

00381

13



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**CÁMBIOS CICLICOS EN SEROTONINA Y CHH EN  
EL TALLO OCULAR DEL ACOCIL *Procambarus  
clarkii* EN DIFERENTES ESTADOS DEL  
DESARROLLO**

29/7/86

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**

P R E S E N T A  
**ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL**

DIRECTOR(A) DE TESIS: DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA

Zool



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.



REPUBLICA NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/0102/00

**DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA**  
Presente.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) **M. EN C. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL**, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: "CAMBIOS CICLICOS EN SEROTONINA Y CHH EN EL TALLO OCULAR DEL ACOCIL *Procambarus clarkii* EN DIFERENTES ESTADOS DEL DESARROLLO".

Asimismo comunico a los siguientes miembros que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de Doctor(a) en Ciencias (Biología).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA	MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES
PRIMER VOCAL	DRA	MARÍA LUISA FANJUL PEÑA
SEGUNDO VOCAL	DR	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
TERCER VOCAL	DR	LEÓN FEDERICO CINTRA MCGLONE
SECRETARIO	DRA	MARCIA HIRIART URDANIVIA
SUPLENTE	DRA	ROCÍO SALCEDA SACANELLES
SUPLENTE	DRA.	MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd Universitaria, D F , a 23 de enero de 2001

JEFE DE LA DIVISIÓN

  
DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA



MCOIASR/cigs

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles y fue financiado por los proyectos: PAPIIT No. IN209397, CONACYT No. PM31858-N, PAEP No. 101307; además de las becas otorgadas por CONACYT No. de Registro 124648 y complementaria de DGEP. Parte de la técnica de RHPA se llevó a cabo en el Laboratorio coordinado por la Dra. Marcia Hiriart en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*A LA MEMORIA DE MI MAMÁ ELSA*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se llevó a cabo gracias al apoyo de muchas personas a las que quiero agradecer.

En primer lugar a mi familia. Mis abuelitos: Alberto, Refugio y Stella\*. Mis tíos: Carmen, Carlos, Irma, Jesús, Ignacio, Isabel, Maximino, Ricardo, Guadalupe, Laura\*, Julia, Georgina\*, Mary Carmen y Magdalena\*. Mi hermano J. Alberto\*. Mi Papá. Mis primos: Migue, Ernesto, Ricky, Hilda, Erandi, Stella y Zahzil. Porque me inculcaron valores, me enseñaron a fijarme metas y llegar a ellas, por el apoyo que toda la vida me han dado y sobre todo porque me dieron un hogar lleno de cariño.

A la Dra. María Luisa Fanjul\*. Por todo el apoyo incondicional que me ha brindado, por sus enseñanzas de honestidad, tenacidad y entrega a la ciencia, porque siempre tiene palabras de aliento en los momentos difíciles, por su amistad y cariño, por ser un ejemplo a seguir y por la oportunidad que me brinda al permitirme seguir formando parte del laboratorio.

A la Dra. Marcia Hiriart\* y a todos los integrantes de su laboratorio\*, en especial a Carmen Sánchez\* y a Román Vidal-Tamayo\*, por abrirme las puertas de su laboratorio, por enseñarme las técnicas necesarias para poder realizar parte de esta tesis, por su paciencia y amistad.

A las doctoras y doctores, miembros del comité tutorial y del sínodo: Ma. Luisa Fanjul, Marcia Hiriart, Luis Felipe Jiménez, Marcela Aguilar, León Cintra, Rocío Salceda y Genoveva González. Por sus aportaciones y críticas al presente trabajo, contribuyendo de esta manera a mi formación académica. También a los doctores que fueron sinodales en el examen general de conocimientos.

Al Dr. Francois Van-Herp, al Ing. Alberto Moles\*, al Dr. Francisco Fernández de Miguel, al M. en C. Viktor J. Romero-Díaz, y al Ing. M. Alberto González, por haber contribuido de una u otra manera en la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio: Julio Prieto\* por la invaluable ayuda que en todo momento me brindó, Mary Durán\*, Abud Farca, Manuel Miranda, Beatriz García, Mario Morales, Octavio Riquelme y en su momento Carolina García, Oscar Castañón, Sonia Ruiz y Dra. Alicia Otazo. Por su apoyo incondicional que siempre me han brindado, por su amistad, cariño y compañía.

A todos mis familiares y amigos que no nombré. Por estar conmigo en las alegrías y en las tristezas.

\*A todos ellos, por la valiosa ayuda y apoyo durante los meses difíciles de Paro en la Universidad.

Al CONACYT y DGEP por las becas otorgadas y a los proyectos de PAPIIT, CONACYT y PAEP por el soporte financiero de la investigación y/o tesis.

Al director de la Facultad de Ciencias, el Dr. Fernando Magaña, por el apoyo que me ha brindado para seguir perteneciendo al personal de la facultad.

Finalmente, pero no menos importante a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas del conocimiento, por acogerme en sus aulas y laboratorios, por permitirme llegar a esta meta, por darme la oportunidad de ser alumna y profesora. Esperando que regresen a ti la paz, el respeto y el prestigio que te mereces y que se exterminen las plagas sociales que tanto daño te han hecho para que sigas siendo la máxima casa de estudios, nuestra *alma mater*.

# ÍNDICE.

1. RESUMEN.....	1
1.2. Abstract.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Generalidades del Acocil.....	3
2.2. Etapas del Desarrollo Postembrionario.....	3
2.2.1. Etapa Postembrionaria 2.....	5
2.2.2. Etapa Juvenil.....	5
2.2.3. Etapa Adulta.....	6
2.3. Sistema Neuroendocrino de los Decápodos.....	6
2.3.1. Sistema Nervioso.....	6
2.3.2. Tallo Ocular.....	7
2.3.2.1. Retina.....	7
2.3.2.2. Pedúnculo Ocular.....	11
2.3.3. Glándulas Endocrinas.....	14
2.3.4. Serotonina.....	15
2.3.5. Hormona Hiperglicemiante de Crustáceos.....	19
2.4. Ritmos Biológicos.....	22
2.4.1. Ritmos Circadianos.....	24
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	28
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	31
6. MÉTODO.....	32
6.1. Animales.....	32
6.2. Histología.....	32
6.2.1. Técnica de Inmunohistoquímica.....	33
6.2.2. Técnica de Inmunofluorescencia.....	34
6.2.3. Morfometría y Digitalización de Imágenes.....	35
6.2.4. Microscopía Confocal.....	37
6.2.5. Análisis Estadísticos.....	37
6.3. Ensayo Hemolítico Inverso (RHPA).....	37
6.3.1. Medios de Cultivo.....	38
6.3.2. Disección de Tallos Oculares.....	38
6.3.3. Dispersión de Células.....	39
6.3.4. Marcaje de Eritrocitos.....	40
6.3.5. RHPA.....	40
6.3.6. Inmunocitoquímica.....	43

6.3.7. Análisis de Datos.....	43
6.3.8. Análisis Estadístico.....	44
7. RESULTADOS.....	45
7.1. Inmunohistoquímica.....	45
7.2. Inmunofluorescencia.....	45
7.2.1. Etapa PO2.....	47
7.2.2. Etapa Juvenil.....	49
7.3. RHPA en la Etapa Juvenil.....	52
7.3.1. Retina.....	52
7.3.2. Pedúnculo Ocular.....	56
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	67
10. LITERATURA CITADA.....	68
11. APÉNDICE. Publicación en revista internacional arbitrada.....	80

## 1. RESUMEN.

En el presente trabajo se investigaron cambios en la inmunorreactividad a la serotonina (5-HT) y a la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH) a tres horas del día, en la retina y complejo órgano-X-glándula sinusal (OX-GS) en dos estadios postembrionarios del acocil *Procambarus clarkii*, la etapa postembrionaria 2 (PO2) y el estadio juvenil.

Para lo anterior, cortes histológicos de tallo ocular se procesaron mediante técnicas de inmunohistoquímica y doble marcaje de inmunofluorescencia, analizando estereológicamente los cambios en la cantidad de 5-HT y CHH a las tres horas del nictémero. Los resultados se analizaron con un ANOVA seguida de una prueba *post hoc* de Scheffé.

Los resultados obtenidos mostraron que tanto en el estadio PO2 como en el juvenil, la Fracción de Volumen de la inmunorreactividad a la 5-HT y a la CHH presentan diferencias significativas entre las diferentes horas de muestreo, lo cual puede indicar ritmos diarios en la actividad secretora. Por otro lado, se encontraron coincidencias en la positividad a la 5-HT y a la CHH en estructura y hora de muestreo, lo cual puede deberse a que la 5-HT influye en la secreción de la CHH.

Con el objeto de investigar lo anterior, mediante la técnica del ensayo hemolítico inverso se determinaron tanto la secreción de CHH como su posible modulación por 5-HT. Los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas similares a las antes mencionadas.

Los resultados mostraron que tanto en la retina como en el complejo OX-GS, hay células secretoras de CHH. Esta secreción es modulada por la 5-HT en ambos casos.

## 1.2 ABSTRACT.

To investigate possible relation between crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and serotonin (5-HT) during the development of crayfish, in the present thesis two studies by performing to different techniques were undertaken. A first study investigated changes in CHH and 5-HT immunoreactivity in the retina and the X-organ sinus gland complex (XO-SG) of *Procambarus clarkii* at two developmental stages, the second postembryonical stage (PO2) and the juvenile stage, at three different times of day of a photoperiodic cycle of LD 12:12 h, using qualitative and quantitative immunohistochemical. In the retina, CHH immunoreactivity was located in the tapetal cells while 5-HT immunostaining was founded in the reticular cells. In the XO-SG, CHH immunopositive reactions were visualized in the CHH-cells. The stereological analysis demonstrated that PO2 and juvenile stages showed significant differences in the amount of the immunoreactive CHH and 5-HT material at the three selected time points, indicating daily and related changes between both regulating factors at the level of the XO-SG and the retina. Based in those findings in a second study, we approached the possible CHH-5-HT relation by performing a reverse hemolytic plaque assay (RHPA) to investigate in juvenile and adult crayfish 1) whether isolated cells of retina and XO-SG secrete CHH and 2) whether 5-HT modify CHH secretion. The results demonstrated that in both structures of the two developmental stages of crayfish, two different populations of cells released CHH depending on 5-HT in a dose-response manner.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. GENERALIDADES DEL ACOCIL.

