



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA**

**EFFECTO DE OPIACEOS SOBRE LA RETINA DEL
ACOCIL PROCAMBARUS CLARKII**

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
BIOLOGO

PRESENTA
ENRIQUE MONTIEL FLORES

MEXICO 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco a mi Papá y Mamá por todo el apoyo que me brindaron para que terminara mi carrera así como para la conclusión de este trabajo, este es el reflejo de su esfuerzo.

A mis hermanos: Francisco, Ricardo, Humberto, Eduardo y Rosa Elizabeth.

Agradezco a todos mis amigos que colaboraron de alguna manera en la realización de este trabajo ya que sin su apoyo, colaboración y cariño aún no estaría terminado:

- A los Sinodales que me hicieron favor de criticar mi trabajo.

- A el Prof. José Baquero agradezco su apoyo en una parte muy importante del trabajo, que fue el Análisis Matemático.

-Agradezco a Pilar por la dirección, apoyo y cariño para que terminara este trabajo.

-A Fernando agradezco su critica ya que fue muy importante en la conclusión de este trabajo.

-A Ma. Rosa, Leonardo, Verónica, Chucho, Laura, compañeros de laboratorio por su apoyo y ayuda en mi trabajo.

- A todos mis compañeros: Vicente, Martha, Juan Arturo, Griselle, Cristina, Berenice, Celerino, Felix, Carlos.

INDICE

1.- INTRODUCCION.....	1
1.1 Sistema visual de los crustáceos.....	1
1.2 Pigmentos accesorios del tallo ocular.....	7
1.3 Tallo ocular de los crustáceos.....	10
1.4 Electrorretinograma.....	12
1.5 Encefalinas.....	16
2.- ANTECEDENTES.....	18
2.1 Localización de péptidos opioides en crustáceos decápodos.....	18
2.2 Efectos de los opiáceos en algunas especies de crustáceos decápodos.....	19
3.- OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivos particulares.....	21
4.- MATERIALES Y METODOS.....	22
4.1 Animales experimentales.....	22
4.2 Sistema de administración de sustancias con posible actividad biológica.....	23
4.3 Sistema de estimulación.....	24
4.4 Sistema de registro.....	25
4.5 Tratamiento de resultados.....	26
5.- RESULTADOS.....	27
5.1 Curvas de obscuridad.....	27
5.1.1 Solución fisiológica.....	27
5.1.2 Metionina encefalina.....	28
5.1.3 D-serina ² leucina encefalina treonina.....	29

5.1.4 Naloxona.....	29
5.1.5 Leucina encefalina.....	30
5.2 Adaptación a la luz.....	33
5.2.1 Solución fisiológica.....	34
5.2.2 Metionina encefalina.....	34
5.2.3 D-serina ² leucina encefalina treonina.....	35
5.2.4 Naloxona.....	35
5.2.5 Leucina encefalina.....	36
5.3 V-logI.....	37
5.3.1 Solución fisiológica.....	37
5.3.2 Metionina encefalina.....	38
5.3.3 D-serina ² leucina encefalina treonina.....	39
5.3.4 Naloxona.....	39
5.3.5 Leucina encefalina.....	40
6.- DISCUSION.....	41
7.- BIBLIOGRAFIA.....	48

1.- INTRODUCCION

El continuo ajuste de las respuestas de los organismos hacia los cambios medio ambientales, involucra al medio interno de estos. Dichos ajustes son realizados posiblemente por procesos orientados a extraer en algún momento la información medio ambiental más relevante, es una de las operaciones básicas en las cuales el sistema nervioso interviene, optimizando el acoplamiento del organismo con el medio ambiente que lo rodea (1).

1.1 Sistema visual de los Crustáceos.

En los artrópodos existen dos tipos principales de ojos: los simples y los compuestos. Los primeros son sésiles y están conformados por lentes mientras que; los segundos generalmente son móviles y bien desarrollados en los crustáceos, encontrándose estos en la parte distal del tallo ocular cuando son pedunculados (2). En el ojo compuesto la retina esta formada por unidades visuales especializadas llamadas omatides, cuyas diferencias anatómicas varían según la especie (3). Así tenemos que hay variaciones en el número y forma de los omatidios, diferencias en el eje y en los campos visuales, además de variaciones en el diámetro del rabdomo y en el número y extensión de los pigmentos accesorios (3) (fig.1).

Las células retinulares o fotorreceptoras son neuronas sensoriales primarias, cuyos axones generalmente terminan en la lámina ganglionar. Este sistema de células es altamente elaborado, presentándose en forma de tubos empaquetados y cerrados (2). Dentro de los Crustáceos Decápodos la unidad visual del ojo compuesto es el omatidio (fig.1). El omatidio es de forma geométrica simple, con una superficie regular suave, cilíndrica de aproximadamente 150 μm de largo y 15 μm de ancho. El área total de la membrana del Rabdomo es de alrededor de 7000 μm^2 , sin embargo la superficie efectiva es mucho más grande, debido a la invaginaciones que originan las microvellosidades, por lo tanto una estimación aproximada de la superficie de la membrana es de 91 000 μm^2 (4). Cada omatidio consiste de dos diferentes unidades: el aparato dióptrico y la retínula; el primero consta de la córnea de aproximadamente 30 μm de diámetro, está compuesta de 5 paredes las cuales son producidas por 2 células corneógenas, localizadas debajo de la córnea (5). Formando parte del aparato dióptrico tenemos a las células corneógenas, que son cuatro células cristalinas las cuales por su posición yuxtapuesta forman el cono cristalino. Este cono se prolonga para formar el tracto cristalino, el cual a su vez termina en el sistema retinular (5). Se a reportado que para el acocil Procambarus clarkii, en la superficie de la córnea se encuentran diferencias morfológicas externas, generalmente de forma rectangular, sin embargo en la región dorsal la forma encontrada es hexagonal o irregular, las formas hexagonales son notablemente más pequeñas que las encontradas en el resto de la córnea. Posiblemente esta región (dorsal) recibe más luz y funciona como una estructura

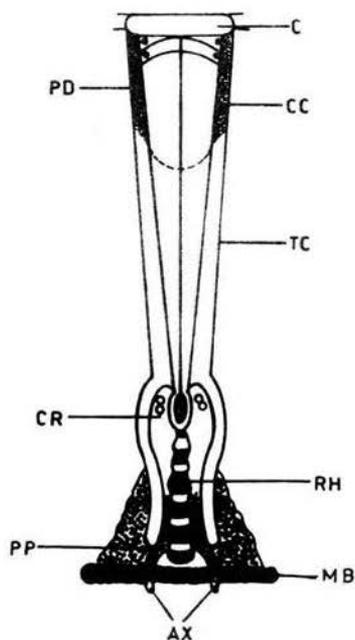


Fig.1 Representación esquemática del omatidio en los crustáceos decápodos: C, córnea; CC, cono cristalino; PD, pigmento distal; TC, tracto cristalino; CR, células retinulares; RH, rabdomo; MB, membrana basal; PP, pigmento proximal; AX, axones de las células retinulares. (tomado de 19).

de aposición, mientras que el resto funciona como una estructura de superposición, y por ello se adapta a niveles bajos de luz (3). Se ha reportado que el acocil Pacifastacus leniusculus tiene alrededor de 2 500 omatidios (6). Cada omatidio está formado por 8 células retinulares (R1-R8), las cuales están arregladas en forma heptagonal, esto es en forma de roseta (6). Siete de estas células emiten prolongaciones membranales en la región medial que se fusionan con las del lado opuesto, en conjunto para formar el rabdomo que se encuentra en la región central, además presenta bandas de microvellosidades perpendiculares a la superficie de la retina (8).

En el rabdomo se encuentra la Rodopsina (8), pigmento fotolabil indispensable para la visión. Cuando este pigmento absorbe la luz se desencadena una cascada de enzimas cuyos productos regulan el potencial de membrana de la célula fotorreceptora, originando una respuesta rápida. La unión bioquímica entre la absorción de la luz y el flujo de iones da como resultado la activación del sistema proteína-GTP, el cual media la actividad de los efectores enzimáticos, regulando fundamentalmente el potencial de membrana de la célula receptora. La estructura celular de los organelos fotorreceptivos optimizan la captura del fotón y provee una área extensa, en la cual las reacciones enzimáticas actúan para llevar a cabo la transducción visual (14). La rodopsina se encuentra localizada principalmente en las microvellosidades y alrededor de los rabdomeros (9). La rodopsina

es una proteína que tiene un arreglo ordenado en las membranas receptoras de los rabinos, presentando un complicado sistema, el cual en presencia de la luz, se presentan algunos cambios en la estructura de esta. Al aplicarse luz la rodopsina se descompone dando como resultado un fotoproducto la metarodopsina. La metarodopsina es más estable que la rodopsina ya que presenta un rango diferente de absorción a la luz (535 nm para la rodopsina y 510 nm para la metarodopsina) (10,11). En coexistencia con la rodopsina se encuentran proteínas más pequeñas de pigmento denominada retinocromo el cual también es un pigmento fotosensitivo. Al absorber la luz el retinocromo se isomeriza dando como resultado cromóforos que se presentan de dos formas: 11 all trans y 11 cis (9,10,12,13). Se ha reportado que en el estado de adaptación a la luz, la forma que predomina es la 11 all trans (10,13), mientras que en la adaptación a la oscuridad es la 11 cis (12).

En el estado de adaptación a la luz se degrada la rodopsina además de presentarse un desgaste en la membrana del rabinos. Esta pérdida parece ser mediada por un proceso de endocitosis la cual se acentúa ó se acelera con el encendido de la luz siendo que la membrana y los constituyentes de las membranas son degradados (15). Para la generación ó síntesis del fotopigmento, además de otras glicoproteínas de la membrana del rabinos, se inicia con la formación de nuevos péptidos en el retículo endoplásmico rugoso pasando a través del aparato de Golgi para después ensamblarse en

la membrana del rabadomo (7). Se ha sugerido que el ensamble de proteínas para la nueva membrana es un proceso continuo lo que indica una constante síntesis de rodopsina (7).

Se ha reportado la existencia de dos mecanismos para la traslocación operativa en los gránulos de pigmentos accesorios (23). Para la migración del pigmento distal se postula un mecanismo de control mediado por una ó más neurohormonas (16,22,24). Dado que la migración no responde a la iluminación directa este reflejo envuelve la liberación de un peptido el cual dispara la migración del pigmento hacia la posición de adaptación a la luz (27). Se ha observado que la inyección de la hormona del pigmento distal y de extractos de glándula sinusal inducen el movimiento de este pigmento a la posición de adaptación a la luz (1,16,20,22,28). El pigmento proximal se comporta como un efector independiente ya que se puede inducir su migración completa por medio de la aplicación de estímulos luminosos, mientras que el movimiento del pigmento distal es disparado por reflejos neuroendocrinos (21).

Ambos pigmentos participan en la modulación luminosa, ya que durante la adaptación a la luz protegen a los fotorreceptores regulando la incidencia de luz sobre el rabadomo. En la adaptación a la oscuridad los pigmentos permiten una mayor entrada de luz (1). En esta fase el pigmento proximal opera con un umbral bajo y tiempo corto facilitando al sistema visual a trabajar con niveles de iluminación baja, mientras que el pigmento distal muestra un

umbral alto y curso temporal lento (1). El rabdomo presenta microscópicamente paredes con microvellosidades con un arreglo en forma de paquete alineados para poder captar la luz. Esto se debe a que están acompañadas de uniones membranales y por un citoesqueleto de actino-miosina (14). En el rabdomero se distinguen dos zonas, la distal que corresponde a la célula retinular R8 y la proximal que corresponde a las células retinulares R1-R7 (15,29). Las microvellosidades del rabdomo de las células retinulares 1, 2, 5 y 6 se arreglan de manera vertical, mientras que las células 3, 4 y 7 se organizan horizontalmente (6). La octava célula se localiza aproximadamente a 15 μm , arriba del rabdomo de las otras células, es corto no presentando gránulos de pigmento en su interior (5,15), en comparación con las restantes células retinulares (R1-R7) del omatidio (6), por lo que se ha identificando a esta octava célula como un probable receptor a la luz ultravioleta (15). El axón de esta célula (8^a) corre paralelamente junto con los axones de las células R1-R7, atravesando la membrana basal así como el primer neuropilo (lámina ganglionar), dirigiéndose hacia el segundo neuropilo (médula externa), en donde establece relevo sináptico, en comparación con los demás axones de R1-R7, que se proyectan en varios compartimientos sinápticos en la lámina ganglionar (6).

1.2 Pigmentos accesorios del tallo ocular

Las células fotorreceptoras del ojo compuesto contienen gránulos de pigmento no fototransductores, los cuales migran como respuesta a la luz. La migración de los gránulos de pigmento contenidos en las células actúan como un filtro ajustable para las membranas fotosensibles modulando la entrada de luz (19).

El ojo compuesto contiene tres tipos de pigmentos accesorios no fototransductores. Dos de estos, el pigmento distal y el pigmento proximal están formados por gránulos de color oscuro constituidos probablemente por melanina (20). Los gránulos de pigmento flotan en una doble pared de fosfolípidos agregándose a la pared de la membrana visual (15), mostrando la capacidad de dispersión en el acocil (16,20). El pigmento distal es el más periférico, sus gránulos se localizan dentro de dos células elongadas adyacentes a los elementos omatidiales desde la terminación de la córnea hasta el interior de la membrana basal. El pigmento proximal se localiza dentro de las células retinulares (20). El tercer tipo de pigmento es el de reflexión el cual es amorfo y blanco se localiza en células cuyos procesos se extienden desde el interior de la membrana basal hasta la base del rabdomo, variando su posición según la especie. En el acocil P. clarkii este pigmento no tiene movilidad y actúa reflejando la luz incidente en el ojo (20,21).

Se sabe que la migración de los gránulos de pigmento proximal puede ser iniciada pocos segundos después de la exposición a la luz, pudiendo durar esta 30 minutos (18). La migración de los pigmentos (principalmente proximal, ya que el distal puede ser controlado hormonalmente) se debe a que son sensibles a la luz que incide sobre los fotorreceptores. La luz actúa en dos fases: una fase inicial "tiempo de exposición" durante la cual un número suficiente de fotones pueden iniciar la migración del pigmento y una etapa "tiempo de migración" durante la cual ocurre el transporte de gránulos (22). Por esta razón se pueden observar dos estados fisiológicos: el de adaptación a la oscuridad y adaptación a la luz (1).

En la oscuridad el pigmento distal se concentra hacia la terminación corneal de la retina mientras que el pigmento proximal migra en dirección opuesta, esto es, hacia el fotorreceptor (1,16). Esto origina que la zona del cono cristalino y el área alrededor del rabadomo quedan expuestas a la luz (1). Bajo iluminación ambos pigmentos migran expandiéndose a lo largo de las células que los contienen cubriendo al fotorreceptor de la luz incidente (1,16,21).

Se ha reportado que en el fotorreceptor existe un sistema de microtúbulos (citoesqueleto), los cuales juegan un papel muy importante en la migración del pigmento proximal conduciendo a este pigmento en las dos etapas de adaptación (19,23). Las evidencias indican que los microtúbulos presentan un arreglo alineado, paralelo, en dirección de los movimientos de los pigmentos, además una aparente variación en el número de microtúbulos en las etapas de adaptación (9). Muchos de estos microtúbulos al parecer se originan en múltiples niveles a lo largo del rabadomo y frecuentemente se alinean con las microvellosidades. La disposición longitudinal de los pigmentos sigue generalmente el arreglo de los microtúbulos. Los cambios en la posición del pigmento van acompañados por profundas transformaciones en el citoplasma de la célula retinular, por lo que el arreglo de los microtúbulos depende del estado de adaptación (19). En el estado de adaptación a la obscuridad las células muestran numerosos microtúbulos con disposición al azar, no totalmente paralelos. En el estado de adaptación a la luz las células presentan numerosos gránulos de pigmento alineados junto con los microtúbulos y el resto del pigmento se arregla en una columna central microtubular (19).

1.3 Tallo ocular de los crustáceos

Los ojos compuestos presentan diferentes estructuras contenidas en el tallo ocular. La ubicación de los principales neuropilos se conocen a partir de los trabajos hechos por Hanstrom (26). Los neuropilos ópticos son: la lámina ganglionar, la médula externa, la médula interna, la médula terminal y el cuerpo hemielipsoide además de la estructura neurosecretora conocida como glándula sinusal (fig.2).

Dentro de los neuropilos existen dos tipos de conexiones axónicas principales: las de primer orden originadas por neuronas cortas que corren entre un neuropilo y el siguiente; y las de segundo orden constituidas por neuronas de arborizaciones largas con arreglo tangencial en las paredes interiores de los neuropilos las cuales proyectan sus axones hacia el cerebro (2).

La lámina ganglionar es una masa en forma de domo constituida por lo menos de 4 capas paralelas a la base del omatidio. En ella convergen axones de primer y segundo orden provenientes de las células retinulares R1-R7 donde hacen sinápsis con otras fibras. Las fibras que vienen del lado posterior de la lámina pasan hacia el borde anterior de la médula externa en donde forman el primer quiasma óptico (2).

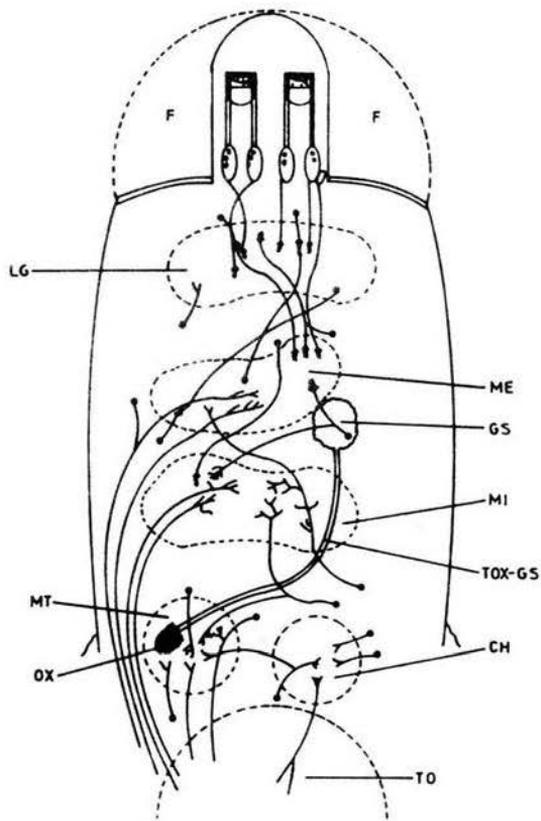


Fig.2 Representación esquemática de los neuropilos contenidos en el tallo ocular de los crustáceos: F, Fotorreceptores; LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; GS, glándula sinusal; OX, órgano X; MT, médula terminal; Ch, cuerpo hemielipsoide; TO, tracto óptico; TOX-GS, tracto organo X-glándula sinusal.

