



00341

2
2j

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTRUCTURA DEL PEDUNCULO OCULAR Y
ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA
SINUSAL EN CAMARONES PENEIDOS.**

T R A B A J O

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
**ESPECIALISTA EN MICROSCOPIA
ELECTRONICA APLICADA A LAS
CIENCIAS BIOLÓGICAS**
P R E S E N T A
ODALIS BARBARA SUAREZ BOADO

DIRECTOR DEL TRABAJO:
DR. GERARDO HEBERT VAZQUEZ-NIN

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

**ESTRUCTURA DEL PEDÚNCULO OCULAR Y ULTRAESTRUCTURA
DE LA GLÁNDULA SINUSAL EN CAMARONES PENEIDOS.**

DEDICATORIA:

Dedico este trabajo:

A mis padres..... por su bondad, sacrificio y amor para conmigo

A mis hijitos.....mis más preciados tesoros

**A mi esposo.....por su comprensión y sobre todo
por nuestro amor...**

AGRADECIMIENTOS:

- Mis sinceros agradecimientos a la Revolución Cubana, en la que me forme y la que me brindó la posibilidad de superarme.
- Al Dr. Gerardo Hebert Vázquez-Nin, quien me brindó sus conocimientos, experiencia y sabiduría en el campo de la Microscopía Electrónica.
- A la Dra. Olga Margarita Echeverría, por sus experiencias en Microscopía Electrónica.
- Al Dr. Luis Felipe Jiménez, ejemplo joven de científico y profesor, quien me brindó sus conocimientos, apoyo y confianza en el quehacer investigativo.
- A la Dra. Guadalupe Zavala, quien dedicó horas de enseñanza hacia mí, me brindó mucho apoyo, supo transmitirme sus valiosas experiencias y ha sido una magnífica compañera.
- De igual manera le debo mis gratitudes al Dr. Alberto Huberman, ejemplo de incansable investigador, quien me ha brindado sus experiencias, su apoyo profesional y humano en todo momento.
- A todos los amigos del laboratorio de Microscopía Electrónica, que de una u otra manera me han brindado sus conocimientos, han compartido conmigo momentos buenos y momentos tristes y sobre todo han confiado en mí, para ellos mis respetos: Francis, Lourdes, Marcos, Gabriel, Elizabeth, Angélica, Rosario, Ernestina y Rafael.
- Especialmente agradezco todo el apoyo y atención que sin reparo me ha brindado la Dra Margarita Collazo.
- A todos mis amigos cubanos y mexicanos.
- A la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM, por concederme la beca del gobierno mexicano.
- Especial agradecimiento le debo a mi familia quien incondicionalmente me ha ayudado y me ha dado fuerzas para poder culminar este trabajo, incluyo aquí a varias familias mexicanas que de igual forma me han brindado lo mejor de sí.

A todos,

MUCHAS GRACIAS

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1- Estructura del pedúnculo ocular en crustáceos.....	7
2- Estructura y ubicación de la glándula sinusal.....	11
3- Función de la glándula sinusal.....	12
4- Ultraestructura de la glándula sinusal.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

RESUMEN.

Una variedad de funciones fisiológicas en los crustáceos decápodos son regulados por productos de neurosecreción, sintetizados por el órgano X, los que son almacenados y liberados por la glándula sinusal, localizada en el pedúnculo ocular.

En este estudio se describe la estructura del pedúnculo ocular donde se localiza el complejo órgano X- glándula sinusal, así como la ultraestructura de esta última. La glándula sinusal es el principal centro de control neuroendocrino en estos organismos. Es un órgano neurohémico formado por terminales axónicas sumamente ramificadas y engrosadas por su alto contenido de gránulos de neurosecreción. Como resultado del análisis ultraestructural fue posible reconocer cuatro tipos diferentes de gránulos limitados por una membrana simple. Los gránulos parecen ser una entidades definidas que varían en tamaño, forma y densidad electrónica.

Se trabajó con tres especies de camarones peneidos: *Penaeus schmitti*, *Penaeus setiferus* y *Penaeus duorarum*. Se usaron técnicas de microscopía óptica y electrónica convencional, para el análisis de los somas de las células neurosecretoras que se encuentran en la zona de la médula terminal y que se denomina órgano X u órgano de Hanström.

Se realizaron los análisis cuantitativos a partir de imágenes grabadas, adquiridas y procesadas con una tarjeta análogo-digital. Se aplicaron pruebas estadísticas para interpretar los resultados y se compara lo obtenido con lo encontrado en otros grupos de decápodos.

INTRODUCCIÓN:

Dentro de los artrópodos, los decápodos constituyen el mayor y más diverso orden de malacostracos. Existen aproximadamente 10,000 especies que habitan en ambientes marinos, de agua dulce y terrestres.

Dentro de los mismos, los camarones peneidos son animales en su mayoría de aguas marinas y salobres, que se encuentran tanto en aguas de mediana y gran profundidad, en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Existen alrededor de 200 a 300 especies .

La clasificación sistemática es como sigue (Pérez-Farfante, 1969; Bliss, 1982):

Clase: Malacostraca (Latreille, 1806)

Subclase: Eumalacostraca (Grobbin, 1892)

Superorden: Eucarida (Caimán, 1904)

Orden: Decapoda (Latreille, 1803)

Suborden: Dendrobranchiata (Bate, 1888)

Superfamilia: Penaeoidea (Rafinesque, 1815)

Familia: Penaeidae (Rafinesque, 1815)

Género: *Penaeus* (Burkenroad, 1931)

Tanto en cordados como en otros fila, el sistema endocrino actúa coordinando la actividad de varios tejidos y órganos, interviniendo así en procesos vitales como la reproducción, el crecimiento y la conducta. En los crustáceos, dicho sistema está formado tanto por elementos de origen epitelial como neuronal. Entre los primeros tenemos un par de órganos Y, situados en la cabeza del animal (análogos a las glándulas protorácicas de insectos), y un par de glándulas androgénicas situadas en la vecindad de los conductos espermáticos en los machos. En el segundo grupo se encuentran las células neurosecretoras, que son muy parecidas a neuronas típicas pero se caracterizan por presentar evidencias de neurosecreción en su citoplasma y sus terminales axónicas son muy ramificadas, presentándose alrededor de

1000 ramificaciones por axón dando la apariencia de un racimo de uvas. Esas terminales se agrupan en la proximidad de vasos sanguíneos, formando órganos neurohémicos, que en crustáceos están representados por los órganos postcomisurales, situados detrás de la comisura tritocerebral; los pericardiácos en la vecindad del corazón y el órgano neurohémico principal: la glándula sinusal, descrita por primera vez por Hanström (1931), que se ubica en el pedúnculo ocular, y en ella se almacenan las secreciones provenientes de las células neurosecretoras del órgano X, de los ganglios ópticos y del ganglio cerebroide (Coro y Otazo, 1982).

Muchas de estas células están dentro de la médula terminal y son llamados órganos-X. Según Highnam y Hill (1977), existen como mínimo cuatro órganos X, que se localizan en diferentes segmentos de los ganglios ópticos. Otro grupo de células neurosecretoras en el ganglio cerebroide envían sus axones hacia la glándula sinusal. Diferentes terminales axónicas son encontradas en la misma glándula, las cuales difieren en dimensiones y contenido de los gránulos de neurosecreción que representan diferentes hormonas. Los órganos post-comisurales son inervados por células neurosecretoras del tritocerebro, y los órganos pericardiácos al menos por siete grupos de células en los ganglios torácicos.

La explotación del camarón se lleva a cabo en gran parte de los mares tropicales sobre un número considerable de especies, lo que se evidencia en una disminución de la producción por pesca excesiva de los animales, principalmente de los pertenecientes a la familia Penaeidae. Dentro de esta familia, las del género *Penaeus* resultan los más importantes desde el punto de vista comercial. Es un recurso muy preciado a nivel mundial que presenta gran demanda internacional, la cual no se satisface totalmente en la actualidad.

La alternativa para aumentar la producción de camarón es la camaronicultura, la cual posee gran potencial y ya se desarrolla en varias partes del mundo, especialmente en América Latina y la región Indopacífica.

Por lo anterior, el conocimiento de los principales aspectos biológicos de los camarones, con el fin de ofrecer vías de manejo adecuadas para garantizar una eficiente explotación, constituye un factor importante para el progreso de la camaronicultura.

Se desarrollan desde hace varios años, estudios relacionados con su cultivo, jugando un papel de importancia el crecimiento y los estudios que establecen ciclos de muda para obtener individuos que alcancen en poco tiempo la talla adecuada. Sin embargo, los estudios dirigidos a localizar, describir morfológicamente la estructura y la ultraestructura del centro rector de todas las funciones elementales de estos animales, no se abordan con regularidad.

Por otra parte, la manipulación de las funciones endocrinas, basada en la ablación unilateral del pedúnculo ocular de las hembras, se utiliza como método de inducción de la maduración, que depende de una serie de factores tanto externos como internos en el animal. Ya desde 1943, Panouse (citado por Charniaux y Payen, 1988), demostraron que eliminando los pedúnculos oculares de las hembras de *Palaemon serratus* durante la estación de quiescencia, ocurre un rápido incremento en el tamaño del ovario y una precoz deposición de los huevos. No obstante, se producen una serie de alteraciones en gran número de procesos metabólicos en los que participan los neuropéptidos presentes en la glándula sinusal. Por ello, aún cuando se utiliza el método de ablación del pedúnculo ocular, se trabaja actualmente en función de encontrar vías que afecten lo menos posible los mecanismos fisiológicos del organismo. Tal es el caso de la búsqueda de bloqueadores de los sitios receptores de las hormonas, la búsqueda de la hormona estimuladora de las gónadas y la aplicación de anticuerpos que bloqueen la acción de las hormonas inhibitoras contenidas en la glándula sinusal.

El principal centro endocrino en los crustáceos es el sistema órgano X-glándula sinusal, situado en el tallo o pedúnculo ocular. Probablemente sea homólogo del sistema ganglio cerebroide-*corpus cardiacum* de los insectos.

En el complejo órgano X de la médula terminal, ubicado en el pedúnculo ocular, se sintetizan una variedad de hormonas peptídicas que intervienen y controlan procesos fisiológicos de estos animales.

OBJETIVOS:

Los objetivos del presente trabajo se dirigen al conocimiento de las bases morfológicas de los elementos constituyentes del pedúnculo ocular en camarones peneidos. Se hace énfasis en el estudio ultraestructural de la glándula sinusal contenida en el mismo y en relacionar los resultados morfológicos con las hormonas contenidas en la glándula sinusal y que, de hecho, intervienen en una serie de procesos como en el comportamiento reproductivo y el crecimiento, entre otros. Asimismo apoyarían los estudios de posible aplicación práctica que se realizarán a posteriori.

Por lo anterior se pretende:

-Localizar la glándula sinusal dentro del pedúnculo ocular en camarones peneidos, que habitan zonas de las costas de Cuba y de México.

-Caracterizar estructural y ultraestructuralmente los elementos tisulares que constituyen el sistema de la glándula sinusal, utilizando métodos de procesamiento de microscopía óptica y electrónica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

ESTRUCTURA DEL PEDÚNCULO OCULAR EN CRUSTÁCEOS:

Con el uso de técnicas de microscopía óptica, se ha descrito la estructura del pedúnculo ocular en algunos grupos de crustáceos.

En algunos camarones peneidos, se describe el pedúnculo o tallo ocular, en cortes longitudinales desde la región distal hasta la proximal. Primero se presenta la cutícula. Enseguida se localiza la retina, constituida por miles de unidades llamadas omatidios los cuales se estructuran en tres partes: el aparato dióptrico, el aparato fotosensible y el aparato aislante. Toda esta estructura permite denominar a este ojo como compuesto.

El aparato dióptrico se halla constituido por el tracto cristalino. El aparato fotosensible lo ocupan las células retinulares y los rhabdomeros, mientras que el aparato aislante está formado por los pigmentos aislantes, agrupados en gránulos localizados en estructuras como son las células pigmentadas especiales, las células fotoreceptoras, la membrana basal y el espacio extracelular. Las células pigmentadas especializadas se encuentran rodeando al cono cristalino y a la retinula de cada omatidio (Coro y Otazo, 1982; Bell y Lighthner, 1988). La membrana basal separa a la retina de la región ganglionar.

Según Van Herp y col. (1977), en un estudio realizado en el camarón *Palaemon serratus*, el eje central del pedúnculo ocular consiste en ganglios ópticos encerrados por una fina cubierta de tejido conectivo, apareciendo primeramente la lámina ganglionar, justo debajo de la retina y que se conecta por bandas de axones a la primera de las tres médulas: la médula externa, la cual está seguida por la médula interna, y ésta por la médula terminal, que es la más grande.

En *Penaeus japonicus*, Nakamura (1988), menciona que los ganglios ópticos están localizados en el centro del ojo. Desde la posición distal a la proximal, se encuentra la lámina ganglionar, la médula externa, la interna, y la terminal. Los neuropilos -excepto los de la médula terminal- muestran capas de diferentes tamaños. Se presentan grandes grupos de células en la superficie de las médulas externa y terminal. En la región dorsal interna de la porción distal de la médula terminal, se encuentra el órgano X. Contrario a esta posición, se ubica la glándula sinusal en el espacio externo de esta médula.

El ojo en los camarones se integra a la región de la cabeza por el pedúnculo ocular.

Según Bell y Ligthner (1988) contiene tres ganglios: la médula terminal, la médula interna y la médula externa. La porción dióptrica de la retina esta compuesta de rabdómeros y cuerpos celulares retinulares, los núcleos de las células retinulares, los tractos cristalinos, los conos cristalinos y la cutícula.

Entre los omatidios y la médula externa se encuentra la lámina ganglionar. La glándula sinusal se localiza entre la médula externa y la médula interna. Se encuentran dos regiones con función secretora: el órgano de Bellonci y el órgano X u órgano de Hanström. En la porción dorsal de la médula externa y la interna se encuentran células globulares. Tanto en la médula externa como en la médula interna, se pueden apreciar capilares, y bordeando dorsalmente a ambas también aparecen las células globulares. En la médula terminal aparecen lagunas y capilares, y las fibras procedentes de dicha médula forman el nervio óptico que se dirige hacia el ganglio cerebroide.

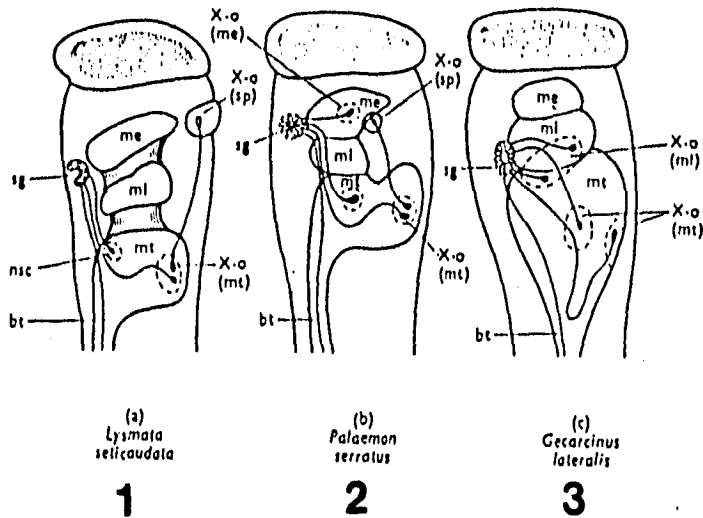
Las células neurosecretoras ubicadas en la región del órgano X dentro del tallo ocular, han sido descritas en diferentes crustáceos (Highnam y Hill, 1977): en el camarón *Lysmata seticaudata*, el órgano X consiste de células neurosecretoras en la médula terminal, con la glándula sinusal como el principal órgano neurohémico. Además la glándula sinusal recibe axones de células neurosecretoras del ganglio cerebroide y algunas células neurosecretoras en la médula terminal que envían axones al poro sensorial (órgano X) el cual, a pesar de

llamarse así, es otro órgano neurohemal. Refieren estos autores, que en *Palaemon serratus* existen dos áreas de células neurosecretoras, llamadas órganos X-ganglionares, una en la médula terminal y una en la médula externa; ambas envían sus axones a la glándula sinusal donde se juntan con axones neurosecretores provenientes del ganglio cerebroide.

El poro sensorial está ausente en esta especie, pero el órgano X del poro sensorial permanece inervado por axones neurosecretores de la médula terminal. En el cangrejo *Gecarcinus lateralis*, se señalan que hay muchos órganos X-ganglionares en la médula terminal y en la médula interna con axones que terminan en la glándula sinusal junto con los provenientes del ganglio cerebroide.

La localización de estructuras anatómicas dentro del pedúnculo ocular en tres especies diferentes de crustáceos, se muestra en las siguientes láminas: bt- representa los axones neurosecretores desde el ganglio cerebroide terminando en la glándula sinusal, me,mi,mt: representan las diferentes médulas: externa, interna y terminal; nsc-grupo de células neurosecretoras; sg-glándula sinusal; sp-poro sensorial; o-órgano X, ver Láminas 1,2 y 3.

Tomado de Highnam y Hill (1977).



La existencia en el pedúnculo ocular de dos regiones con función secretora, el órgano de Bellonci, también denominado órgano del poro sensorial; órgano X de la pars distalis, y el órgano de Hanström, también denominado órgano X de la médula terminal.

El órgano de Hanström, se ubica cerca de la superficie ventral del ojo, opuesto al órgano de Bellonci donde numerosos axones entran al mismo, algunos de los cuales se conectan con la glándula sinusal. El órgano de Bellonci en peneidos contiene células neurosecretoras, una estructura laminar de cuerpos en capas de cebolla (onion bodies), y cerca se encuentran las células globulares. El órgano X está asociado a la glándula sinusal formando el complejo denominado órgano X-glándula sinusal.

En 1977, Chaigneau, realizó un estudio ultraestructural del órgano de Bellonci, en malacostracos, describiendo principalmente en el grupo de isópodos, al órgano de Bellonci caracterizado por células sensoriales ciliadas con largas microvellosidades; y en decápodos donde el órgano se caracteriza por presentarse en cuerpos en capas de cebolla. La homología entre la forma de este órgano (tipo vesicular) en isópodos y de cuerpo en capas de cebolla en otros malacostracos es la presencia, en ambos casos, de células sensoriales portando uno o dos complejos de segmentos ciliares externos proyectados hacia uno o muchos lúmenes centrales. Según este autor se podría representar los diferentes órdenes de decápodos de la siguiente manera (Ver hoja anexa 1).

En ambos casos, la degeneración de las células sensoriales producen formaciones de grupos de alta densidad electrónica. Por lo anterior, Chaigneau, 1977 considera dos direcciones en la evolución: una donde el órgano es univesicular con los segmentos externos ramificados en largas microvellosidades, y el otro donde el órgano es multilobular con los segmentos externos divididos en su interior en láminas planas concéntricas, que son los cuerpos en capas de cebolla. En algunas especies que viven en cuevas no se presenta este órgano. No obstante, el órgano de Bellonci y el poro sensorial deben corresponder a un complejo órgano

sensorial múltiple localizado cerca del lóbulo óptico del ganglio cerebroide y cuyos componentes están más o menos ausentes, acorde a los diferentes grupos de crustáceos.

ESTRUCTURA Y UBICACIÓN DE LA GLÁNDULA SINUSAL:

En diversos grupos de crustáceos se ubica la glándula sinusal en la región proximal del pedúnculo ocular , entre la médula externa y la médula interna, según Cooke y Sullivan (1982).