El acocil o cangrejo de río es un animal perteneciente al phylum Artropoda, clase Crustacea, subclase Malacostraca y al orden Decapoda. En México existen diferentes especies de acocil, una de ellas es *Procambarus clarkii*, la cual es una especie introducida, adaptada para habitar en sistemas lénticos, los cuales se caracterizan por tener verano seco y lluvias periódicas abundantes. Esta especie posee una enorme capacidad de adaptación, tanto metabólica como conductual (Hogger, 1988). Este animal tiene un desarrollo directo, esto quiere decir que el desarrollo larval se manifiesta en la etapa embrionaria, aunque postembrionariamente todavía presenta cambios morfológicos. El crecimiento del acocil se da mediante un proceso de muda; después de once mudas alcanza la etapa de madurez sexual, 12 meses después de la eclosión (Sukô, 1954). Este acocil presenta cuatro etapas del desarrollo postembrionario, la etapa postembrionaria 1 (PO1), la etapa postembrionaria 2 (PO2), el juvenil y el adulto.

### 2.2. ETAPAS DEL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO.

Después de la primera eclosión el acocil se despoja de la membrana embrionaria y entra en la etapa postembrionaria 1 (PO1). Esta etapa se caracteriza por la gran cantidad de vitelo que tienen en el cefalotorax (Fig. 1A), ni el telson ni los urópodos se encuentran bien desarrollados (Sandeman y Sandeman, 1990), presentan ojos sésiles y las estructuras que forman la retina todavía no están bien diferenciadas (Hafner et al., 1982; Escamilla-Chimal et al., 1998; Fanjul-Moles, 1998), los acociles permanecen adheridos a los pleópodos de la madre y son de hábitos diurnos. Este animal muda de ocho a diez días

A



B

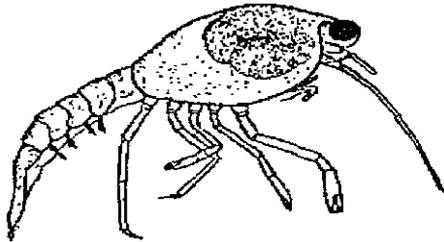


Figura 1.- Etapas del desarrollo postembrionario. A) estadio PO1 y B) estadio PO2. (Tomado de Andrews, 1922).

después de la eclosión para pasar a la siguiente etapa del desarrollo.

### 2.2.1. ETAPA POSTEMBRIONARIA 2.

Después de esta primera muda los animales entran en la etapa postembrionaria 2 (PO2), en esta etapa que comprende de 10 a 28 días de edad después de la eclosión, el animal empieza a reptar en el sustrato, desprendiéndose y prendiéndose de la madre. Los organismos PO2 presentan menos cantidad de vitelo en el cefalotorax, por lo que se ven más delgados que en la etapa anterior. Los animales ya se pueden mover libremente, pero no son muy activos y al final de este estadio la cantidad de vitelo es menor (Sandeman y Sandeman, 1990) (Fig. 1B). Sus ojos son pedunculados y únicamente el 50% de los fotorreceptores poseen pigmento, en esta etapa los animales son muy parecidos al adulto (Hafner *et al.*, 1982). Posteriormente el animal muda para pasar al estadio juvenil.

### 2.2.2. ETAPA JUVENIL.

El animal juvenil, por su morfología externa, parece un adulto muy pequeño, el cual no se prende de la madre, su color es café verdoso, es muy activo y se alimenta de vegetales verdes, moluscos, larvas de insectos acuáticos, detritos y/o de posibles restos de vitelo (los que aún lo conservan) y puede presentar canibalismo (Goddard 1988). El acocil adquiere hábitos nocturnos en esta etapa del desarrollo; este juvenil tardará aproximadamente un año en alcanzar la etapa adulta (Sukô, 1954; Castañón-Cervantes *et al.*, 1995). En esta etapa el acocil presenta todas las características del animal adulto, aunque es mas pequeño y todavía no se puede reproducir. Por todo lo anterior este estadio es de crucial importancia en muchos de los cambios, tanto morfológicos como fisiológicos, que ocurren durante el desarrollo.

### 2.2.3. ETAPA ADULTA.

El animal adulto es muy similar al juvenil pero su tamaño es de al menos 55 mm de longitud, su exoesqueleto es de color rojo o café rojizo, en esta etapa que el acocil ya está maduro es cuando se pueden distinguir los caracteres sexuales secundarios, en los machos estos son la aparición del primero y segundo par de pleópodos modificados en un órgano copulatorio llamado petasma, las quelas son de forma rectangular y presentan una espícula en el tercer par de pereiópodos (Sukô, 1953). En el caso de las hembras presentan un desarrollado receptáculo seminal llamado *annulus ventralis* el cual se localiza en la base de los pleópodos y una hilera de papilas translúcidas simétricamente distribuidas a lo largo del telson, estas espinas o papilas son estructuras glandulares que facilitan la adhesión firme de las crías a su madre (Andrews, 1907).

## 2.3. SISTEMA NEUROENDOCRINO DE LOS DECÁPODOS.

### 2.3.1. SISTEMA NERVIOSO.

El acocil adulto como todos los crustáceos, presenta un sistema nervioso central de tipo ganglionar el cual está formado por dos cordones nerviosos ventrales que unen a varios ganglios en forma de escalera; un ganglio cerebroide (ganglio supraesofágico), un ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y cinco ganglios abdominales; de cada ganglio salen los nervios que inervan los diferentes apéndices. El ganglio cerebroide es considerado como una serie de ganglios fusionados (Maynard, 1965), se divide en tres regiones: a) protocerebro, que inerva la región óptica, b) deutocerebro, que inerva las anténulas, y c) tritocerebro, que inerva las antenas y el intestino.

### 2.3.2. TALLO OCULAR.

Los acociles adultos poseen ojos de tipo compuesto, pedunculados, localizados en posición anterodorsal del cuerpo y separados de él por el *rostrum*. A partir de la etapa PO2 la superficie de cada ojo está cubierta por una córnea con pequeños cromatóforos (Hafner *et al.*, 1982), en el adulto esta córnea es de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de ancho, forma el límite óptico entre el medio ambiente líquido o gaseoso y el medio acuoso, es secretada por pequeñas células comeágenas (dos por omatidia) que se encuentran inmediatamente por debajo de la córnea. Posterior a ésta se localiza la retina y debajo de ésta se encuentra el pedúnculo ocular (Fig. 2).

#### 2.3.2.1. RETINA.

La retina (Fig. 2A) está formada por 2500 omatidias (Fig. 2B), estas son las unidades básicas de la fotorrecepción. La omatidia es un elemento óptico individual en el que las estructuras fotorreceptoras especializadas en la absorción y transducción de la luz se encuentran en el centro (Shaw y Stowe, 1982). Cada omatidia constituye una subunidad constituida por la comea, el cono cristalino, 8 células retinulares y sus axones, los rabadomos, 4 células tapetales y la membrana basal, aunque en cada omatidia también existen células pigmentarias, las del pigmento distal y las del pigmento proximal. Las omatidias cambian conforme avanza el desarrollo postembrionario, en el estadio juvenil estas estructuras son más elongadas y tanto el cono cristalino como los rabadomos son más alargados que en el estadio PO2.

El cono cristalino es la estructura óptica que hace converger la luz hacia las células fotorreceptoras, está compuesto por porciones de varias células cuyas partes centrales son transparentes; cuatro células para cada omatidia. La luz incidente, después de pasar a través de la córnea, pasa por el cono cristalino y

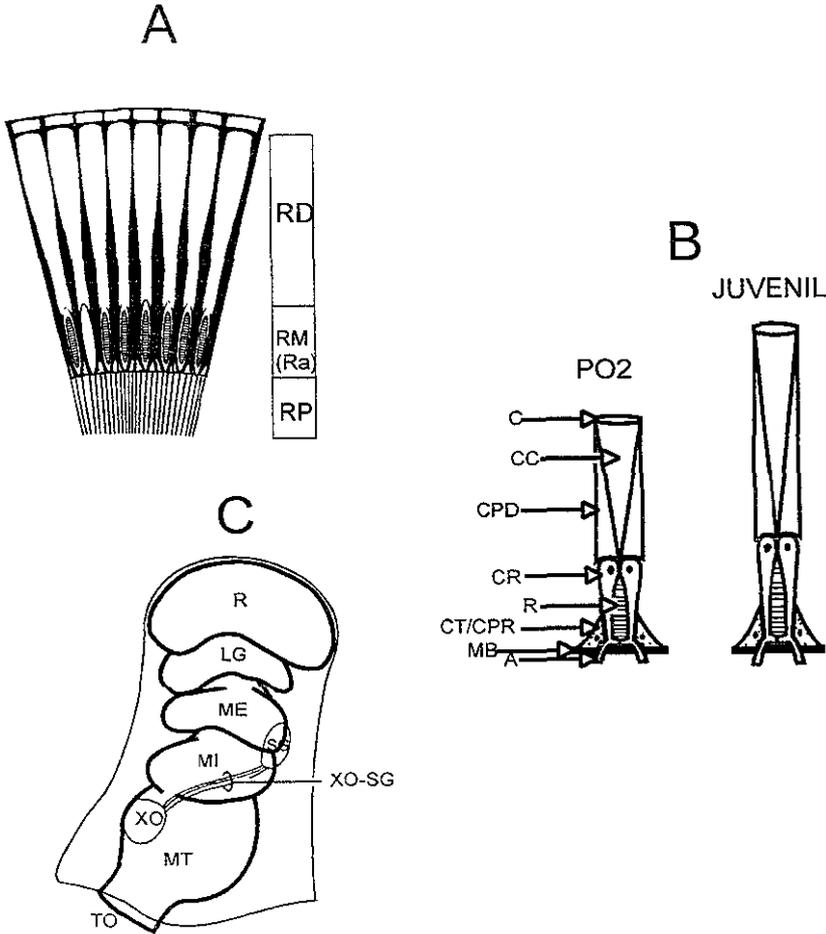


Figura 2.- Esquemas de: A) Representación esquemática de un grupo de ommatidias y axones de las células retinulares. RD región distal ( parte distal de los rabdómos, células del cono cristalino y raíz del cono), RM región medial (células tapetales y rabdómos), RP región proximal (membrana basal y axones de las células retinulares). B) Comparación de la ommatidia típica del acocil en la etapa PO2 y juvenil. El sistema dióptrico se encuentra más elongado y aumenta el tamaño de los rabdómos en la etapa juvenil. C: córnea, CC: cono cristalino, CPD: células del pigmento distal, CR: células retinulares, R: rabdómo, CT: células del tapetum, CPR: células del pigmento reflector, MB: membrana basal, A: axones de las células retinulares. C) Tallo ocular del acocil juvenil. R: retina, LG: lámina ganglionaris, ME: médula externa, MI: médula interna, MT: médula terminalis, SG: glándula sinusal, XO-SG: tracto órgano-X-glándula sinusal, XO: órgano-X, TO: tracto óptico

posteriormente es absorbida por el rabdomo principal.