Las médulas externa e interna se componen de neuropilos densos, estructuras entre las cuales se sitúa el segundo quiasma óptico. El tercer quiasma se localiza entre la médula interna y la terminal (2).

La médula terminal, se sitúa en el lado dorsal medial del tallo ocular, lateral al cuerpo hemielipsoide. Este neuropilo contiene un número de tractos provenientes de la médula interna, en el que se encuentran dos paquetes diferentes de axones que van hacia el cerebro. Los paquetes corren a lo largo de tractos en donde se forma el tracto óptico, el número de axones que los conforman es aproximadamente 6 veces mayor que el número de omatidios (2).

El cuerpo hemielipsoide, se localiza a un lado de la médula terminal, es una masa profunda y densa casi libre, de forma regular, encontrándose grupos de células globulares asociadas con este neuropilo (2).

Entre la médula externa y la interna se encuentra la glándula sinusal (26), estructura elaborada que recibe inervaciones de la médula terminal. La glándula presenta canales secretores localizados cerca del seno sanguíneo y se reconoce como un almacén de hormonas entre las que se encuentran las que controlan la migración de los pigmentos corporales, el nivel de azúcar en la sangre, los movimientos del pigmento distal y la muda entre otras. La liberación de estas hormonas se realiza en el seno sanguíneo (26).

1.4 ELECTORRETINOGRAMA

Las células retinulares al ser excitadas por la luz se despolarizan generándose un potencial de receptor que persiste mientras que el estímulo luminoso esté presente (4,14). Esta despolarización consiste de dos fases: una fase transiente rápida, seguida de una fase sostenida ó estacionaria precedida por la repolarización (30). La actividad masiva de los fotorreceptores, es susceptible de ser detectada por medio del registro extracélular conocido como Electrorretinograma (ERG) (4,39). El registro extracelular es la respuesta promedio proveniente de un gran número de células retinulares, este registro es la medida de voltaje generado por la corriente extracelular debido al cambio en el potencial y resistencia de la membrana de las células visuales. Cuando la intensidad del estímulo luminoso cambia, la respuesta extracelular se modifica por lo tanto podemos registrar los cambios que ocurren en las células visuales, tanto en el estado de adaptación a la obscuridad como en la luz, pudiéndose evaluar estas modificaciones sobre la amplitud del ERG (32).

La absorción de fotones produce cambios químicos en las moléculas del pigmento receptor, los constituyentes celulares en proteínas, seguido de modificaciones en el potencial de membrana. Se han propuesto 2 hipótesis para la generación del potencial de receptor: Una modificación en la bomba de Sodio y/o un incremento en la conductancia de iones (33). Smith y cols. en 1968 (34)

postulan que el potencial de receptor es producido por la actividad de la bomba electrogénica de Sodio. Brown y Lisman (1972) (35) reportaron que la inhibición de la bomba de Sodio puede reducir la amplitud del potencial de receptor, pero muestran que este efecto es dependiente de las concentraciones de Calcio extracelular. Brown y Mote en 1974 (37) demostraron que el potencial de receptor depende de la concentración de Sodio extracelular existiendo un incremento en la conductancia para el Sodio (y quizá para el Potasio), por lo que se propone este mecanismo como responsable de la generación del potencial de receptor. Por lo que respecta a la conductancia de iones se ha reportado que el principal efecto causado por la luz es la apertura de canales hacia la entrada de Sodio, presentándose dos sistemas de transporte: un sistema de contratransporte Sodio-Potasio y un sistema de contratransporte Sodio-Calcio. Este último sistema es importante ya que la concentración de Calcio afecta fuertemente la sensibilidad de la célula produciendo cambios profundos en la respuesta del potencial hacia la luz (36). Durante el potencial de receptor hay una entrada masiva de Sodio, entonces el canal se sensibiliza a la permeabilidad hacia el Potasio elevando la concentración de Potasio en el interior celular, por lo tanto hay una salida simultánea de potasio hacia el exterior (36). Se ha demostrado que en la generación de la fototransducción el Sodio y el Calcio son los iones más importantes asociándose el sodio a la fase transiente del potencial de receptor, mientras que el calcio se ha implicado a procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad. La fase

transciente depende de la disponibilidad de Sodio-Calcio, y sus interacciones pueden determinar la amplitud del potencial de receptor, mientras que el Calcio determina la duración del potencial de receptor (30,37).

Las células retinulares responden a la luz con un potencial de receptor despolarizante existiendo una estrecha interacción entre el potencial de receptor y la migración de los pigmentos. Se ha sugerido que los cambios eléctricos y la migración de los pigmentos son respuestas funcionalmente acopladas (38). En el acocil Procambarus bouvieri se ha sugerido que el flujo de Sodio inducido por el estímulo luminoso da como resultado la liberación de Calcio intracelular. El cual dispara la dispersión de los gránulos del pigmento proximal (38). Los reportes de Stieve 1973; Wullf y Muller 1973; Brown y Blinco 1974 muestran que los iones Sodio y Calcio están involucrados en la respuesta de las células retinulares hacia la luz, entre estos iones el calcio puede tener un acoplamiento importante de la respuesta hacia la luz y la migración de los pigmentos. Se conoce que el calcio sirve como factor de transporte intracelular y de secreción, además de que puede controlar la activación inicial de los mecanismos de transporte (22). Se ha reportado que el tratamiento con Ouabaina altera el balance intracelular de los iones a través de la bomba de Sodio, teniendo un efecto muy fuerte de inhibición en la agrupación de los gránulos de pigmento en la obscuridad (38).

Se ha reportado que en el ERG extracelularmente se distinguen dos componentes, los cuales se describen como: HI ó transiente que responde al encendido de la iluminación y HII ó estacionaria que se mantiene durante el estímulo luminoso. La amplitud de HI es independiente de la duración del estímulo, mientras que HII se incrementa en latencia ó duración cuando la duración del estímulo se incrementa (39,30) (Fig.3).

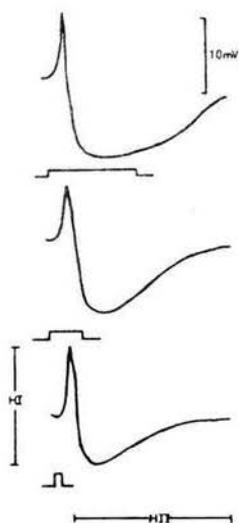


Fig. 3 Registro de la parte exterior de la pared del receptor, en la cual se muestran los dos componentes del ERG: HI es independiente de la amplitud y duración del estímulo luminoso, sin embargo HII se incrementa en latencia cuando el estímulo se incrementa (tomado de 39).

1.5 ENCEFALINAS

En 1973 se reportó la presencia de receptores específicos a opiáceos en el sistema nervioso central de los vertebrados los cuales son capaces de combinarse con una gran variedad de opiáceos conocidos activamente (40,41,42).

En 1975 el grupo de J. Huges y cols. (43) en Aberdeen Escocia, descubren dos pentapéptidos con actividad opiácea en el cerebro de vaca y cerdo a los cuales denominaron Metionina-encefalina (Met-enc) y Leucina-encefalina (Leu-enc). Estos presentan una composición de Try-Gly-Gly-Phe-Met y Try-Gly-Gly-Phe-Leu respectivamente, diferenciándose únicamente por el último aminoácido. En 1982 Noda y cols. (47) reportaron la existencia del precursor de las encefalinas, siendo está la pro-encefalina A. Esta proteína tiene un peso molecular de alrededor de 30 Kda. contando con una proporción de 6 veces la secuencia de Met-Enc por una de Leu-Enc. Las encefalinas tienen una vida muy corta degradándose muy rápidamente. Basados en los reportes sobre la hemolinfa del acocil Astacus fluviatilis hay una degradación ó inactivación rápida de las encefalinas existiendo tres diferentes enzimas que actúan sobre ellas. Estas enzimas son la amino-peptidasa, carboxi-peptidasa y la peptidil-dipeptidasa. Estas enzimas probablemente actúan como una barrera metabólica contra la acción de peptidos biológicamente activos (48). Esto implica que están involucrados en efectos rápidos y transitorios, correspondiéndoles una función de

transmisión. En 1976 el grupo de Roger Guillemin (44) descubrió las endorfinas. En 1977 Eipper y Ling reportaron que el precursor de las endorfinas es la pro-opiomelanocortina; esta consta de las hormonas siguientes: β -lipotropina la cual esta constituida por la β -endorfina y Met-enc, la Adrenocorticotropina y la Melanotropina contiene a α , β y γ endorfinas (45,46,59). Las endorfinas son más estables, tiene una vida más larga y presentan efectos prolongados. Por lo que se postula que las encefalinas pueden actuar como neurotransmisores y las endorfinas como neurohormonas, además las encefalinas y endorfinas tienen configuraciones similares en la porción del ligando por lo tanto los receptores al parecer son similares para ambos opiáceos (45,46,59).

2.- ANTECEDENTES

2.1 Localización de péptidos opiodes en Crustáceos Decápodos

En 1981 Mancillas y cols. (49), por medio de técnicas inmunocitoquímicas, e incubando secciones de tejido de tallos oculares de la langosta Panulirus interruptus y del acocil Procambarus clarkii en antisuero de Leu-enc y substancia P, observaron que en la langosta se encuentra inmunoreactividad positiva a leu-enc en los fotorreceptores primarios y en las fibras que pasan en dirección centrífuga a través de la médula terminal y finalizando en un plexo de finas fibras en la médula terminal. Mientras que en el acocil esta encefalina se detectó en fibras que pasan a través de los fotorreceptores primarios y la lámina ganglionar así como en terminales de la lámina (49).

Empleando la misma técnica Fingerman y cols. 1983 detectaron que en el tallo ocular del cangrejo Uca pugilator, la presencia de leu-enc y met-enc en el nervio óptico, glándula sinusal y lámina ganglionar, además de la porción del neuropilo de la médula terminal y en los bordes de las células neurosecretoras del Organo X-médula terminal. La Met-enc además se encontró en células neurosecretoras de la médula terminal, órgano X y en axones de las células neurosecretoras de la glándula sinusal (50).

En 1985 Jaros y cols. por medio de técnicas de inmunofluorescencia y tinción con peroxidasa, reportaron en el cangrejo Carcinus maenas inmunoreactividad positiva a leu-enc en perfiles axónicos de la glándula sinusal, en pequeñas neuronas de los neuropilos del tallo ocular, en pequeños cuerpos celulares y fibras de la lámina ganglionar y en la médula externa, interna y terminal, así como en fibras que van hacia el primer quiasma óptico. Con técnicas cromatográficas (HPLC) comparando el tiempo de retención de patrones conocidos con el de los extractos inmunorreactivos de glándula sinusal, revelan una mayor cantidad de Leu-enc, trazas de Met-enc y Met-enc-arg⁶-ala⁷ (51) (Fig.4).

2.2 Efectos de los opiáceos en algunas especies de Crustáceos Decápodos.

En 1984 Quackenbush y Fingerma (52), trabajando con el cangrejo Uca pugilator, estudiaron el efecto de Leu-enc, Met-enc y β -endorfina, en el tallo ocular aislado, apéndices aislados y en el animal íntegro. La Leu-enc no produjo efecto alguno sobre las preparaciones utilizadas. La Met-enc induce la concentración de los pigmentos rojo y negro en los cromatóforos intertegumentarios del animal íntegro. Este efecto es dependiente de la dosis aplicada pudiéndose bloquear con Naloxona. Sin embargo, en las patas aisladas no afecta el movimiento de los pigmentos. En los tallos oculares aislados provoca la liberación de las hormonas

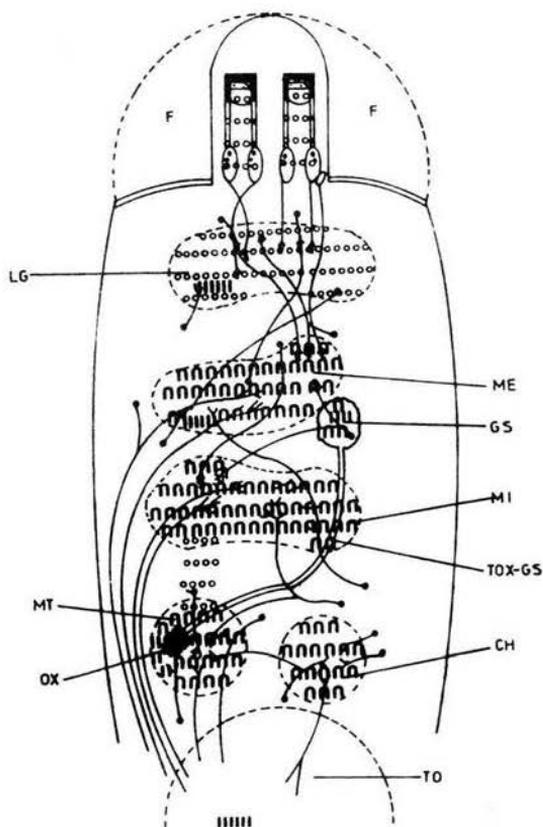


Fig. 4 Representación esquemática de la localización de peptidos opioides en crustáceos decápodos, según Mancillas (o), Fingerman (|) y Jaros (n) (modificado de 2,26).

concentradoras del pigmento rojo (RCPH) y negro (BCPH) bloqueándose esta liberación con la aplicación de naloxona. La Met-enc aplicada a una concentración 10^{-5} M en los tallos aislados potencializa la liberación de las dos hormonas inducida por la aplicación de voltaje (10 V). La naloxona es capaz de bloquear completamente la liberación de la BCPH y dos formas largas de RCPH inducidas por el voltaje. Por su parte la β -endorfina produce la dispersión del pigmento oscuro en los apéndices aislados y en el animal íntegro (52).

En 1986 Freijo (53) trabajando con el acocil Procambarus clarkii en preparaciones de retina aislada y en animal íntegro, durante el proceso de adaptación a la obscuridad estudió el efecto de la Met-enc, Leu-enc, Morfina y Dser²-leu-enc-treo y como antagonista la naloxona. En la retina aislada se observó un aumento en la velocidad de adaptación a la obscuridad cuando las retinas se incubaron en Leu-enc 10^{-3} M y Met-enc 10^{-3} M. Este efecto se bloqueó e invirtió al emplear simultáneamente las encefalinas con naloxona mientras que con la Morfina y la Dser²-leu-enc-treo se produjo el efecto contrario esto es, el de una disminución en la velocidad de adaptación, bloqueándose solo parcialmente con naloxona. En el animal íntegro solo la Morfina y la Dser²-leu-enc-treo modifican el curso temporal del movimiento de los pigmentos en condiciones de adaptación a la obscuridad, bloqueandose el efecto con naloxona (53).

3 Objetivo General

Se ha documentado la presencia de encefalinas en el sistema visual, así como el efecto de éstas sobre el proceso de adaptación a la obscuridad en preparaciones aisladas. El propósito de esta Tesis fue estudiar el efecto de los siguientes opiáceos: Met-enc, Dser²-leu-enc-treo, Naloxona y Leu-enc en el sistema visual del acocil Procambarus clarkii, a través del registro eléctrico de la retina en el animal íntegro.

3.1 Objetivos particulares

A.- Obtener la curva dosis-respuesta de algunos opiáceos sobre la amplitud del ERG en la retina del acocil.

B.- Evaluar el efectos de algunos opiáceos sobre la amplitud del ERG en las curvas de adaptación a la obscuridad, adaptación a la luz y curvas V-logI.

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Animales experimentales.

Los experimentos se realizaron en acociles de la especie Procambarus clarkii (Girard), colectados en el río Conchos en el estado de Chihuahua. Se emplearon organismos adultos sin distinción de sexo y en la etapa C ó D del ciclo de muda (54). Los organismos una vez colectados se aclimataron por lo menos una semana previa a los experimentos a las condiciones de laboratorio. Los animales se colocaron en recipientes de plástico a temperatura ambiente y ciclos naturales de luz-obscuridad. Todos los experimentos se realizaron cada tercer día, a partir de las 12:00 horas.

Los experimentos se realizaron en la retina de animales íntegros para lo cual se les extirpo el rostrum dejando los tallos oculares completamente al descubierto. Posteriormente el tallo ocular se fijo con pegamento sintético a los bordes de las orbitas oculares del caparazón del animal, con el fin de mantenerlos fijos. El animal experimental estuvo sujeto a condiciones de baja temperatura durante un período de 30 minutos antes de cada experimento para evitar el movimiento. Posteriormente se colocó y fijó sobre una placa de plástico. Esta placa se introdujo dentro de una cámara con agua fría. Por último se procedió a insertar el electrodo de registro.

4.2 Sistema de administración de sustancias con posible actividad biológica.

Las sustancias experimentales se administraron en la base del pódunculo ocular de los organismos a través de una jeringa Hamilton. A los animales control se les inyectaron 5 μ l de solución fisiológica para crustáceos Van Harreveld (55). A los animales experimentales se separaron en lotes y se les administró 5 μ l de Met-enc 10^{-3} M, Dser²-leu-enc-treo 10^{-3} M, Naloxona 10^{-3} M y Leu-enc 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M. Para la realización de las curvas de oscuridad la inyección se realizó en el minuto 57 tiempo en el cual los organismos ya habían alcanzado el 100 % de adaptación (grafica 1). En las curvas de adaptación a la luz así como las curvas V-logI, la inyección se aplicó en el intervalo de oscuridad (10 minutos) de la curva control y la experimental, faltando un minuto para iniciar esta última (Tabla 1).

Fijación de los tallos oculares anestesia del organismo.