En *Palaemon serratus*, Van Herp y col.,(1977) describen a la glándula sinusal, ubicada debajo del exoesqueleto transparente y en la región dorso-lateral del pedúnculo ocular entre la médula externa y la médula interna. Es de color azulado y la forma varía entre un disco y una media luna, separada de los senos sanguíneos externos por una fina membrana, la cual se tiñe de azul oscuro después de la tinción de azán y púrpura con paraformaldehído-fuscina. Dentro de la glándula sinusal, se distingue un pequeño número de senos sanguíneos. Estos resultados de la ubicación de la glándula sinusal coinciden con lo descrito (Dirksen,1992) en *Carcinus maenas*, donde se utiliza la tinción de Gomori, para la cual la glándula es fuertemente positiva.

En *Penaeus schmitti* y *Penaens notialis*; se ubica la glándula en la región dorso-lateral del pedúnculo ocular, entre la médula externa y la médula interna. De igual forma resultó positiva la tinción de Gomori, así como la tinción con impregnación argéntica.

En braquiópodos, la glándula sinusal se presenta como una estructura blanca iridiscente en la superficie del ganglio óptico, sobre el lado dorsal o dorso-lateral a nivel de la médula externa o de la médula interna, debajo de una capa de tejido conectivo esponjoso, en algunos casos debajo de los músculos asociados con movimientos del pedúnculo ocular y muy bien expuesta a la hemolinfa (Cooke y Sullivan,1982).

Dentro del pedúnculo ocular, justo entre los ganglios ópticos, se encuentra la glándula sinusal en otros grupos de crustáceos como en el acocil, *Procambarus bouvieri*, y en otro tipo de crustáceo como en la langosta, *Homarus americanus*.

FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA SINUSAL:

Históricamente, los crustáceos han contribuido al estudio y desarrollo de los conceptos de neurosecreción y control neuroendocrino, y fue en este grupo de animales invertebrados donde se aisló y secuenció el primer neuropéptido (Highnam y Hill, 1977).

La glándula sinusal, constituye el centro principal donde se almacenan y distribuyen las hormonas de contenido neuropéptido, que intervienen en procesos como la muda, cambios de color, desarrollo gonadal, niveles de glucosa, entre otras funciones.

Koller demostró desde 1925 en crustáceos, la existencia de hormonas (citado por Huberman y col., 1995) y fue Carlisle y Knowles (1953) quienes reconocieron el carácter neurohémico de la glándula sinusal, donde se almacenan gránulos de neurosecreción, cuyo contenido se libera a la hemolinfa.

Desde 1972 (Keller, 1992) Fernlund y Josefsson, aislaron y secuenciaron el primer neuropéptido en invertebrados, la hormona concentradora del pigmento rojo. Posteriormente, otros investigadores han encontrado otras sustancias que intervienen en el control del metabolismo de los crustáceos.

En el complejo órgano X- glándula sinusal, existe una diversidad de neuropéptidos, que intervienen en el control de la pigmentación como la hormona dispersante del pigmento y la hormona concentradora del pigmento rojo, la regulación de la glucosa por la hormona hiperglicemiante de los crustáceos; como la presencia de factores inhibidores tales como la

hormona inhibidora de la muda, y la hormona inhibidora de la vitelogenesis o de las gónadas, según Laverdure y col.,(1992), quienes señalan que en diversos crustáceos como en *Carcinus maenas* y *Homarus americanus* y en *Procambarus bouvieri* Huberman y col.,(1995) se han podido aislar y secuenciar algunos de estos factores.

Además de estos péptidos, se logró purificar y determinar la estructura primaria de hormonas en otros crustáceos. En el acocil mexicano *Procambarus bouvieri*, han sido aislados cuatro péptidos, lo que ha permitido identificar una hormona inhibidora de las gónadas, una hormona inhibidora de la muda, un isomorfo mayoritario de la hormona hiperglicemiante, y un isomorfo menor de la hormona hiperglicemiante (Huberman y col, 1995). Asimismo, ciertos péptidos, como la hormona hiperglicemiante de los crustáceos, la hormona inhibidora de la muda, y la hormona inhibidora de la vitelogenesis, según Keller (1992), han sido sólo encontrada en crustáceos, pero todo indica que ocurre en otros invertebrados también, ya que otros péptidos como la hormona dispersante del pigmento distal y la cardioactiva presentes en crustáceos, recientemente se encontraron en insectos, lo que indica la presencia de familias de péptidos entre invertebrados en general, y quizás puntos de versatilidad y funciones múltiples de neuropéptidos como hormonas, transmisores, y moduladores.

La idea de una hormona inhibidora de la muda y de una hormona inhibidora de las gónadas secretadas por el complejo órgano X-glándula sinusal del pedúnculo ocular ha sido bien aceptada. Esto ha sido demostrado realizando la ablación de uno solo de los pedúnculos, evidenciándose que se induce la maduración del ovario y se acelera la muda, indicando que al disminuir el nivel de hormona inhibidora de la muda y de la hormona inhibidora de las gónadas en camarones con un sólo pedúnculo ocular da como resultado una precoz muda y maduración ovárica en *Penaeus chinensis* (Chu y Chow,1992).

Asimismo (Chang y Connor, 1988) postularon que parte del material neurosecretor de la glándula sinusal, es responsable del control negativo de la cantidad de ecdisona secretada por los órganos Y, debido a la regulación negativa ejercida sobre la síntesis de ecdisona.

Por otra parte, investigaciones que datan desde 1988, (Chang y Connor), refieren la existencia de un análogo de la hormona juvenil propia de los crustáceos, el farnesoato de metilo, secretado por el órgano mandibular, que estimula la reproducción y la muda, señalando que actúa asociado a proteínas específicas. El órgano mandibular de los crustáceos presenta una estructura parecida al *corpus allatus* de los insectos.

Recientemente, Tensen y col., (1991) utilizaron técnicas de hibridación *in situ*, acopladas con análisis inmunocitoquímicos y Northern blot, para localizar mRNAs de neuropéptidos como la hormona hiperglicemiante de los crustáceos en *Orconectes limosus* (citado por Laverdure, 1992) y en la langosta *Homarus americanus* donde detectaron el mRNA de la hormona inhibidora de la vitelogénesis en células neurosecretoras del órgano X.

ULTRAESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA SINUSAL:

Hanström (1931), fue el primero en describir las células neurosecretoras en crustáceos y el primero en describir la glándula sinusal. Ya desde 1928 Sharrer, (citado por Meusy y Payen, 1988) había establecido el concepto de neurosecreción cuando observó el complejo hipotálamo-hipófisis en Teleosteos. Posteriormente un grupo de investigadores en la década de los 50, demostraron que el complejo órgano X- glándula sinusal formaba una asociación similar a la descrita para vertebrados por Scharrer.

Los estudios acerca de la ultraestructura de la glándula sinusal basados en las terminales axónicas ramificadas, han sido realizados en diversas especies de crustáceos y han revelado la presencia de diferentes tipos de gránulos de neurosecreción, así como de vesículas.

Según Smith (1974) y Van Herp (1977), las terminales axónicas de las células neurosecretoras que constituyen la glándula sinusal, son finas, de una textura grumosa, acidófilas y PAS positivas.

Las primeras correlaciones del contenido neurohormonal con los diferentes gránulos en ciertas terminales axónicas, han sido demostradas por inmunocitoquímica en glándulas sinusales de especies de astacuros y en glándulas sinusales de especies de braquiuros.

En general, todos los autores han señalado la diversidad estructural de los gránulos, basados sobre todo en criterios morfológicos, sugiriendo la presencia de varios tipos de gránulos con diferentes contenidos hormonales.

En *Carcinus maenas* (Dirksen, 1992) se correlacionan los tipos de gránulos encontrados con técnicas de identificación inmunocitoquímica, localizando varias hormonas. Se encontró que la glándula sinusal en dicha especie contiene un complejo de terminales axónicas neurosecretoras interdigitadas y rodeadas de células gliales, separadas de la hemolinfa por una membrana. Describen cuatro tipos de terminales axónicas, las que se distinguen por la distribución, tamaño y densidad electrónica de sus gránulos de neurosecreción.

El contenido de los gránulos es liberado a la circulación por un mecanismo de exocitosis. Está generalmente aceptado que la exocitosis constituye un mecanismo mediante el cual se exportan los productos de secreción por empaquetamiento de membrana, lo que ha sido comprobado ultraestructural y bioquímicamente en varios tipos celulares como en células salivales, cromafínicas, neuronales y neurosecretoras; entre otras. En todos los casos, el

calcio resulta esencial para el mecanismo de liberación, actuando como un estimulador de la secreción. Sin embargo, el Na^+ y el K^+ son esenciales en los eventos de despolarización de membranas, por lo que Andrew y col.,(1976), sugieren que un incremento del Ca^{2+} libre intracelular junto con un decremento en el K^+ intracelular constituyen los requisitos necesarios y eficientes para lograr el proceso de exocitosis desde la glándula sinusal, lo que fue demostrado en el crustáceo, *Orconectes virilis*, con técnicas de manipulación iónica.

Los autores citados encontraron que la glándula sinusal en esta especie, contiene terminales axónicas con dos poblaciones distintas de gránulos con densidad electrónica: unos grandes (entre 1.500- 2.000 Å de diámetro) y otros pequeños (de 1.000 Å de diámetro), que se liberan a la hemolinfa en forma similar. También señalan la presencia de seis tipos diferentes de hormonas no caracterizadas bioquímicamente.

En braquiuros Jaros y col.,(1987) señalan que la glándula sinusal está constituida por terminales axónicas repletas de gránulos de secreción, los que se presentan con un diámetro de 120-275 nanómetros, y aparecen distribuidos en las terminales.

Cooke y Sullivan (1982), describen seis tipos de terminales axónicas en la glándula sinusal del cangrejo, *Cardisoma carnifex*, y consideran a la glándula como punto de almacén y liberación de muchas hormonas, presentando a la misma como un mosaico de procesos neuronales densamente empaquetados en gránulos de neurosecreción. Estos autores señalan que en general los estudios sobre la ultraestructura de la glándula sinusal en crustáceos son de particular importancia para lograr la caracterización de los gránulos, y precisar el número de terminales que supuestamente varía desde 2 a 7, dependiendo del tratamiento usado para procesar las muestras y si esto está en relación con la especie. Las características de las terminales hacen que se denominen gránulos secretores y no vesículas sinápticas. Los gránulos se secretan por exocitosis, solo en puntos donde las terminales están en contacto con el neurilema. Este proceso se incrementa cuando se estimula la secreción por medio de electricidad, ionoforesis o elevación del potasio en la solución salina, todo ello seguido del proceso de fijación de las muestras.

MATERIALES Y METODOS:

El trabajo se realizó con tres especies de camarones peneidos: *Penaeus schmitti*, *Penaeus duorarum* y *Penaeus setiferus*.

P. schmitti, conocido como camarón blanco, habita en las costas de Cuba, Nicaragua, Venezuela, Honduras, entre otras.

P. setiferus, conocido como camarón blanco en México, habita en el Golfo de México, y a lo largo de la costa atlántica de los Estados Unidos, entre otros lugares.

P. duorarum, conocido como camarón rosado, habita en el Golfo de México y a lo largo de la costa atlántica de los Estados Unidos.

Geográficamente, estas especies de peneidos se distribuyen de la siguiente forma (Dore I and Frimodt, 1987). Ver hoja anexa 2.

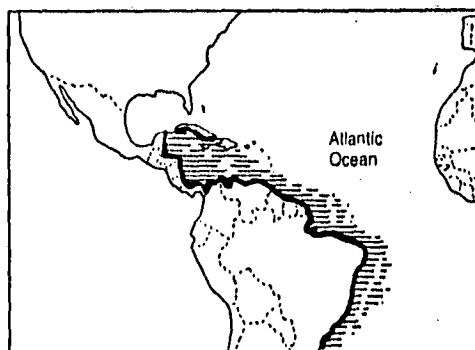
El material biológico de *P. schmitti*, fue colectado en aguas de la Bahía de Cienfuegos, en la costa sur de Cuba.

P. duorarum y *P. setiferus*, tras su captura en el Golfo de México, se trasladaron vivos, al acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se colocaron en peceras durante aproximadamente 24 horas, a una temperatura entre 25-27°C, con una salinidad de aproximadamente 29 ‰. Se trabajó con los animales tras este tiempo en que los mismos se recuperan del estrés producido por el cambio de habitat.

Anexo 2

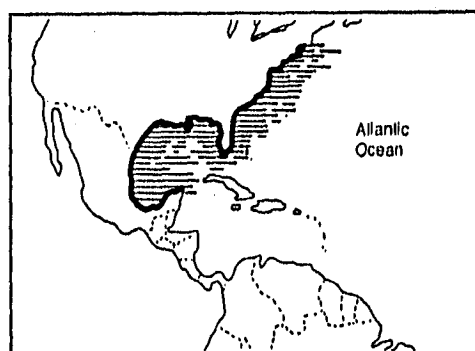
Penaeus schmitti

Family: *Penaeidae*



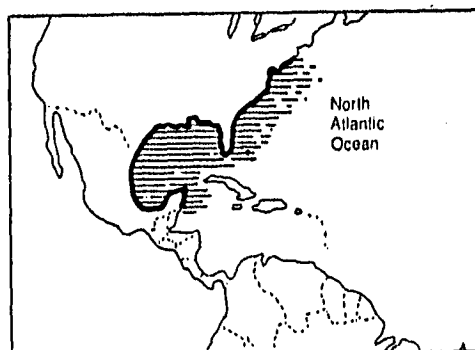
Penaeus setiferus

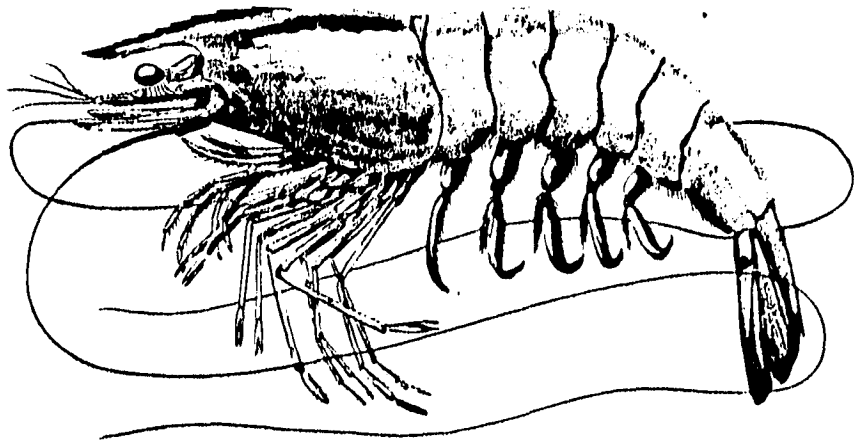
Family: *Penaeidae*



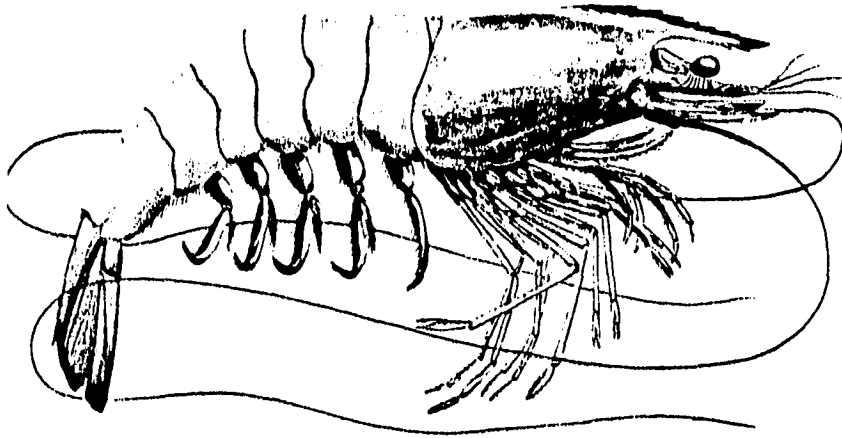
Penaeus duorarum

Family: *Penaeidae*

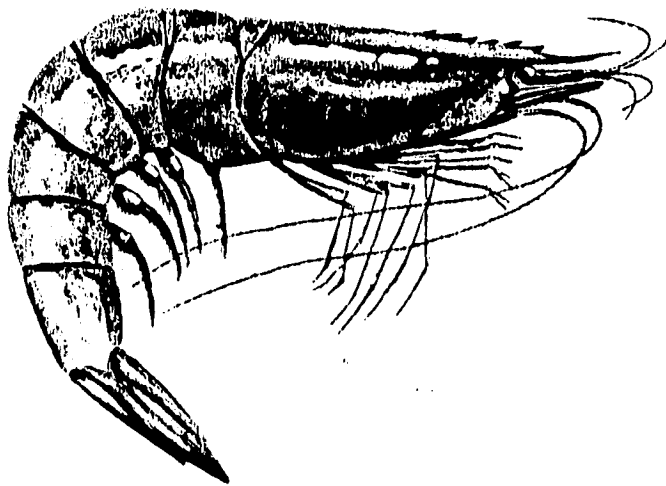




Penaeus schmitti



Penaeus setiferus



Penaeus duorarum

Se realizó un trabajo previo en ejemplares de camarón blanco de Cuba, *P.schmitti* con el objetivo de caracterizar histológicamente el pedúnculo ocular en cortes longitudinales para microscopía óptica.

Para todos las muestras los pasos fundamentales de procesamiento fueron los siguientes:

Se usaron 10 animales adultos tomados al azar sin distinción de sexo.

A los mismos se les cortó el pedúnculo o tallo ocular por su base, y se procedió a su disección bajo microscopio estereoscópico. Se usaron pinzas y tijeras de iridectomía, y se retiró en primer lugar la cubierta quitinosa que cubre al pedúnculo.

Una vez desquitinizados fueron inmediatamente procesados según se observa en el Diagrama de flujo No. 1

En general los pasos seguidos fueron:

- 1- Fijación del material.
- 2- Deshidratación del tejido en concentraciones crecientes de etanol, realizando varios cambios en el tiempo.
- 3- Infiltración en solventes intermediarios - medio de inclusión.
- 4- Inclusión en parafina, para ello se usan moldes de cartón previa preparación con gotas de glicerina.
- 5- Cortes en micrótomo vertical, manual.
- 6- Tinción con colorantes acuosos.
- 7- Observación al microscopio óptico.
- 8- Micrografías.

El procesamiento general usado para microscopía electrónica en las especies mencionadas anteriormente fue el siguiente:

- 1- Disección del pedúnculo ocular.
- 2- Extracción de la glándula sinusal.
- 3- Fijación de la glándula sinusal.
- 4- Deshidratación del tejido, en concentraciones crecientes de etanol.
- 5- Infiltración del tejido en resinas epóxicas.
- 6- Inclusión del tejido en las resinas.
- 7- Cortes semifinos y ultrafinos, en ultramicrotomo.
- 8- Tinción de cortes semifinos con azul de toluidina.
- 9- Contraste de cortes ultrafinos con metales pesados.
- 10-Observación al microscopio óptico de cortes semifinos.
- 11-Observación de cortes ultrafinos en un microscopio electrónico de transmisión, modelo EM-10, de la casa ZEISS.
- 12- Obtención de micrografías.

A partir de la imagen electrónica obtenida, en los casos en que fue posible, las imágenes fueron recogidas por una cámara de video, se pasaron a un monitor de alto contraste y se grabaron en cassette de video, en un video grabador. Se grabaron imágenes a bajo aumento (5.000x) y a altos aumentos (16.000x) previa calibración. Se trabajaron las imágenes con una tarjeta análogo digital y se usó el programa MIMAD, de BIOCUM. Además se realizó el análisis de una fotografía panorámica tomada a 11,500 aumentos, calibrada y adquiriendo las imágenes con una cámara de video.