El rabdomo principal está constituido por las microvellosidades de 7 rabdómeros individuales de las células retinulares R1 a R7, estos rabdómeros están formados por millares de invaginaciones llamadas microvilli o microvellosidades, en las células retinulares R1, R2, R5 y R6 las microvellosidades corren dorsoventralmente, con respecto al eje anteroposterior, y en las células R3, R4 y R7 se encuentran orientadas horizontalmente. Hay un número fijo de 8 células retinulares, la octava célula retinular no contribuye al rabdomo principal, sino que forma un rabdómero pequeño, que probablemente actúa como un filtro de luz, antes de que ésta llegue al rabdomo principal. El rabdomo es una estructura especializada en la captación de fotones (Nassel, 1992), que contiene un pigmento fotosensible, la rodopsina, el cual por acción de la luz se convierte a metarrodopsina.

Los axones de las células retinulares, antes mencionadas, se extienden hacia la membrana basal, entre ellos se encuentran senos venosos.

En cada omatidia se encuentran células pigmentarias que contienen los pigmentos de blindaje, estos son pigmentos oscuros que en los crustáceos, al parecer están formados por omocromos, como la melanina y las pterinas (Ghidalia, 1985). Entre estos pigmentos se encuentran: el pigmento distal, el proximal y un pigmento reflector. Cuando los animales están expuestos a la luz, los pigmentos se dispersan a lo largo de la omatidia blindando la entrada de luz, y cuando el animal se encuentra en obscuridad se agregan permitiendo su entrada. La redistribución de los pigmentos blindantes ayuda a controlar la apertura del campo de visión de la omatidia.

El pigmento distal se localiza en las células pigmentarias distales, también llamadas células del pigmento primario, células oscuras o células pigmentarias absorbentes, éstas se encuentran rodeando al cono cristalino y se extienden

desde la córnea hasta la membrana basal (Rao, 1985). Cuando los ojos están adaptados a la luz, el pigmento se encuentra disperso cubriendo el cono cristalino y en la oscuridad se encuentra agregado hacia la córnea. El movimiento de este pigmento en condiciones de luz es regulado por la hormona dispersora del pigmento distal y en la acumulación en adaptación a la oscuridad es regulado por la hormona concentradora de eritróforos (Aréchiga et al., 1993).

El pigmento proximal se encuentra en el citoplasma de las células retinulares R1 a R7, cuando el ojo se encuentra adaptado a la luz el pigmento rodea al rabdomo y cuando está adaptado a la oscuridad se presenta en los axones de las células retinulares, por debajo de la membrana basal. Este pigmento migra como una respuesta directa a la luz (Rao, 1985).

El pigmento reflector de luz se encuentra en las células tapetales. En el acocil, el pigmento reflejante parece ser inmóvil, puesto que aparentemente no se desplaza (Page y Larimer, 1975).

Las células tapetales son también llamadas células del pigmento secundario o células del pigmento reflector, las cuales se localizan rodeando a las omatidias (Rao, 1985), estas células se diferencian a partir de la etapa PO2 (Hafner et al., 1982; Escamilla-Chimal et al., 1998). Hasta hace relativamente poco tiempo no se sabía cual era la función de estas células en la retina, recientemente Meyer-Rochow (1999) aportó evidencias de que la reflexión de la luz parece ser solo una de las funciones de las células tapetales, otra función es de naturaleza metabólica que está relacionada con las células retinulares y pigmentarias.

La membrana basal, en los crustáceos, fue un término adoptado sin ningún análisis claro de sus componentes para designar a una lamela claramente visible que delinea la parte omatidial del resto del pedúnculo ocular. Esta no es una estructura aislada, está formada por una porción celular y una extracelular. La composición de la parte celular varía, puede incluir terminales dilatadas (pies) de

células pigmentarias o también pueden formar parte de ésta las células gliales (que pueden ser idénticas a las células basales). Odselius y Elofsson (1981) proponen que cualquier célula que forme parte de las omatidias puede contribuir a la formación de la membrana basal. La porción extracelular está formada por la base de los rbdomos y la lámina basal.

La lámina basal está constituida por matriz extracelular, la cual es una capa delgada y fibrilar, está formada por muchas proteínas que mantienen unidas a las células, regulan su desarrollo y determinan su crecimiento, entre estas proteínas se encuentran el colágeno tipo IV, las lamininas, las fibronectinas y los proteoglicanos. El término lámina basal se usó en muchas investigaciones realizadas en crustáceos, como sinónimo de membrana basal, aunque esta es más compleja (Odselius y Elofsson, 1981).

Una razón obvia de que exista la membrana basal es que les da polaridad a las células y es el soporte mecánico que estabiliza a las omatidias. Se ha propuesto que la función de la porción celular puede ser nutrir a las células del cono y a las retinulares o bien regular la actividad hormonal relacionada con el movimiento de los pigmentos en las células del pigmento distal. La membrana basal no constituye una barrera a la hemolinfa (Elofsson y Odselius, 1975). Por debajo de la membrana basal se encuentra un área altamente vascularizada, que puede estar relacionada con el control neurohumoral de la actividad de los pigmentos blindantes de la retina que actúan como una pseudopupila (Shivers, 1967).

#### 2.3.2.2. PEDÚNCULO OCULAR.

Por debajo de la retina se encuentra un espacio vascular, al que le sigue un neurópilo no muy bien definido, la lámina ganglionaris, por debajo de ésta se encuentran tres neurópilos bien definidos: la médula externa, la médula interna y

la médula terminalis (Maynard, 1962) (Fig. 2C).

En el adulto la lámina ganglionaris y las médulas están constituidas por una región central, el neurópilo, formada por fibras nerviosas, glía, senos venosos, células sanguíneas y algunas neuronas, y una región periférica formada por células nerviosas con diferentes características. Shivers (1967) clasificó a las neuronas en dos: 1) las neurosecretoras de tipo 1 que presentan gránulos de 1000-1700 Å de diámetro, son de gran tamaño, presentan núcleo prominente y se localizan principalmente en el OX; y 2) las neurosecretoras de tipo 2 que contienen gránulos de 1500-2100 Å, el cuerpo celular es grande, el citoplasma se encuentra lleno de material heterogeneo denso y se localizan en la región de la médula terminalis.

Entre la médula externa y la interna se encuentra un quiasma, el externo, y entre la médula interna y la terminalis se localiza el quiasma interno; ambos quiasmas están constituidos por fibras nerviosas, ascendentes y descendentes, las que provienen de neuronas que se encuentran en diferentes partes del lóbulo óptico, al parecer los quiasmas se formaron por el giro de los neurópilos que conforman las médulas durante la etapa embrionaria (Elofsson y Dahl, 1970). Entre la médula externa y la interna, hacia la región lateral externa, se encuentra la glándula sinusal (GS). Hacia la región frontal lateral interna de la médula terminalis está el órgano-X (OX), las fibras de las neuronas del OX forman el tracto que termina en un seno venoso formando la GS. Finalmente, de la médula terminalis sale el tracto óptico, o también llamado nervio óptico, que llega a la región protocerebral del ganglio cerebroide, (Sandeman, 1982).

En posición anterior y hacia un costado de la médula terminalis, se encuentra un neurópilo glomerular llamado cuerpo hemielipsoidal.

El órgano-X es particularmente interesante pues está formado por células ganglionares neurosecretoras que presentan un núcleo de 12 a 16 µm, y poco

citoplasma. Es aquí en donde se secretan algunas hormonas que se almacenan en la GS, como la hormona inhibidora de la muda (HIM), la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH), la hormona dispersora del pigmento rojo (RPDH) (Rudolph y Spaziani, 1990), la hormona dispersora y concentradora del pigmento distal, la hormona inhibidora de la muda (MIH), etc.

Shivers (1967) describió dos tipos de neuronas presentes en el OX, sin embargo en el microscopio óptico no se pueden distinguir fácilmente una de la otra. Un tipo de neuronas al parecer están relacionadas con el desarrollo, son las que secretan una neurohormona, la cual se transporta por flujo axónico y se libera al sistema vascular. El otro tipo de neuronas son las que sintetizan un producto que pasa a lo largo de los axones hacia el botón sináptico donde se libera como un transmisor, también llamado neurohumor. Las neuronas liberadoras de neurotransmisores, se piensa que están involucradas en la actividad de los cromatóforos y en el movimiento de los pigmentos de la retina. Kleinholz y Keller (1973) proponen que el complejo órgano-X-glándula sinusal (OX-GS) es análogo a la hipófisis anterior de los vertebrados por la diversidad de efectos fisiológicos que tienen, constituyendo una convergencia evolutiva.