TIEMPO

Colocación del electrodo de registro

(min)

- 0 Obtenida la señal eléctrica el organismo se mantuvo en oscuridad constante.
- 20 Oscuridad constante.
- 22 Se inicio el registró hasta que no se presentaron cambios en la amplitud del ERG

58-62 Administración de Opiaceos

Fase de oscuridad	Curvas de adaptación a la luz	Curvas V-logI
Minuto 58	Minuto 62	Minuto 62
5 μ de VH	5 μ de VH	5 μ de VH
5 μ de Met-enc 10 ⁻³ M	5 μ de Met-enc 10 ⁻³ M	5 μ de Met-enc 10 ⁻³ M
5 μ de Dser ² -leu-enc-treo 10 ⁻³ M	5 μ de Dser ² -leu-enc-treo 10 ⁻³ M	5 μ de Dser ² -leu-enc-treo 10 ⁻³ M
5 μ de Nlx 10 ⁻³ M	5 μ de Nlx 10 ⁻³ M	5 μ de Nlx 10 ⁻³ M
5 μ DE Leu-enc 10 ⁻³ M	5 μ de Leu-enc 10 ⁻³ M	5 μ de Leu-enc 10 ⁻³ M

Tabla 1.- Síntesis de los Materiales y Métodos

4.3 Sistema de estimulación.

Para la fotoestimulación se utilizó un estimulador Grass mod. S4KP. A éste se le adaptó un diodo emisor de luz verde con una longitud de onda de 540 nm para la emisión de estímulos luminosos, el cual se monitoreó a través de una fotorresistencia. El voltaje emitido por el estimulador y captado por la fotorresistencia se registró en un Osciloscopio de rayos catódicos digital Tektronix 5323, y se almacenó en cintas magnéticas con ayuda de una Grabadora Vetter mod. D simultáneamente con la respuesta experimental (Fig. 5) para su posterior análisis. La intensidad, duración y frecuencia del estímulo fue variada de acuerdo al protocolo de cada experimento. Evaluándose los parámetros de la fase de obscuridad, adaptación a la luz y las curvas V-log I (Tabla 2). Para las curvas de adaptación a la obscuridad el estímulo luminoso que se aplicó (1 pulso cada dos minutos durante 210 minutos), con una intensidad de 911.19 lux y 500 msec de duración. En las curvas de adaptación a la luz, la estimulación luminosa consistió de un tren de pulsos durante 1 minuto con una frecuencia de 1 Hz, 713.44 lux de intensidad y 500 msec de duración. La curva fue repetida cada 10 minutos. Por último para las curvas V-log I, la intensidad fue variable en orden creciente de 2.7, 7.56, 14.79, 44.28, 66.96, 196.79, 494.64, 713.44, 911.19 y 1222.34 lux, con una duración de 500 msec, aplicando un estímulo cada dos minutos, la curva fue repetida cada 10 minutos.

EXPERIMENTO	INTENSIDAD	DURACION	FRECUENCIA
ADAPTACION A LA OBSCURIDAD	911.19 Lux	500 mseg	1 pulso cada 2 minutos
CURVAS V-LOGI	2.7, 7.56, 14.79, 44.28, 66.96, 196.79, 494.64, 713.44, 911.19 y 1222.34 lux	500 mseg	1 pulso cada 2 minutos
ADAPTACION A LA LUZ	713.44 Lux	500 mseg	1 tren cada 10 minutos de 1 minuto de 1 Hz

Tabla 2.- Se muestran los parámetros, así como las condiciones de estimulación para cada tipo de experimento.

4.4 Sistema de Registro.

Para el registro del Electrorretinograma (ERG), se utilizó un electródo de metal elaborado de un alfiler entomológico del No. 00, el cual se lijó hasta obtener el grosor deseado (aprox. 10-15 μm), se aislo con esmalte de uñas teniendo cuidado de dejar al descubierto la punta. Este electrodo se introdujo verticalmente a través de la córnea hacia la lámina ganglionar para obtener el ERG. La señal eléctrica se comparó a la tierra de referencia a través de un electrodo de plata clorurado. El ERG se amplificó y por medio de un amplificador diferencial Tektronix mod. AM 502 y un Osciloscopio de rayos catodicos Digital Tektronix mod. 5323. La señal obtenida se almacenó en cinta magnética, por medio de una grabadora Vetter mod. D para su posterior análisis (fig. 5) (tabla 1).

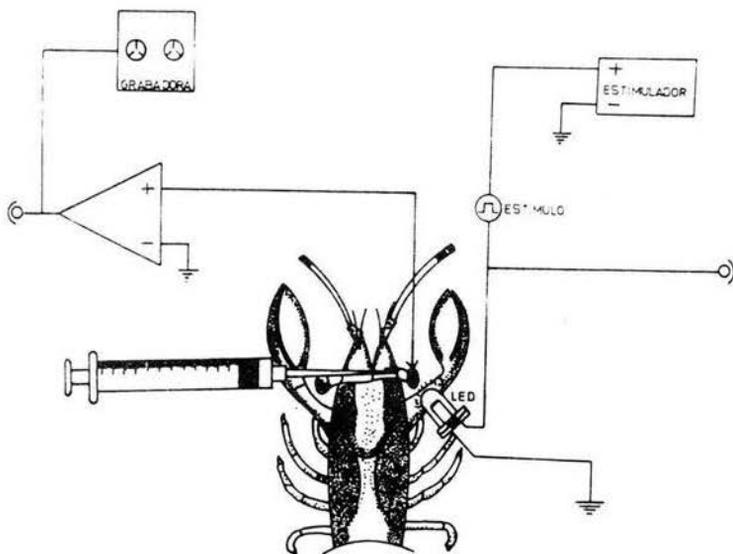


Fig. 5 Esquema en donde se presenta el Sistema de estimulación, el Sistema de registro del ERG y el Sistema de administración de sustancias para la retina del animal íntegro.

4.5 Tratamientos de resultados

Las señales eléctricas obtenidas a partir del registro del animal íntegro se calibraron en mV de acuerdo con la amplificación utilizada para cada tipo de experimento y así como al sistema de registro antes descrito. Se determinó el porcentaje en relación a la máxima amplitud del ERG en la fase de adaptación obtenida para cada experimento para los diferentes casos experimentales.

Se construyeron las curvas de obscuridad, adaptación a la luz y $V\text{-log } I$, en donde se presenta la relación amplitud del ERG en porcentaje con respecto al tiempo para las dos primeras, así como el porcentaje de la amplitud con respecto al logaritmo de la intensidad empleada para el último caso.

Se calculó para las curvas experimentales la desviación estándar, el coeficiente de variación, la varianza y el error estándar. Posteriormente se calculó la pendiente por medio de un análisis de mínimos cuadrados para obtener la tendencia de la curva y por último se realizó la prueba de comparación de pendientes con el fin de establecer las diferencias entre las curvas. Se estableció la relación de la curva control con respecto a las experimentales utilizando como criterio de significancia estadística del $p < 0.01$, en la tabla de "t".

5.- RESULTADOS

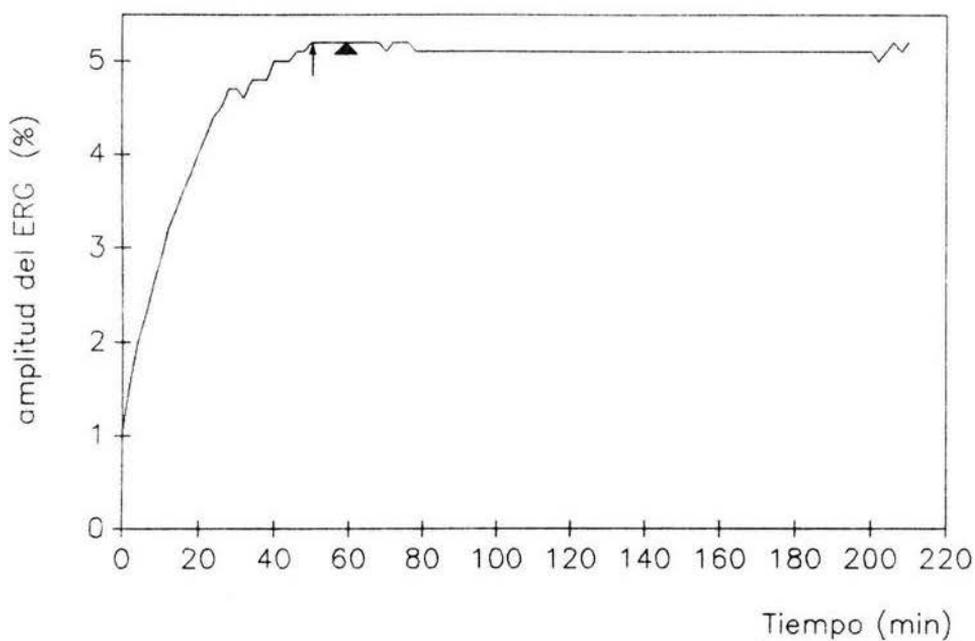
A partir del registro eléctrico de la retina (ERG) en el animal íntegro se obtuvieron los siguientes resultados:

5.1 CURVAS DE OSCURIDAD

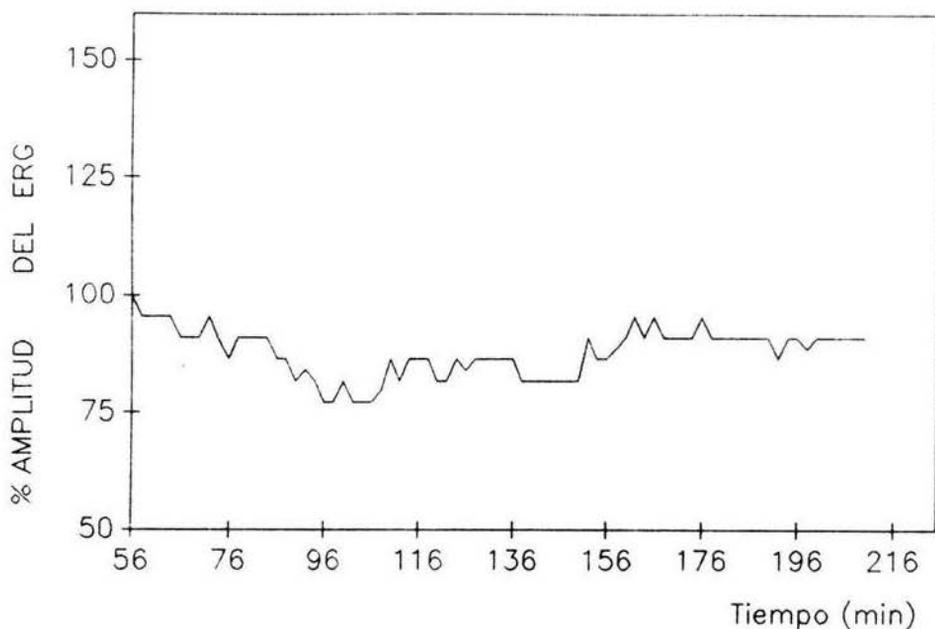
En las gráficas se representa en el eje de las abscisas el tiempo en minutos. En el eje de las ordenadas el porcentaje de la amplitud del ERG. La administración de sustancias se realizó en el minuto 57, cuando el organismo ya había alcanzado la adaptación total a la oscuridad (gráfica 1). Se inyectaron 5 μ l de solución fisiológica VH para el grupo control, así como Met-enc 10^{-3} M, Dser²-leu-enc-treo 10^{-3} M, Naloxona 10^{-3} M y Leu-enc 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M, para los animales experimentales.

5.1.1 Solución fisiológica VH

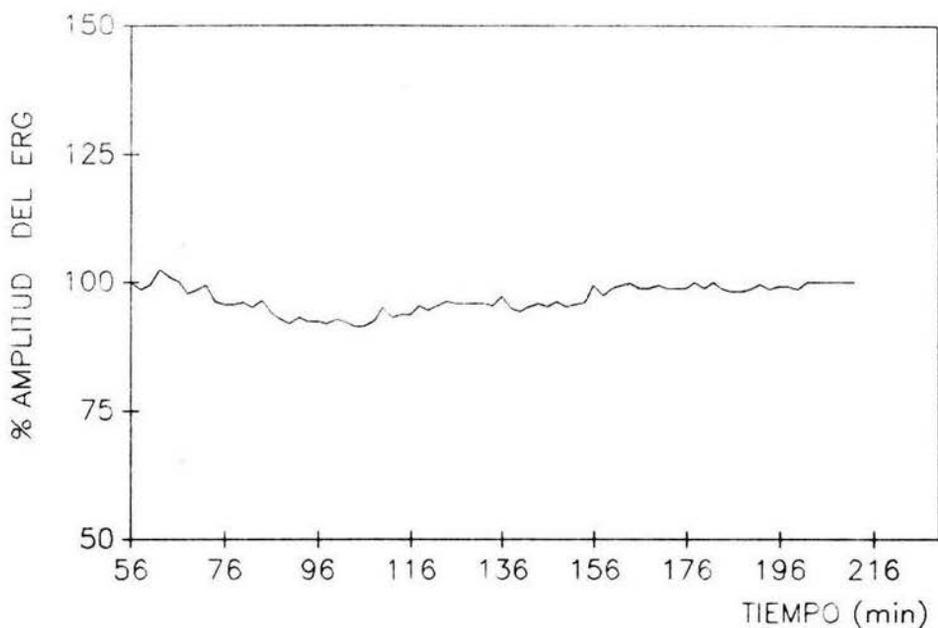
En la gráfica 2 se representa un solo experimento control, observamos que después de la administración de los 5 μ l de VH, se produce una reducción máxima en la amplitud del ERG de un 20 %, recuperándose parcialmente (5%) a partir del minuto 162. Esta reducción posiblemente se deba a la acción mecánica durante la inyección. La gráfica 3 muestra el promedio de 5 experimentos



Gráfica 1.- Se representa desde el tiempo 0 hasta el minuto 220, se observa que en el minuto 46 (†) el organismo ya se adaptó totalmente a la oscuridad, por lo que en el minuto 57 (▲) se realizó la administración de las sustancias experimentales.



Gráfica 2.- En el eje de las abcisas se representa el tiempo (min) y en el eje de las ordenadas la amplitud del ERG (%). La inyección de solución salina se realizó en el minuto 57, cuando el organismo ya había alcanzado el 100 % de adaptación a la oscuridad total. Después de la inyección hay una reducción gradual de la amplitud del ERG, seguida de su recuperación parcial (n=1).

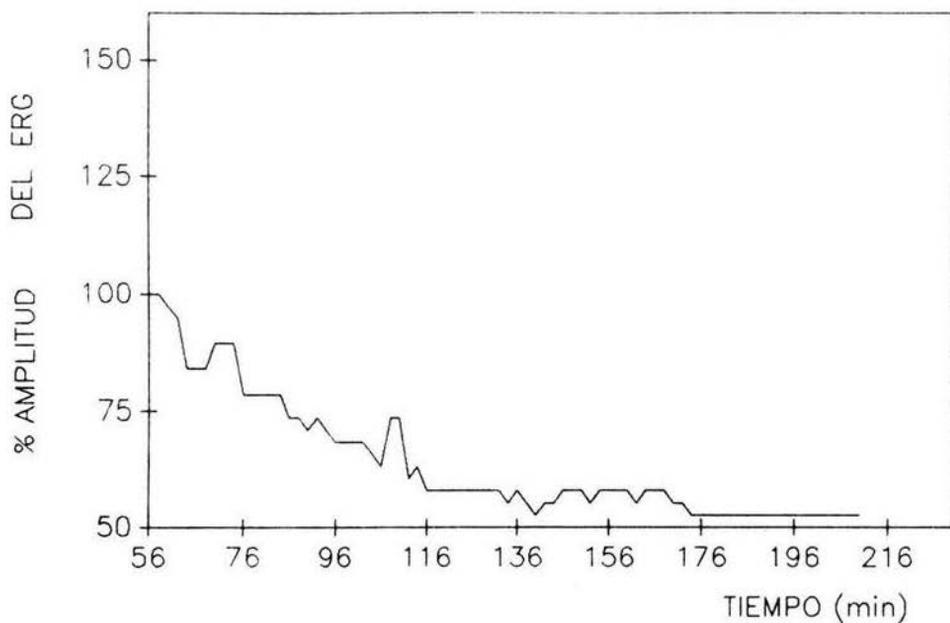


Gráfica 3.- Se representa el promedio de 5 experimentos, después de la inyección hay un decremento gradual de la amplitud del ERG, iniciándose en el minuto 76. Este efecto se prolonga durante 80 minutos, recuperándose totalmente a partir del minuto 156.

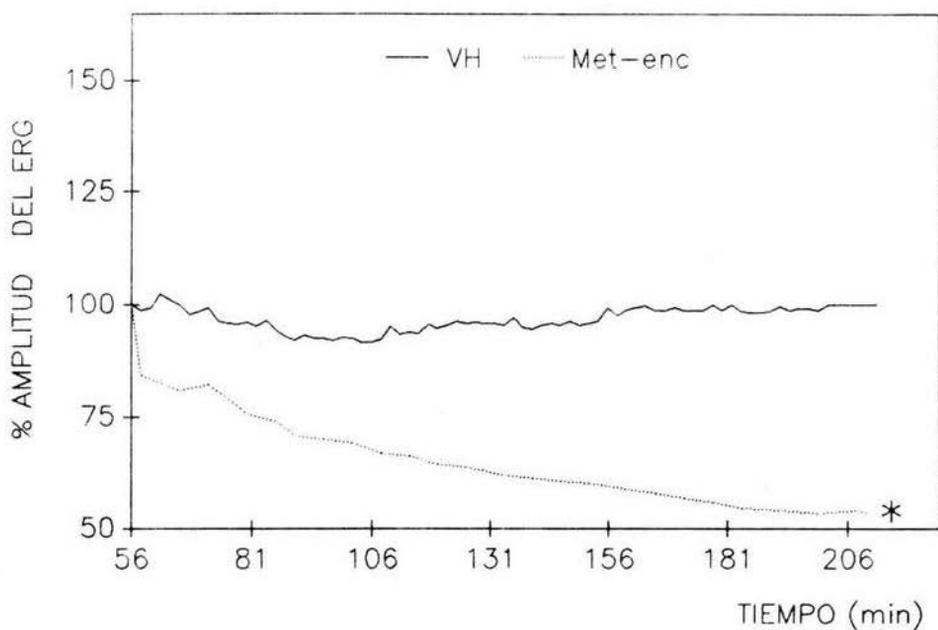
después de la inyección de solución VH se puede observar una reducción gradual en la amplitud del ERG de un 10 % a partir del minuto 76, prolongándose esta reducción durante 80 minutos. A partir del minuto 154 empieza a recuperarse gradualmente hasta ser total en el minuto 156 al 210.

5.1.2 Metionina-encefalina (Met-enc)

Ante la administración de 5 μ l de met-enc, 10^{-3} M se observó que después de la inyección se distinguen dos etapas: primero una reducción gradual inmediata de un 45 % en la amplitud del ERG alcanzando el minuto 116, y segundo esta reducción se mantiene fluctuando a partir del minuto 118 hasta el 210 sin presentarse recuperación (Gráfica 4). En la gráfica 5 se muestra el promedio de 6 experimentos. Posterior a la inyección, se presenta una caída brusca en la amplitud del ERG, hasta el minuto 58 de un 16 % seguido de una reducción gradual del minuto 60 al 74 alcanzando el 20 %. Del minuto 76 al 100 de 30 %, del minuto 102 al 158 en un 40 %, del 160 al 176 en un 43 % y del minuto 178 al 210 de un 47 %. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$) con respecto a la curva control. El registro se mantuvo hasta el minuto 240 sin observar recuperación alguna, en comparación con la curva de VH en donde sí se logra una recuperación total.