Con el uso del programa se cuantificaron gránulos de secreción, determinando diámetro y densidad de los mismos. Se utilizó un procesador estadístico, STATGRAPHICS, que nos permitió conocer las variables de media, desviación estándar, error estándar, modo, etc. Se

utilizó la prueba t de Student para determinar el nivel de significación de la comparación de variables.

Se tomaron medidas lineales del diámetro mayor y medidas relativas de densidad expresadas por el cociente entre la zona más negra del interior del gránulo como numerador sobre una zona clara del citoplasma adyacente. Los valores de cada una de estas zonas oscilan entre 0-255 en la gama de grises.

Los resultados del cociente, fluctúan entre 0 y 1. Sólo será el cociente 1 cuando coincidan las intensidades de grises. Este sería el máximo valor posible. Esta forma de análisis de la densidad de los gránulos, nos da medidas relativas de resultados. Con ello, eliminamos ruidos como las variaciones en relación con la sensibilidad de la cámara de video (tanto en el microscopio electrónico como utilizando una cámara de video aislada para tomar la imagen a partir de una micrografía. Eliminamos las variaciones de iluminación creadas por el microscopio electrónico (al aumentar o disminuir la intensidad de luz) y eliminamos las variaciones producidas por los diferentes espesores de corte.

El análisis del diámetro mayor del gránulo y el análisis de densidad del mismo se realizó dentro de cada terminal, por lo que se corresponde cada resultado del valor del diámetro de un gránulo en específico con el valor de densidad del mismo gránulo. De esta forma se analizaron 20 terminales axónicas, que se muestran en gráficas de barras posteriormente.

Los resultados fueron graficados con el uso del programa Harvard Graphics, Statistica (Windows Stat Soft) y el programa Graph Pad Prism. Para cada caso, se muestran los siguientes diagramas de flujo, relacionados con el procesamiento de las muestras:

Penaeus schmitti

FIJACIÓN



Bouin acuoso (12 horas)
Lavados en agua destilada

DESHIDRATACIÓN



Alcoholes de: 70%, 80%, 90% y 100%
Varios cambios en el tiempo (hrs)

INFILTRACIÓN



Alcohol-Xilol
Xilol 1 y Xilol 2
Xilol - parafina (estufa a 60°C)

INCLUSIÓN



Parafina

CORTES



Micrótono de rotación manual
(6-8 micrómetros)

TINCIÓN



Desparafinización

Tinción de Gomori (Hematoxilina crómica-floxina)

Tinción con impregnación argéntica

Montaje en Bálsamo de Canadá

OBSERVACIÓN



Microscopio binocular óptico.
Toma de fotografías al mismo.

DIAGRAMA DE FLUJO No. 1

Penaeus schmitti (4 glándulas):

FIJACIÓN



glutaraldehído 3,2%, 2 horas a 4°C
en amortiguador cacodilato de sodio pH 7.4, 0.1M.
Lavados en amortiguador cacodilato de sodio,
cambios de 2x5 minutos.



Post- fijación en tetraóxido de osmio
1%, durante 1 hora, en amortiguador cacodilato de sodio.



DESHIDRATACIÓN

Alcoholes de: 70%, 80%, 90%, a 4°C y 100% a t.a.
Cambios de 2x10 y de 1 hora en 100%.



INFILTRACIÓN

óxido de propileno-medio de inclusión

2-1

1-1

1-2



INCLUSIÓN

resina Spurr, (1969) en la estufa 24 horas



CORTES

semifinos (0.5-1 micrómetros) montados en portaobjetos
ultrafinos (60-90 nanómetros) montados en rejillas de cobre



CONTRASTE

Tinción con azul de toluidina- Observación al microscopio óptico



Contraste con acetato de uranilo (20) y citrato de plomo (10)
Observación al microscopio electrónico de transmisión, modelo JEOL.
Observación al MET, modelo EM-10, ZEISS.

DIAGRAMA DE FLUJO No.2

Penaeus duorarum (4 glándulas):

FIJACIÓN



Se perfundió el fijador directamente en la base
del pedúnculo:

glutaraldehído 2.5%, en amortiguador fosfato

0.16 M y pH-7.3, durante 30 , a t.a

Disección de la glándula sinusal, bajo estereo, se mantuvo en el fijador
durante una hora.

Lavados en amortiguador de fosfatos con cambios de 10 minutos

Post-fijación en tetraóxido de osmio,

al 1%, toda la noche, a 4°C. Lavados en amortiguador de fosfatos

DESHIDRATACIÓN



Concentraciones crecientes de alcoholes.

70%-80%-90%-100% (todo a temperatura ambiente)

INFILTRACIÓN



óxido de propileno- resina epón 812

2-1

1-1

1-2

INCLUSIÓN



En moldes planos, en resina epón. Estufa a 60°C, durante 24 horas



CORTES

semifinos (240 nanómetros) montados en portaobjetos.

ultrafinos (60-90 nanómetros) montados en rejillas de cobre cubiertas con formvar.



CONTRASTE

cortes semifinos con azul de toluidina- observación al microscopio óptico y cortes ultrafinos acetato de
uranilo- 20% citrato de plomo -10% (Reynolds, 1963). observación al microscopio electrónico.

DIAGRAMA DE FLUJO No.3

En pedúnculos oculares de otros animales de la misma especie se realizó la

FIJACIÓN



glutaraldehído 2.5% en agua de mar filtrada
durante 1 hora, a t.a, y pH-9

Se perfundió en la base del pedúnculo con el fijador.

Los procesos de extracción de la glándula fueron igual
al caso anterior.

Lavados en amortiguador de agua de mar y post-fijación
en tetraóxido de osmio al 1%, toda la noche, a 4°C.

El resto de los pasos se realizaron como se muestra
en el diagrama 3.

DIAGRAMA DE FLUJO No. 4

Penaeus setiferus (3 glándulas):

FIJACIÓN



En este caso, se abrió el pedúnculo ocular completo longitudinalmente y se sumergió en el fijador durante unos minutos, luego se extrajeron las glándulas, bajo el estereocópio y se dejaron en el fijador:

glutaraldehído 2.5%, en amortiguador de fosfato de sodio durante 1 hora, a t.a.

El resto de los pasos son iguales al caso anterior.

DIAGRAMA DE FLUJO No. 5

RESULTADOS:

ESTRUCTURA DEL PEDÚNCULO OCULAR.

UBICACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA SINUSAL:

En cortes longitudinales del pedúnculo ocular de *P.schmitti*, encontramos que se presentan las tres médulas o ganglios ópticos: médula externa, médula interna y médula terminal. Numerosas células globulares rodean o bordean las zonas de la médula externa e interna, y la zona de la glándula sinusal se localiza en posición dorso-lateral entre la médula externa y la interna, Figura 1. Esta glándula se ubica justo debajo de la retina.

En la zona de la médula terminal se presentan agrupaciones de células o somas neuronales de gran tamaño con un núcleo bien definido y con prolongaciones evidentes (axones), dirigidos hacia la zona de la glándula sinusal, lo que se corresponde con lo descrito como órgano X. Próximo a ellas se encuentran muchas células o núcleos de células globulares, como se muestra en las Figuras 2,3 y 4.

Con la técnica de impregnación argéntica se logró visualizar muy bien estas neuronas de gran tamaño propio de neuronas neurosecretoras.

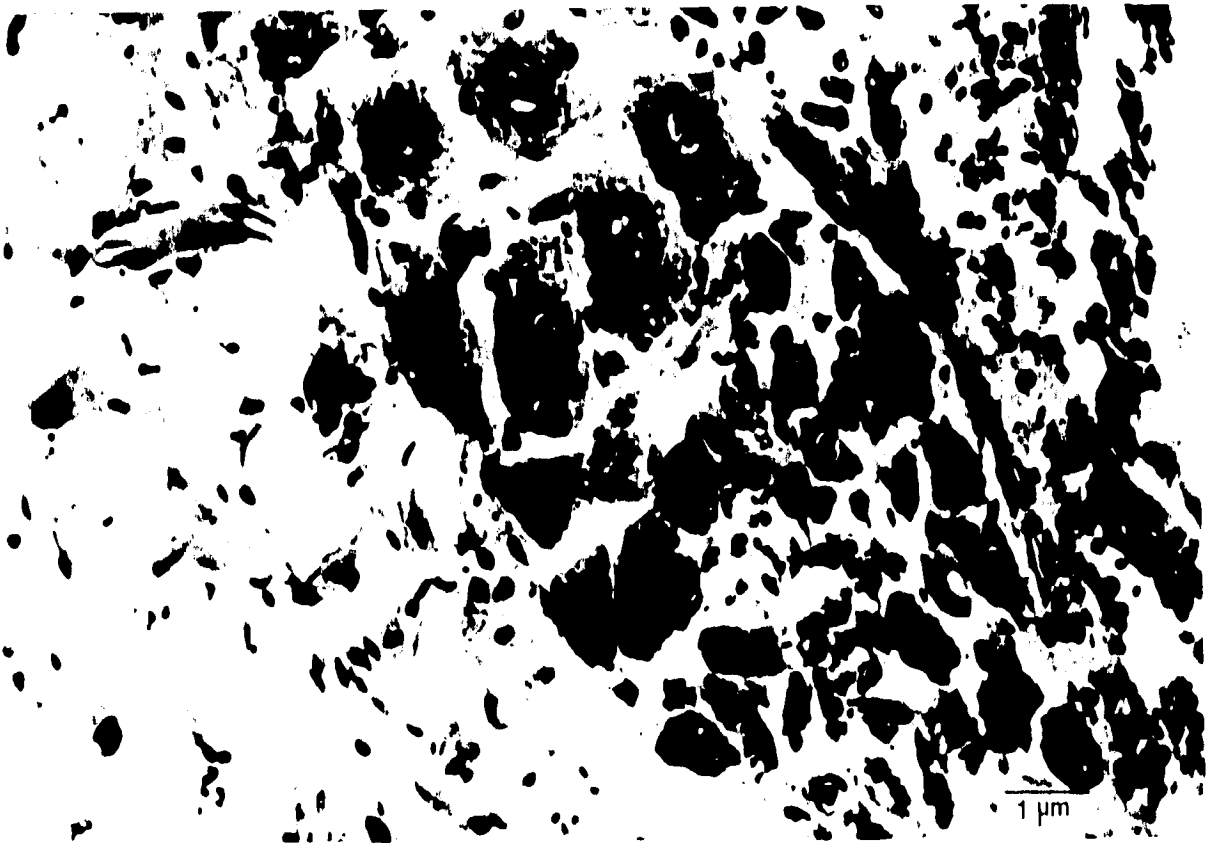
En los cortes realizados encontramos una estructura similar al órgano X, a nivel de la médula terminal, que presenta una estructura lobular, así como agrupaciones laminares, dichas características apuntan a que pueda ser el órgano de Bellonci, que se muestra en la Figura 5, rodeada de tejido nervioso. Van Herp y col. (1977) sugieren la hipótesis de una asociación de funciones glandulares y sensoriales para este órgano.

Figura 1. Corte histológico longitudinal del pedúnculo ocular, en *Penaeus schmitti* donde se observan diferentes ganglios ópticos como la médula externa (me), médula interna (mi), médula terminal (mt), glándula sinusal (gs) y nervio óptico (no). Aumento 600x.

Figura 2. Corte histológico de la zona de la médula terminal, donde se ven agrupaciones de somas neuronales (sn), en *P.schmitti*. Aumento 2160x.



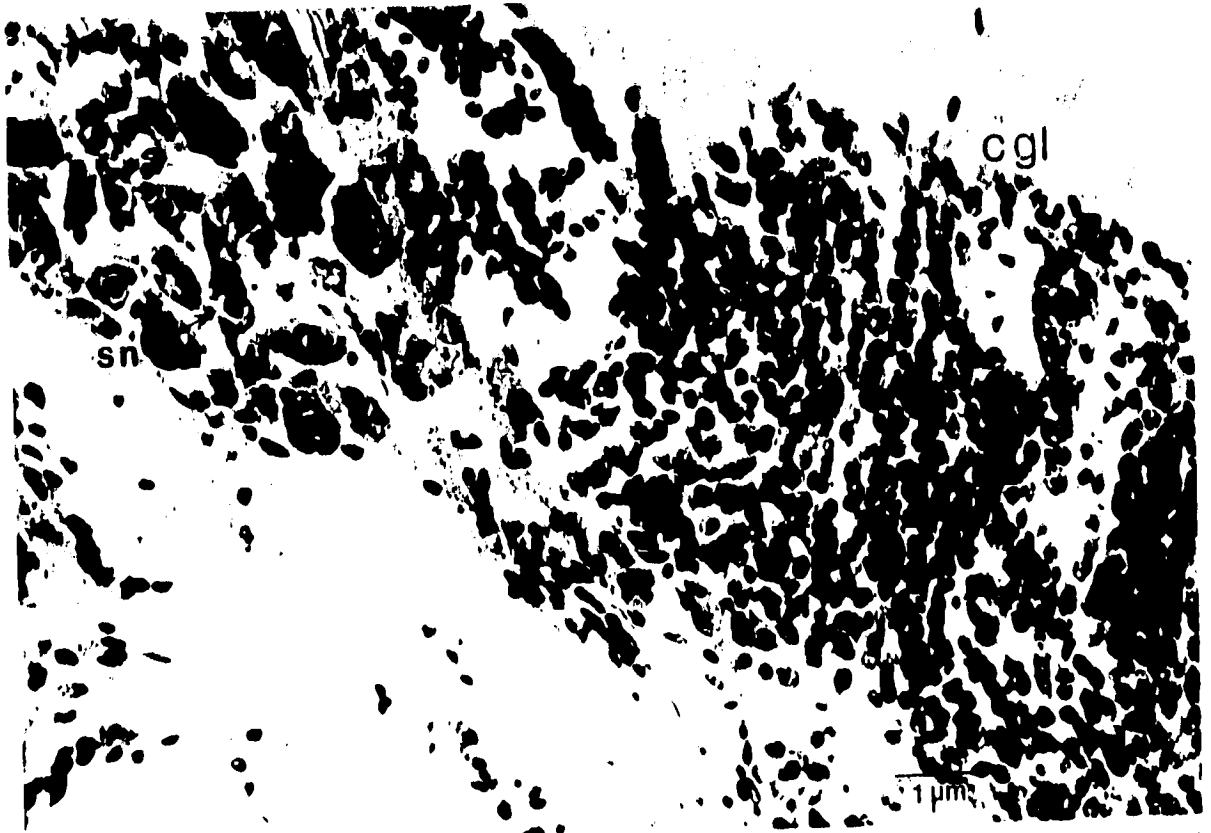
1



2

Figura 3. Agrupación de células globulares, observadas al microscopio óptico (cgl) y cercanas a la zona del órgano X donde se ven los somas neuronales (sn) en *P. schmitti*. Aumento 2600x

Figura 4. Gran aumento de una neurona gigante ubicada en la médula terminal (ng). Se observa bien la prolongación axónica, señalada con flecha, *P. schmitti*. Aumento 8200x



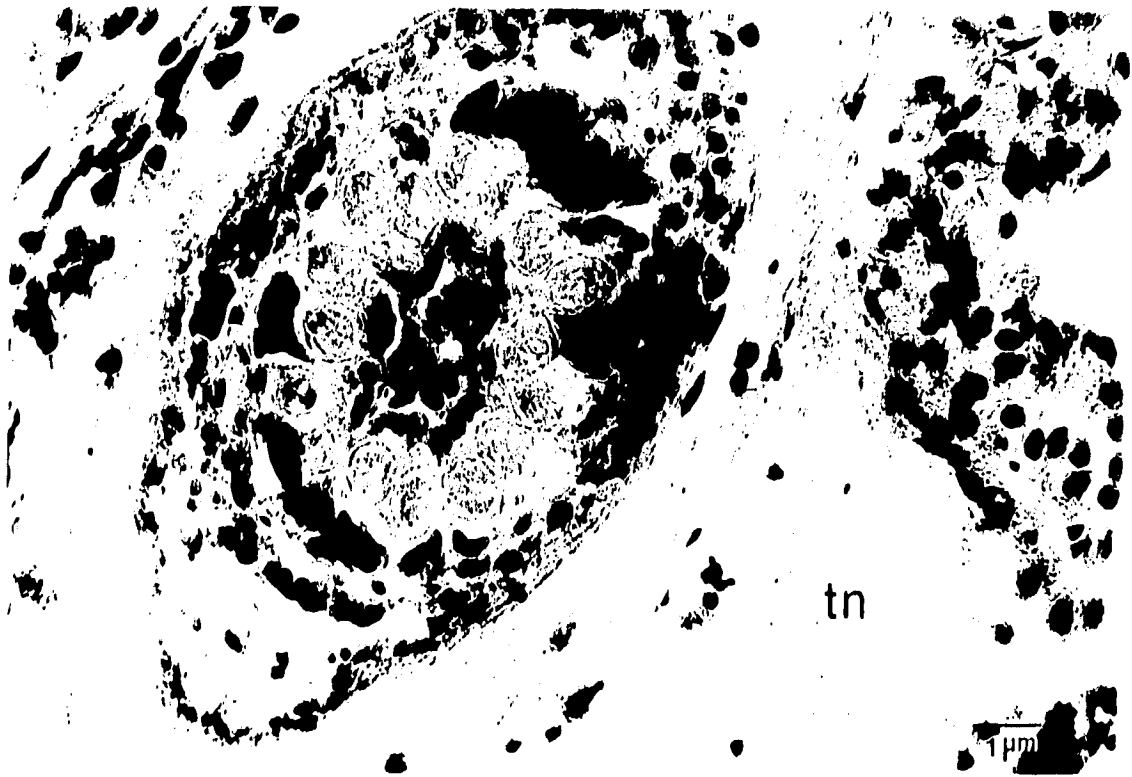
3



4

Figura 5. Posible estructura correspondiente al órgano de Bellonci, rodeado de tejido nervioso (tn), en *P.schmitti*. Aumento 6500x

Figura 6. Cortes semifinos de la glándula sinusal en especies de peneidos. Se observa un lumen central (lc) en cuya cercanía se sitúan grupos de gránulos (g), *P.schmitti*. Aumento 2000x



5



6

Se continúa la médula terminal con el nervio óptico. Cada médula contiene numerosos capilares. La médula externa, hacia el extremo distal del pedúnculo ocular se sigue de una lámina ganglionar con lagunas de hemolinfa así como fibras nerviosas que conectan a la médula externa con la zona de la lámina ganglionar.