La glándula sinusal, fue la primer estructura en los crustáceos que mostró tener un papel endocrino, es una estructura neurohemal muy vascularizada formada por proyecciones axónicas (neuritas) de las médulas externa, interna, el quiasma interno y del órgano-X- médula terminal (MTOX). Se estima que las terminales axónicas provenientes del OX forman el 90% del total de la GS (Cooke y Sullivan, 1982), y el 10% restante está formado por terminales axónicas provenientes de las estructuras del tallo ocular antes mencionadas. El OX y la GS, son el lugar de síntesis, de almacenamiento y de liberación, de las neurohormonas responsables de la regulación del metabolismo y las diferentes funciones que permiten la adaptación ambiental; como la regulación de azúcar en

la hemolinfa, la adaptación a la luz, la muda, etc. (Rudolph y Spaziani, 1990). Esta estructura se ha propuesto como una región fundamental para la regulación de la posición de los pigmentos retinianos y tegumentarios, así como de hormonas que intervienen en el ritmo de sensibilidad a la luz y el ritmo motor, participa en la regulación de los eritróforos (Aréchiga *et al.*, 1993) y tal vez en la manifestación de los ritmos circadianos (Cooke y Sullivan, 1982).

### 2.3.3. GLÁNDULAS ENDOCRINAS.

Además del complejo OX-GS existen otras glándulas encargadas de la secreción de diversas hormonas de importancia para la fisiología de los crustáceos, estas se mencionan y describen a continuación.

- Órganos postcomisurales.- Son un par de estructuras neurohemales, asociadas con la comisura tritocerebral, que al igual que el complejo OX-GS, están formadas por terminales axónicas que almacenan y liberan neurohormonas, tales como las encargadas del cambio de color del animales (Knowles, 1953; Fingerman, 1966).

- Órganos pericárdicos.- Son órganos neurohemales, se sitúan en el seno venoso, como la cavidad pericárdica que rodea al corazón, estos órganos consisten de fibras, plexos y terminales nerviosas, las cuales liberan hormonas que tienen actividad cardioexcitatoria. Extractos de estos tejidos incrementan la frecuencia del batido del escafognatito, ayudando a la ventilación (Kleinholz, 1985).

- Organo-Y.- Es una glándula pareada situada en el segmento maxilar de la cabeza (Fingerman, 1997), secreta la hormona inhibidora de la muda (MIH) (Skinner, 1985).

- Glándula androgénica.- Es una glándula accesoria, está unida a la región

subterminal eyaculatoria del conducto deferente, es la encargada de la diferenciación y maduración del sistema reproductor masculino y los caracteres sexuales secundarios (Cronin, 1947).

- Ovarios.- Producen la hormona ovárica que induce el desarrollo de las características sexuales secundarias (Fingerman, 1997), la hormona vitelogénica, la hormona de la madurez gonadal, etc.

- Órganos mandibulares.- Se localizan cercanos al músculo abductor mandibular posterior, fueron descritos por primera vez por Roux en 1968 (citado en Fingerman, 1997), su función aun es incierta.

#### 2.3.4. SEROTONINA.

La serotonina (5-HT) es una monoamina que pertenece a un grupo de compuestos aromáticos llamados indoles, con un anillo de 5 miembros que contienen nitrógeno unido a un anillo benzeno. Esta monoamina se forma a partir del aminoácido triptofano, y por medio de la enzima triptofano hidroxilasa, que pone un grupo hidroxilo en la posición 5 del grupo indol del aminoácido triptofano, se convierte en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). El 5-HTP es descarboxilado por la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa, para formar la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina (Nicholls *et al.*, 1992) (fig. 3). La enzima triptofano hidroxilasa es la enzima limitante en la síntesis de 5-HT (Schwartz, 1985; McGeer *et al.*, 1987; Cooper *et al.*, 1996). Es poco lo que se conoce referente a los mecanismos de acción de la 5-HT en las neuronas de los crustáceos y en particular del acocil, con excepción de unos pocos estudios en los que se ha mostrado que la 5-HT trabaja a través de los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y AMP cíclico (AMPc), también se sabe que incrementa el número de vesículas que son liberadas lo cual se da a una velocidad relativamente rápida, en otras palabras

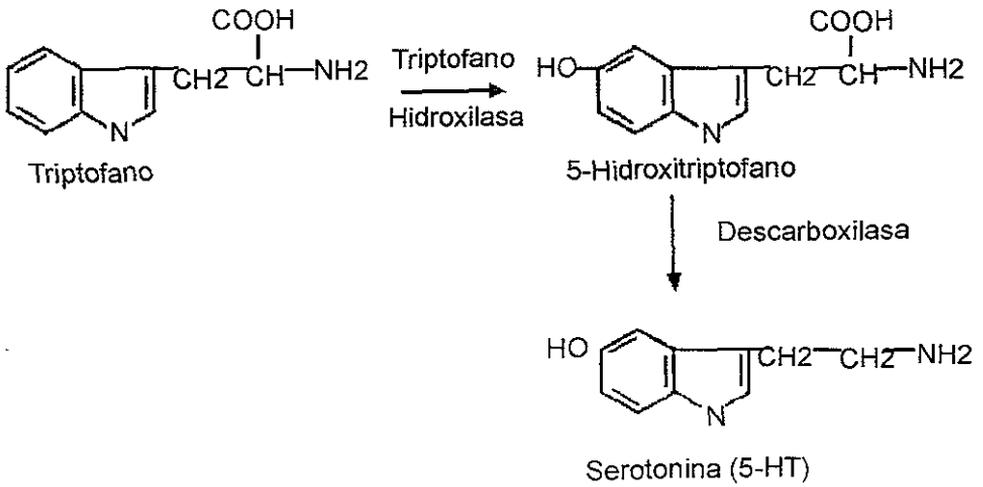


Figura 3.- Síntesis de la serotonina.

aumenta la eficiencia sináptica (Southard et al., 2000).

En los invertebrados, las aminas funcionan tanto como neurotransmisores, y neuromoduladores como neurohormonas. La 5-HT se ha propuesto como un modulador circadiano de los sistemas visuales de los invertebrados (Nadakavukaren et al., 1986), así mismo regula funciones motoras, y es un modulador de la función sensorial y de la actividad interneuronal en los anélidos, artrópodos y moluscos al igual que en los vertebrados (Walker y Holden-Dye, 1989).

En *Aplysia*, la 5-HT facilita el reflejo de retracción branquial y los reflejos alimenticios, también participa en los procesos visuales cambiando la fase del ritmo circadiano de actividad eléctrica del nervio óptico en el ojo aislado (Eskin et al., 1982), e incrementa la sensibilidad visual en *Limulus* (Barlow et al., 1977). En los ofiuridos, promueve el aumento del nado de las larvas y la concentración de ésta aumenta conforme avanza el desarrollo embrionario y larval, presentando mayor concentración de 5-HT en el momento de la eclosión. En la langosta, modula la programación motora y central para la flexión mediando así la postura extensora (de defensa) y la flexora (de agresión) (Beltz y Kravitz, 1987).

Goldberg y colaboradores (1986; 1989) demostraron que la 5-HT está presente en el sistema nervioso de embriones del molusco *Helisoma* y puede actuar como un regulador del desarrollo. Estos autores encontraron que hay un aumento en la expresión a 5-HT en diferentes neuronas en las etapas postembrionarias.

En los crustáceos se han encontrado neuronas serotoninérgicas en varios ganglios del sistema nervioso central, los pedúnculos oculares y hemolinfa del acocil y de la langosta (Sandeman et al., 1988; Beltz y Kravitz, 1983) durante todas las etapas del desarrollo. El encontrar inmunoreactividad a 5-HT desde etapas tempranas del desarrollo y que permanezca hasta la etapa adulta podría

deberse a que esta monoamina ejerce una acción neuromoduladora sobre varios sistemas neurales, además de que podría estar relacionada con la habilidad del acocil para regenerar sus apéndices (Sandeman y Sandeman, 1990). Elofsson y colaboradores (1982) encontraron 5-HT en la hemolinfa de la forma juvenil del acocil *Pacifastacus leniusculus*, esto sugiere que la 5-HT actúa como una hormona inmediatamente después de la eclosión.

Se ha reportado la presencia de 5-HT en el sistema nervioso del acocil *Cherax destructor* desde la etapa embrionaria hasta el adulto. En este acocil la 5-HT incrementa la frecuencia de los potenciales de acción en las terminales motoras y parece que afecta la actividad de las motoneuronas en los ganglios centrales, y la transmisión neuromuscular periférica. (Sandeman y Sandeman, 1990).

Resultados de nuestro laboratorio corroboraron lo anterior para *Procambarus clarkii* encontrado inmunorreactividad a 5-HT en los pedúnculos oculares (Escamilla-Chimal et al., 1998; Escamilla-Chimal et al., 2001) y en el ganglio cerebroide (Castañón-Cervantes et al., 1998), desde la etapa PO1 hasta el adulto.

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* con técnicas de microscopía electrónica, en pedúnculos aislados de *Procambarus clarkii* adulto, han demostrado que existe un incremento nocturno de la 5-HT, que parece ser coincidente al aumento de la sensibilidad de los fotorreceptores visuales. Lo anterior se ha atribuido a que la 5-HT influye en la retracción del pigmento proximal en ojo aislado de acocil (Frixione y Hernández, 1989). Aréchiga y colaboradores (1990) han propuesto que la serotonina juega un papel de modulador, en la fase nocturna, del ciclo circadiano en la retina del acocil. Kulkarni y Fingerman (1992) sugirieron que existían relaciones entre 5-HT, la luz y algunas neurohormonas como la hormona dispersora del pigmento rojo y la

hormona de adaptación del pigmento distal a la luz.