Gráfica 4.- ERG representativo de la administración de los 5 μ l de Met-enc 10^{-3} M (n=1). Se observa un decremento en la amplitud del ERG de un 45 %.



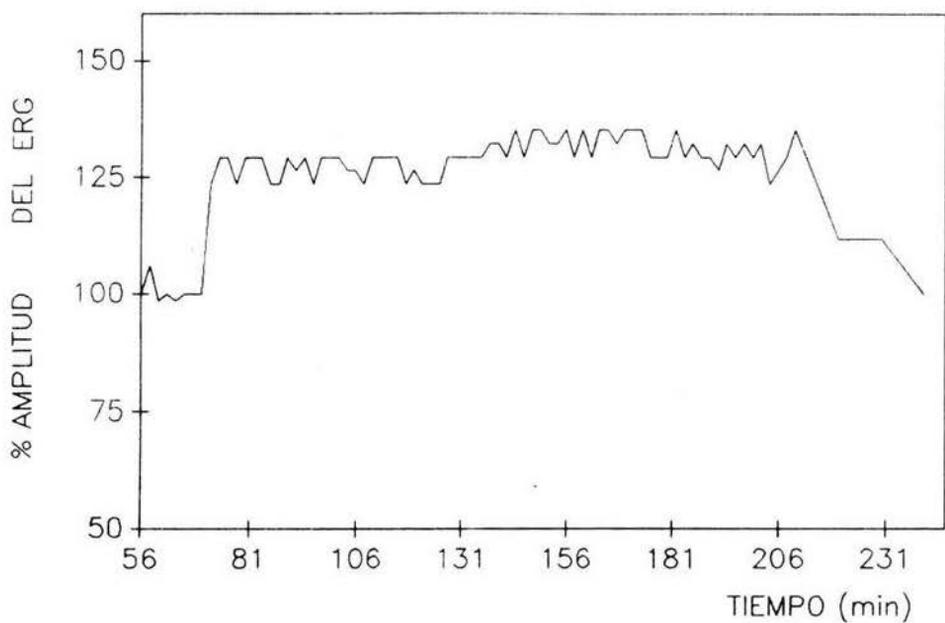
Gráfica 5.- Efecto de la administración de Met-enc 10^{-3} M (n=6). Obsérvese el decremento gradual en la amplitud del ERG $*=p<0.01$, hasta un 47 % en relación al 100 % de adaptación. Se gráfica en conjunto con los experimentos de VH.

5.1.3 Dserina²-leucina-encefalina-treonina (Dser²-leu-enc-treo)

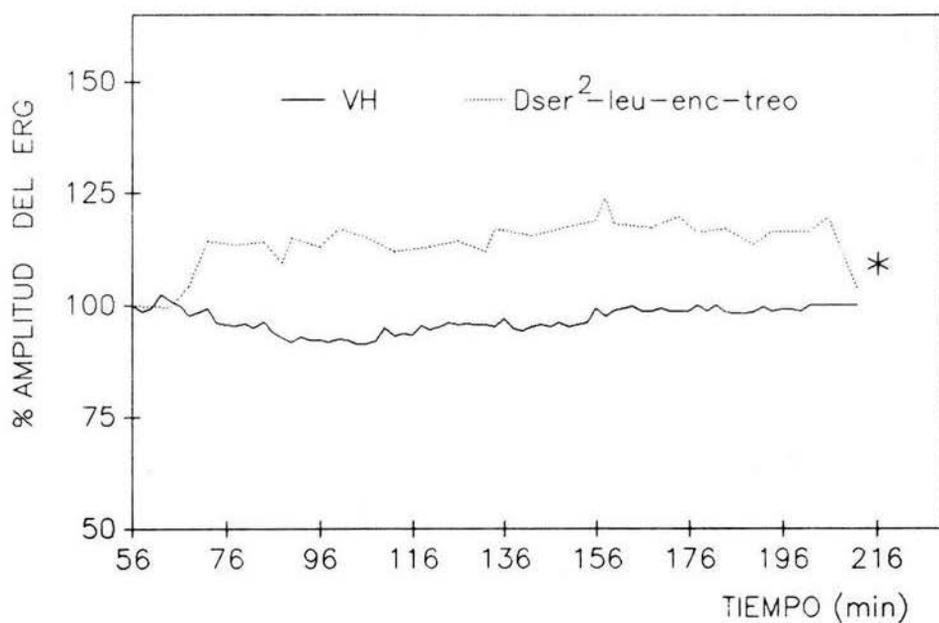
La Dser²-leu-enc-treo en una dosis de 10^{-3} M (gráfica 6), produce un incremento en la amplitud máxima del ERG de hasta el 35 % (minuto 70) el cual se mantiene durante 140 minutos (minuto 210). Su efecto fue monitoreado del minuto 212 hasta el 240 observándose una recuperación total. En el promedio de 3 experimentos (gráfica 7), se observa un aumento en la amplitud del ERG, en un 15 % del minuto 68 al minuto 148 y en un 17 % del minuto 150 al 156. En el minuto 158 llega a su máximo pico de aumento de 24 % que dura 4 minutos. Este aumento fue estadísticamente significativo ($p < 0.01$), después del minuto 204 empieza su recuperación, hasta el minuto 210 donde ésta es total.

5.1.4 Naloxona (Nlx)

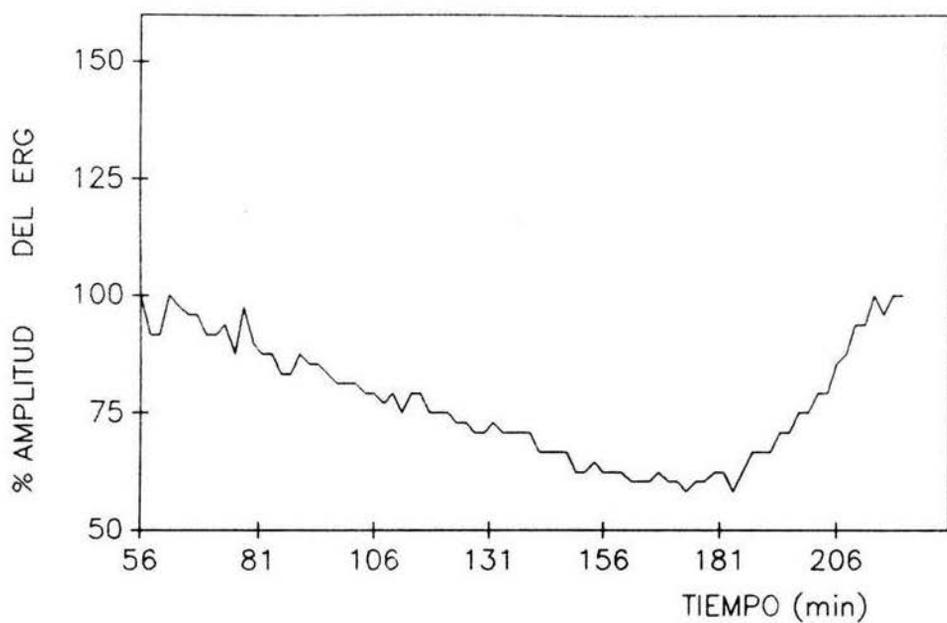
La Nlx aplicada en la dosis de 10^{-3} M, (gráfica 8), produce una reducción gradual de la amplitud del ERG alcanzando en el minuto 186 un 40 % y recuperándose totalmente en los últimos minutos del experimento (minuto 190-216). La gráfica 9 muestra el promedio de 9 experimentos. Después de la inyección se produce una reducción gradual de la amplitud del ERG, entre el minuto 58 al 78 se observó una reducción de un 10 %, del minuto 80 al 90 del 20 %, del minuto 92 al 166 del 30 %, este efecto se prolonga durante 76 minutos. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$) y del



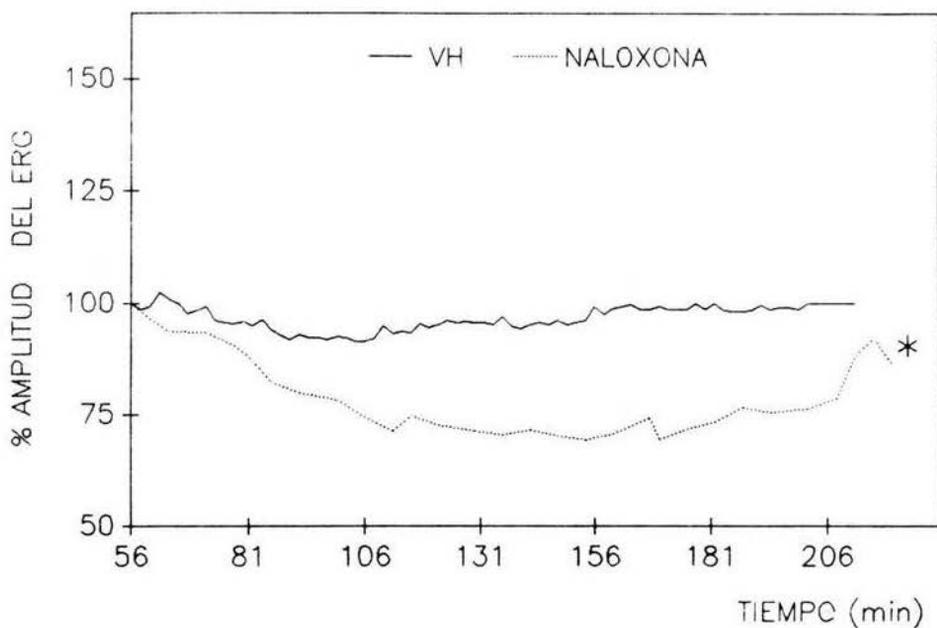
Gráfica 6.- Representando un solo experimento, de el efecto de la Dser²-leu-enc-treo, después de la inyección hay un aumento en la amplitud del ERG hasta un 25 %, posteriormente se recupera totalmente (n=1).



Gráfica 7.- En el promedio de 3 experimentos observamos un aumento gradual de la amplitud del ERG, después de la inyección, hasta 24 %, recuperándose totalmente en los últimos minutos.



Gráfica 8.- La Naloxona, 10^{-3} M, produce una reducción gradual en la amplitud del ERG hasta un 40 %, iniciándose su recuperación a partir del minuto 190 (n=1).

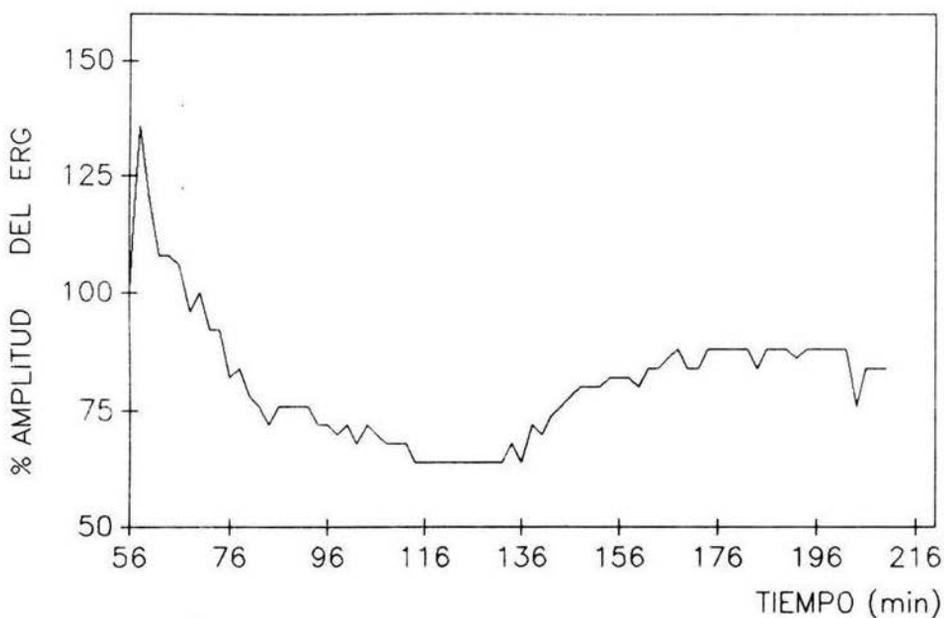


Gráfica 9.- Se representa al promedio de 9 experimentos, después de la inyección detectamos que la amplitud del ERG disminuye gradualmente hasta alcanzar un 30 %, prolongándose este efecto durante 76 minutos, recuperándose parcialmente en un 10 % en relación al 100 % de adaptación total, a partir del minuto 168 hasta el 220.

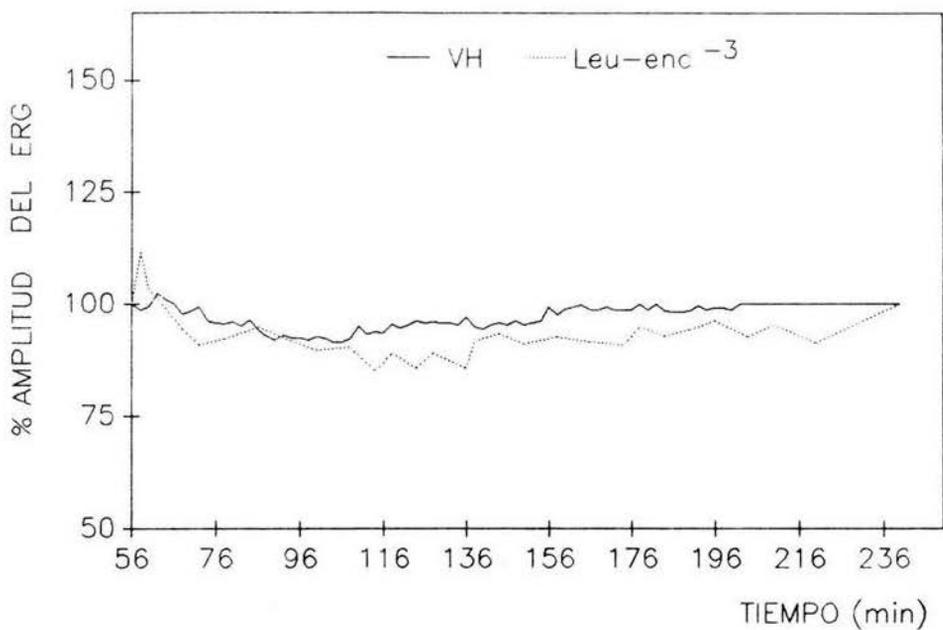
minuto 168 hasta el 220 observamos una ligera recuperación de un 10 % con respecto a la curva control en donde hay una recuperación total.

5.1.5 Leucina-encefalina (Leu-enc)

Las concentraciones a las que se administró la Leu-enc fueron las siguientes: 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M. Con Leu-enc 10^{-3} M (gráfica 10), se produce un aumento inmediato en la amplitud del ERG en un 35 % durante 4 minutos, seguido de una reducción en la amplitud en un 70 %, que se mantiene durante 24 minutos (minuto 136) A partir del minuto 138 se inicia su recuperación parcial que es de un 15 % hasta el minuto 210 con respecto al momento de la inyección. En la gráfica 11 se representa el promedio de 4 experimentos. Después de la inyección hay un aumento en la amplitud del ERG en un 10 % que dura 4 minutos a partir del minuto 62 y hasta el 112 se presenta una reducción gradual de un 10 %. Del minuto 114 al 134 se observó reducción de hasta el 15 %, siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p < 0.01$). Del minuto 136 al 210 se presenta una recuperación parcial del 10 % con respecto al momento de la inyección. Finalmente se monitoreó del minuto 230 al 240 en donde se observó que alcanza su recuperación total.



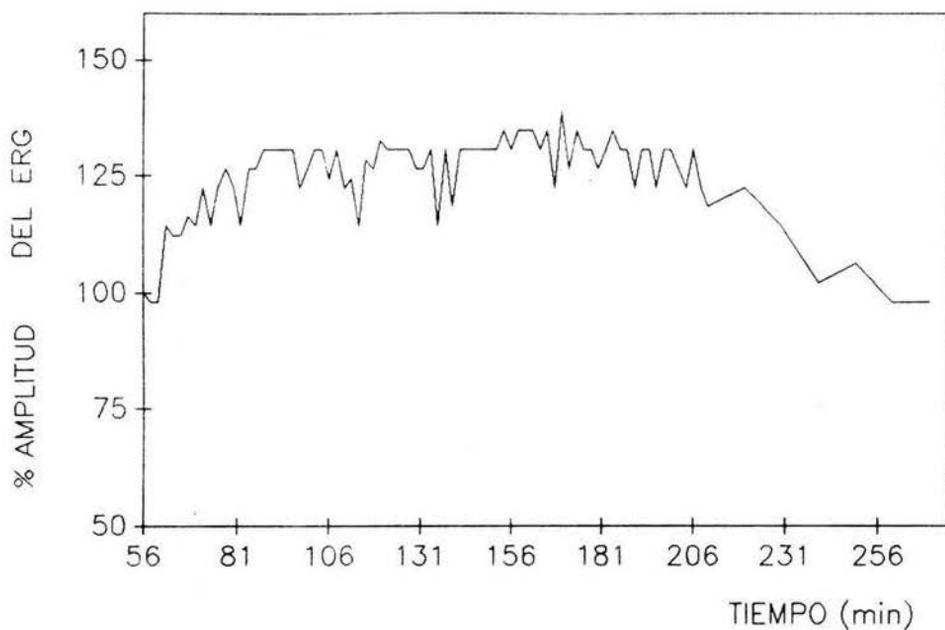
Gráfica 10.- La leu-enc 10^{-3} M (n=1), provoca después de la inyección, primero un aumento de la amplitud del ERG, hasta un 35 % durante 4 minutos, seguido de una reducción hasta un 70 % recuperandose parcialmente (15 %) en relación al 100 % de adaptación total.