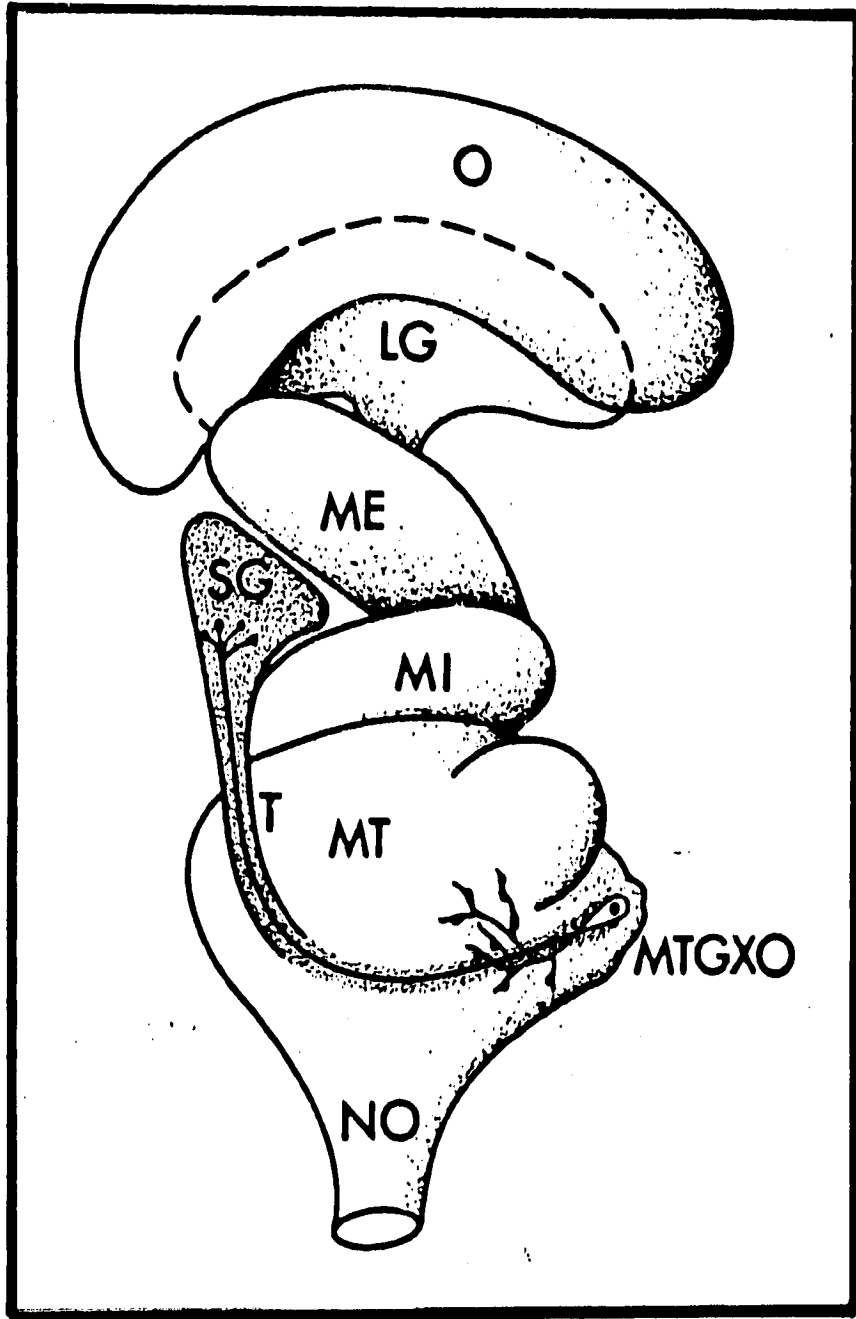
La glándula sinusal en las especies procesadas en este trabajo, se encuentra ubicada entre la médula externa y la médula interna en posición dorso-lateral del pedúnculo ocular, como se representa en el Esquema 1.

En las microdisecciones realizadas a las muestras frescas se visualizó bajo el estereoscopio la ubicación de los ganglios ópticos en la zona interior del ojo, pudiéndose definir la médula externa y la médula interna, así como la zona de la médula terminal continuándose con el nervio óptico.

La glándula sinusal está situada en estos camarones peneidos por debajo de la retina , lo que hace difícil localizarla. Su color es azul iridiscente, que se logra observar cuando se trabaja con animales frescos. Se presenta como una estructura difusa y con apariencia digitiforme. Como resultado de la disección se puede observar una porción del nervio denominado de la "glándula sinusal" precisamente en continuación con la masa de gránulos contenida en las terminales axónicas que constituyen la glándula sinusal.

Se diferencia la glándula sinusal del tejido circundante precisamente por la coloración azulosa debida al tamaño de las micelas de los gránulos que contiene, que contrasta con zonas opacas de tejido nervioso adyacente.

Esquema 1. Representación esquemática de la ubicación de los ganglios ópticos dentro del pedúnculo ocular, donde se distinguen: nervio óptico (NO), médula terminal (MT), complejo órgano X- médula terminal (MTGXO), glándula sinusal (SG), nervio de la glándula sinusal (T), médula interna(MI), médula externa (ME), lámina ganglionar (LG), y zona del aparato óptico (O). Tomado de Gorgels-Kallen (1985).



ULTRAESTRUCTURA:

En los cortes semifinos y finos, notamos que la glándula sinusal u órgano neurohémico presenta forma de interdigitaciones conteniendo terminales axónicas separadas por membranas. Son terminales muy ramificadas y englobadas, precisamente porque contienen numerosos gránulos de neurosecreción. Estas terminales se separan de la hemolinfa por medio de una lámina o membrana basal, como se observa en las Figuras 6 y Figura 7.

En *Penaeus schmitti*, el material fijado no fue del todo favorable. Muchas zonas aparecen poco conservadas y la distribución de los gránulos se presentan muy difusos, no conservándose las membranas que rodean a las terminales axónicas y con vesículas vacías, Figura 8.

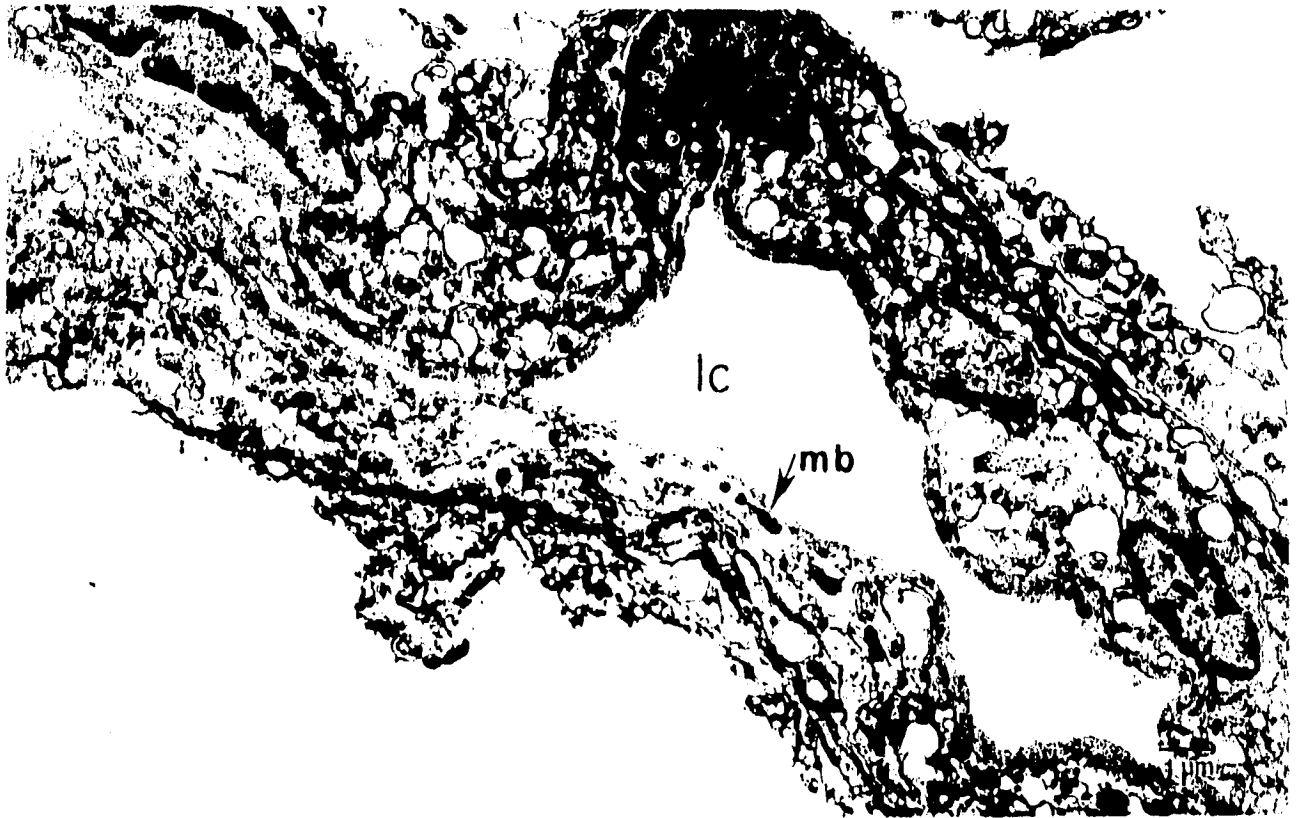
En *Penaeus duorarum*, el material fijado en glutaraldehído al 2,5% diluido en amortiguador de agua de mar filtrada, brindó los mejores resultados, conservándose mejor las estructuras celulares. El tratamiento se realizó a temperatura ambiente y sobre todo se perfundió el fijador en el tejido, disecándose la glándula en la solución fijadora.

En *Penaeus setiferus*, aunque no se utilizó agua de mar filtrada como amortiguador pues se tornaba muy turbia la solución, se usó como amortiguador fosfato de sodio, conservándose bien las estructuras y observándose zonas de vesículas claras, y zonas adyacentes a la glándula sinusal.

En cortes finos Figura 9, en *Penaeus duorarum* se presenta la glándula sinusal como una agrupación de terminales nerviosas neurosecretoras, entremezcladas con células gliales o de sostén. Estas terminales contienen gránulos de diferentes tamaños y densidades electrónicas.

Figura 7. Visión panorámica observada en corte colocado en una rejilla de Sjöstrand. Se observa un lumen central (lc) en cuya cercanía se sitúan grupos de gránulos (g), y se observa la membrana basal (mb), en *P.schmitti*. Aumento 2000x

Figura 8. Micrografía electrónica de una terminal axónica de la glándula sinusal, donde se observan numerosos gránulos (g), en *P.schmitti*. Aumento 15,500x

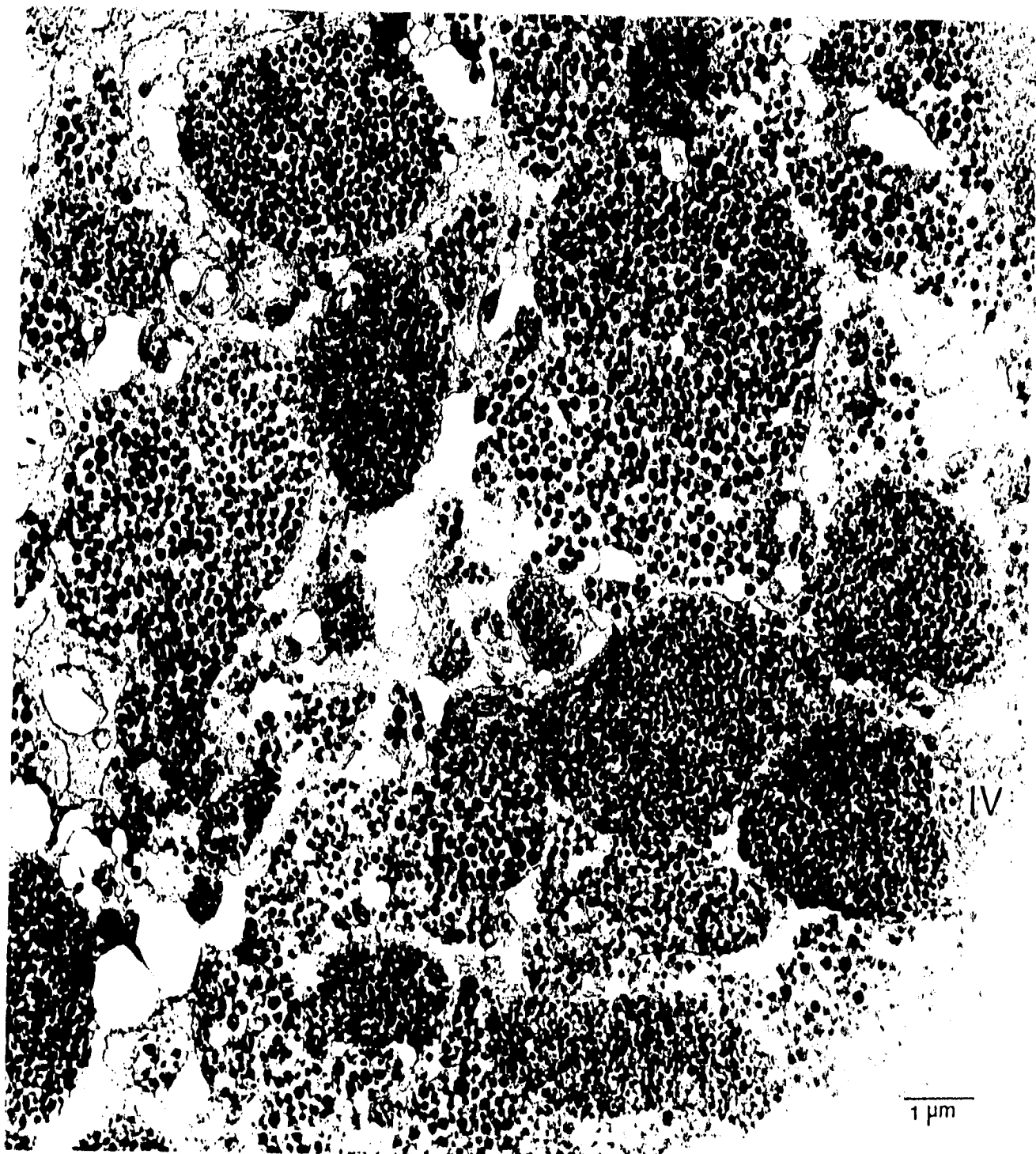


7



8

Figura 9. Micrografía panorámica donde se aprecian las características de la estructura fina de numerosas terminales axónicas, en *P. duorarum*. Estas contienen varios tipos de gránulos: I, II, III y IV. Los del tipo I ocupan gran parte de la glándula, con densidad mediana. Se ven al menos dos estructuras de gránulos diferentes dentro de esta terminal en relación con el tamaño y la densidad. El tipo II se presenta de menor tamaño que el anterior, y aparecen densamente agrupados. Los gránulos tipo III son más grandes, se observan menos frecuentes y se presentan más espaciados dentro de la terminal. Los del tipo IV son pequeños y medianos, medianamente teñidos, y se presentan menos juntos que los del tipo II. Aumento 13,200x



Se pueden apreciar al menos 4 tipos de terminales axónicas diferentes. Estas terminales están separadas de la circulación por una membrana basal, la que presenta diferentes protuberancias o irregularidades, Figura 10. Esta membrana es extracelular y aunque es amorfa parece estar constituida por fibras que pudieran ser colágeno. Se ve como la membrana forma proyecciones digitiformes a intervalos.

El contenido de los gránulos de neurosecreción, en este caso los neuropéptidos son liberados a la hemolinfa a través de procesos de exocitosis paralelos a los de endocitosis, donde se recupera la membrana rápidamente. En la Figura 11, puede considerarse que podría ocurrir un mecanismo de recuperación de membrana. Se observa también dos membranas que rodean a cada terminal axónica y una membrana que rodea a cada gránulo de neurosecreción.

Rodeando a cada terminal axónica encontramos dos membranas como se observa en la Figura 12, y Figura 13. Entre ellas y dentro de la misma terminal se evidencian mitocondrias. Las mitocondrias aparecen de forma alargada o redondeada. Algunos neurotúbulos se distribuyen entre las terminales. Se observó escaso retículo endoplásmico liso, no muy evidente.

Diversos núcleos de células gliales o de sostén, se ubican entre las terminales axónicas (Figura 14). Son núcleos muy desarrollados que prácticamente ocupan todo el volumen celular, se puede observar la doble membrana que rodea al núcleo. Estos contienen cromatina distribuida en grumos hacia la periferia del mismo, que probablemente sea cromatina compacta o heterocromatina. Internamente se evidencian partículas menos densas, las cuales pueden ser cromatina laxa o eucromatina y partículas que pudieran ser ribonucleoproteínas. Centralmente se encuentra el nucleolo, el que no siempre aparece por el plano en que se realiza el corte. En esta misma figura se observa alrededor del nucleolo grumos de partículas que pueden ser DNA.

Figura 10. Micrografia a gran aumento de la membrana basal (mb) que separa a las terminales de la hemolinfa, *P.duorarum*. Aumento 20,000x



Figura 11. Corte fino de una zona de la glándula donde se señala con 2 flechas la zona de posible recuperación de membrana, en *P.duorarum*. Además se señala con 1 flecha la membrana que rodea a cada gránulo. Aumento 54,400x

Figura 12. Se observan dos membranas: una de la terminal axónica y otra del citoplasma glial que la envaina (m). Encontramos mitocondrias entre las terminales (mit) . Se señala con 2 flechas la membrana que rodea a cada gránulo y se observa en algunos casos separada del contenido del mismo, en *P. duorarum*. Aumento 54,400x