La 5-HT se ha propuesto como un sincronizador o acoplador de los diferentes ritmos circadianos del sistema visual de los crustáceos. Por otra parte, estudios realizados en el pedúnculo ocular, han demostrado que la 5-HT es una neurohormona y/o neurotransmisor que modula *in vivo* la secreción y liberación de las neurohormonas producidas por el OX y liberadas por la GS (Tensen et al., 1991); tal es el caso de la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH) en los acociles *Astacus leptodactylus* (Strolenberg y Van Herp, 1977; Van Herp y Strolenberg, 1980) y *Procambarus clarkii* (Chi-Ying et al., 2000), la hormona inhibidora de la muda (MIH), y de la hormona dispersora del pigmento rojo (RPDH) (Rudolph y Spaziani, 1990). El papel de la 5-HT en la regulación de la secreción y transferencia de diferentes neurohormonas, ha sido el objeto de estudio de varias investigaciones (Kulkarni y Fingerman, 1992; Fingerman, 1997); sin embargo, el papel de la 5-HT en la secreción de CHH, se a comprobado en el OX-GS en algunas especies de acocil pero no ha sido dilucidado su papel ni en la retina ni en la especie *Procambarus clarkii* en ambas estructuras.

### 2.3.5. HORMONA HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS.

La hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH) es un péptido termolábil, que se ha caracterizado como una proteína de pequeño tamaño molecular (Kleinholz y Keller 1973), la especie *Procambarus clarkii* presenta dos isoformas de CHH, la CHH-I y la CHH-II (Yasuda, et al., 1994), esta hormona es sintetizada en el OX, se transporta por el tracto OX-GS a la GS donde es almacenada y liberada (Keller, 1992; Van Herp, 1998). La CHH es la encargada de aumentar los niveles de glucosa en hemolinfa.

En experimentos realizados por Kleinholz y colaboradores (1967) en los cuales inyectaron CHH en crustáceos de la especie *Orconectes*, observaron que

dos horas más tarde de la inyección se incrementaba la concentración de glucosa en sangre. Por otra parte se ha reportado que cambios circadianos en la secreción de CHH están relacionados con los ritmos circadianos de los niveles de glucosa sanguínea (Hamann, 1974). En el acocil *Astacus leptodactylus* la máxima concentración de glucosa en hemolinfa se presenta de dos a tres horas después de iniciar el periodo de oscuridad (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981).

Estudios de microscopía electrónica demostraron que en los acociles *Astacus leptodactylus* al inyectarse 5-HT hay un aumento en el número de vesículas en exocitosis y poco tiempo después se produce una hiperglicemia, lo anterior ocurre en la primer hora después de iniciar el periodo de oscuridad (Strolenberg, et al., 1977). La CHH se ha encontrado en las células del pedúnculo ocular, en esta misma especie mediante detección con inmunofluorescencia, se identificaron 32 células de la parte distal del complejo ganglionar MTOX que contienen CHH. La mitad de estas células muestran una baja afinidad por el anticuerpo a CHH lo que sugiere que estas células se encuentran en diferentes etapas en el proceso de secreción (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981); también se ha reportado un patrón circadiano en la inmunorreactividad de las células individuales productoras de esta hormona (Gorgels-Kallen y Voorter, 1984; Gorgels-Kallen y Meij, 1989).

Gorgels-Kallen y Voorter en 1985, reportaron que en la especie *Astacus leptodactylus*, las células responsables de la síntesis de CHH (en el OX) presentan diferentes etapas secretoras, esto lo correlacionaron con la ritmicidad de 24 h de concentración de glucosa en hemolinfa por lo que estos autores sugirieron que estas células deben ser estimuladas dos horas antes de que inicie el periodo de oscuridad. Después del apagado de la luz (inicio del periodo de oscuridad) se presenta una gran cantidad de CHH en los axones que llega a las terminales axónicas de la glándula sinusal, posteriormente hay una gran actividad

exocitótica que causa una fuerte liberación de CHH dentro de la hemolinfa, cuatro horas más tarde se produce una hiperglicemia en el animal. Este mismo proceso se repite con menos intensidad al inicio del periodo de luz.

También en el acocil *Orconectes limosus*, se encontró un ritmo en la concentración de glucosa en hemolinfa con dos niveles máximos, 1 y 3 horas después de iniciar el periodo de oscuridad. La CHH en hemolinfa llega a su máxima concentración 2 horas después de iniciar el periodo de oscuridad, estos niveles de CHH y glucosa bajan durante el día y permanecen en niveles basales (Kallen et al., 1990).

Por otra parte, se ha reportado que células productoras de CHH, contienen en sus terminales nerviosas, uniones sinápticas de 5-HT en el acocil *Astacus leptodactylus* (Van Herp y Kallen, 1991).

La hormona hiperglicemiante tiene un papel multifuncional en los crustáceos (Fingerman, 1997) ya que además de jugar un papel central en los procesos metabólicos, como el metabolizar carbohidratos, es un secretagogo de las enzimas digestivas en el hepatopáncreas (Keller y Sedlmeir, 1988; Santos y Keller, 1993), está involucrada en el control de la reproducción, la inhibición de la muda y la osmorregulación (Charmantier-Daures et al., 1994; Webster, 1998). Estos cambios han sido reportados para diferentes especies de acociles (Kallen et al., 1988).

Chang y colaboradores (1998), propusieron que la CHH puede tener diversos locus de síntesis y secreción además del complejo OX-GS, puesto que al cortar ambos tallos oculares en la langosta *Homarus americanus*, estas lograron sobrevivir alrededor de un año, con niveles basales de CHH en hemolinfa. Entre los posibles locus de síntesis y secreción de CHH están el cordón ganglionar, ya que se han encontrado genes de expresión de CHH en *H. americanus* (De Kleijn et al., 1995; Reddy et al., 1997), el ganglio cerebroide, los

ganglios torácicos y los órganos pericárdicos puesto que se encontró inmunorreactividad a CHH en en estas estructuras de *C. maenas* (Keller et al., 1985), ésto también fue corroborado mediante la técnica de ELISA.

En estudios recientes se ha reportado que la CHH es sintetizada por dos tipos de células; el complejo OX-GS produce esta hormona en un porcentaje mayor que otras neurohormonas, el proceso de síntesis desde los precursores hasta la liberación de las dos isoformas de CHH dura al rededor de 14 horas (Fig. 4) (Ollivaux y Soyez, 2000).

#### 2.4. RITMOS BIOLÓGICOS.

La mayoría de los seres vivos detectan claramente las estaciones del ciclo anual, presentando así una gran capacidad de adaptación para poder identificar los cambios en los periodos de día-noche, que están relacionados con los movimientos de rotación y traslación de la Tierra (Pitendrigh y Minis, 1964; Reinberg y Smolensky, 1993). Estos cambios son los que determinan la actividad de los organismos como la reproducción, migración, alimentación, depredación, ciclos de actividad-reposo y sueño-vigilia, la floración en el caso de las plantas, etc., los cuales se presentan rítmicamente. Los cambios cíclicos ambientales pueden sincronizar algunos de estos ritmos, entre ellos están la temperatura y la luz que es considerada como la señal más importante. Los sistemas biológicos son capaces de mantener su ritmicidad, aún en condiciones ambientales constantes, lo cual indica que los mecanismos generadores de éstos son de naturaleza endógena.

Kalmus (1935) definió a un ritmo biológico como la recurrencias de cualquier evento en un sistema biológico en intervalos mas o menos regulares (Citado en Aschoff, 1981). Ejemplos de ritmos biológicos son: la menstruación, el ciclo estral, la hibernación, la migración, la floración, la frecuencia respiratoria, la

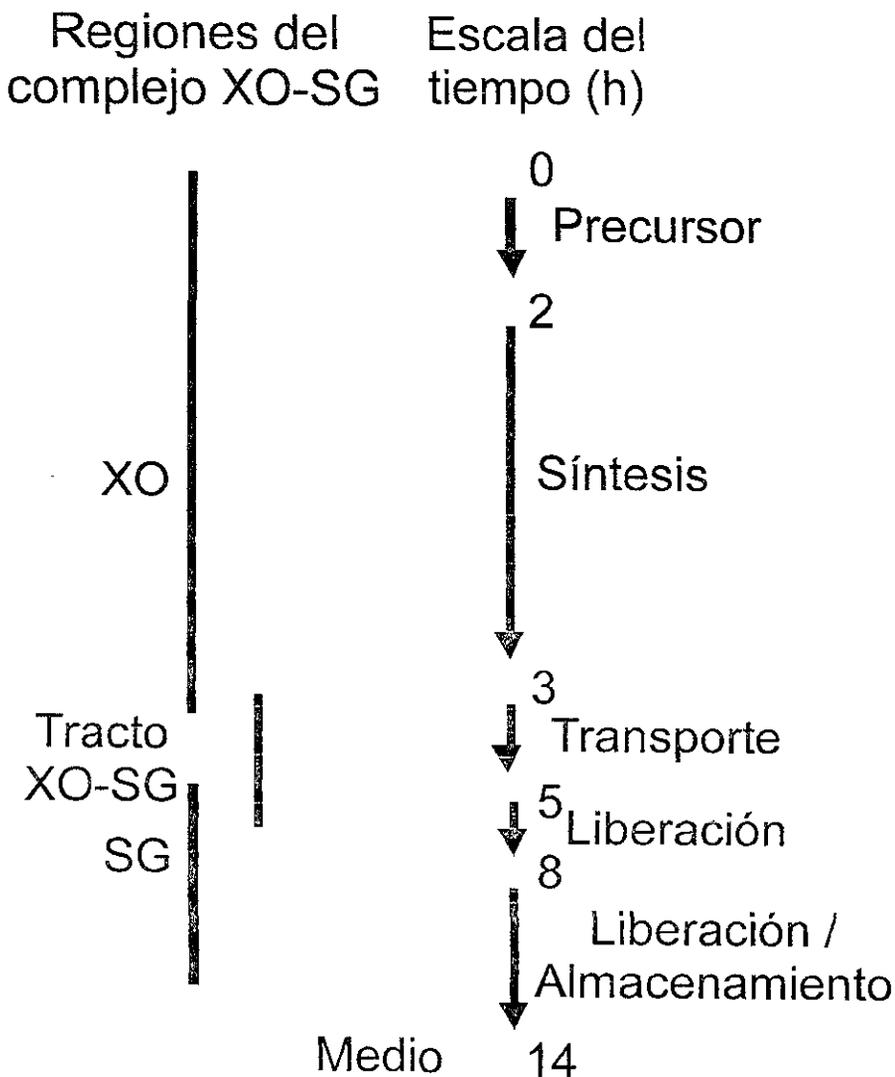


Figura 4.- Diagrama de los tiempos de liberación de la CHH en el complejo OX-GS. (Reesquemmatizado de Ollivaux y Soyey, 2000).