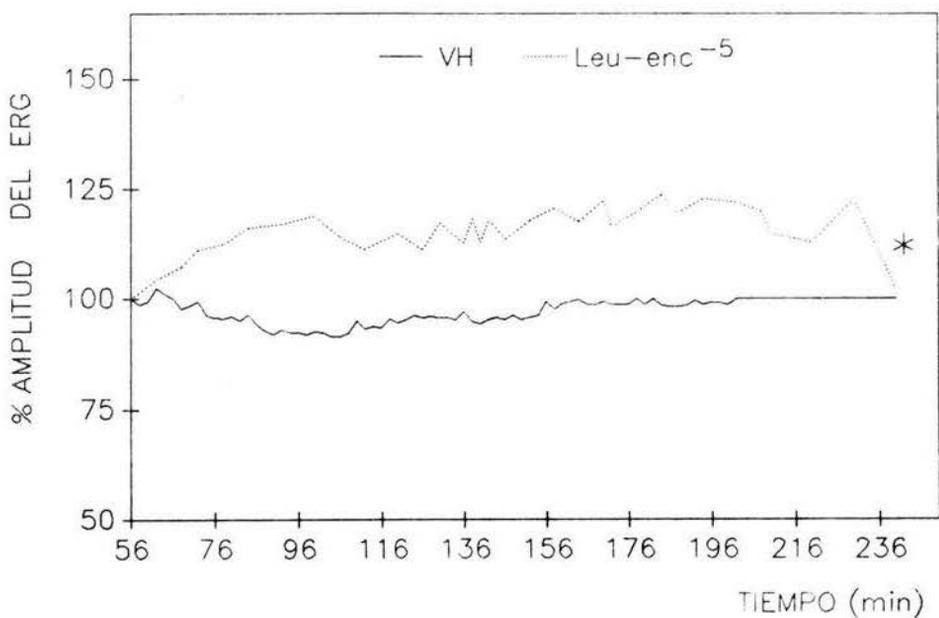
Gráfica 11.- Efecto de la leu-enc 10^{-3} M (n=4). Después de la inyección provoca un aumento en la amplitud del ERG hasta un 10 % en los primeros 4 minutos, seguido de una reducción gradual en la amplitud (a partir del minuto 62) alcanzando un 15 %. A partir del minuto 136 empieza su recuperación, siendo esta total del minuto 230 al 240.

La administración de Leu-enc 10^{-5} M, (gráfica 12) produjo un aumento en la amplitud del ERG en un 30 %. Este efecto se prolongó durante 140 minutos recuperándose totalmente en los últimos minutos del experimento (minuto 206-210). En la gráfica 13 se representa el promedio de 5 experimentos. En este caso la Leu-enc 10^{-5} M produce un aumento gradual en la amplitud del ERG hasta un 19 % en el minuto 94 fluctuando a partir del minuto 96 alrededor del 20 % hasta el minuto 232, siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p < 0.01$). A partir del minuto 234 se inicia su recuperación hasta el minuto 240 en donde ésta es total.

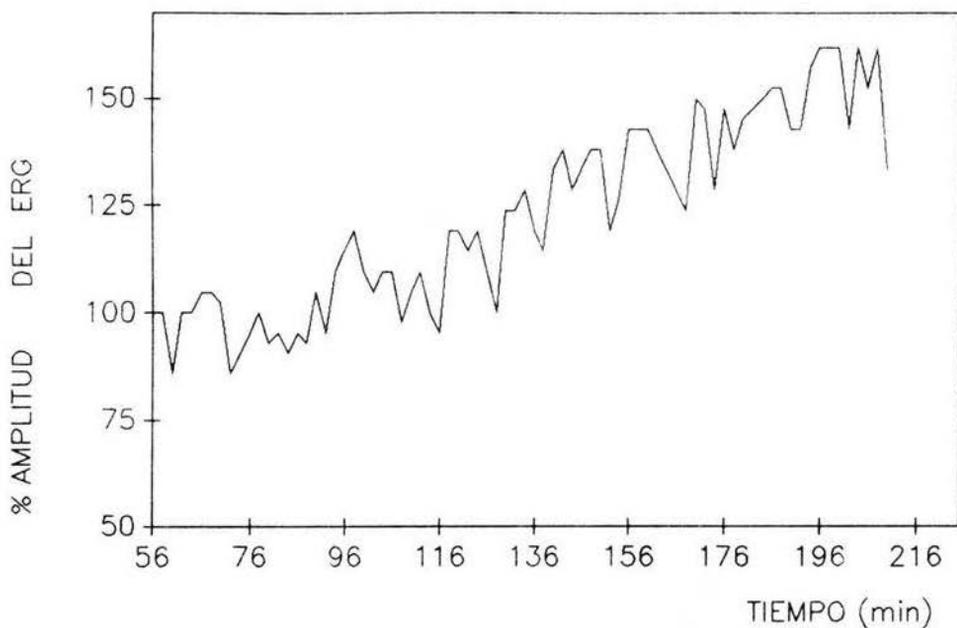
La Leu-enc 10^{-7} M (gráfica 14) se produjo un aumento gradual en la amplitud del ERG que alcanza un 60 % fluctuando este durante 148 minutos (minuto 210). A partir del minuto 212 y hasta el 240 se observa una ligera recuperación de un 30 % con respecto al momento de la inyección. En la gráfica 15 se muestra el promedio de 3 experimentos. La amplitud del ERG aumentó gradualmente de un 10 % (minuto 60 al 110) hasta un 50 % (minuto 112 al 210). A partir del minuto 212 y hasta el 240 se detecta una recuperación parcial de un 20 %.



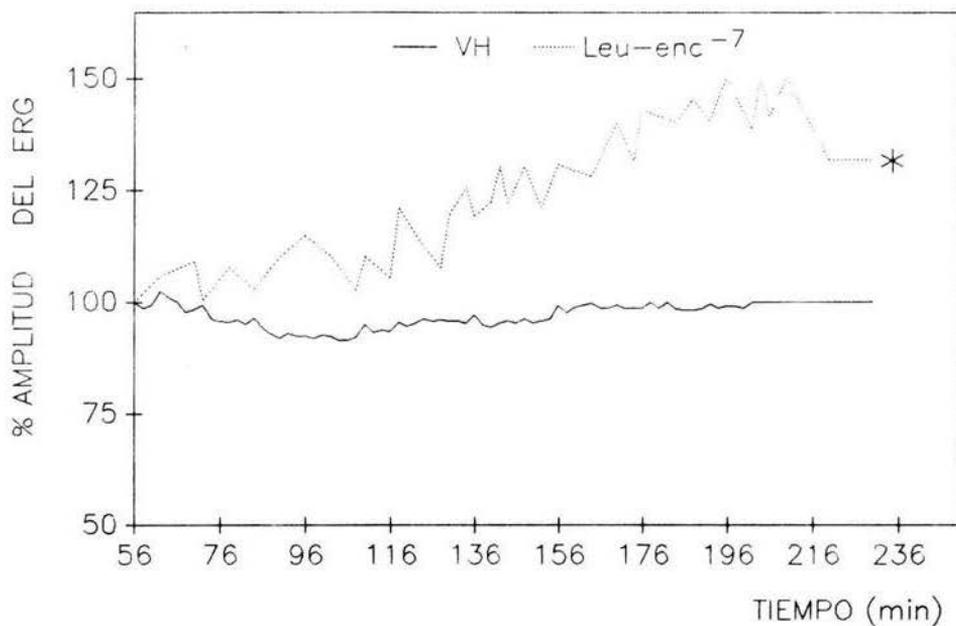
Gráfica 12.- Cuando administramos leu-enc 10^{-5} M (n=1), hay un aumento de la amplitud del ERG, después de la inyección, hasta un 30 % recuperandose totalmente en los últimos minutos. ERG representativo.



Gráfica 13.- La leu-enc 10^{-5} M (n=5) después de la inyección provoca un aumento gradual significativo $*=p<0.01$ de la amplitud del ERG hasta un 20 %. Este efecto se prolonga durante 140 minutos recuperándose en los últimos minutos del experimento (minuto 212 al 230).

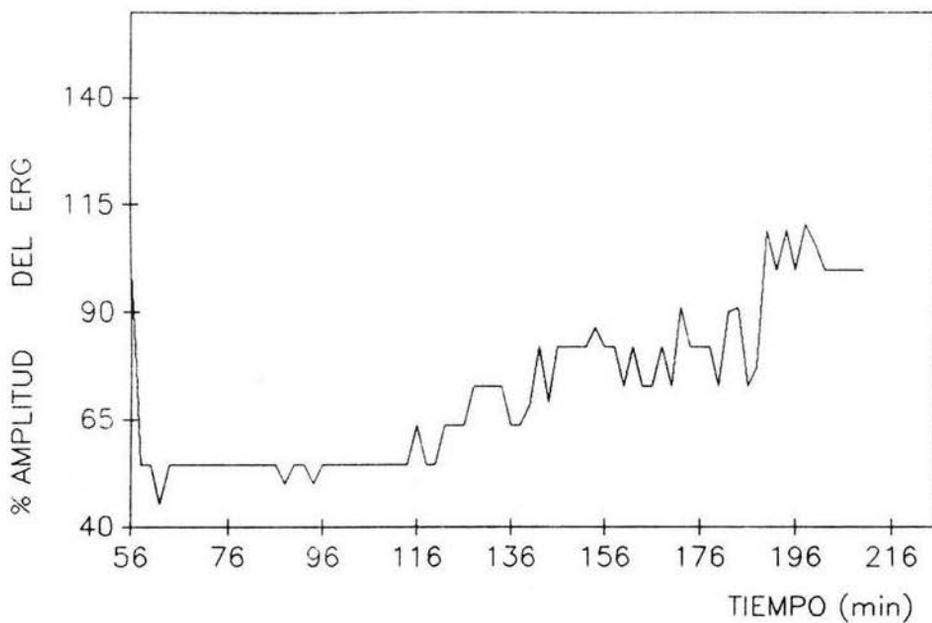


Gráfica 14.- ERG representativo de la administración de leu-enc 10^{-7} M. Se produjo un aumento gradual de la amplitud del ERG hasta un 60 %. A partir del minuto 212 y hasta el 240, aparece un ligera recuperación del 30 %.

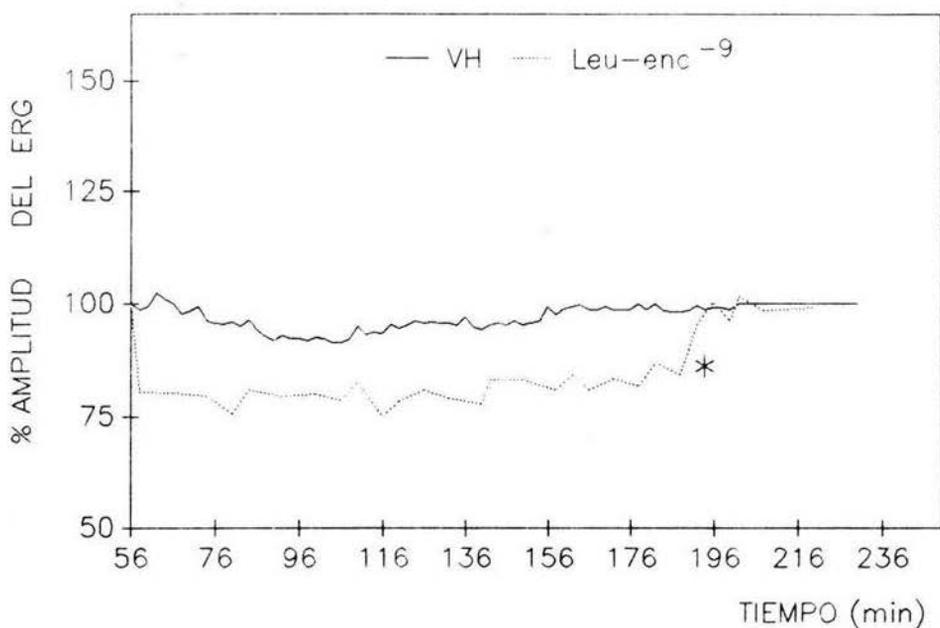


Gráfica 15.- La administración de leu-enc 10^{-7} M (n=2) provocó un incremento gradual de la amplitud del ERG significativo $*=p<0.01$ hasta un 50 %, del minuto 212 y hasta el 240. Se observó una ligera recuperación de un 20 %.

La administración de Leu-enc 10^{-9} M (gráfica 16) produjo una reducción inmediata en la amplitud del ERG en un 55 % (hasta el minuto 62), este efecto se prolongó durante 54 minutos (minuto 64 al 114). A partir del minuto 116 y hasta el 198 la amplitud fluctuó en 30 % recuperándose totalmente a partir del minuto 200 y hasta el 210. En el promedio de 5 experimentos (gráfica 17) inmediatamente después de la inyección (minuto 58), la amplitud del ERG se decrementó en un 20 %. Este efecto se prolongó durante 136 minutos hasta el minuto 192. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$) a partir del minuto 194, en donde se inició la recuperación observando que se completa en el minuto 196 y del minuto 200 al 210.



Gráfica 16.- Con leu-enc 10^{-9} M (n=1). Se provocó una reducción de la amplitud del ERG hasta de un 55 %. Su recuperación se inicia en el minuto 142.



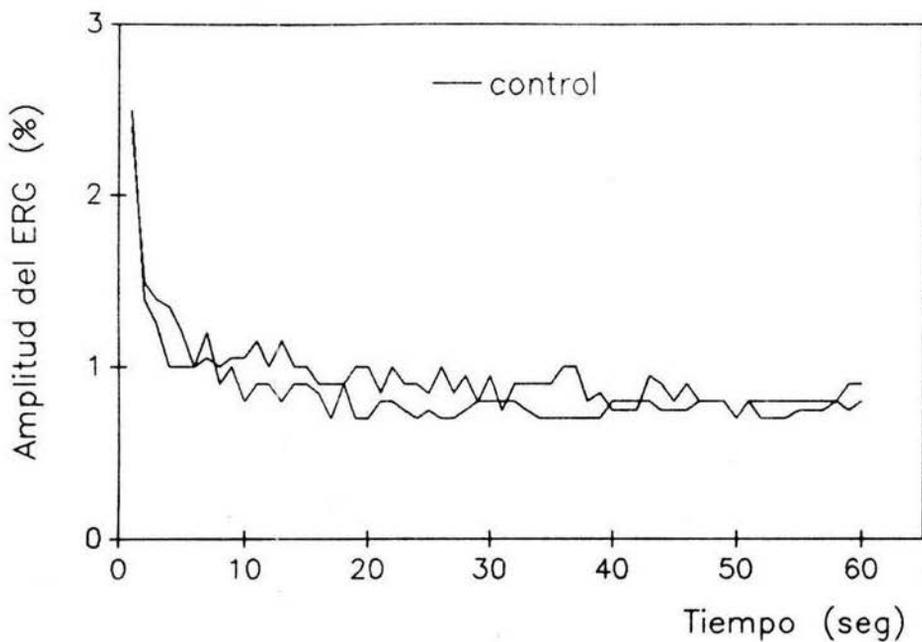
Gráfica 17.- Efecto de la leu-enc 10^{-9} M (n=5). Se observó un decremento significativo $*=p<0.01$ de la amplitud del ERG hasta un 20 %, este efecto se prolonga durante 124 minutos empezando a recuperarse a partir del minuto 182.

5.2 ADAPTACION A LA LUZ

Se administraron 5 μ l de solución fisiológica VH para el grupo control, así como 5 μ l de Met-enc 10^{-3} M, Naloxona 10^{-3} M, Dser²-leu-enc-treo 10^{-3} M y Leu-enc 10^{-3} M, para los grupos experimentales. La administración de la solución VH así como las sustancias experimentales se aplicaron, después de la curva control en el mismo organismo experimental.

En estas gráficas se representa en el eje de las ordenadas la amplitud del ERG en porciento y en el de las abcisas el tiempo en segundos.

En la gráfica 18 se presentan dos curvas obtenidas de registros, en los cuales no se les administró ninguna sustancia. Cada curva se registró con un intervalo de 10 minutos. Se observó que no se presentan cambios significativos en la amplitud del ERG cuando se compararon las dos curvas desde el inicio de la frecuencia de estímulo hasta su adaptación a la luz.



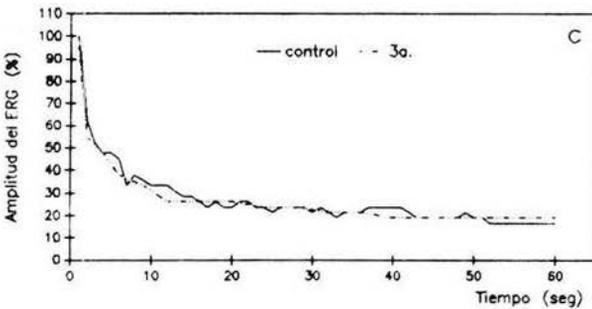
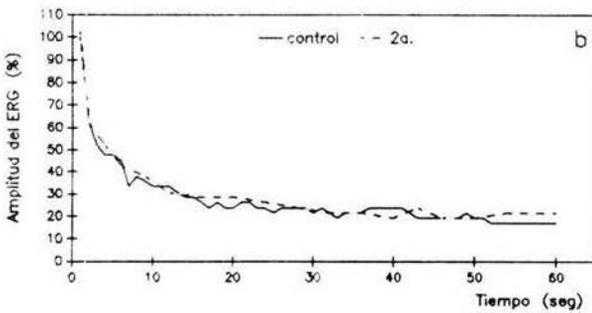
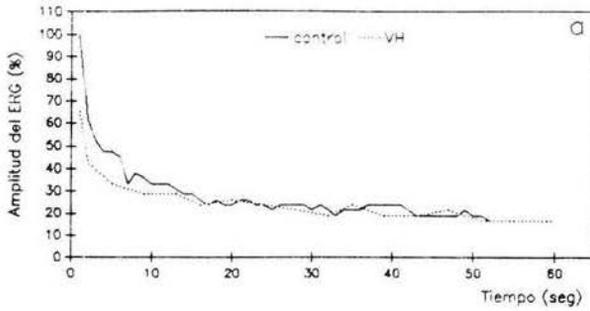
Gráfica 18.- Adaptación a la luz (n=2). Se Observaron dos curvas (10 minutos de obscuridad entre las dos), en las cuales se detecta que no hay diferencias entre ambas, desde el inicio de la frecuencia de estímulo, hasta su completa adaptación a la luz.