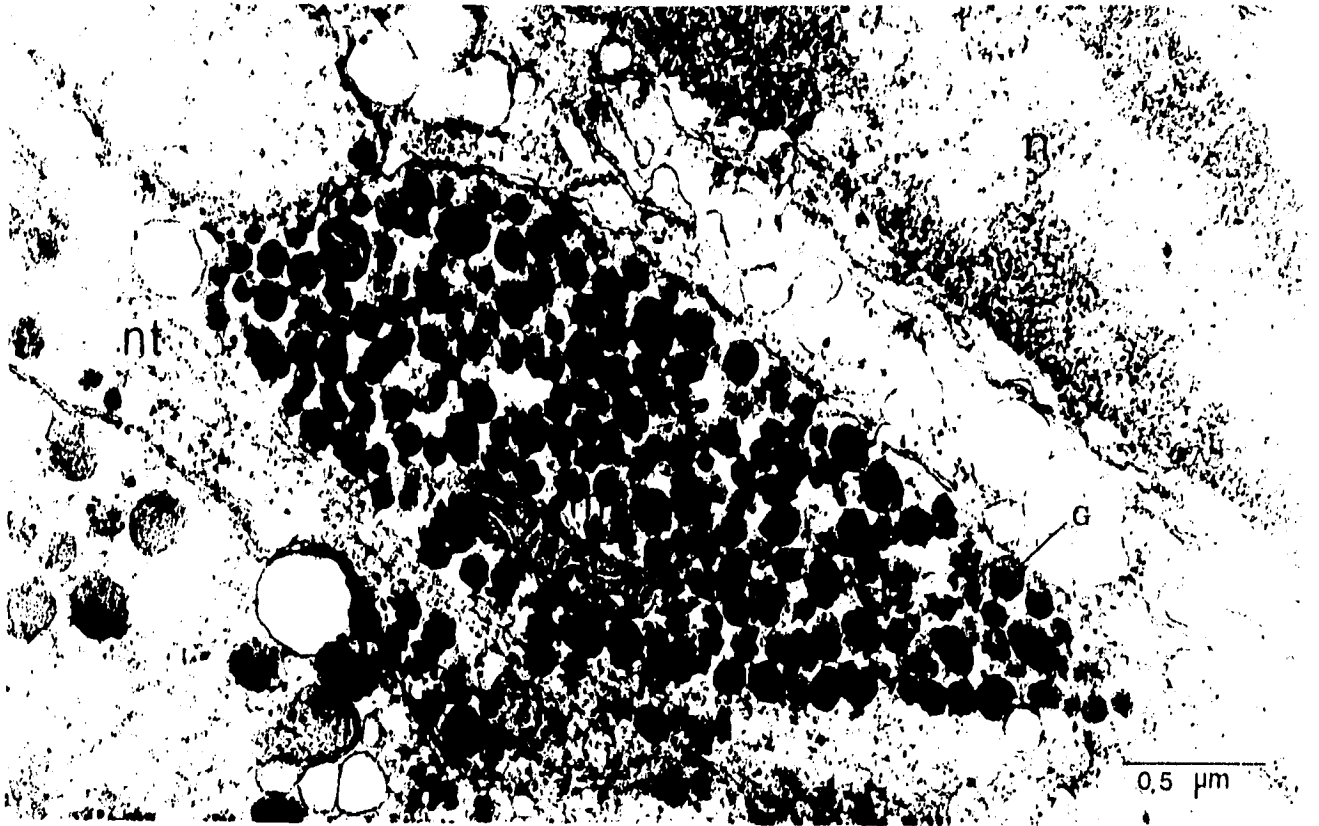
11



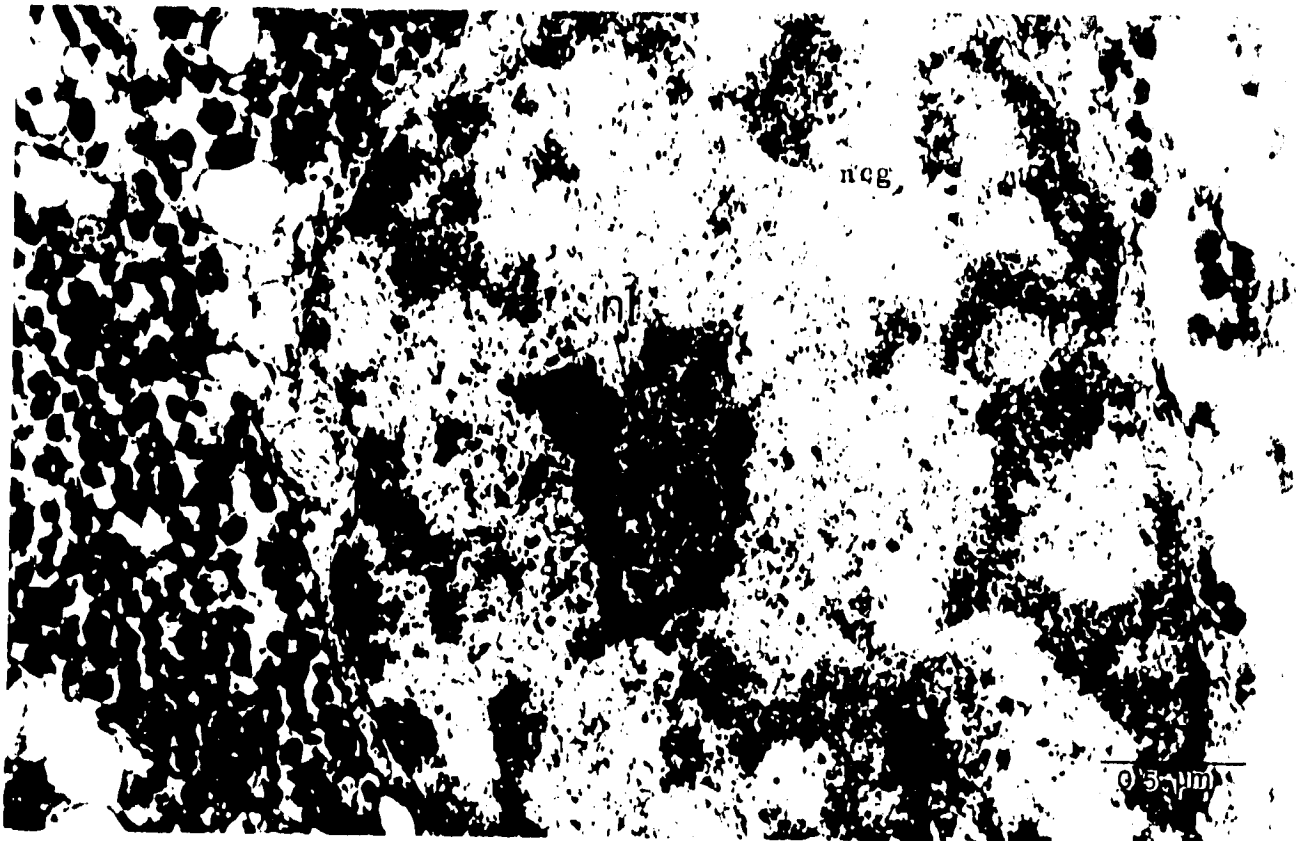
12

Figura 13. Observamos dentro de la terminal numerosos gránulos (g) y una mitocondria alargada (mit). Además observamos neurotúbulos (nt) que rodean áreas de las terminales axónicas y una fracción de núcleo (n), en *P. duorarum*. Aumento 46,800x

Figura 14. Micrografía que muestra al núcleo de una célula glial (ncg) y su nucleolo (nl) en *P. duorarum*. Aumento 44,800x



13



14

Al menos dos núcleos de células gliales (Figura 15) se encuentran muy cercanos, a veces agrupados, pero no definimos desmosomas o estructuras de comunicación entre dichas células.

Según Dirksen (1992), estas células gliales, alrededor del punto de entrada y salida del seno hemolinfático central, son procesos que impiden que una parte considerable de las terminales axónicas se pongan en contacto con la lámina basal que bordea el espacio de la hemolinfa. Sin embargo, en la región central de la glándula sinusal, la mayor parte de las terminaciones neurosecretoras se ponen en contacto directo con la lámina basal.

En la Figura 16, se muestra como podrían ser liberados los contenidos de los gránulos hacia el espacio hemolinfático (señalados con flechas). Las vesículas vacías podrían representar el resultado del mecanismo de endocitosis o de recuperación de membrana.

Zonas de vesículas claras, menos densas y menos homogéneas, como observa Dirksen (1992) en *Carcinus maenas*, se presentan en *P. setiferus* y *Penaeus shmitti*. Están bien delimitadas por membranas (Figura 17) y pudieran contener un neurotransmisor y formar parte de un sistema regulador de la secreción.

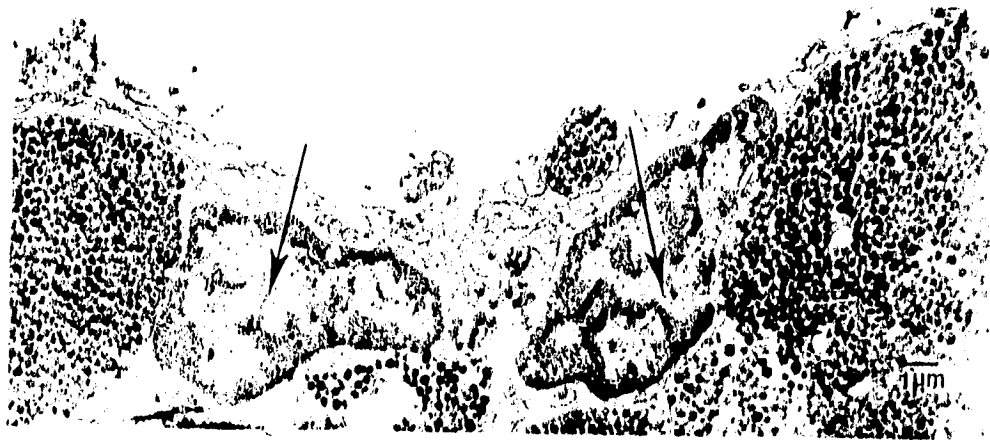
En la Figura 18, se muestra una serie de sinapsis, que posiblemente sean sinapsis químicas que presentan en ciertos casos gránulos o vesículas en ambas terminales pre- y post-sinápticas lo que indica que deba existir una transmisión del contenido como se observa en la misma figura. Se ven varias mitocondrias y terminales cuyo espacio interior está vacío.

MORFOMETRIA:

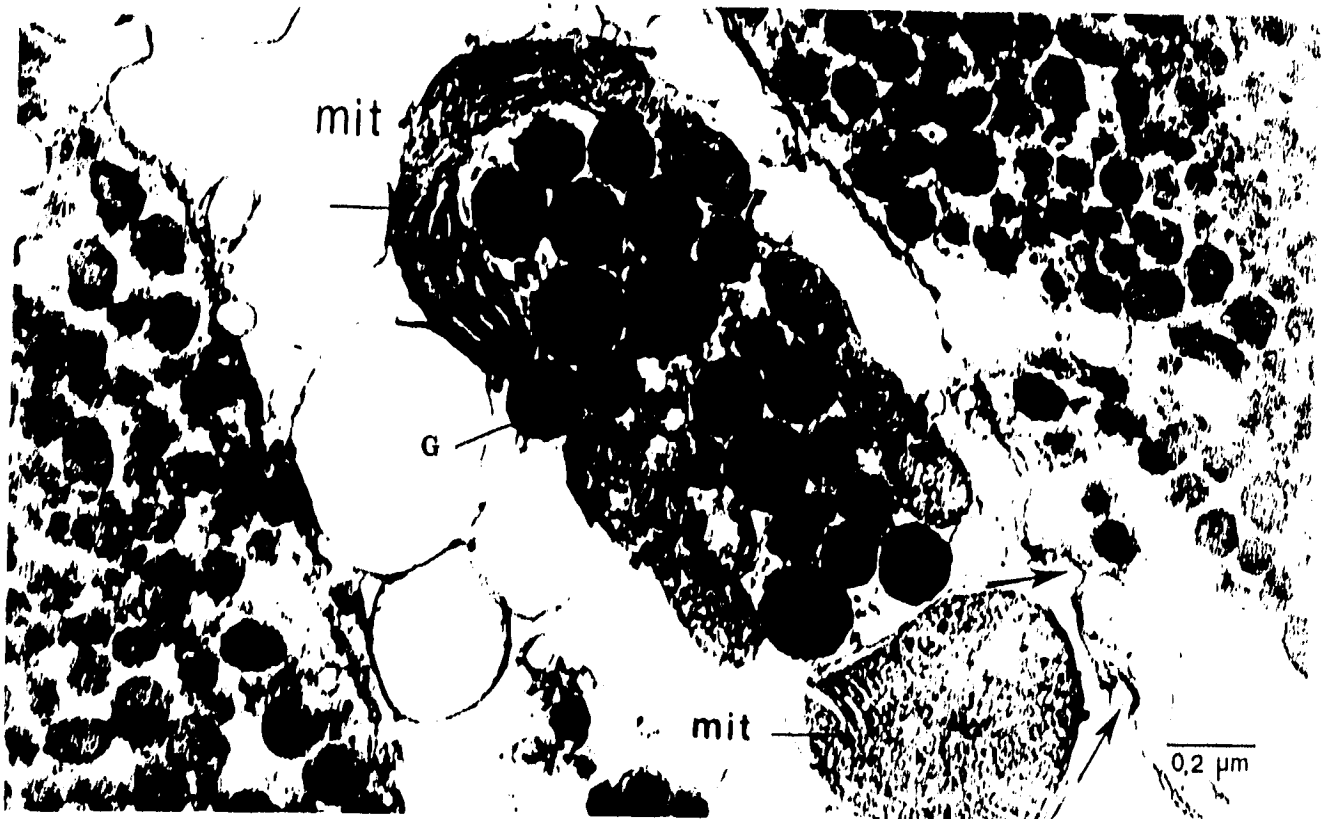
En terminales axónicas seleccionadas en observaciones a bajo aumento, se definen al menos cuatro tipos diferentes de gránulos de neurosecreción con una estructura fuertemente contrastada y otros tipos de estructuras vesiculares y vacuoladas pueden distinguirse con

Figura 15. Núcleos de células gliales, señalados con flechas en *P. duorarum*. Aumento 45,000x.

Figura 16. En la terminal central observamos gránulos (g) y algunas mitocondrias (mit). En la parte superior de la terminal de la derecha, encontramos estructuras de liberación ó recuperación de membrana señaladas con flechas, en *P. duorarum* Aumento 87,500x

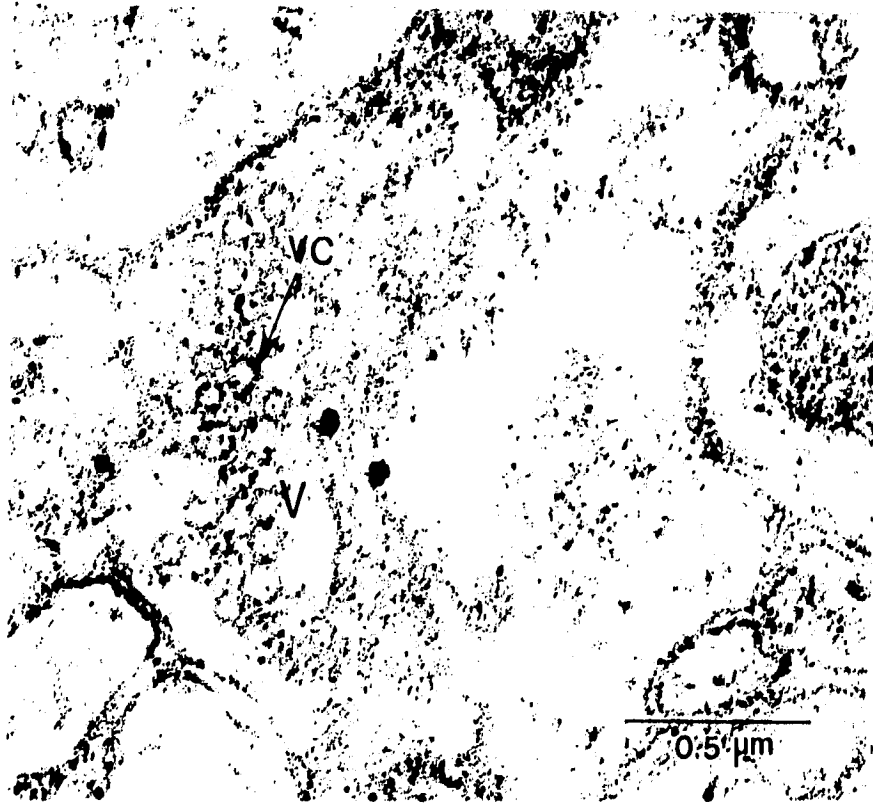


15



16

Figura 17. Micrografía de una zona de la glándula sinusal en *P.setiferus* (foto 17 a) y de *P. schmitti* (foto 17 b) donde se observan áreas de vesículas claras (vc) que se corresponden con el tipo V de gránulos referido en el texto. Aumento 50,000x y 18,000 respectivamente.

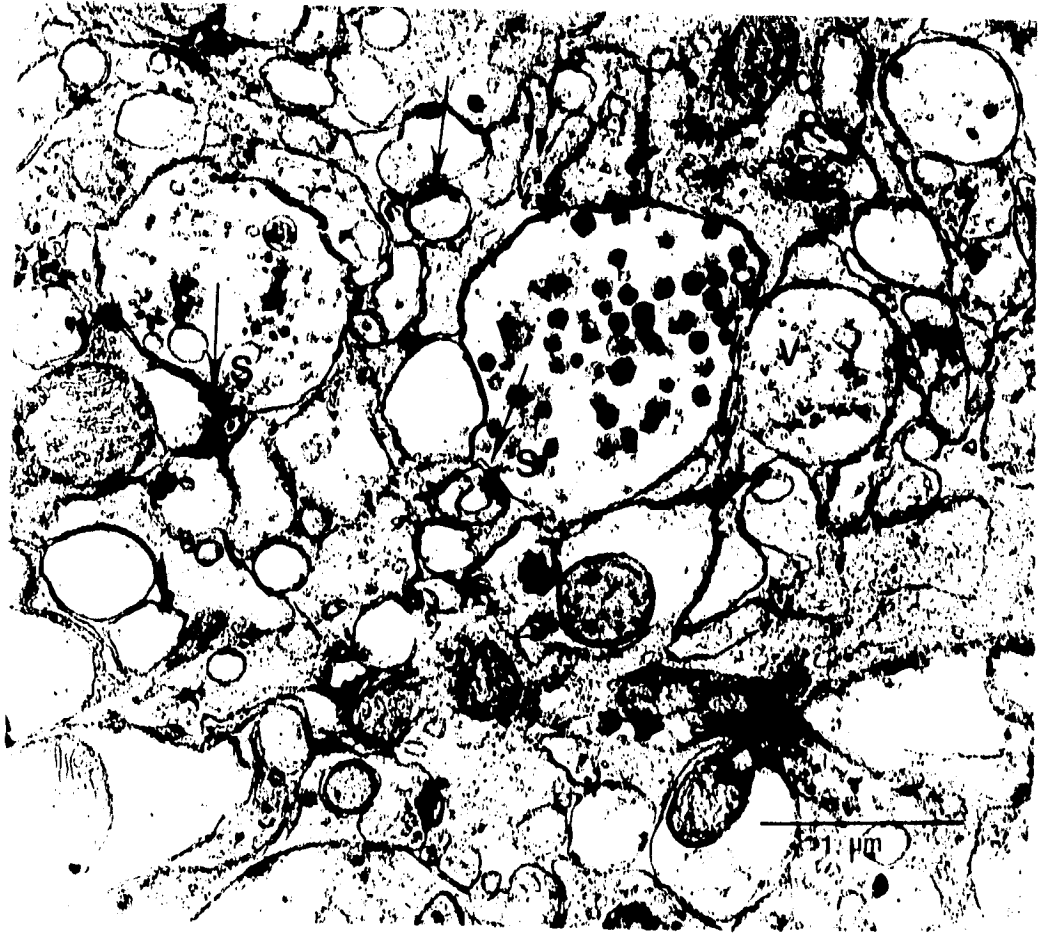


17 a

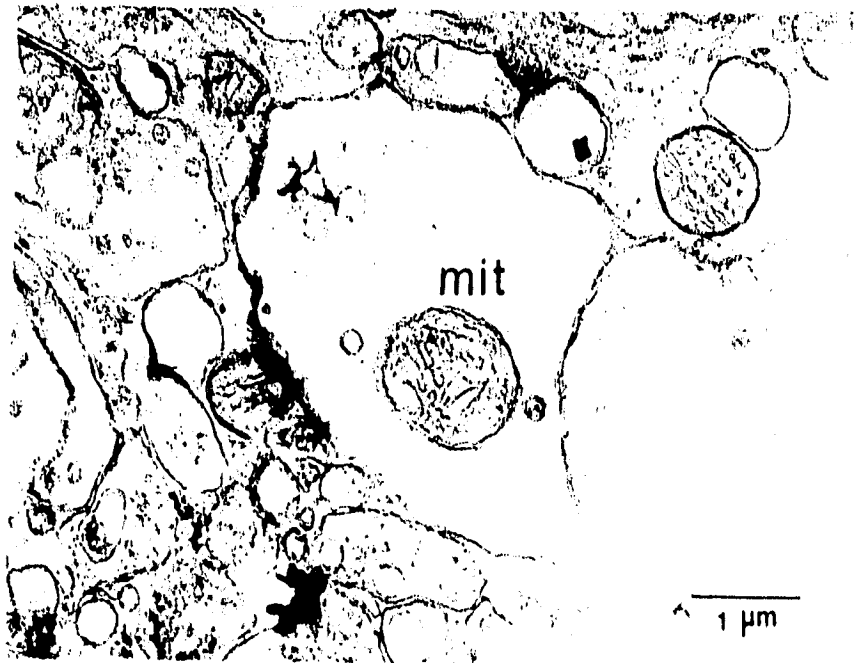


17 b

Figura 18. Zona de posible sinapsis (s) figura 18a en los procesos axonales que se dirigen a la glándula sinusal, señalados con flechas, en *P.setiferus*. Algunas vesículas están contenidas en las terminales (v). Numerosas mitocondrias redondeadas (mit), amplificadas en la foto 18 b. Aumento 31.250.



18a



18b

bajos aumentos en *Penaeus duorarum*. Estas agrupaciones se pueden diferenciar entre ellas por su tamaño, densidad electrónica y distribución dentro de la misma terminal. Por ejemplo en el histograma de frecuencia (ver gráfica 1 y 2) se muestra la variación en el tamaño de los gránulos (representado por el valor del diámetro mayor) y escalas diferentes de densidades dentro de una misma agrupación de gránulos.