Los ritmos biológicos fueron clasificados por Halberg y colaboradores (1965) de acuerdo con la duración del periodo del ciclo ( $\tau$ ). Sin embargo, Enright (1981) clasificó los diferentes ritmos en función a la frecuencia con la que se presentan, es decir el inverso del periodo ( $1/\tau$ ). En base a la frecuencia, son tres los principales tipos de ritmos: ultradianos, circadianos e infradianos. Además de éstos, también existen otros ritmos, como los circa-anales, que se presentan cada año, los tidales (mareales), etc.

Los ritmos ultradianos se definen como un fenómeno que se presenta recurrentemente en periodos menores a 19 horas, por lo que se presentan con una frecuencia mayor a la de un día. Ejemplos son el movimiento rápido de los ojos (MOR) durante el sueño, la respiración, los latidos cardiacos, las ondas cerebrales, etc.

Los ritmos infradianos tienen periodos mayores a 29 horas, por lo que su frecuencia es menor a un día, como la larvificación del mosquito, el ciclo menstrual en los mamíferos, los ciclos reproductores, etc.

#### 2.4.1. RITMOS CIRCADIANOS.

Los ritmos circadianos son los ritmos que se presentan con periodos aproximados a las 24 horas, aunque si tomamos en cuenta los otros dos tipos de ritmos, se puede considerar que son ritmos con periodos mayores a las 19 horas y menores a las 29 horas. Ejemplos de ellos son los ritmos de secreción del cortisol, la prolactina y la melatonina, los ciclos sueño-vigilia y actividad-reposo, así como numerosos ritmos fisiológicos en vertebrados e invertebrados.

La palabra circadiano proviene del latín *Circa* que significa cerca de y *dies* que significa días. Este término fue utilizado por Franz Halberg en 1959 (citado en Aschoff 1981), para describir ciclos de aproximadamente 24 horas, que son

estudios sobre los ritmos circadianos desde los años de 1950, mediante los cuales ha demostrado que el ritmo no es un fenómeno aprendido (citado en Pittendrigh y Minis 1964). Se ha comprobado la endogenicidad y sincronización de este tipo de ritmos a factores externos o zeitgebers (dador de tiempo) que también se repiten una vez cada 24 horas, como por ejemplo los cambios nictemerales (día-noche).

Las características mas distintivas de los ritmos circadianos son:

- 1) Son endógenos y programados genéticamente.
- 2) Son susceptibles de ser sincronizados.
- 3) Al ser endógenos persisten en oscilación espontánea en ausencia de señales externas.
- 4) En general el periodo es mayor de 24 horas para especies diurnas y menor en las especies nocturnas, cuando los organismos están en obscuridad constante.
- 5) Son capaces de compensar cambios de temperatura.
- 6) Generalmente desaparecen bajo luz intensa constante.

Para que estos ritmos se expresen es necesaria la existencia de un reloj biológico interno. Pittendrigh y Aschoff definen al reloj biológico como una estructura orgánica que funciona como marcapaso; es una entidad funcional localizable, capaz de oscilar autosostenidamente y capaz de detectar y sincronizarse a cambios rítmicos externos, impone el periodo y la fase a los procesos orgánicos.

El acil *Procambarus clarkii* manifiesta una serie de ritmos circadianos que han sido bien estudiados (Aréchiga et al., 1993), se ha observado que el movimiento de los pigmentos retinianos, proximal y distal presentan un ritmo circadiano (Aréchiga et al., 1990; Larimer y Smith, 1980). Asimismo se ha caracterizado el ritmo de sensibilidad del ojo a la luz, la cual se puede determinar

mediante los cambios en la amplitud del electroretinograma (ERG) lo cual se ha caracterizado tanto en el animal adulto (Aréchiga y Yanagisawa, 1973) como durante el desarrollo (Fanjul-Moles et al., 1987; Fanjul-Moles et al., 1992; Fuentes-Pardo et al., 1992).

El ERG es la respuesta extracelular del ojo a la luz, producida por la diferencia de potencial eléctrico, entre las estructuras visuales del ojo y el electrodo de referencia. El voltaje registrado en los animales adultos, en condiciones constantes cambia a lo largo del día, habiendo una diferencia en la magnitud del ERG de entre 600 y 700  $\mu\text{V}$  o más de la mañana a la noche. A ésta diferencia se le denomina ritmo de amplitud del ERG, y presenta un ritmo circadiano (Aréchiga y Fuentes, 1970).

La amplitud del ERG, es mayor cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad y es menor cuando están en posición de adaptación a la luz (Rao, 1985). No obstante hay cierta ritmicidad del ERG que puede no ser necesariamente regulada por la migración de los pigmentos.

En los acociles *Procambarus clarkii* de la etapa PO1 el ritmo ERG es ultradiano pues se manifiesta con características de un periodo de 15 min a 4 h, conforme avanza el desarrollo del acocil, el periodo del ritmo aumenta, presentándose un ritmo circadiano evidente a los 30 días de edad, aunque este animal no tiene un ritmo circadiano de ERG bien establecido hasta los 90 días postnatales (Fanjul-Moles et al., 1987).

En animales adultos, se ha propuesto que la amplitud del ERG, a un pulso de intensidad constante, depende de la actividad fisiológica de tres estructuras (Aréchiga et al., 1993). Una es la sensibilidad de los propios fotorreceptores a la luz debido a cambios en su conductancia iónica; otra es la posición del pigmento proximal; por último, la posición del pigmento distal. Estos ritmos se presentan tanto en la oscuridad constante como en la luz-oscuridad (Welsh, 1930).

Lo anterior indica que la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz puede ser regulada por cambios circadianos endógenos en los componentes oculares pigmentarios. El pigmento proximal migra como una respuesta directa de los fotorreceptores a la luz y a la oscuridad, y el pigmento distal es sensible a las neurohormonas liberadas, como una respuesta a la luz y a la oscuridad (Aréchiga, 1977). La hormona dispersora del pigmento distal se libera en la iluminación y promueve la dispersión de este pigmento; la hormona concentradora de eritróforos mueve el pigmento distal hacia la córnea durante la oscuridad constante; las dos hormonas se producen en el complejo OX-GS. En los crustáceos, se ha asumido que el pedúnculo ocular es un lugar de generación de ritmicidad circadiana. En estudios realizados con el acocil *Procambarus clarkii* se observó que los pedúnculos oculares aislados son capaces de generar un ritmo circadiano autosostenido de secreción de la hormona concentradora del pigmento rojo (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994).

La 5-HT tiene un efecto directo sobre la retina, actuando en las células fotorreceptoras, aumentando la respuesta a la luz y promoviendo la retracción de los pigmentos de los fotorreceptores retinianos. La presencia de 5-HT en la noche determina la retracción del pigmento e incrementa la sensibilidad del fotorreceptor (Aréchiga *et al.*, 1990).

### 3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

En los crustáceos se han propuesto dos estructuras como marcapasos del ritmo circadiano de la actividad de la respuesta retiniana a la luz, el lóbulo óptico, para la sincronización unilateral, y el ganglio supraesofágico, para la sincronización bilateral. Sin embargo, hasta ahora este modelo no puede explicar totalmente ni la génesis, ni la sincronización y acoplamiento del sistema.

Estudios previos durante el desarrollo del acocil, han mostrado que las etapas PO2 y juvenil, son las etapas clave en la maduración de varios ritmos circadianos, como el ritmo circadiano del ERG (Fanjul-Moles et al., 1987), el ritmo circadiano de actividad locomotora (Fanjul-Moles, 1998) y el ritmo circadiano de 5-HT (Castañón-Cervantes et al., 1999). Estos trabajos han evidenciado que durante las etapas PO2 y juvenil, cambian parámetros circadianos tales como el valor del periodo, la fase y la amplitud del ritmo, por lo que éstas etapas podrían ser consideradas como marcadores de la maduración de los efectores responsables de los ritmos y de su acoplamiento a los marcapasos. En el caso del ritmo del ERG los efectores son los fotorreceptores oculares, cuya sensibilidad circadiana depende de las neurohormonas liberadas en el complejo OX-GS mencionado previamente. Una de estas neurohormonas podría ser la CHH, aunque nunca se ha propuesto una acción de CHH sobre la retina.

Algunos experimentos fisiológicos mostraron que la liberación de CHH se lleva a cabo en las terminales axónicas de la GS en varios crustáceos (Strolenberg y Van Herp, 1977; Martin, 1978; Kallen, 1988). Por otra parte, Sáenz y colaboradores (1997) reportaron que en el acocil *Procambarus clarkii* la 5-HT induce despolarización en las células del OX, que por su forma, localización y

tamaño, son semejantes a las sintetizadoras de CHH. Aunado a lo anterior Chi-Ying y colaboradores (2000) han reportado que la 5-HT induce un aumento en los niveles de glucosa en la hemolinfa del acocil *Procambarus clarkii*. Sin embargo, el papel de la CHH en los mecanismos que subyacen los ritmos de sensibilidad visual en el acocil *Procambarus clarkii*, no han sido explorados.

En caso de que lo anterior se cumpla, se investigará: 1) si la 5-HT y la CHH están presentes *in situ* en las estructuras consideradas como marcadores del ritmo circadiano del ERG, i.e. la retina y el complejo OX-GS en el acocil *P. clarkii*. 2) Si las variaciones diarias de la inmunorreactividad a 5-HT, reportadas en la retina (Escamilla-Chimal et al., 1998), también se presentan en el complejo OX-GS, y ver si están relacionados con las variaciones diarias en la inmunorreactividad a CHH en las mismas estructuras. 3) Si en la retina y el complejo OX-GS hay células secretoras de CHH y 4) Si la 5-HT influye en la secreción de CHH en células de la retina y del pedúnculo ocular del acocil *P. clarkii*.