5.2.1 Solución Fisiológica VH

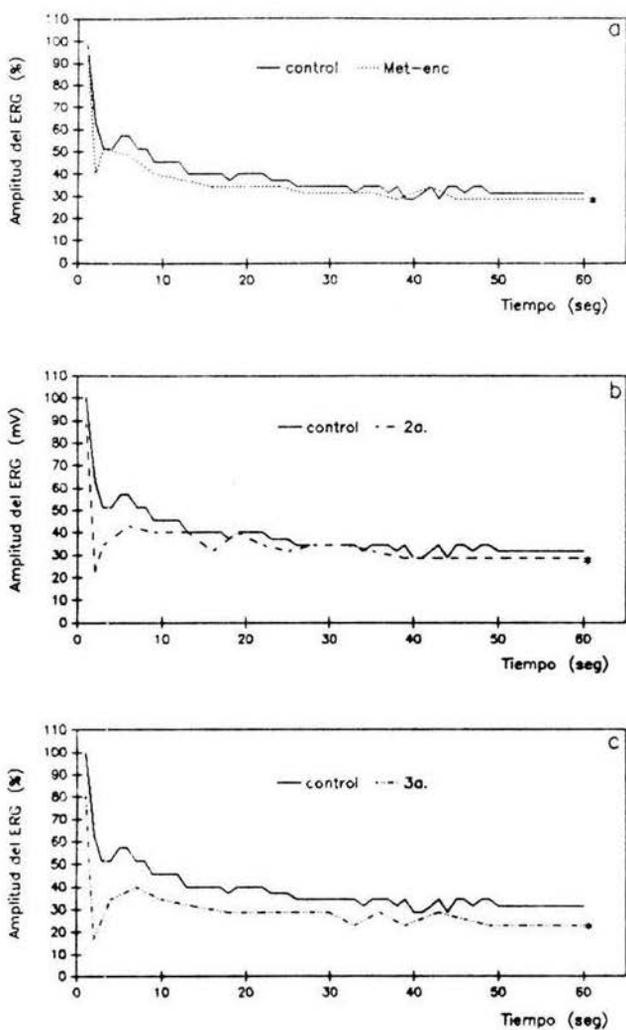
Se administraron 5 μ l de solución VH durante el intervalo de obscuridad (10 minutos) entre la primera y segunda curva. En la gráfica 19a se puede observar, que después de la inyección se presenta una reducción en la amplitud del ERG de un 35 %, en los primeros segundos de haber iniciado la frecuencia de estimulación con respecto a la control. Sin embargo esta reducción en la amplitud desaparece en las curvas posteriores como observamos en las gráficas 19b y 19c, 11 y 22 minutos después de la inyección respectivamente con respecto a el control.

5.2.2 Metionina-encefalina (Met-enc)

La administración de 5 μ l de met-enc en una concentración de 10^{-3} , (gráfica 20a) produce un ligero decremento en la amplitud del ERG de un 10 % en los primeros segundos de haber iniciado el estímulo, seguido de su adaptación con respecto al control (-). Diez minutos después de la inyección (Gráfica 20b) se detecta que este decremento alcanzó hasta un 25 % en los primeros segundos de haber iniciado el estímulo. Veinte minutos después de la inyección (gráfica 20c) el decremento llegó a un 30 %. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$).



Gráfica 19.- Ante la administración de solución salina (···) la amplitud del ERG se decrementa en relación al control (-) panel a. Sin embargo en el panel b (--) y c (---), observamos que las diferencias han desaparecido (10 y 20 minutos después de la inyección respectivamente) en relación al control (-) (n=1).



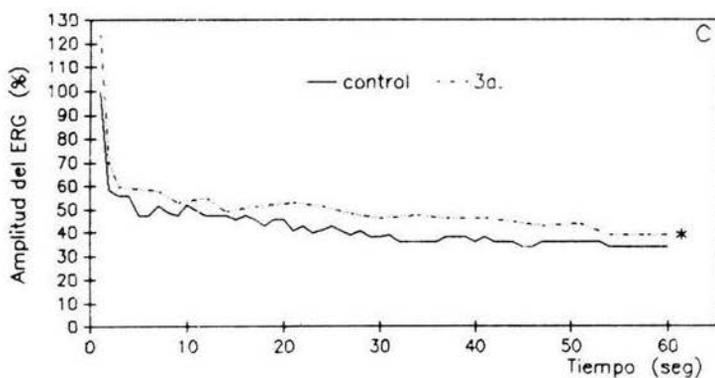
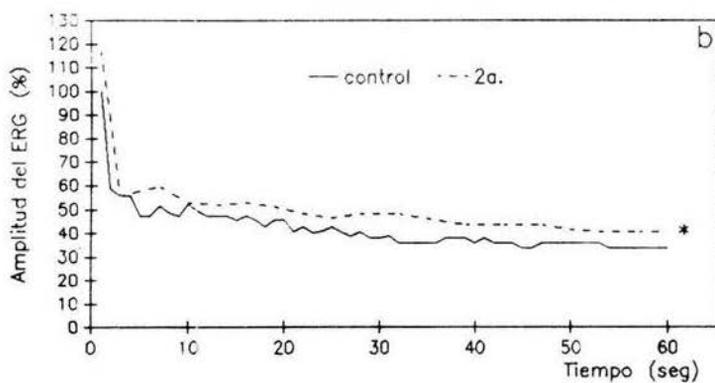
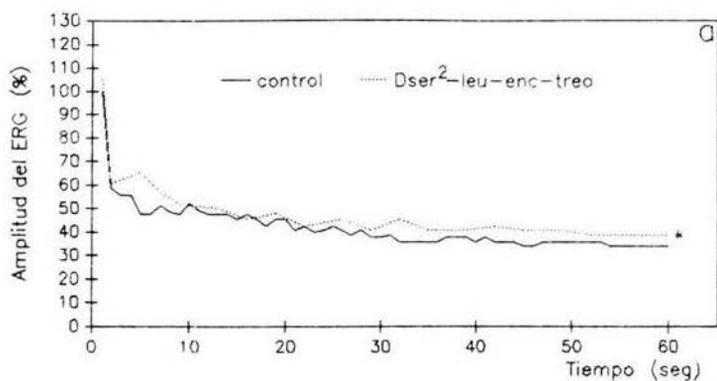
Gráfica 20.- En el panel a, se detecta un ligero decremento en la amplitud del ERG cuando se administra Met-enc (...) con respecto al control (-). Después de 10 (--) y 20 (---) minutos (panel b y c respectivamente) este decremento se acentúa (n=1). *=p<0.01

D-serina²-leucina-encefalina-treonina (D-ser²-leu-enc-treo)

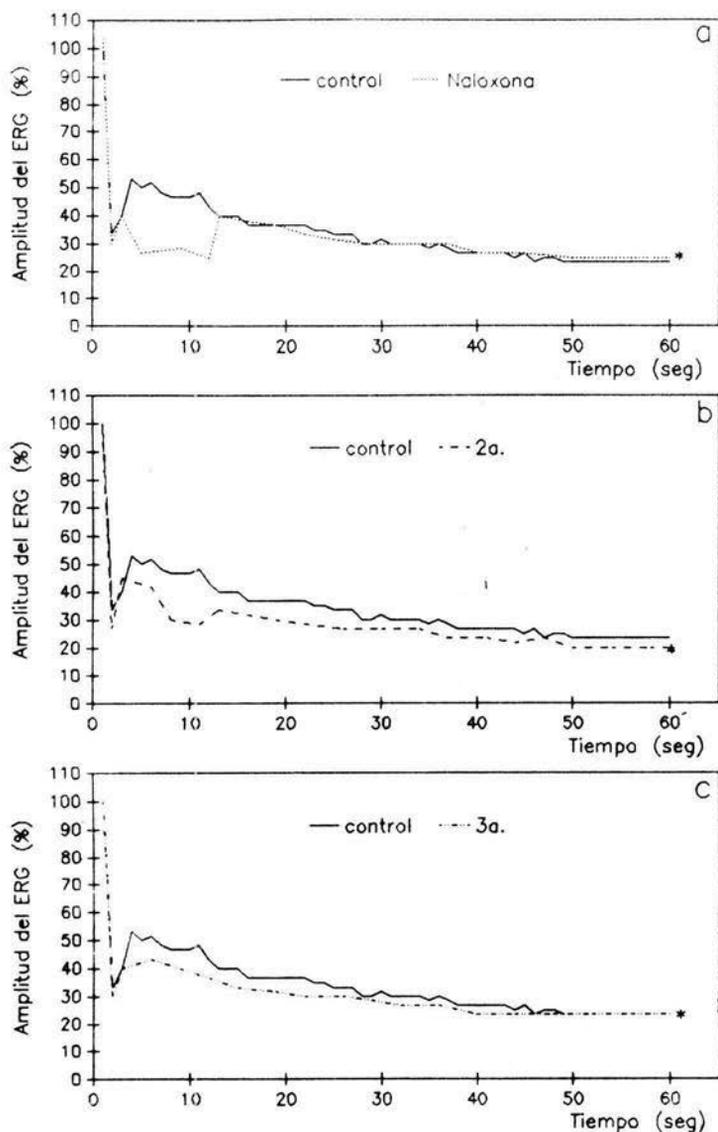
En la gráfica 21a, se observa el efecto de la administración de 5 μ l de Dser²-leu-enc-treo 10^{-3} M la cual indujo un aumento en la amplitud del ERG de un 10 % a partir aproximadamente 5 segundos después de haber iniciado el estímulo. Este aumento fluctuaba entre 5 y 10 % en el resto de la curva, en comparación con la curva control. Después de 10 minutos de haber realizado la inyección (gráfica 21b) el aumento en la amplitud se incrementó llegando a un 20 % que se mantuvo desde el inicio del estímulo con respecto a la control. En la gráfica 21c, 20 minutos después de la inyección, el aumento en la amplitud fue mayor alcanzando un 30 % desde el inicio de la aplicación del estímulo. No se observa recuperación en relación a la curva control y estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

5.2.4 Naloxona (Nlx)

Después de la aplicación de Nlx 10^{-3} M (gráfica 22b) se observa un decremento en la amplitud del ERG en un 20 % inmediatamente después (3 segundos) de haber iniciado el estímulo. Esta disminución se mantuvo alrededor de 9 segundos. A partir del segundo 11 se inició en la curva experimental una tendencia hacia la curva control, sin embargo 10 minutos después de la inyección como se observa en la gráfica 22b, este decremento se redujo a un 10 % en un tiempo de 9 segundos, pero el resto de la curva se



Gráfica 21.- La administración de Dser²-leu-enc-treo (·····) panel a, provoca un aumento en la amplitud del ERG con respecto al control (-). Este aumento se presenta más marcado 10 (---) y 20 (-·-·-) minutos después de la inyección panel b y c respectivamente (n=1). * $p < 0.01$

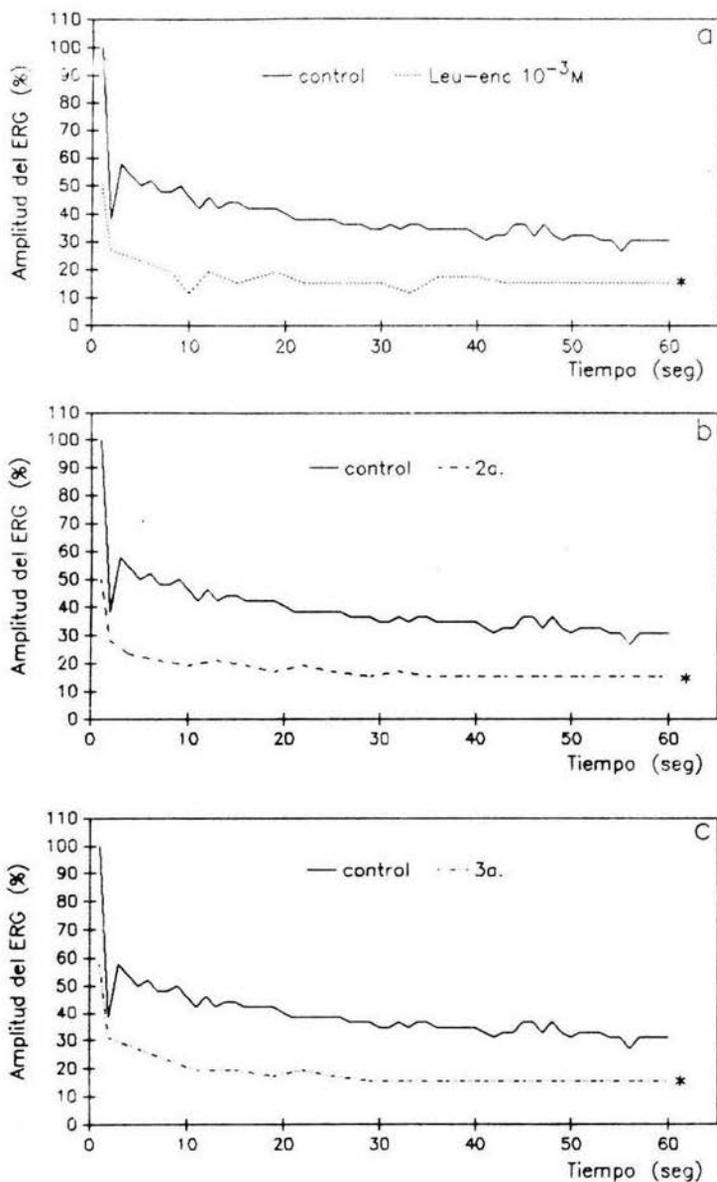


Gráfica 22.- En el panel a se detecta un decremento en la amplitud del ERG cuando se administra Nlx (...) en los primeros segundos de iniciada la estimulación, seguido de su adaptación. 10 minutos después (--) de la inyección panel b este decremento es más marcado y 20 minutos después (---) panel c ya se presenta una tendencia hacia la curva control (-) (n=1). *= $p < 0.01$

mantuvo fluctuando en 5 % con respecto a la curva control. 20 minutos después de la inyección (gráfica 22c) el decremento es menor al 5 % desde el inicio de la estimulación presentando esta curva una tendencia hacia la curva control. Todos los cambios descritos fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

5.2.5 Leucina-encefalina (Leu-enc)

La administración de $5 \mu\text{l}$ leu-enc 10^{-3} M (gráfica 23a) produjo un decremento en la amplitud del ERG de un 40 % al inicio de la estimulación, el resto de la curva fluctuaba en un 20 % con respecto al control. En la gráfica 23b se puede observar que 10 minutos después de la inyección este decremento se mantuvo constante; 20 minutos después se observó una tendencia del 10 % hacia la curva control, sin embargo en el resto de la curva, se mantuvo fluctuando en 20 % con respecto a la curva control siendo estos cambios estadísticamente significativos ($p < 0.01$).



Gráfica 23.- La aplicación de Leu-enc 10^{-3} M (n=1) (···) provocó un decremento en la amplitud del ERG con respecto al control (-) panel a. Este decremento se mantiene constante 10 y 20 minutos después de la inyección como se observa en el panel b (--) y c (-·-·) respectivamente en relación al control (-). *= $p < 0.01$

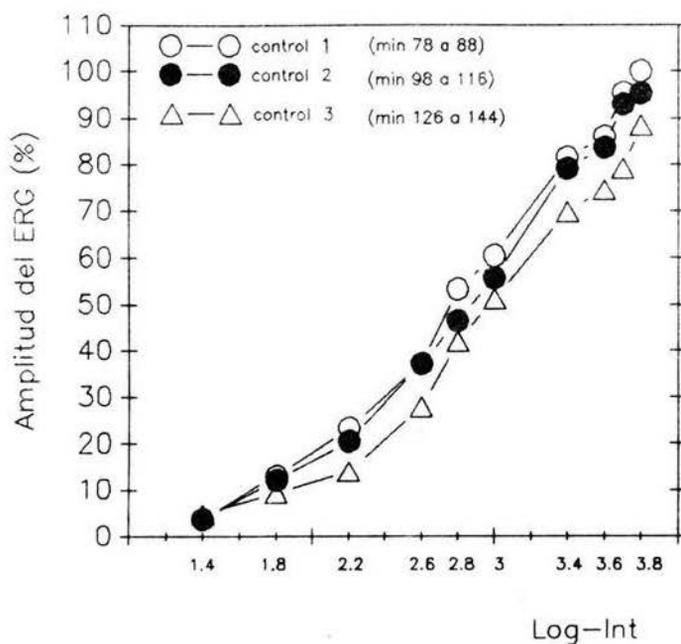
5.3 V-logI

En esta serie de experimentos, se aplicaron diferentes estímulos luminosos que fueron de una menor intensidad hacia la más alta (ver tabla 2). Se administraron para el grupo control 5 μ l de solución fisiológica VH y 5 μ l de Met-enc, Dser²-leu-enc-treo, Naloxona y Leu-enc para el grupo experimental en una concentración de 10^{-3} M para todos los casos. La administración de las sustancias experimentales se realizó después de registrar el ERG control en el mismo organismo y faltando un minuto para comenzar el registro experimental.

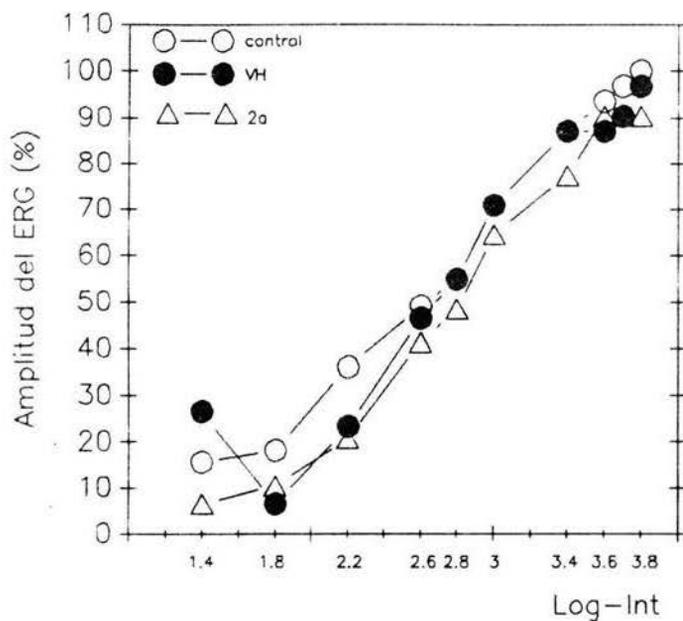
En la gráfica 24 se muestran tres curvas, a las cuales no se les administró ninguna sustancia, obtenidas con un intervalo de oscuridad de 10 minutos entre cada una. En las dos primeras se observó que no hay cambios en la amplitud del ERG ante todas las intensidades empleadas. Después de 20 minutos en la tercera curva, se observó un ligero decremento en la amplitud del ERG a partir del segundo pulso (7.56 lux) y hasta el último (1222.4 lux).

5.3.1 Solución fisiológica VH

La administración de solución VH produjo un decremento de un 10 % en la amplitud del ERG en el segundo estímulo (7.56 lux), con respecto a la curva control (gráfica 25). 20 minutos después de la inyección, el decremento, antes visto desapareció desde el primer pulso y hasta el último, con respecto a la curva control.