Los gránulos tipo I son redondos o algo ovales, ocupan gran parte de la glándula sinusal, no se observan tan estrechamente unidos y presentan una densidad electrónica mediana. Tienen una distribución estructural variable, encontrando gránulos de diferentes tamaños y diferentes tonos de grises que pudiera atribuirse a la presencia de dos poblaciones dentro de una misma terminal.

Los gránulos tipo II son de mediano a pequeño tamaño, redondos u ovales, mostrando moderado o intenso contraste electrónico, en muchos casos son muy homogéneos y aparecen muy juntos.

Los gránulos tipo III son grandes y redondos, muestran una fuerte tinción con centro homogéneo, son más escasos y se disponen más espaciados dentro de la terminal.

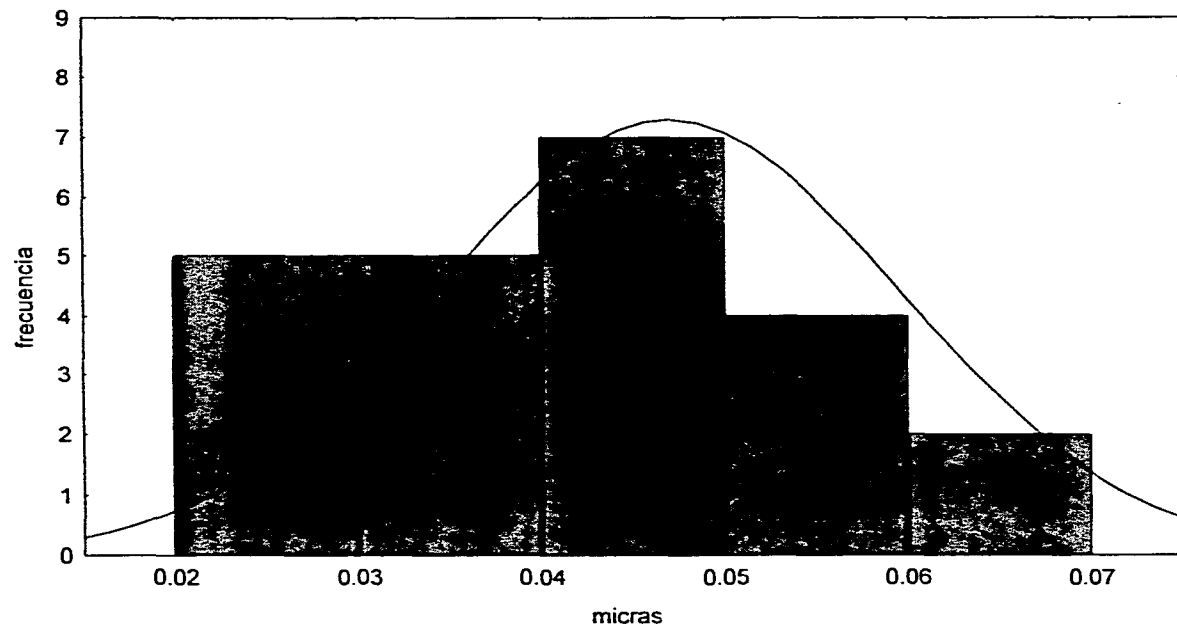
Los gránulos tipo IV son pequeños y redondos, medianamente teñidos y se agrupan más que los del tipo III pero menos que los del grupo II.

Podríamos señalar un tipo de gránulo V, que se presenta como un grupo muy heterogéneo, en cuanto a tamaño, forma y densidad.

Se muestran en las gráficas diferencias en relación al diámetro y densidad de los gránulos de neurosecreción. Tal es el caso de la gráfica 3, donde los datos muestran que el diámetro de los gránulos oscilan entre 0.04-0.1 micrómetros. En la gráfica 3 los datos fueron ordenados consecutivamente. En la gráfica 3a, se representan los diámetros de las 20 terminales sin

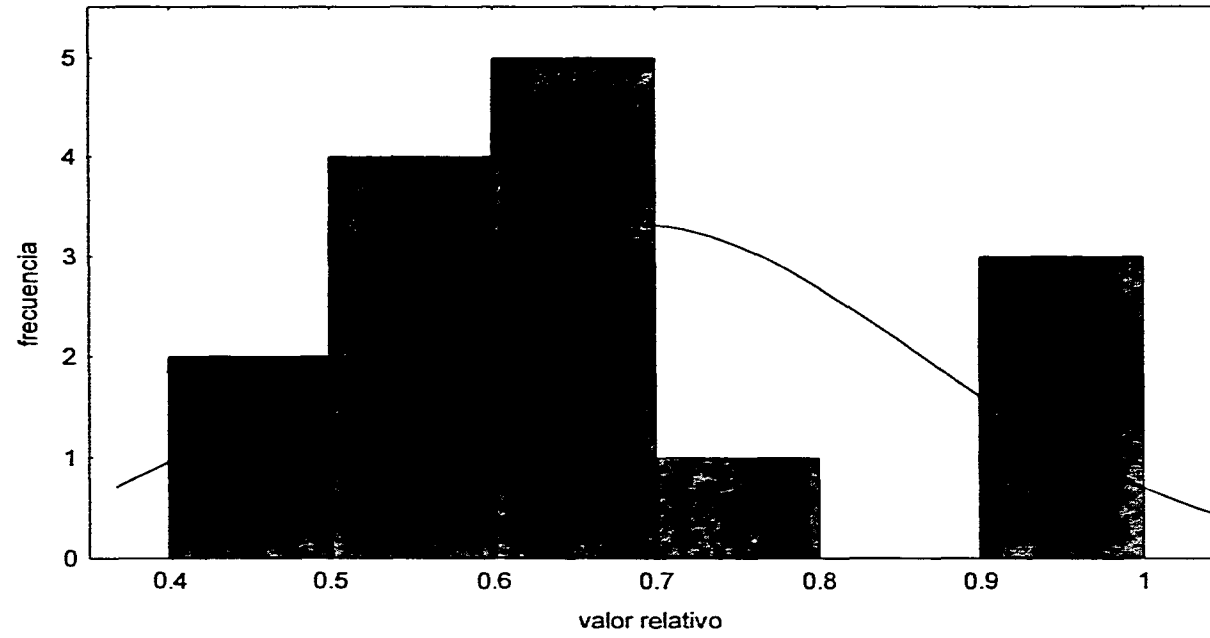
Gráfica 1. Histograma de frecuencia que muestra la distribución de las clases que representadas por barras indican la media de los diámetros de los gránulos dentro de una terminal. La línea conínua indica una distribución normal. Se realizó en *P.duorarum*.

DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN
DENTRO DE UNA MISMA TERMINAL



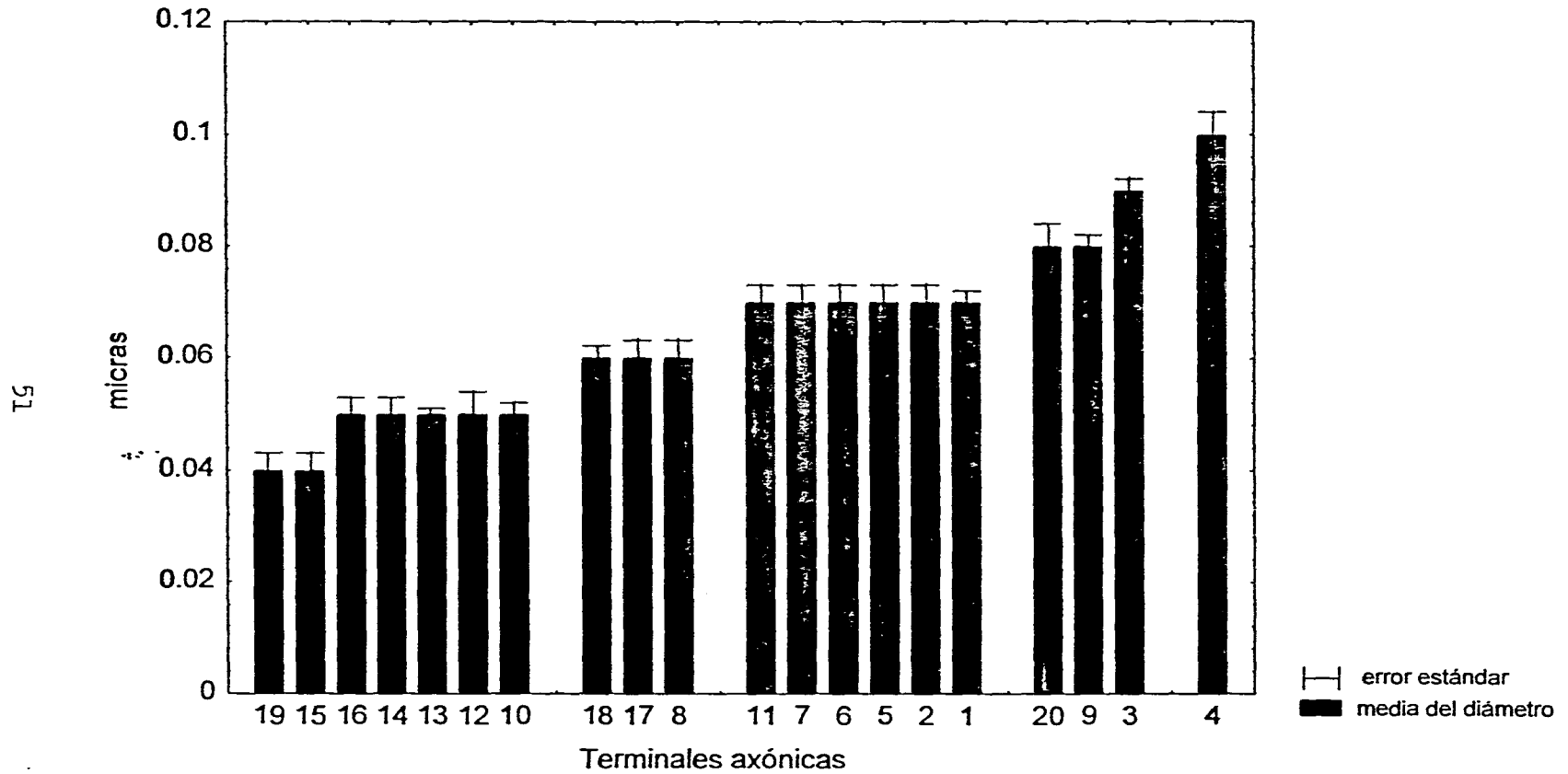
Gráfica 2. Histograma de frecuencia que muestra la distribución de las clases que, representadas por barras, indican la media de las densidades de los gránulos dentro de una terminal, en *P.duorarum*. Se corresponde esta terminal con la analizada en el histograma de frecuencia del tamaño de los gránulos (gráfica 1). La línea continua indica una distribución normal.

DISTRIBUCION DE DENSIDADES DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN
DENTRO DE UNA MISMA TERMINAL



Gráfica 3- Representación gráfica de medidas del diámetro mayor de los gránulos por cada terminal. Se analizaron 20 terminales. Las barras representan las medias y el error estándar por líneas verticales con máximo y mínimo. En *P.duorarum*.

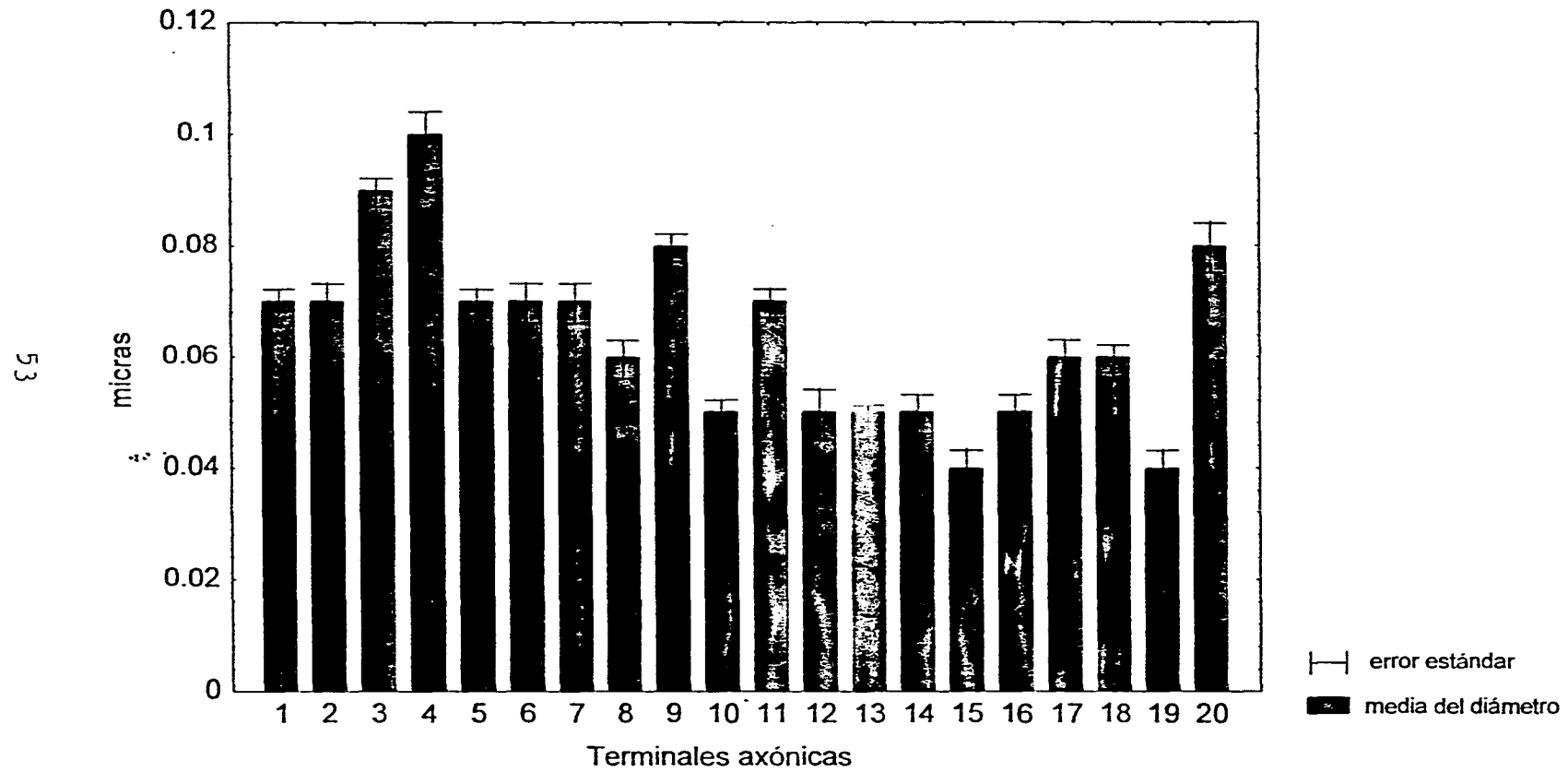
DIÁMETRO DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN



Gráfica 3.

Gráfica 3a- Representación gráfica de medidas del diámetro mayor de los gránulos por cada terminal. Se analizaron 20 terminales, y se expresan 5 grupos de terminales agrupadas por los valores promedios de sus diámetros. Las barras representan las medias y las líneas verticales el error estándar. En *P. duorarum*.

DIÁMETRO DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN



Gráfica 3a

Tabla 1.-Comparación del diámetro de los gránulos de secreción entre terminales, usando la prueba estadística t-de Student. Los valores numéricos indican el nivel de diferencia entre ellos, el espacio en blanco indica la ausencia de diferencias y la X el valor representado. En *P.duorarum*.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		3.38E-7	1.40E-3					5.26E-3	5.60E-7		0.04	2.64E-7	8.07E-3	3.63E-7	9.79E-4	0.02	8.58E-3	2.29E-8	
2	x		0.012	0.03					1.35E-7		5.54E-3	1.21E-7	7.23E-4	3.30E-7	2.82E-4	1.72E-3	5.14E-4	1.13E-8	
3	x	x		5.36E-11	2.54E-6	1.78E-5	1.05E-5	9.75E-3	1.10E-15	2.84E-8	1.98E-8		9.8E-11	5.77E-15	1.51E-10	1.28E-9	6.03E-12	1.11E-15	6.06E-3
4	x	x	x	6.20E-6	2.26E-3	5.24E-3	1.36E-3		1.88E-9	7.5E-5	2.04E-5	6.73E-12	1.58E-6	1.32E-9	7.36E-6	1.55E-6	3.34E-7	7.48E-10	
5	x	x	x	x				1.68E-5	1.29E-6			4.60E-7	0.02	9.08E-8	3.33E-3	0.014	0.03	2.19E-7	5.10E-3
6	x	x	x	x	x			7.76E-3	6.90E-6				0.01	1.76E-6	3.57E-3	0.025	0.012	4.54E-7	
7	x	x	x	x	x	x		0.030	2.10E-7		6.91E-3	1.04E-7	1.02E-3	2.44E-7	4.43E-4	2.03E-3	7.85E-4	1.34E-8	
8	x	x	x	x	x	x	x	4.55E-3	3.22E-5			7.30E-6	0.015	5.87E-6	8.34E-3	0.02	0.015	2.41E-6	
9	x	x	x	x	x	x	x			3.71E-4	6.75E-6	3.21E-14	3.9E-14	2.85E-12	1.18E-6	3.24E-7	9.99E-8	1.30E-7	
10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	6.95E-7	0.03		0.02			0.03	7.57E-3		5.75E-7
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0.02	9.25E-8	5.24E-4	5.31E-8	1.50E-3	9.19E-3	5.54E-3	1.71E-7	0.04
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			7.12E-3				3.32E-3	2.37E-5
13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		0.02			0.015	6.25E-3	8.46E-9
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	4.22E-3				1.52E-3	3.23E-4
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0.04	6.77E-3	7.21E-4		1.46E-7
16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			0.018	2.72E-4
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		3.14E-3	6.24E-4
18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	2.06E-4	1.70E-4
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	5.95E-8
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Tabla 1.

ordenar por el valor del diámetro. La comparación entre terminales indica que existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tamaño de los gránulos, lo que se muestra en la Tabla 1.

La significación estadística de las diferencias de los diámetros de los gránulos indican que éstos podrían agruparse en 5 clases o conjuntos como se observa en la gráfica 3. Un grupo que comprende a las terminales (19-15-16-14-13-12-y10) cuyos valores oscilan entre 0.04 y 0.05 micrómetros. Un segundo grupo que comprende las terminales (18-17 y 8) con valores de 0.06. Un tercer grupo que comprende a las terminales (11-7-6-5-2 y1) con valores de 0.07, el cuarto grupo contiene a las terminales (20-9 y 3) con valores entre 0.8 y 0.9 y un quinto valor correspondiente a la terminal 4, con un diámetro de 0.1 micrómetro.

La densidad relativa de los gránulos se expresa en la gráfica 4 donde podemos definir cuatro niveles de densidades. En la gráfica 4a se representan los valores de densidades de las 20 terminales analizadas, cada valor de densidad de una terminal se corresponde con un valor de diámetro de la misma terminal.

Se presentan mayor cantidad de gránulos de baja densidad y resultan mucho menos los de muy alta densidad, interpretando los valores obtenidos entre (0-1), donde los más cercanos a cero son los más densos.

