properties of a voltage dependent junctional conductance. *J. Gen. Physiol.* 77: 77-93.
- Spray, D.C. y M.V.L. Bennet. (1985). Physiology and pharmacology of gap junctions. *Ann. Rev. Physiol.* 47: 281-303.

Stavenga, D.G. (1979). Pseudopupils of compound eyes. En: Handbook of sensory Physiology Vision in Invertebrates. (H. Autrum, ed.) VII/6A: 358-429. Spriger Verlag, Berlin, Germany.

Stefanowska, H. (1890). La disposition histologique du pigment dans les yeux des arthropodes sous l'influence de la lumière directe et de l'obscurité complète. Rec Zool. Suisse. 5: 151-200.
Citado por Parker, G.H. (1932).

Stieve, H. e I. Claßen-Linke. (1980). The effect of changed extracellular calcium and sodium concentration on the electroretinogram of the crayfish retina. Z. Naturforsch. 35C: 308-318.

Unwin, P.N.T. y G. Zampighi. (1980). Structure of the junctions between communicating cells. Nature. 283: 545-549.

Unwin, P.N.T. (1989). The structure of ion channels in membranes of excitable cells. Neuron. 3: 665-676.

Van Harrevelde, A. (1936). A physiological solution for Freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34: 428-432.

Van Hateren, J.H. (1986). Electrical coupling of neuro-ommatidial photoreceptor cells in blowfly. J. Comp. Physiol. 158: 795-811.

Verselis, V., H.V.L. Bennett y T.A. Bargiello. (1991). A voltage dependent gap junction in *Drosophila melanogaster*. Biophys. J. 59: 114-126.

Weidmann, S. (1952). The electrical constants of Purkinje fibres. J. Physiol. (London). 118: 348-360.

Weidmann, S. (1966). The diffusion of radio potassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle. J. Physiol. 187: 323-342.

Wiersma, C.A.G. (1947). Giant nerve fiber system of the crayfish. A contribution to comparative physiology of synapse. *J. Neurophysiol.* 10: 23-38.

Wojtczak, J.A. (1985). Electrical uncoupling induced by general anesthetics: a calcium-independent process? En: *Gap junctions* (M.V.L. Bennett y D.C. Spray, eds.). Cold Spring Harbor, New York. pp. 167-175.

Zampighi, G. y P.N.T. Unwin. (1979). Two forms of isolated gap junctions. *J. Mol. Biol.* 135: 451-464.