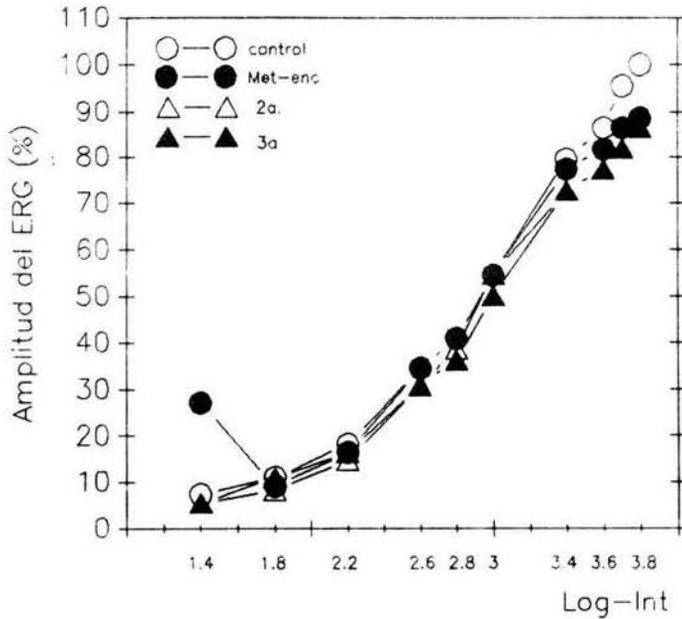
Gráfica 24.- En el eje de las abcisas se representa el logaritmo de la intensidad y el de las ordenadas la amplitud del ERG (%). En las dos primeras curvas (O-O) (●-●), no se detectan diferencias en la amplitud del ERG en presencia de las diferentes intensidades empleadas. 20 minutos después (Δ-Δ) se observó una ligera reducción en la amplitud del ERG a partir de la segunda y hasta la última intensidad.



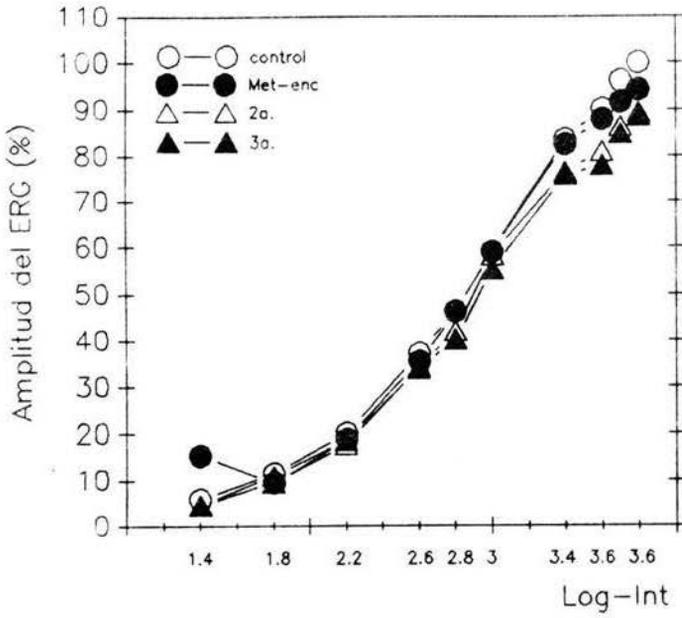
Gráfica 25.- Cuando se administra la solución salina VH (●-●). se detecta un ligero aumento en la 1ª intensidad seguida de una reducción en la amplitud del ERG, con respecto al control (○-○). 10 minutos después de la inyección (△-△) la curva tiende hacia el control (○-○) (n=2).

5.3.2 Metionina-encefalina (Met-enc)

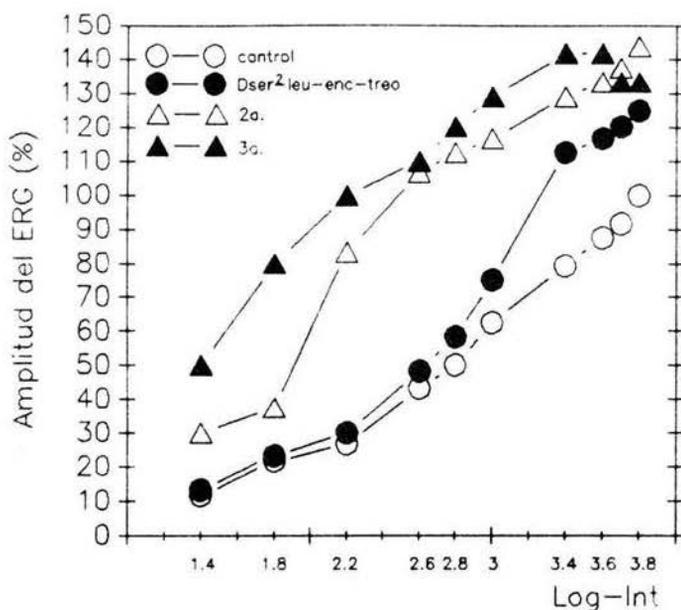
Con la aplicación de Met-enc en el primer pulso (2.7 lux) se detectó un aumento de 20 % en la amplitud del ERG (gráfica 26). A partir del segundo y hasta el séptimo estímulo esta curva presenta una tendencia hacia la curva control, sin embargo en los tres últimos estímulos (713.44, 911.19 y 1222.34 lux) hubo una reducción en la amplitud de un 18 %, 12 % y de un 10 % respectivamente. 10 minutos después se observó que desde el primer pulso hasta el séptimo no hay diferencias con respecto al control, sin embargo en los tres últimos pulsos, la reducción vista en la curva anterior se mantuvo constante. 20 minutos después de la aplicación no se presentó ningún cambio en la amplitud con respecto al control. En la gráfica 27, promedio de dos experimentos, se observó después de la inyección un ligero aumento en la amplitud del ERG de un 15 % en el primer pulso (2.7 lux) a partir del segundo y hasta el último estímulo esta curva se comportó como la curva control. Después de 10 y 20 minutos de haber realizado la inyección estas curvas presentaron tendencia hacia la curva control.



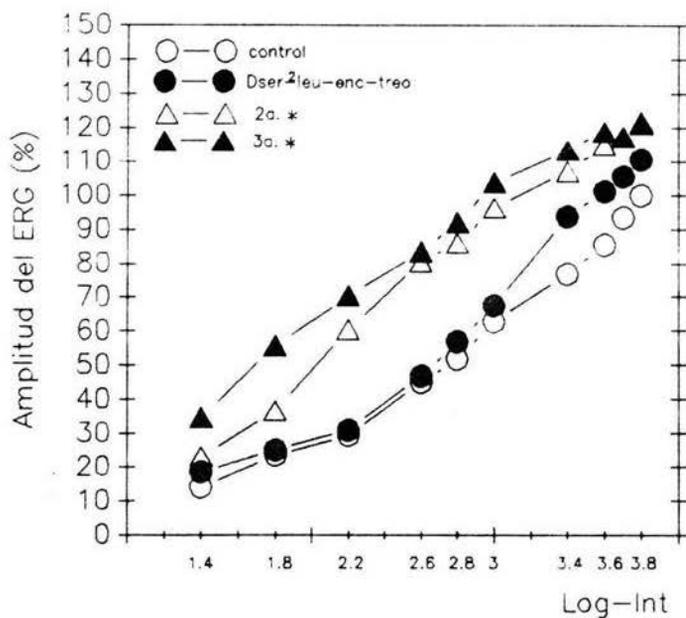
Gráfica 26.- La amplitud del ERG aumenta en la 1ª intensidad cuando se aplica Met-enc 10^{-3} M (●-●), a partir del 2º estímulo hay una tendencia hacia la curva control (O-O), 10 (△-△) y 20 (▲-▲) minutos después de la inyección no hay diferencias con respecto a la curva control (O-O) (n=1).



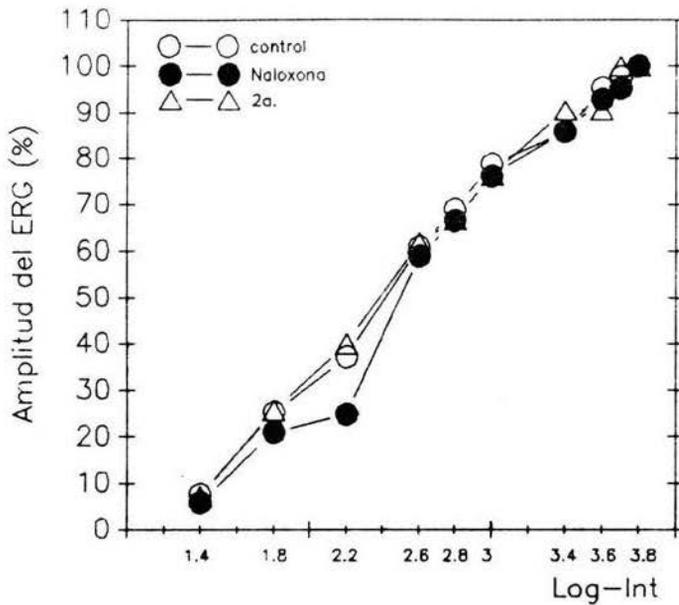
Gráfica 27.- Promedio de dos experimentos, cuando se administra Met-enc 10^{-3} M (●-●) provocó un ligero incremento en la amplitud del ERG en la 1ª intensidad. A partir del 2º estímulo hay una tendencia hacia la curva control (○-○), 10 (△-△) y 20 (▲-▲) minutos después de la inyección, el comportamiento es similar al control (○-○).



Gráfica 28.- Cuando se administró Dser²-leu-enc-treo (●-●) esta provocó un aumento en la amplitud del ERG a partir de la 4^o intensidad y hasta la última con respecto al control (O-O), 10 minutos después de la inyección (△-△) se incrementa más la amplitud a partir de la 1^o y hasta la última intensidad y después de 20 minutos (▲-▲) este aumento se acentúa más con respecto al control (O-O) (n=1).



Gráfica 29.- Promedio de dos experimentos donde se aplicó Dser²-leu-enc-treo 10⁻³ M (●-●). Esta causa un aumento en la amplitud del ERG significativo *=p<0.01 en los últimos cuatro estímulos con respecto al control (○-○), 10 (△-△) y 20 (▲-▲) minutos después de la inyección este aumento se acentúa más en relación al control (○-○).



Gráfica 30.- Administración de $Nlx 10^{-3} M$ ($n=1$). Se observó en la curva experimental (●-●), se presenta una reducción en la amplitud del ERG en la 3ª intensidad en relación al control (○-○), 10 minutos después de la inyección (▲-▲) este decremento desaparece.

5.3.3 D-serina²-leucina-encefalina-treonina (D-ser²-leu-enc-treo)

La administración de este opiáceo, durante los tres primeros pulsos no se presentaron efectos sobre la amplitud del ERG, sin embargo a partir del cuarto estímulo (44.28 lux), se observó que la amplitud aumentó hasta un 25 % con respecto a la curva control. 10 minutos después de la inyección se incrementó en 20 % en el primer estímulo y hasta en un 40 % para el último pulso con respecto a la curva control. 20 minutos de la inyección, la amplitud se incrementó un 40 % para el primer pulso hasta un 45 % para el último, con respecto a la curva control. Estos cambios se pueden observar en la gráfica 28. En el promedio de dos experimentos (gráfica 29), después de la inyección la curva experimental se mantiene igual que la curva control. Sin embargo 10 minutos después, la amplitud aumentó en un 10 % para el primer estímulo y 15 % para el último pulso. 20 minutos después hay una tendencia hacia la curva control pero solo se redujo un 5 % desde el primer estímulo hasta el último. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

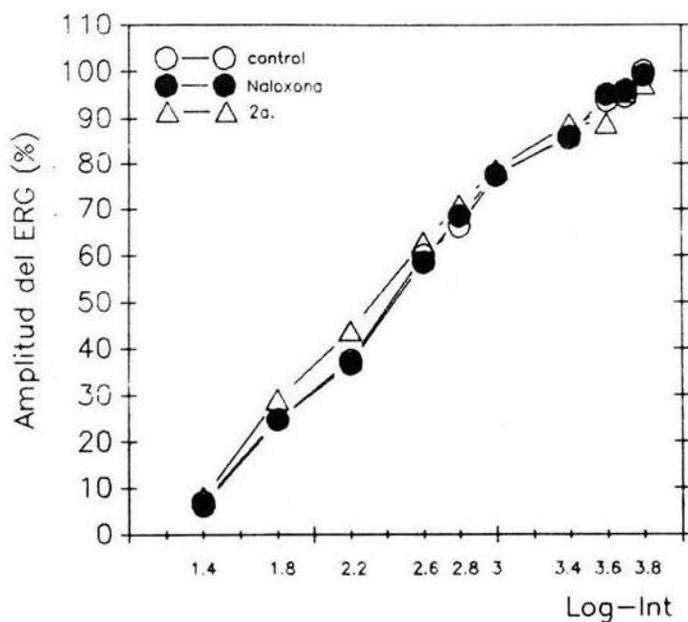
5.3.4 Naloxona (Nlx)

Cuando se administró la Nlx en una concentración de 10^{-3} M (gráfica 30), la amplitud del ERG disminuye un 10 % en el tercer pulso luminoso (14.79 lux), la respuesta a los siguientes estímulos no cambiaron con respecto a la curva control. 10 minutos después de

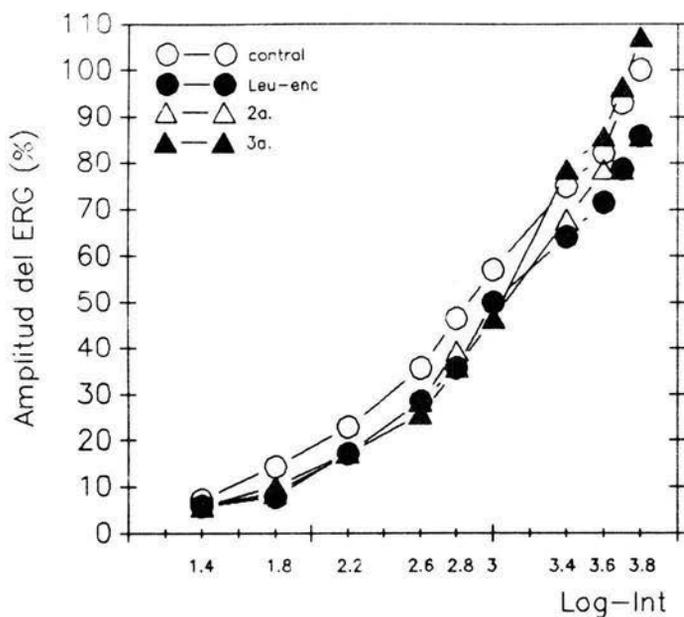
la inyección el decremento desaparece y esta última curva presenta un comportamiento igual al de la curva control. En la gráfica 31 se observa que después de la inyección, no hay cambios en la amplitud del ERG, resultado similar se observó 10 y 20 minutos después de la inyección manteniendo la tendencia similar que la control.

5.3.5 Leucina-encefalina (Leu-enc)

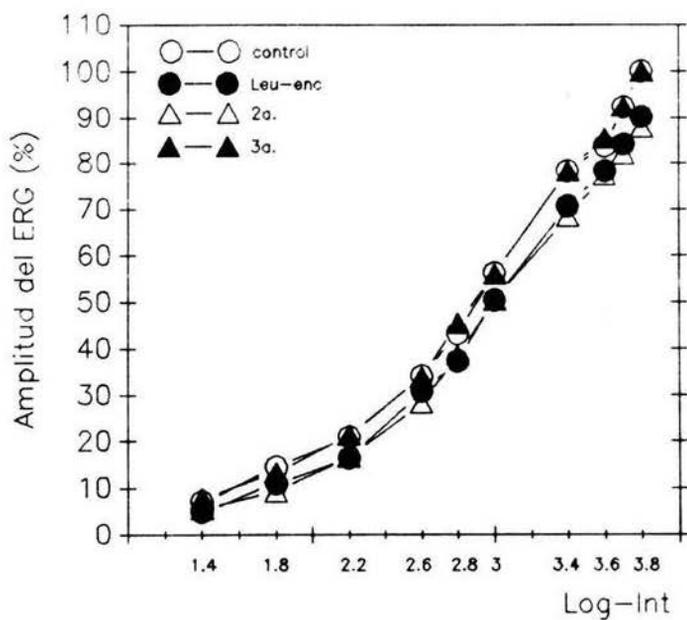
La leu-enc cuando fué administrada como se observó en la gráfica 32, produjo un ligero decremento en la amplitud del ERG de un 5 % a partir del segundo estímulo y hasta el último. Este decremento se mantuvo constante (5 %) 10 minutos después de haber realizado la inyección. 20 minutos después, se observó que en los 6 primeros estímulos este decremento se mantuvo constante (5 %), sin embargo a partir del séptimo pulso hubo una tendencia hacia la curva control. En el promedio de dos experimentos (gráfica 33) después de la inyección se observó un ligero decremento en la amplitud del ERG de un 5 % desde el primer estímulo y hasta el último. Este decremento se mantuvo en la tercera curva, 10 minutos después de haber realizado la inyección, sin embargo 20 minutos después este decremento desapareció.



Gráfica 31.- La $Nlx 10^{-3} M$ ($n=2$) cuando se administra (●-●) no se presenta ningún cambio en la amplitud del ERG después de la aplicación y 10 minutos (Δ-Δ) después de la inyección. Con respecto al control (○-○).



Gráfica 32.- La administración de leu-enc 10^{-3} M (●-●) provocó una ligera reducción en la amplitud del ERG a partir de la 2ª y hasta la última intensidad en relación al control. 10 minutos (△-△) después de la inyección este cambio se mantiene constante, después de 20 minutos (▲-▲) en los últimos cuatro estímulos aparece una tendencia hacia la curva control (○-○) (n=1).



Gráfica 33.- Promedio de dos experimentos al aplicarse Leu-enc 10^{-3} M (●-●). La administración no provocó ningún cambio en la amplitud del ERG, 10 (Δ-Δ) y 20 (▲-▲) después de la inyección con respecto al control (○-○).

6. DISCUSION

En la evaluación de los cambios en la amplitud del ERG originada por los diferentes opiáceos administrados se encontró lo siguiente:

La administración de Dser²-leu-enc-treo en una concentración de 10^{-3} M produjo que la amplitud del ERG se decrementara significativamente ($p < 0.01$) tanto en las curvas de oscuridad, en las de adaptación a la luz y las curvas V-log I. Estos cambios en la amplitud probablemente se deban a que esta substancia actúa sobre los receptores δ situados en diferentes regiones de la vía visual ó bien sobre vías encefalinérgicas que se encuentran presentes en el tallo ocular. Se ha reportado que con la aplicación de este opiáceo en retina aislada hay un cambio en la amplitud del ERG en la adaptación a la oscuridad (53). Se postula que estos cambios se deben a que este opiáceo está actuando sobre el movimiento de los pigmentos visuales, tanto proximal como distal (previamente adaptados a la luz durante 120 minutos), ya que los primeros minutos (de la adaptación a la oscuridad) no se alcanza la adaptación total (53). Ahora bien, en nuestro sistema descartamos esta posibilidad ya que los experimentos se mantuvieron en oscuridad previa (20 minutos), por lo que los pigmentos visuales tanto el proximal como el distal se encontraban retardados.