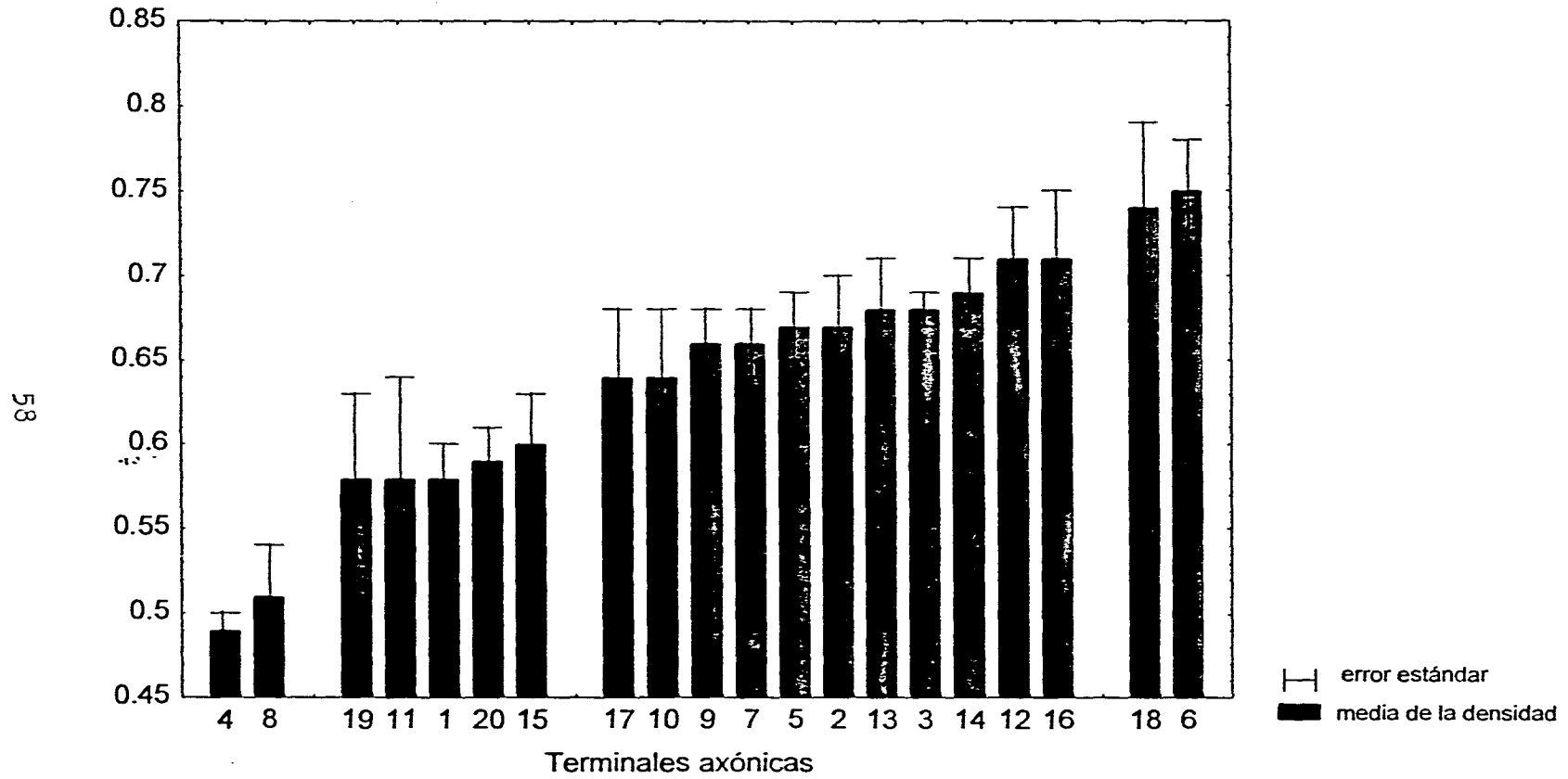
La comparación de las densidades por terminales (ver gráfica 4) muestra diferencias significativas entre ellas, lo que se representa en la Tabla 2.

Podríamos agruparlos por terminales (ver gráfica 4), donde un grupo se corresponde con valores cercanos a cero y contiene a las terminales (4 y 8), un segundo grupo que contiene a las terminales (19-11-1-20 y 15), un tercer grupo que incluye la mayoría de las terminales y éstas son (17-10-9-7-5-2-13-14-12 y 16) las que se presentan con baja densidades y un cuarto grupo que incluye a las terminales (18 y 6).

En las imágenes obtenidas directamente del microscopio electrónico no se relacionó el diámetro y la densidad de cada gránulo sino como grupo de datos separados. En la gráfica 5, se pueden encontrar cuatro grupos de tamaños de gránulos donde el primer grupo corresponde a las terminales (1-6), el segundo grupo (7-9), el tercer grupo (10-12) y un

Gráfica 4- Representación gráfica de medidas relativas de densidad electrónica de los gránulos de secreción. El valor oscila entre 0 y 1, donde los valores mas cercanos a 0, son los más oscuros. Las barras representan las medias, la línea vertical el error estandar. Se analizaron 20 terminales. En *P. duorarum*.

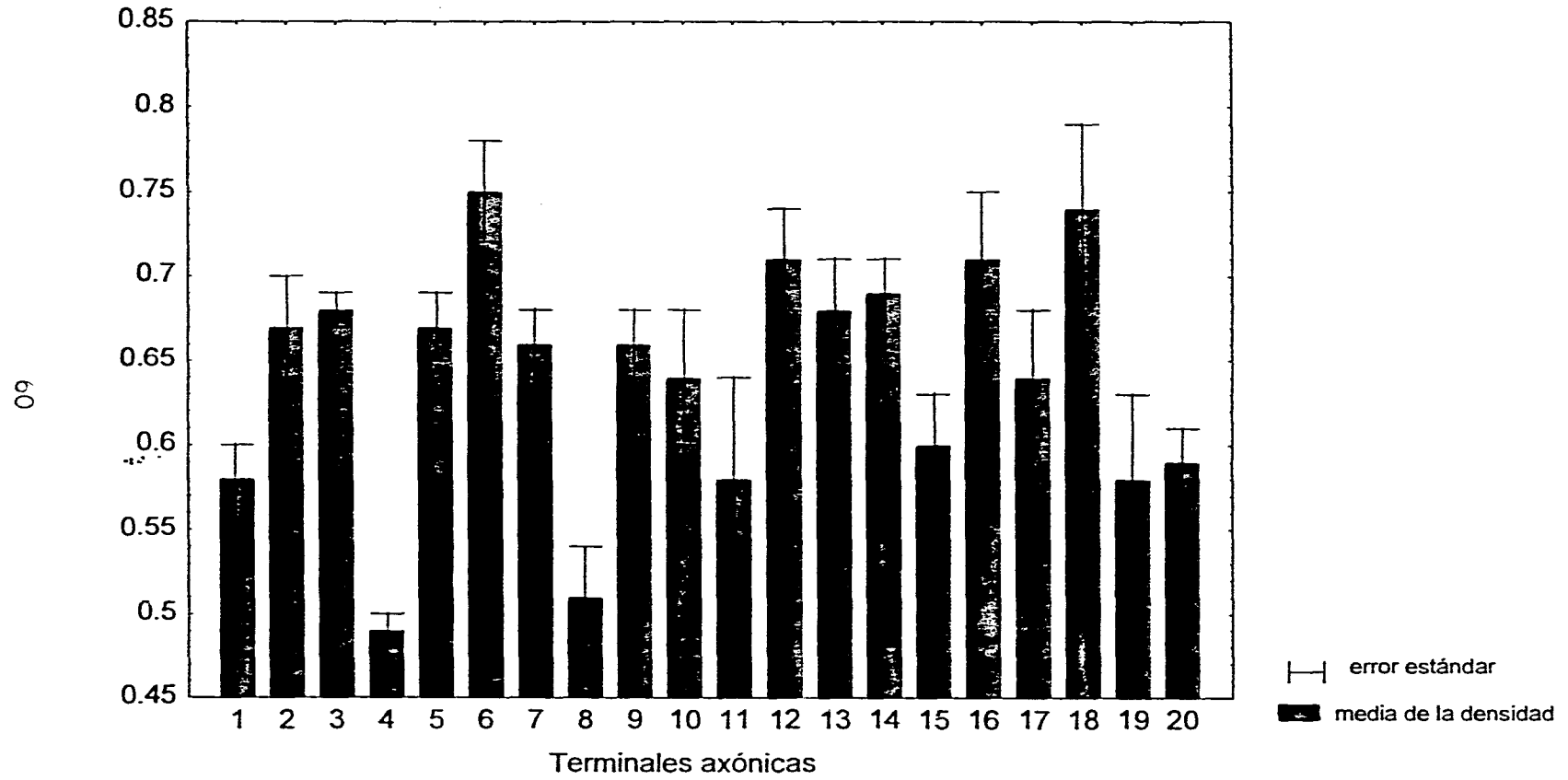
DENSIDAD DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN



Gráfica 4

Gráfica 4a- Representación gráfica de densidades relativas de los gránulos de secreción. Las barras constituyen las medias de las densidades y las líneas verticales el error estándar. En *P. duorarum*. Se analizaron 20 terminales y se representan los valores relativos de menor o mayor densidad.

DENSIDAD DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN



Gráfica 4a

7

Tabla 2. Comparación entre la densidad de las terminales. Los valores numéricos indican el nivel de significación. El espacio en blanco señala que no existe diferencia significativa entre los valores y X el valor ya representado. En *P. duorarum*.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	2.28E-3	9.45E-4		1.91E-3	9.32E-5	7.09E-3		1.03E-4	0.017		6.55E-4	6.2E-3	9.85E-4		8.49E-5	0.04	6.73E-3		
2	x		3.3E-7				0.016												9.02E-3
3	x	x	1.71E-8				0.015								0.019				4.37E-3
4	x	x	x	1.16E-7	1.28E-7	1.11E-6		1.35E-7	3.27E-5	0.026	6.20E-8	2.17E-6	1.99E-7	8.04E-4	6.81E-9	2.08E-4	2.28E-5	6.73E-3	5.5E-3
5	x	x	x	x			8.7E-3								0.049				0.011
6	x	x	x	x	x		5.76E-4							0.027				0.032	4.6E-4
7	x	x	x	x	x	x	0.029								0.019				0.036
8	x	x	x	x	x	x	x	2.87E-4			2.99E-3	0.012	0.013		1.23E-3		6.5E-3		
9	x	x	x	x	x	x	x	x											1.34E-3
10	x	x	x	x	x	x	x	x	x										0.049
11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								0.87	
12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								3.25E-3
13	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							0.031
14	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		0.046				4.23E-3
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0.011				
16	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			0.026	1.98E-4
17	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
18	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		0.021
19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
20	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

: Table 2.

cuarto grupo (13). Sería conveniente realizar un análisis diferencial entre los grupos para demostrarlo estadísticamente.

En la gráfica 6, se representan tres grupos de densidades donde el valor más alto corresponde a gránulos de baja densidad, como lo expresado en la gráfica 4.

Gráfica 5- Representación gráfica de 13 terminales. Los valores de diámetro de los gránulos de secreción corresponden con imágenes adquiridas directamente del microscopio electrónico. Las barras representan las medias de los valores de diámetro y las líneas verticales el error estándar. En *P. diorarium*.

DIÁMETRO DE LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN

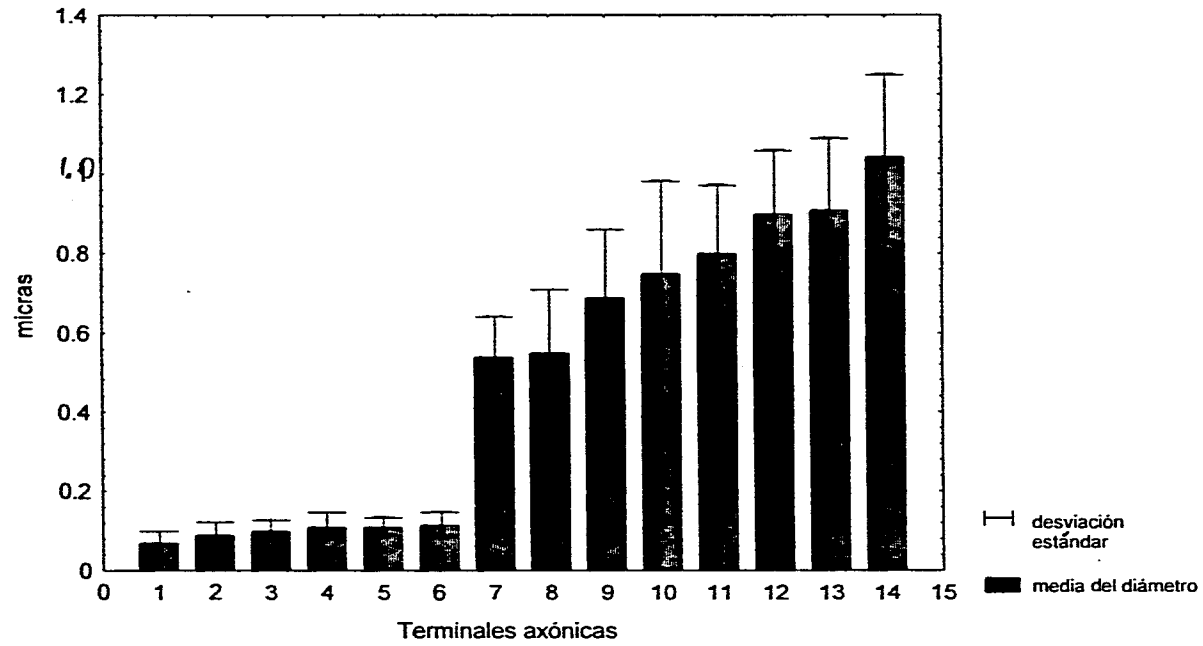
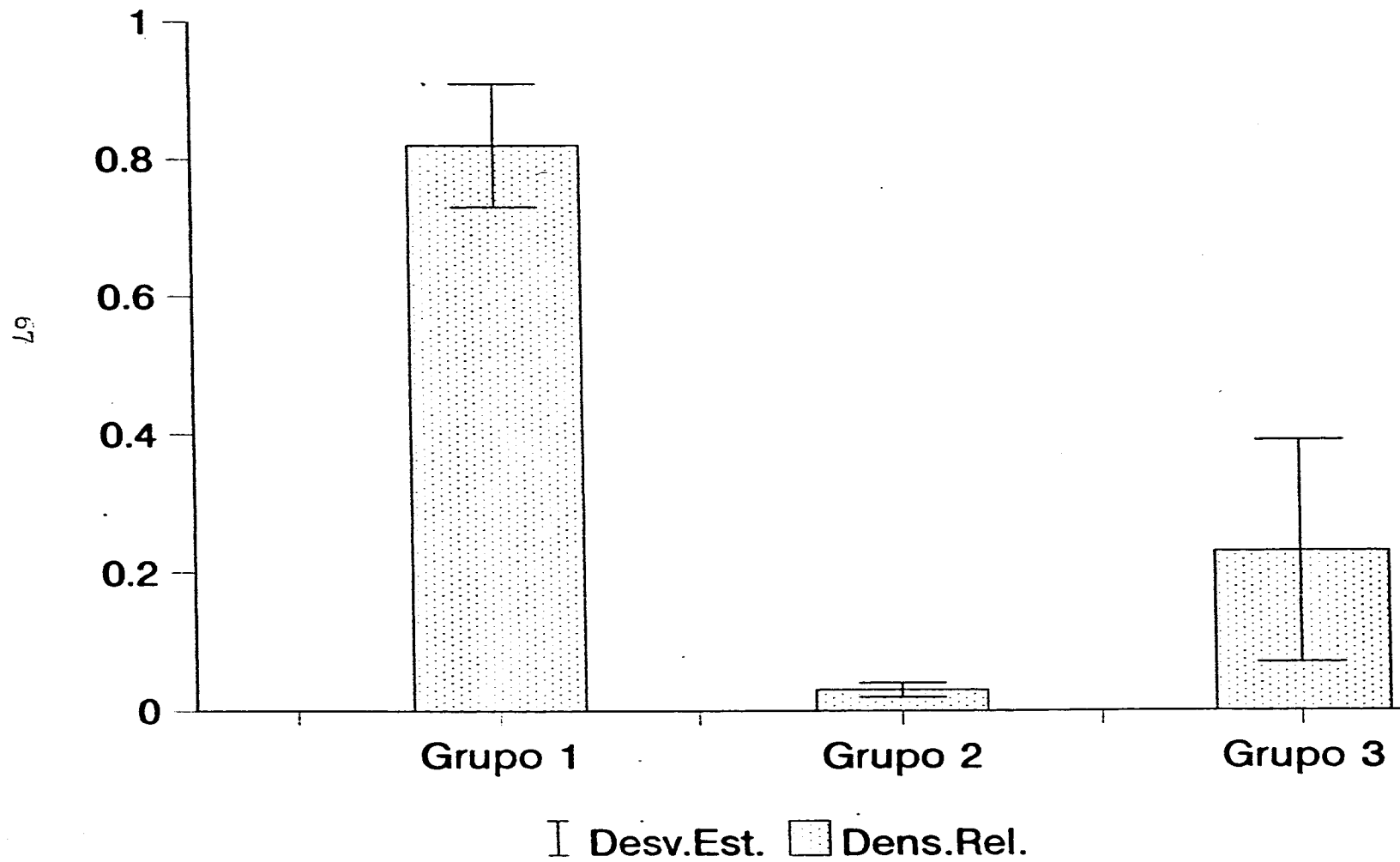


Gráfico 5

Gráfico 6.- Histograma que representa tres grupos de densidades relativas diferentes donde vemos que el máximo valor corresponde a los gránulos menos densos (valor cercano a 1), existiendo menos gránulos con densidad fuerte. Las barras representan las medias de densidad relativa. Las líneas verticales la desviación estándar. En *P. duorarum*.

Densidad de gránulos



DISCUSIÓN:

La ubicación de la glándula sinusal en diversos crustáceos se presenta en la región proximal del pedúnculo ocular, específicamente entre la médula externa y la médula interna, y en posición dorsolateral. Tal es el caso de *Penaeus japonicus* (Nakamura, 1988), *Palaemon serratus* (Van Herp y col., 1977), en braquiuros (Cooke y Sullivan, 1982), en *Carcinus maenas* (Dirksen, 1992), entre otros. Estos resultados coinciden con lo encontrado en nuestro trabajo para las tres especies de camarones peneidos.

Según Huberman (1994), la glándula sinusal resulta más compacta en cangrejos, menos en langostinos de ríos, y se hace más difusa en peneidos, lo que se corresponde con lo observado en los animales tratados en este trabajo.

En crustáceos isópodos que no tienen pedúnculo ocular desarrollado se presenta la glándula sinusal como pera que cuelga del nervio óptico en el interior de la cabeza, como por ejemplo *Armadillidium vulgare*. En esta especie, según Nussbaum y col., (1995) se encontró en la glándula sinusal, un factor hiperglicemiante.

La extracción de la glándula sinusal en peneidos no resulta fácil, ya que por su propia constitución tomamos restos de tejido adyacente que no se corresponde con la glándula. El tejido nervioso que circunda a la glándula sinusal, se ve opaco con algunas zonas blancas debido a la presencia de calcio, lo que contrasta con el color azul nacarado de la glándula. Estas observaciones coinciden con lo encontrado en el acocil, *Procambarus bouvieri* expuesto por Huberman en 1994.

Resultó definitorio realizar la extracción de la glándula en animales frescos para obtener la estructura completa, lo que corrobora trabajos realizados por nosotros con anterioridad, y que probaron que el tratamiento de disección de la glándula en pedúnculos congelados o liofilizados no brinda buenos resultados pues se torna de color blanco opaco y no se

diferencia del tejido circundante, además de deteriorarse mucho al momento de extraer la pieza.