## 4. HIPÓTESIS.

Hipótesis general.

La serotonina y/o la hormona hiperglicemiante de los crustáceos participan como moduladores y/o efectores en la expresión de los ritmos circadianos de amplitud del ERG del acocil *Procambarus clarkii*.

Hipótesis particulares:

H1. Tanto la 5-HT como la CHH se encuentran en las estructuras consideradas como marcapasos de los cambios de sensibilidad del ojo, i.e.: la retina y el complejo órgano-X-glándula sinusal, presentando cambios diarios tanto en su localización como en su concentración.

H2. Puesto que el ritmo de amplitud ERG sufre cambios importantes en sus parámetros circadianos (amplitud y fase) durante el desarrollo, y en especial entre los estadios PO2 y juvenil, las diferencias temporales en la concentración y localización de 5-HT y CHH serán un indicador de la participación de estas dos neurohormonas en el proceso de maduración del ritmo circadiano.

H3. La 5-HT produce cambios en la secreción de CHH en células aisladas de la retina y el sistema órgano-X-glándula sinusal modulando esta secreción.

## 5. OBJETIVOS.

Para probar la H1:

Detectar si estructuras del tallo ocular, en acociles de las etapas PO2 y juvenil, consideradas claves en los mecanismos de génesis y expresión de los ritmos biológicos, presentan inmunorreactividad a 5-HT y CHH.

Para probar la H2:

Cuantificar cambios cíclicos a tres horas del día en la inmunorreactividad a CHH y 5-HT en dichas estructuras, mediante el método de estimación de fracción de volumen.

Para probar la H3:

Mediante el método de ensayo hemolítico inverso, determinar y cuantificar la secreción de CHH en la retina y el complejo OX-GS.

Determinar y cuantificar el efecto de 5-HT sobre la secreción de CHH en células de la retina y del complejo OX-GS.

## 6. MÉTODO.

### 6.1. ANIMALES.

Se utilizaron acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii*, los cuales fueron colectados en el Río Conchos en Saucillo, Chihuahua. Una vez aclimatados a las condiciones de laboratorio, se distribuyeron colocando en cada acuario 6 hembras con 3 machos para reproducción. Cuando se detectaron las hembras ovígeras fueron separadas del resto de los acociles en una pecera individual. A partir de la eclosión se llevó el conteo del número de días que transcurrían para determinar la etapa en la que se encontraban los acociles, de esta manera obtuvimos los animales de las etapas PO2 y juveniles (de dos meses de edad). Los animales se mantuvieron en condiciones de luz-obscuridad (LO) 12:12 (7:00 h encendido de luz) y con una temperatura de 20-22°C, en acuarios con filtro biológico y se alimentaron tres veces a la semana con verduras cocidas.

### 6.2. HISTOLOGÍA.

12 acociles de cada una de las etapas PO2 y juvenil (n=24) fueron anestesiados a tres diferentes horas del día (8:00, 15:00 y 20:00 h), colocándolos en el congelador durante 30 min, durante los cuales permanecieron en obscuridad constante con la finalidad de que los pigmentos de la retina se encontraran en adaptación a la obscuridad (agregados en la región distal y proximal respectivamente). Inmediatamente se disectaron los tallos oculares de cada animal utilizando un microscopio de disección (Olimpus SZ SCTU1).

Cada tallo ocular se fijó en formaldehído al 10% durante 12 horas, se

deshidrataron en alcoholes graduales a diferentes concentraciones de la siguiente manera: 24 h en 50%, 24 h en 70%, 12 h en 96% y 12 h en 100%. Finalmente cada tejido se colocó 30 min en xilol para aclararlo.

Cada ojo se incubó en Paraplast (Oxford Labware) durante 12 horas en una estufa (Felisa) a 59°C y posteriormente se incluyeron en bloques; mediante un microtomo (American Optical 820) se hicieron cortes histológicos longitudinales y transversales de 4 µm de grosor. Los cortes se pegaron con grenetina en portaobjetos utilizando un baño de flotación (Lab. Line Instruments Inc.).

Las laminillas de cada ojo se desparafinaron 30 min en xilol y posteriormente los cortes se rehidrataron pasándolos por alcoholes graduales: 10 min en 100%, 10 min en 96%, 5 min en 70%, 5 min en 50% y finalmente agua destilada, para proceder a realizar las técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

#### 6.2.1. TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

En una primera aproximación, tanto para visualizar la 5-HT como la CHH en las estructuras del tallo ocular, así como para determinar la dilución a la cual se utilizaría el anticuerpo contra CHH y 5-HT, un animal PO2 y uno juvenil (para cada hora de muestreo) se procesaron mediante técnicas de inmunohistoquímica de acuerdo al método ABC (Priestley, 1997). Para localizar la CHH se utilizó un anticuerpo policlonal contra CHH de *Astacus* (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981; donado por el Dr. Van Herp) en diluciones 1:100, 1:500 y 1:1000 en amortiguador de fosfatos a pH 7.6 (PBS), escogiendo como dilución final 1:500. Por separado, para visualizar la 5-HT se usó un anticuerpo monoclonal contra 5-HT (Dako) probándose las diluciones 1:10, 1:50 y 1:80 en PBS, eligiendo la dilución 1:10. También se probaron diferentes tiempos y temperaturas de incubación con el anticuerpo primario: 1 h a temperatura ambiente (TA), 2 h a TA, 14 h a 4°C, 18 h

a 4°C y 24 h a 4°C; finalmente se decidió incubar 18 h a 4°C. Posteriormente todos los cortes se incubaron en un anticuerpo secundario (IgG anti-conejo) biotinilado (BioGenex) durante 20 min y se marcaron con fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina (BioGenex), por 20 min. Se lavaron con PBS, fueron teñidos con el cromógeno rojo rápido (BioGenex) y contrastados con hematoxilina de Mayer (BioGenex). Posteriormente estos cortes se lavaron con agua de la llave para parar la tinción de la hematoxilina y después con agua amoniacal al 1% por 10 seg. para virar la reacción de la hematoxilina. Finalmente los cortes fueron montados en medio de montaje acuoso Vikel (donado por el M. en C. Viktor Romero-Díaz).

#### 6.2.2. TÉCNICA DE INMUNOFUORESCENCIA.

Con el objeto de cuantificar la inmunorreacción a 5-HT y CHH, se prosiguió a realizar la técnica de inmunofluorescencia con doble marcaje.

Se utilizaron tres laminillas por ojo de cada acocil. Previamente en cada una de las laminillas, se delimitó el área en la que se encontraban los cortes (con un PAP pen) para asegurar que todos los medios de incubación permanecieran sobre los cortes. Posteriormente los portaobjetos se colocaron en una cámara húmeda y oscura. Los cortes se lavaron con PBS a pH 7.6 durante 5 min, se incubaron 20 min con un bloqueador de proteínas (suero normal de cabra, BioGenex). Este bloqueador reduce la tinción de fondo que se presenta por los enlaces no específicos de los anticuerpos con el tejido.

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal contra 5-HT (Dako) en una dilución 1:10 y con el anticuerpo policlonal contra CHH de acocil, con una dilución 1:500, durante 18 h a 4 °C. Se lavaron 5 min con el PBS. La 5-HT se reveló con el fluorocromo FITC cabra-anti-ratón en dilución 1:10 (Dako), 2 min a 59 °C y 6 h a temperatura ambiente, después se lavó con PBS. La CHH se reveló

con el fluorocromo Rojo Texas cabra-anti-conejo en dilución 1:50 (Rockland) 1 h a temperatura ambiente y se lavó 5 min con PBS. Finalmente se montaron los cortes con medio de montaje acuoso para fluorescencia (Dako).

Se realizaron dos tipos de controles, por una parte las preparaciones control se procesaron sin la incubación con los anticuerpos primarios correspondientes; por otra parte los cortes fueron incubados por separado ya sea con el anticuerpo anti-5-HT preabsorbido con un exceso de complejo de 5-HT sulfato de creatinina (500 µg/ml, Sigma), o con anticuerpo contra CHH preabsorbido con extracto crudo de tallo ocular de *P. clarkii* (Kleinholz et al., 1967).

### 6.2.3. MORFOMETRÍA Y DIGITALIZACIÓN DE IMÁGENES.

Con el objeto de cuantificar la cantidad de inmunofluorescencia a 5-HT y CHH se cuantificó la cantidad de fluorescencia en las estructuras mencionadas previamente en un microscopio de luz con epifluorescencia (Labophot 2 HFX-DX, Nikon). Por lo anterior los cortes se visualizaron capturándolos a 40X, por medio de un sistema procesador de imágenes (Hamamatsu C5510-01, Argus 20, con cámara Nikon Fx-35DX) vía una computadora, mediante el programa de captura video Buzz, con el software MGI Video Wave SE+ (IOMEGA). Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa Sigma Scan Pro para Windows (Jandel Scientific Softwar, versión 3.0), el cual permitió medir el área de inmunofluorescencia de cada estructura.

La retina se dividió en tres regiones arbitrarias: a) retina distal (RD), abarca desde el cono cristalino hasta la región distal de los rbdomos, b) retina medial (RM), que corresponde a las células retinulares, los rbdomos y las células tapetales, y c) retina proximal (RP), constituida por la membrana basal y los axones de las células retinulares (Fig. 2A). Cada una de las regiones

mencionadas se tomó como el 100% del área, posteriormente se midió el área de cada zona inmunopositiva a los anticuerpos, cada una por separado para posteriormente calcular el porcentaje de fluorescencia positiva a 5-HT y a CHH que presentaba cada región de la retina.

Por otra parte se midió el área total del OX, de la GS y del tracto OX–GS tomándose como el 100% cada uno de ellos, también se midió el área fluorescente, positiva a los anticuerpos y con ello se calculó el porcentaje de inmunofluorescencia a 5-HT y CHH.