Con la administración de Naloxona en concentración de 10^{-3} M se provocó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) en las curvas de oscuridad así como en las curvas de adaptación a la luz, sin embargo en las curvas V-log I no existieron diferencias estadísticamente significativas; estas modificaciones en la amplitud del ERG probablemente se deban a que la Naloxona está compitiendo por los receptores del tipo δ y μ . Sin embargo la Naloxona presenta una mayor afinidad por los receptores δ , que pueden encontrarse situados en diferentes vías ó regiones del sistema visual ó bien sobre las vías encefalinérgicas presentes en el tallo ocular. Se ha reportado que la aplicación de Naloxona en retina aislada, por sí sola no induce ningún cambio en la amplitud del ERG en las curvas de adaptación a la oscuridad. Sin embargo en combinación con otros opiáceos como la Leu-enc y Dser²-leu-enc-treo hay un bloqueo parcial y total respectivamente del efecto que provocan estas dos sustancias. El autor propone que este bloque de la Naloxona hacia las encefalinas podría deberse a varios factores, entre ellos la especificidad de los ligandos sobre los receptores, además de los patrones de estimulación. Por otro lado se ha reportado que la Naloxona por sí misma tiene efecto sobre la migración de los pigmentos visuales tanto proximal como distal, aumentando la migración inicialmente, debido a que previamente se adaptaron a la luz durante 120 minutos (53). Ahora bien, en nuestro sistema se observó que la Naloxona por sí misma tiene efecto sobre la amplitud del ERG, tanto en las curvas de oscuridad como en las de adaptación a la luz, pero no en la V-log I. Estos cambios en la

amplitud probablemente se deban a que la Naloxona está compitiendo por los receptores antes mencionados, presentándose un mayor efecto bajo los patrones de estimulación de obscuridad así como los de la adaptación a la luz en comparación con los patrones de las curvas V-log I.

Con respecto a la Leu-enc, la cual fué administrada en concentraciones de 10^{-3} M, 10^{-5} M, 10^{-7} M y 10^{-9} M para las curvas de obscuridad, se encontró lo siguiente: con 10^{-3} M se produjeron dos efectos: primero un aumento en la amplitud del ERG seguido de un decremento, sin embargo estos cambios no fueron estadísticamente significativos, con 10^{-5} M y 10^{-7} M se observó un aumento en la amplitud del ERG estadísticamente significativo ($p < 0.01$); ahora bien, con 10^{-9} M se produjo un decremento en la amplitud estadísticamente significativo ($p < 0.01$). En las curvas de adaptación a la luz con Leu-enc 10^{-3} M la amplitud del ERG aumentó alcanzando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$), sin embargo en las curvas V-log I no existieron cambios en la amplitud del ERG. Estos cambios en la amplitud del ERG principalmente en las curvas de obscuridad, se deben probablemente a que la Leu-enc causa un efecto diferencial, esto es, que el efecto se disocia con la concentración de la dosis empleada, además de que esta substancia se ha relacionado con los receptores μ que se encuentran situados en vías encefalinérgicas ó en diferentes regiones de la vía visual que están presentes en el tallo ocular. La posibilidad de que estos cambios en la amplitud del ERG se deban

al movimiento de los pigmentos visuales, puede ser descartada considerando que el organismo se encontró en obscuridad constante durante 20 minutos, razón por la cual los pigmentos se encontraban retraídos. La aplicación de Met-enc 10^{-3} M provocó que la amplitud del ERG se decrementara significativamente ($p < 0.01$) en las curvas de obscuridad así como en las de adaptación a la luz, sin embargo en las curvas V-log I no se observaron cambios en la amplitud estadísticamente significativos. Además se ha relacionado esta substancia con receptores μ que se encuentran situados sobre vías encefalinérgicas ó en diferentes regiones de la vía visual presentes en el tallo ocular. Descartamos pues que estos cambios se deban al movimiento de los pigmentos visuales, ya que como se mencionó anteriormente, el organismo se mantuvo en obscuridad constante (20 minutos) y los pigmentos se encontraban retraídos.

En trabajos realizados con 5-Hidroxitriptamina (Serotonina) sobre la amplitud del ERG, cuando es administrada en concentraciones de 10^{-4} M, se provocó un aumento en la amplitud del ERG que se mantuvo durante 60 minutos en las curvas de adaptación a la obscuridad (16); ahora bien, los resultados que se observan en el presente trabajo, cuando se administra los diferentes opiáceos, también se modificó la amplitud del ERG, esta modificación se observó durante un tiempo prolongado (150 minutos) en altas y bajas concentraciones (10^{-3} M y 10^{-9} M). Por lo tanto podemos inferir que el tiempo de acción es un indicativo de que existe un mecanismo de acción de neuromodulador.

Se ha reportado que el aumento en la respuesta del fotorreceptor, inducida por la aplicación de Serotonina ha sido asociado directamente con las propiedades eléctricas del fotorreceptor, estos cambios pueden ser mediados directamente por esta substancia, ya que se reporta la presencia de fibras serotoninérgicas en el acocil Procambarus clarkii (29,56), por lo tanto la respuesta eléctrica hacia la luz puede estar actuando a través del mismo receptor. Sin embargo el sustrato y el mecanismo de acción puede ser diferentes (14,16). Lo anterior lo podemos aplicar para los resultados que se obtuvieron en este trabajo, ya que con la administración de los diferentes opiáceos, de alguna manera también se está modificando la actividad eléctrica del fotorreceptor. Dado que se ha reportado que en el acocil Procambarus clarkii (49) por medio de técnicas inmunocitoquímicas se obtienen reacciones positivas hacia Leu-enc, en diferentes regiones y estructuras del tallo ocular, tanto en fotorreceptores, lámina ganglionar y en los bordes terminales de la lámina ganglionar, probablemente estos cambios en la amplitud se deban a que están actuando directamente sobre alguna de estas estructuras; a través de otras células ó bien tengan una acción directa sobre los receptores que se encuentran situadas fuera de los elementos retinianos. Además se ha reportado que en otras especies de crustáceos la presencia de inmunoreactividad positiva hacia Leu-enc y Met-enc en la glándula sinusal y en algunas estructuras del sistema Organo X-médula terminal y en fibras del tracto óptico para la especie Uca pugilator (50); en Carcinus maenas además de las

estructuras anteriormente mencionadas se encuentran tambien en fibras de la lámina ganglionar y en las médulas externa, interna y terminal (51).

Estos neuromoduladores de alguna manera estan actuando sobre receptores a opiáceos que se encuentran situados fuera de los elementos retinianos, ubicados en diferentes regiones de la vía visual ó bien sobre vías encefalinérgicas que se encuentran presentes en el tallo ocular y que modifican ó bien controlan la actividad del fotorreceptor, lo que permite plantear que tienen un papel de intermediario entre el estímulo luminoso y la respuesta visual.

De lo anterior se puede concluir lo siguiente:

- a) Que el efecto de la aplicación de los diferentes opiáceos empleados en este trabajo no actúa sobre los pigmentos visuales, sino muy probablemente sobre las propiedades eléctricas del fotorreceptor ó bien tengan una acción directa sobre los receptores δ y μ ó alternativamente hacia los receptores κ .
- b) Probablemente los receptores (δ , μ y κ) que se encuentran sobre las vías encefalinérgicas de alguna manera pueden modificar ó controlar la actividad del fotorreceptor.
- c) Se puede inferir que estas sustancias tengan un mecanismo de acción de neuromodulador.
- d) Se abre la posibilidad de estudiar con mayor detalle la existencia de receptores a opiáceos ubicados dentro ó fuera de los elementos retinianos.
- e) Los experimentos sugieren que los opiáceos que se utilizaron en este trabajo participan en la fisiología del sistema visual como neuromoduladores, interactuando con los receptores posiblemente ubicados fuera de la retina.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aréchiga, H. (1977). Modulation of visual input in the crayfish. In: Identified neurons and Behavior of arthropods. G. Hoyle (Eds.). Plenum Publishing Corporation. New York 287-403.
- 2.- Horridge, G.A. (1965). Arthropoda In: Structure and Function in the nervous systems of invertebrate. T.H. Bullock and G.A. Horridge (Eds.) W.H. Freeman and Co. San Fransisco and London Vol. II:1064-1132.
- 3.- Tokarski, T.R. and Hafner, G.S. (1984). Regional morphological variations within the crayfish eye. Cell Tissue Res. 235:387-392.
- 4.- Picones, A. and Aréchiga, H. (1990). Electrophysiological properties of crayfish retinal photorreceptors. J. Exp. Biol. 150:111-112.
- 5.- Eccles, F., Ming Tiang, K. and Meyer-Rochow, V. (1983). Electrophysiological and histological studies on the eye on the Freshwater Crayfish Paranephrops planiformis. Zool. Jb. Physiol. 87:477-489.
- 6.- Nassel, D.R. (1975). The retina and retinal proyection on the lamina ganglionaris of the Crayfish Pacifastacus leniusculus (Dana). J. Comp. Neur. 167:341-360.
- 7.- Hafner, G.S. and Tokarski, T.R. (1988). The diurnal pattern of protein and photopigment synthesis in the retina of Crayfish Procambarus clarkii. J. Comp. Physiol. A 163:253-258.
- 8.- Kong, K.L. and Goldsmith, T.H. (1977). Photosensitivity of retinular cell in white-eye Crayfish (Procambarus clarkii). J. Comp. Physiol. 122:273-280.

- 9.- Ozaki, K., Hara, R. and Hara, T. (1983). Histochemical localization of retinochrome and rhodopsin studied by fluorescence microscopy. *Cell Tissue Res.* 233:335-345.
- 10.- Suzuki, T., Makino-Takasa, M. and Eguchi, E. (1984). 3-Dehydroretinal (Vitamin A2 Aldheyde) in Crayfish eye. *Vision Res.* 24 (8): 783-787.
- 11.- Cronin, T.W. and Goldsmith, T.H. (1981). Fluorescence of Crayfish metarhodopsin studied in single Rhabdoms. *Biophys. J.* 35: 653-664.
- 12.- Suzuki, T., Maeda, Y., Toh, Y. and Eguchi, E. (1988). Retinyl and 3-Dehydroretinyl esters in single Rhabdoms. *Biophys. J.* 22: 653-664.
- 13.- Larrive, D. and Goldsmith, T.H. (1982). Spectral dimorphism of Crayfish visual pigment in solution. *Vision Res.* 22: 727-737.
- 14.- Langmack, K. and Saibil, H. (1991). Signal transduction in photoreceprors. *Biochemical Society Transactions.* 19: 858-860.
- 15.- Meyer-Rochow, B.V. and Eguchi, E. (1984). The effects of temperature and light on particles associated with Crayfish visual membranes: a freeze-fracture analysis and electrophysiological study. *Journal of Neurocytology.* 13:935-959.
- 16.- Aréchiga, H., Bañuelos, E., Frixione, E., Picones, A. and Rodriguez-Sosa, L. (1990). Modulation of Crayfish retinal sensitivity by 5-Hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150:123-143.
- 17.- Muntz, W.R.A. and Richard, D.S. (1982). Photomechanical movements in the Trout retina followind brief flashes of light. *Vision Res.* 22: 529-530.

- 18.- Olivo, R.F. and Crismer, K.L. (1980). Spectral sensitivity of Screening-Pigment migration in retinula cells of the Crayfish Procambarus. Vision Res. 20: 385-389.
- 19.- Frixione, E. (1983). The microtubular systems of Crayfish retinular cells and its changes in relation to Screening-Pigment migration. Cell Tissue Res. 232:335-348.
- 20.- De Bruin, G.H. and Crisp, D.J. (1951). The influence of migration on vision of higher crustacea. J. Exp. Biol. 34: 447-463.
- 21.-Rodríguez-Sosa, L. and Aréchiga, H. (1982). Range of modulation of light sensitivity by accessory pigments in the crayfish compound eye. Vision Res. 22: 1515-1524.
- 22.- Olivo, R.F. and Larsen, M.E. (1978). Brief exposure to light initiates Screening-Pigment migration in retinula cells of crayfish, Procambarus. J. Exp. Physiol. 125:91-96.
- 23.-Frixione, E., Aréchiga, H. and Tsutsumi, V. (1979). Photomechanical migrations of pigments granules along the retinula cells of the crayfish. J. Neurobiol. 10 (6): 574-590.
- 24.- Kleinholz, L.H. (1936). Crustacean eyestalk Hormone and retinal pigment migrations. Biol. Bull. 70: 159-184.
- 25.- Hanstrom, B. (1924). Citado por Horridge, G.A. In: Structure and function in the nervous systems of invertebrate. T.H. Bullock and G.A. Horridge (Eds.) W.H. Freeman and Co. San Fransisco and London. Vol. II: 1064-1132.

- 26.- Horridge, G.A. (1965). Arthropoda. En: Structure and function in the nervous systems of invertebrate. T.H. Bullock and G.A. Horridge (Eds.) W.H. Freeman and Co. San Fransisco and London Vol. II: 1064-1132.
- 27.- Fernlund, P. (1976). Structure of a light-adapting hormone from the shrimp Pandalus borealis. Biochem. Biophys. Acta 439: 17-25.
- 28.- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. and Barrera-Mera, B. (1974). Influence of retinal shielding on light sensibility in the crayfish. Acta Fisiol. Lat. 24: 601-611.
- 29.- Frixione, E. and Hernandez, J. (1989). Modulation of Screening-Pigment position in crayfish photorreceptors by Serotonin: Possible involvement of Na/K -ATPasa Activity. J. Exp. Biol. 143: 459-473.
- 30.- Hernandez-Falcon, J. and Fuentes-Pardo, B. (1991). Crayfish retinular cells: Influence of extracelular sodium and calcium upon receptor potencial. Comp. Biochem. Physiol. 100 A (4): 823-832.
- 31.- Picones, A. and Aréchiga, H. (1985) Electrical propiedades of crayfish photorreceptor cell. Biophysical Journal 47: 474a.
- 32.- Stieve, H., Bruns, M. and Gaube, H. (1979) Simultaneous recording by extra-and intracelular electrodes of high responses in the crayfish retina. Vision Res. 18: 621-628.
- 33.- Chase, R. (1975) The electrophysiology of transduction, retinal interaction and axonal conduction in invertebrate photorreceptors. Comp. Biochem. Physiol. Pergamon Press. 52 A: 571-576.

- 34.- Smith, T.G., Stell, W.K. and Brown, J.E. (1968) Conductance changes associated with receptor potentials in Limulus photoreceptors. Science 162: 454-456.
- 35.- Brown, J.E. and Lisman, J.E. (1972) An electrogenic sodium pump in Limulus ventral photoreceptor cell. J. gen. Physiol. 59: 720-733.
- 36.- Fain, L.G. and Lisman, J.E. (1981) Membranes conductances of photoreceptors. Prog. Biophys. Molec. Biol. 37: 91-147.
- 37.- Brown, J.E. and Mote, M.I. (1974) Ionic dependence of reversal voltage of the light response in Limulus ventral photoreceptor. J. Gen. Physiol. 63: 337-350.
- 38.- Frixione, E. and Aréchiga, H. (1981) Ionic dependence of Screening-Pigment migrations in crayfish retinal photoreceptors. J. Comp. Physiol. 144: 35-43.
- 39.- Naka, K. and Kuwabara, M. (1959) Two components from the compound eye of the crayfish. J. Exp. Fisiol. 24: 601-611.
- 40.- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science 179: 1011.
- 41.- Simon, E.L., Hiller, J.M. and Edelman, I. (1973) Stereospecific binding of the narcotic analgesia (3H), etorphine to rat brain homogenate. Proc. Nat. Sci. 70: 1049-1049.
- 42.- Terenius, I. (1973) Characteristic of the receptors for narcotic analgesics and synaptic plasma membrane fraction from rat brain. Acta Pharmacol. Toxicol. 33: 377-384.

- 43.- Huges, J. and Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Morris, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonist activity. *Nature* 258: 577-879.
- 44.- Guillemein, R. (1977) Endorphines brain peptides that act like opiates. *N. Engl. J. Med.* 296: 226-278.
- 45.- Rosier, J. and Chapoutier, G. (1982) Brain opiates. *Endeavour, New Series*. Pergamon Press. Great Britain 6 (4): 168-176.
- 46.- Snyder, S.H. and Simantov, R. (1977) The opiate receptor and opioid peptides. *Journal of Neurochemistry.* 28: 13-20.
- 47.- Noda, M., Eurutami, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakkanishi, S. and Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* 295: 202-206.
- 48.- Coletti-Previero, M-A., Mattras, H., Zwilling, R. and Previero, A. (1985) Enkephalin-degrading activity in Arthropode Hemolimphe. *Neuropeptides* 6: 405-415.
- 49.- Mancillas, R.J., McGinty, F.J., Selverston, I.A., Karten, H. and Bloom, E.F. (1981) Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurons of lobster. *Nature* 293: 576-578.
- 50.- Fingerman, M., Hanumate, M.N. and Vacca, L.L. (1983) Enkephalin-like and substance P immunoreactivity in the eyestalk neuroendocrine complex of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 9: 437.

- 51.- Jaros, P.P., Dickerson, H. and Keller, R. (1985) Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and others nervous structures in the eyestalk of shore crab Carcinus means L. (Crustacea, decapoda). Cell Tissue Res. 241: 111-117.
- 52.- Quackenbush, S.L. and Fingerman, M. (1984) Regulation of neurohotmone release in the fiddler crab Uca pugilator. Effects of Gamma-amino butyric acid, octopamine, metionine-Enkephalin and B-endorphin. Comp. Biochem. Physiol. 79c (1): 77-84.
- 53.- Freijo, N.P. (1986) Influencia de las encefalinas sobre la función visual del acocil Procambarus clarkii. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. ENEP Iztacala, UNAM. México.
- 54.- Drach, P. and Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur le Méthode de détermination des stades d'intermude son applications générale aux crustacés. Vie et Milieu 18 (3a): 595-609.
- 55.- Van Harreveld, A. (1936) A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. New York 34: 428-432.
- 56.- Bañuelos, S.E. (1983) Modulación de la actividad eléctrica del fotorreceptor retiniano del acocil. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. ENEP Iztacala UNAM. México.
- 57.- Freijo, P. y Flores, J. (1989) Distribución y efectos farmacológicos de las encefalinas en los Crustáceos Decápodos. Umbrales 2 (3): 15-22.

58.- Frederickson, R.C.A. and Geary L.E. (1982) Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. Progress in Neurobiology. Pergamon Press Ltd. 19: 19-69.