En el presente trabajo, el extraer la glándula con extremo cuidado facilitó la no contaminación con pigmentos oculares. Este aspecto es de suma importancia para la realización de estudios bioquímicos a posteriori.

En *P.schmitti*, el proceso de fijación se hizo en condiciones adversas, llevándose a cabo en un medio muy caliente y de gran humedad relativa; por lo que se trató de mantener el tejido en el fijador a bajas temperaturas (en hielo), durante el proceso de extracción de la glándula sinusal, luego se mantuvo a 4°C.

El fijador usado fue glutaraldehído al 3,2%, no resultando lo más adecuado.

La fijación óptima de los gránulos de neurosecreción de la glándula sinusal, depende del pH de la solución amortiguadora y del uso de diferentes concentraciones de aldehídos como fue discutido por Nordmann y Morris (1980) para *Carcinus maenas* y Andrew y col., 1976 en *Callinectes sapidus*, citado por Dirksen (1992). Este autor refiere que para una mejor conservación de las estructuras de la glándula debe usarse como amortiguador el cacodilato de sodio, en lugar de fosfato y a pH de 7,4.

Sin embargo, Andrew y col.(1976) señalan como óptimos resultados, el uso de glutaraldehído como fijador al 5%, en amortiguador de cacodilato de sodio 0,2M a pH 7,3 conteniendo las soluciones lavadoras y las fijadores 5% de sacarosa y 10mM de CaCl .

De acuerdo con lo obtenido en nuestro trabajo, el uso de glutaraldehído al 2,5 %, pH de 7,2, diluido en agua de mar filtrada es decir acercándonos a condiciones fisiológicas lo más próximas al estado natural del animal y realizando el proceso a temperatura ambiente resulta en una adecuada conservación del tejido. Esto coincide con lo propuesto por Santander (1969), cuando trata de soluciones amortiguadoras adecuadas para organismos marinos.

Nordmann (1977) apunta que la diversidad de gránulos de neurosecreción puede depender de su estado de maduración, con tamaño y densidad electrónica determinadas, pero sobre todo influenciada por el pH usado durante el proceso de fijación del material.

De nuestro trabajo deducimos que la conservación de las estructuras celulares de la glándula sinusal, mediante técnicas de microscopía electrónica, pudiera depender del estado de conservación del animal, de realizar la manipulación de la glándula en condiciones lo más parecida a su medio natural, que medie poco tiempo entre la extracción de la glándula y la fijación del material y tomando en cuenta la temperatura a la cual se realiza la técnica, lo que deberá ser a temperatura ambiente donde ésta no sea muy elevada.

El lumen de la glándula sinusal está completamente rodeado por axones que están separados de éste por una fina lámina basal, lo que coincide con lo descrito para otros crustáceos por diferentes autores y lo encontrado en nuestros resultados.

En *P.schmitti* y *P.notialis*, la técnica de Gomori y de impregnación argéntica revelaron agrupaciones de somas neuronales grandes cuyos axones se dirigen hacia la glándula sinusal. Se considera que sean células de neurosecreción por su reacción ante los colorantes específicos utilizados. Estas agrupaciones de células sugieren ser el órgano X u órgano de Hanström, y se ubican en la zona de la médula terminal lo que coincide con lo observado por Van Herp y col.,(1977) y Cooke y Sullivan (1982), entre otros.

En 1985, Gorgels- Kallen, señala que se encontraron 35 somas localizados rostralmente en la región latero.ventral del órgano X de la médula terminal. Las proyecciones axonales de estas células terminan en la glándula sinusal. Con técnicas inmunocitoquímicas fueron identificados como secretores de la hormona hiperglicemiante. Este trabajo fue realizado en el cangrejo de río, *Astacus leptodactylus*, y coinciden los resultados con lo obtenido en algunos grupos de astácidos y palinúridos, así como en especies de carídeos.

En *Carcinus maenas*, Dircksen (1992) también describe a la glándula sinusal de tipo digitiforme y encuentra a nivel ultraestructural las proyecciones en forma de dedos de la membrana extracelular que separa a las terminales de la circulación.

A partir de los resultados obtenidos por medio de la microscopía óptica y la microscopía electrónica, en relación con las diferentes terminales axónicas podemos describir a la glándula sinusal en los camarones estudiados como un órgano formado por diversas agrupaciones de gránulos rodeados de membranas, que confluyen hacia un lumen o espacio hemático y que vacían su contenido a través de una membrana basal o barrera extracelular por un proceso de exocitosis.

Inferimos de nuestros resultados que podría estarse liberando sustancias contenidas en los gránulos y que se vierten a la circulación. Estos gránulos deben liberar muchas moléculas simultáneamente, gránulos que se originan en el soma neuronal y que se desplazan o fluyen hacia la terminal axónica por lo que requieren energía (ATP) y quizás un mecanismo de movimiento, por lo que encontramos neurotúbulos en nuestros cortes que se presentan en hileras a lo largo de las terminales. De igual manera aparecen numerosas mitocondrias, cuyas crestas no se disponen muy uniformemente, lo cual es característico de mitocondrias de invertebrados.

La ultraestructura de la glándula sinusal revela que está formada por numerosas terminales axónicas que contienen gránulos de neurosecreción los cuales varían en tamaño y densidad electrónica. Dentro de una misma terminal existen gránulos diferentes, algo muy marcado en la terminal que presenta gránulos tipo I. Esto pudiera explicarse teniendo en cuenta el estado citofisiológico de la estructura donde podrían haber descargado algunos gránulos sus contenidos, podrían no estar maduros todos al mismo tiempo, o podrían existir contenidos de péptidos diferentes dentro de una misma terminal, lo que habría que demostrar con técnicas de inmunocitoquímica. Resulta probable como se ha descrito para otros crustáceos, que encontremos la presencia de dos formas diferentes de una misma hormona, como

7

podiera ser la hormona hiperglicemiante mayoritaria y un isomorfo minoritario de la hormona hiperglicemiante, aspectos que deberán ser esclarecidos. No obstante, podríamos inferir que este tipo de terminal que es muy abundante en nuestras observaciones, podría corresponder con las dos formas de la hormona hiperglicemiante.

Del mismo modo, existen otros grupos de gránulos (II, III, IV) que deben corresponder a otras hormonas. El tipo V es menos abundante pero no podemos dejar de tenerlo en cuenta en nuestros resultados, pues podrían contener una hormona específica o compuestos de bajo peso molecular.

Como hallazgo obtenido de nuestros resultados en relación a los análisis morfométricos de los gránulos contenidos en la glándula sinusal determinamos que los diámetros de los gránulos varían entre 0.04 y 0.1 micrómetros y que varían con relación a su densidad. Al correlacionar cada terminal axónica en relación a estos parámetros vemos que existe una variedad de tamaños y densidades de los gránulos, no existe un patrón uniforme sino que podemos encontrar dentro de una terminal gránulos pequeños de baja y alta densidad, gránulos medianos de baja y alta densidad, así como encontrar gránulos grandes con baja y alta densidad. Sería bueno conocer el porcentaje de los tipos de gránulos tomando en cuenta éstos parámetros dentro de cada terminal con el fin de saber si se correlacionan los análisis cualitativos observados con los resultados morfométricos.

En *C.maenas*, según Dirksen (1992) los diámetros de los gránulos varían desde 40 y 50 nanómetros, hasta 10-50 micrómetros y se distribuyen irregularmente dentro de una misma terminal axónica.

Algunas ramificaciones axonales muestran áreas de contactos sinápticos evidentes, con zonas pre- y post- sinápticas, las pre-sinápticas con vesículas claras y quizás un cilindro eje pueda hacer contacto con varias ramificaciones axonales de una hormona determinada. En *A.leptodactylus*, Gorgels-Kallen (1985) encontró un proceso similar, logrando visualizar la ultraestructura del sistema órgano X- glándula sinusal, marcando con Lucifer Yellow todas las ramificaciones de las células que producen la hormona hiperglicemiante. Gorgels-Kallen

sugiere la presencia de un neuromodulador aminérgico en los axones presinápticos. Posiblemente jueguen un papel importante las aminas biogénicas y los nucleótidos cíclicos en la liberación de sustancias neurosecretoras desde la glándula sinusal.

La liberación del contenido neurosecretor se debe realizar por medio de un mecanismo de exocitosis, que ha de estar mediado por fuerzas químicas y físicas. Según Cooke y Sullivan (1982) parece ocurrir sólo en los puntos donde las terminales están en contacto con el neurilema y un incremento en la frecuencia de las imágenes de exocitosis ocurre cuando la fijación ha sido acoplada con procedimientos que estimulen la secreción, como podría ser la estimulación eléctrica.

Pensamos que con estudios de iontoforesis, mediante el marcaje con cloruro de cobalto o cloruro de níquel, podría conocerse el recorrido de los axones hasta la glándula sinusal, así como los nervios que parten del ganglio cerebroide hacia esta zona y se plantea que no todos deben contener actividad neurosecretora.

Por otra parte, pudiera incorporarse al organismo alguna sustancia que induzca el mecanismo de exocitosis como se encontró en el cangrejo *Astacus leptodactylus*, por Nordmann (1977), donde la inyección de serotonina evidenció el proceso de exocitosis y al mismo tiempo se incrementaron los niveles de glucosa en la hemolinfa de estos animales.

Dirksen (1992), describe a la glándula sinusal de *C. maenas* como una agrupación compacta de terminales axónicas asociadas con células gliales que se agrupan y se conectan por desmosomas, exhibiendo una apariencia de astrocito, presentando un prominente núcleo y un pequeño nucleolo y cuyas prolongaciones rodean a las terminales axónicas. Estas células gliales, alrededor del punto de entrada y salida del seno hemolinfático central, impiden que una parte considerable de las terminales axónicas se pongan en contacto con la lámina basal que bordea el espacio de la hemolinfa; sin embargo, en la región central de la glándula sinusal, la mayor parte de las terminaciones neurosecretoras se ponen en contacto

directo con la lámina basal. Este autor señala que las células de sostén deben estar involucradas en procesos de regulación y control de concentraciones iónicas y de nutrientes alrededor de las terminales axónicas.

Gupta (1983), señala que la presencia de conexiones entre las células neurosecretoras y las estructuras de almacén que están en contacto con la circulación permiten establecer el concepto de órgano neurohémico, establecido tanto para crustáceos como para vertebrados, donde estarían el sistema órgano X- glándula sinusal y el sistema hipotálamo- neurohipófisis.

La localización y ubicación de la glándula sinusal en las especies tratadas en nuestro trabajo ha facilitado desde 1995, que un grupo de investigadores tales como Huberman y col., se dedicaran al estudio de las neurohormonas metabólicas en *P.schmitt*, lo que permitirá contar con anticuerpos que bloqueen la actividad en este caso de la hormona inhibidora de la vitelogenénesis o con la síntesis artificial de antagónicos bloqueadores de los receptores de esta hormona, sustituyendo el método actual de ablación ocular. Se hace necesario de hecho, la identificación inmunocitoquímica de esta hormona dentro de la glándula sinusal.

Actualmente la ubicación correcta de la glándula sinusal permite contar con un método seguro para su eliminación mediante la ablación ocular, técnica usada como método de inducción de la maduración en la generalidad de las especies del género *Penaeus*, de importancia comercial.

La regulación de los principales procesos fisiológicos en estos animales se logra a través de la interacción vía control nervioso y endocrino, por lo que el estudio de las estructuras involucradas en los mecanismos de neurosecreción, demuestran la relación morfofuncional de los dos sistemas vitales para su existencia.

CONCLUSIONES:

Se propone una metodología para microscopía electrónica que incluye fijación por perfusión de glutaraldehído 2.5% en agua de mar filtrada, y un posterior procesamiento estándar y análisis de las muestras para futuros estudios histológicos y ultraestructurales del pedúnculo ocular y la glándula sinusal en este grupo de decápodos. Estos estudios se realizan por primera vez en las especies tratadas en el presente trabajo, lo que aporta datos al conocimiento de la biología de estos camarones peneidos.

El conocimiento de la posición anatómica de la glándula sinusal localizada en la región dorsolateral del pedúnculo ocular descrita para este grupo de animales, podrá ser utilizada posteriormente para lograr disecarla, extraerla, obtener un extracto crudo, purificar y caracterizar bioquímicamente las hormonas contenidas en ella.

En camarones peneidos, la glándula sinusal aparece como un conjunto de terminales axónicas ramificadas y ensanchadas rodeadas de lagunas de hemolinfa. Contiene numerosos gránulos de neurosecreción que deben ser liberados por exocitosis a la circulación. Constituye un órgano neurohémico cuyo contenido de sus gránulos corresponden a la actividad secretora de neuronas peptidérgicas ubicadas en el órgano X de la médula terminal del nervio óptico.

La utilización de las técnicas de microscopía electrónica aplicada al estudio de la glándula sinusal constituye un aporte al conocimiento de esta estructura por cuanto nos permitió proponer la existencia de al menos cuatro tipos diferentes de gránulos de secreción en *Penaeus duorarum* distribuidos por numerosas terminales axónicas, que difieren en tamaño y densidad intra- e interterminales debiendo corresponder con contenidos peptídicos, que representan hormonas las cuales estimulan o inhiben determinados procesos fisiológicos en estos animales.

BIBLIOGRAFÍA:

Andrew, D. and Shivers R. 1976. Ultrastructure of Neurosecretory Granule Exocytosis by Crayfish Sinus Gland Induced with Ionic Manipulations. *Journal of Morphology*. Vol 150, No 1 pp 253-278.

Bell, T. A and Lightner, D.V. 1988. *A Handbook of Normal Penaeid shrimp*. Histology Word Aquaculture Society, New York, pp 1-114.

Bliss, D.E. 1982. *The Biology of Crustacea Vol 1. Systematics, the fossil record, and Biogeography* Academic Press, New York.

Carlisle, D. B and Knowles, F.G.W. 1953. Neurohemal organs in crustaceans. *Nature (London)*, 172: 404.

Chang, E. S and O'Connor J.D. 1988. Crustacea: Moulting. En: H.Laufer y R.G.H.Dowver, *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, Alan R. Liss, New York. pp 259-278.

Chaigneau, J. 1977. L'organe de Bellonci des crustacés, mise au point sur l'ultrastructure et sur l'homologie des types avec et sans corps en oignon. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie, Paris*. 12. Tome 19, pp 401-438.

Charniaux, C.H and Payen, G. 1988. Crustacean Reproduction. *Endocrinology of Selected Invertebrate Types*, pp 279-303.

Chu, K.H and Chow, W.K. 1992. Effects of unilateral versus bilateral eyestalk ablation on moulting and growth of the shrimp, *Penaeus chinensis* (Osbeck, 1765) (Decapoda, Penaeidea). *Crustaceana* 62 pp: 226-233.

Cooke, I.M and Sullivan, R.E. 1982. Hormones and neurosecretion. En: H.L. Atwood and D.C. Sandeman (Editors), D.E. Bliss (Editor-in Chief), *The Biology of Crustacea*, Vol 3, Neurobiology, Structure, and Function. Academic Press, New York, pp 205-290.

Coro, F. y Otazo, A. 1982. *Fisiología Celular y de los Sistemas de Control*. Pueblo y Educación, Habana, pp: 256-300.

Dircksen, H. 1992. Fine structure of the neurohemal sinus gland of the shore crab, *Carcinus maenas*, and immuno-electron microscopic identification of neurosecretory endings according to their neuropeptide contents. *Cell Tissue Research*, 269: 246-266.

Dore, I and Fridolf, C. 1987. *An Illustrated guide to shrimp of the world*. An Osprey Book. Van Nostrand Reinhold, New York.

Gorgels-Kallen, J.L. 1985. Appearance and innervation of CHH-producing cells in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* examined after tracing with Lucifer Yellow. *Cell Tissue Research*. 240: 385-391.

Gupta, A.P. 1983. *Neurohemal Organs of Arthropods. Their Development, Evolution, Structures and Functions*. Thomas, Springfield, Illinois, pp 53-91.

Hanström, B. 1931. Neue untersuchungen über Sinnesorgane und Nervensystem der Crustaceen. I. *Z. Morphol Ökol Tiere*, 23: 80-236.

Highnam, K.C and Hill, L. 1977. *The Comparative Endocrinology of the Invertebrates*. Second Edition. Editorial Edward Arnold, London. pp. 28-31.

Huberman, A. 1994. Comunicación personal.

Huberman, A; Aguilar MB and Quackenbush L.S. 1995. A neuropeptide family from the sinus gland of the Mexican crayfish, *Procambarus bouvieri*.(Ortmann). *Aquaculture* 135. pp 149-160.

Jaros, P.P; Huberman, A; Sedlmeir, D and Keller, R. 1987. Isolation of neurohormone containing granules from sinus glands of *Carcinus maenas*. *Comparative Endocrinology (Life Sci. Adv)* 6: 175-179.

Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48. pp 439-448.

Laverdure, A-M; Breuzet, M; Soye, D and Becker J. 1992. Detection of the mRNA encoding vitellogenesis inhibiting hormone in neurosecretory cells of the x-organ in *Homarus americanus* by *in situ* hybridization. *General and Comparative Endocrinology*. 87: 443-450.

Meusy, J.J and Payen, G.G. 1988. Female Reproduction in Malacostracan Crustacea. *Review Zoological Sciences* 5: 217-265.

Nakamura, K. 1988. Control Site of Ovarian Development in the Optic Ganglion of the Prawn *Penaeus japonicus*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 37: 141-145.

Nordmann, J.J. 1977. Ultrastructural appearance of neurosecretory granules in the sinus gland of the crab after different fixation procedures. *Cell Tissue Research*. 185: 557-63.

Nordmann, J.J and Morris, J.F. 1980. Depletion of neurosecretory granules and membrane retrieval in the sinus gland of the crab. *Cell Tissue Research*. 205: 31-42.

Nusbaum, Th and Dirksen H. 1995. Neuronal pathways of classical crustacean neurohormones in the central nervous system of the woodlouse, *Oniscus asellus* (L). Phil Trans R. Soc Lond. B. 347: 139-154.

Pérez-Farfante, I. 1969. Western Atlantic Shrimps of the Genus *Penaeus*. Fishery Bulletin Vol 67 No. 3, Washington, D C, USA:

Reynolds, E S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol 17: 208-212.

Santander, G R. 1969. Técnicas de Microscopía Electrónica en Biología. Editorial Aguilar, España.

Smith, G. 1974. The ultrastructure of the sinus gland of *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). Cell Tissue Res, 155: 117-25.

Spurr, A R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.

Tensen, C.P., de Kleijn, D.P.V. and Van Herp, F., 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycaemic hormones from the lobster, *Homarus americanus*. Eur. J. Biochem., 200: 103-106.

Van Herp F, Bellon-Humbert Ch, Luub M. J and Van Wormhoudt, A. 1977. A histophysiological study of the eyestalk of *Palaemon serratus* (Pennant) with special reference to the impact of light and darkness. Arch Biol (Bruxelles) 88: 257-278.

LEYENDA:

cgl - células globulares

g - gránulos

lc - lumen central

LG - lámina ganglionar

m - membrana

mb - membrana basal

ME - médula externa

MI - médula interna

mi - mitocondrias

MTGX - complejo órgano X-médula terminal

MT - médula terminal

n - núcleos

ncg - núcleo célula gigante

ng - neurona gigante

nl - nucleolo

NO - nervio óptico

nt - neurotúbulo

O - aparato óptico

T - terminación nerviosa

tc - tejido nervioso

s - sinapsis

SG - glándula sinusal

sn - somas neuronales

v - vesículas

vc - vesículas claras

7

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL *DOCTOR. GERARDO
HEBERT VÁZQUEZ-NIN.*