Con lo anterior se estimó la fracción de volumen ( $\hat{V}_v$ ) de las estructuras fluorescentes, verde (5-HT) y rojo (CHH), estimado por una técnica de conteo de puntos (Gundersen et al., 1988). El área total de cada una de las estructuras fue definida como el espacio de referencia y la fluorescencia fue la región de interés de acuerdo con el método de Thompson (1930), con la fórmula:

$$\hat{V}_v(Y,ref) = L_p(Y,ref) = \frac{P(Y)}{P(ref)}$$

Dónde  $P(Y)$  indica el número de puntos que caen en el espacio de interés y  $P(ref)$  es el número de puntos que caen en el espacio de referencia. Los puntos contados se usan para estimar áreas, la cual es por sí misma un estimador del volumen (Howard y Reed, 1998). En este estudio la  $\hat{V}_v$  expresa la cantidad relativa de inmunoreactividad a 5-HT o a CHH en cada una de las estructuras antes mencionadas. Los datos se presentan como la media la desviación estándar de la  $\hat{V}_v$  inmunofluorescente expresada como porcentaje.

#### 6.2.4. MICROSCOPIA CONFOCAL.

Con el objeto de corroborar los datos, cada una de las estructuras de interés, una por cada etapa y hora de muestreo, se observó en un microscopio confocal (MRC 2100, Nikon).

#### 6.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A los datos obtenidos se les aplicó la prueba de Bartlett, para verificar la homogeneidad de las varianzas de cada muestra. (Bartlett, 1937; Aguilar-García, 1981), y determinar que prueba estadística se aplicaría a los datos.

La prueba de Bartlett demostró que las varianzas eran homogéneas dentro de cada grupo a las tres horas investigadas, por lo cual se decidió aplicar un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $p < 0.05$ ), seguida de una prueba *post hoc* de Scheffé. Estas pruebas se llevaron a cabo tanto para la 5-HT como para la CHH. La ANOVA permite determinar si hay o no diferencia entre dos o más grupos de varianzas homogéneas sujetos a uno o más factores. La prueba de Scheffé permite hacer comparaciones entre las medias de dos o más muestras (Dawson-Saunders y Trapp, 1993). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Statistica.

#### 6.3. ENSAYO HEMOLÍTICO INVERSO (RHPA).

Esta técnica permite identificar una célula en una población celular mixta de acuerdo con su secreción hormonal, así como cuantificar esta secreción. Esta técnica utiliza la hemólisis mediada por complemento en presencia del complejo antígeno-anticuerpo (Neill y Frawley, 1983; Hiriart y Ramírez-Medeles, 1991).

Una vez que se logró montar la técnica y con el objeto de caracterizar la secreción de CHH en células del tallo ocular, se realizaron 5 repeticiones experimentales por duplicado de la técnica de RHPA.

### 6.3.1. MEDIOS DE CULTIVO (Microlab).

#### L-15-1.

Medio de cultivo Leibovitz (L-15) modificado para tener 205 mM de NaCl, 4.5 mM de KCl, 13.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, además de 8 mM de glucosa, 10 mM de HEPES, 0.1% de albúmina (BSA), gentamicina (16 µg/ml), penicilina 200 U/ml, estreptomina 200 µg/ml y anfotericina B (0.5 µg/ml), a pH 7.4.

#### L-15-2.

Medio de cultivo L-15, igual que el L-15-1, sin gentamicina y con bicarbonato de sodio, 0.1% de BSA, penicilina 200 U/ml y estreptomina 200 µg/ml.

#### L-15-3.

Medio de cultivo L-15, igual que el L-15-1, sin gentamicina ni glucosa y con bicarbonato de sodio, 0.1% de BSA, penicilina 200 U/ml y estreptomina 200 µg/ml.

#### L-15-4.

Medio de cultivo L-15, igual que el L-15-1, sin gentamicina ni glucosa, con 40 mM de KCl, bicarbonato de sodio, 0.1% de BSA, penicilina 200 U/ml y estreptomina 200 µg/ml.

### 6.3.2. DISECCIÓN DE TALLOS OCULARES.

Acociles juveniles de dos meses de edad de la especie *Procambarus clarkii* se mantuvieron en un fotoperiodo LO 12:12 (7:00 h encendido de la luz), en acuarios con filtro biológico a una temperatura de 20-22°C. A los acuarios se les ponían unas gotas de azul de metileno y/o verde de malaquita para disminuir los parásitos que presentaban los acociles, esto se realizó tres veces por semana, durante las dos semana anteriores a que los animales fueran sacrificados.

Tres acociles por cada experimento se anestesiaron durante 30 min en el congelador, sus tallos oculares (6 por cada ensayo) se lavaron con alcohol al 96%, se cortaron y lavaron tres veces con medio L-15-1.

Los tallos oculares fueron despojados de la quitina mediante un microscopio de disección (Olimpus SZ SCTU1). Por otra parte, en una caja petri Falcon (previamente impregnada con silgar), se colocaron los tallos oculares utilizando microalfileres, lo anterior fue necesario para retirar el tejido conectivo y muscular, dejando únicamente los neurópilos del pedúnculo ocular y la retina, estos últimos fueron separados en ese momento.

### 6.3.3. DISPERSIÓN DE CÉLULAS.

En una campana de flujo laminar (VECO) la retina y el pedúnculo ocular (por separado) se colocaron en tubos de centrifuga estériles (Corning), se les agregaron 40 $\mu$ l de colagenasa/dispasa diluida en L-15-1 (2 mg/ml, Sigma), para que se llevara a cabo la digestión se agitaron los tejidos durante 20 min a 37°C, en un baño de agitación (American Optical). Posteriormente las diferentes poblaciones celulares fueron dispersadas por pipeteo manual con pipetas Pasteur siliconizadas. Las células ya dispersas se lavaron 2 veces en medio L-15-1, para lo cual se colocaron en una centrifuga (Beckman) 10 min, 188 x g a 15 °C. Posterior a los lavados, las células se contaron en una cámara de Neubauer haciendo una mezcla de 3 $\mu$ l de azul tripano y 27  $\mu$ l de células diluidas en 1 ml de medio de cultivo, para determinar la viabilidad de las células.

El resto de las células que no se contaron se colocaron en cajas petri Falcon estériles con medio L-15-1, estas cajas a su vez fueron colocadas en una cámara húmeda estéril en la que se dejaron durante 21 horas para su recuperación.

#### 6.3.4. MARCAJE DE ERITROCITOS.

5 ml de eritrocitos de borrego (Microlab) se colocaron en un tubo de centrifuga (Corning) y se llevaron a 15 ml con una solución salina de NaCl al 0.9%, se centrifugaron 10 min a 395 x *g*, el sobrenadante se desechó y el "pellet" se lavó dos veces más de igual manera.

Al "pellet" final de eritrocitos se le agregaron gota a gota 500µl de Proteína-A (Sigma), la cual se obtiene de estreptococos. Posteriormente se le agregaron gota a gota 2.5 ml de cloruro de cromo (Sigma) al 4% diluido en solución de NaCl al 0.9%, el cual es un quelante que ayuda a que la Proteína-A se una a la membrana de los eritrocitos.

En un baño de incubación (Baxter Scientific Products) se incubó la mezcla anterior durante 1 hora a 29-30 °C, moviendo lentamente cada 15 min.

Posteriormente el complejo anterior se lavó 3 veces con NaCl al 0.9% centrifugando a 270 x *g* durante 10 min. y se le hizo un último lavado con solución salina RPMI (Microlab). Finalmente el "pellet" se dejó en refrigeración en solución de RPMI hasta el siguiente día.

#### 6.3.5. RHPA.

De los eritrocitos marcados se colocaron 8 ml en un tubo de centrifuga y se llevaron a 15 ml con una solución salina de Hank, se centrifugó 10 min a 395 x *g*, haciendo un segundo lavado con medio L-15-2, en el "pellet" de eritrocitos se resuspendió en medio L-15-2 en una dilución 1:10.

Por otra parte, las células del tallo dispersadas junto con el medio en el que se encontraban se colectaron en tubos de centrifuga, se les agregó medio L-15-2 y se centrifugaron 10 min a 188 x *g*, 2 veces para hacer los lavados y quitar el medio que contenía gentamicina.

Con una micropipeta, se calculó el volumen del "pellet" de las células antes

mencionadas y posteriormente se les agregaron los eritrocitos marcados en una dilución 1:1. Este complejo se colocó por capilaridad en cámaras Cunningham previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma) (0.5 mg/ml de buffer Tris, pH 8.2) y lavadas 4 veces con agua bidestilada, esto fue para cambiar la polaridad del vidrio de la cámara y que se pegaran todas las células; las cámaras Cunningham se introdujeron en una cámara húmeda la cual a su vez se metió a una incubadora con CO<sub>2</sub> a 37 °C (Forma Scientific Inc., modelo 3158s/n3472-4281), para promover la adhesión de las células al piso de las cámaras. Posteriormente se hicieron lavados con medio L-15-3 y se incubaron 1 hora con el anticuerpo de acocil contra CHH (donado por el Dr. Van Herp) en una dilución 1:10, diluido en L-15-3 con 40 mM de KCl. Paralelamente, otras células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de 5-HT sulfato de creatinina (5, 10 y 50 µM; Sigma), siendo el KCl y la 5-HT los secretagogos, teniendo por lo menos dos cámaras en el ensayo por cada tratamiento. Finalmente las células se lisaron por incubación con complemento de cobayo diluido 1:20 en L-15-4 durante 45 min. Todos los medios se introdujeron en las cámaras por acción capilar (Fig. 5).

Se llevaron a cabo diferentes controles de la técnica de RHPA, en unas cámaras se suprimió el KCl y/o el anticuerpo contra CHH. El control de las cámaras experimentales carecía de 5-HT.

Las células se fijaron 30 min con glutaraldehído (Sigma) al 2% en NaCl al 0.9%, finalmente se colocan las cámaras en frascos con NaCl, para posteriormente ser analizadas.

Las células que secretaron CHH estaban rodeadas por una placa de eritrocitos lisados, a lo cual llamamos inmunoplaque.

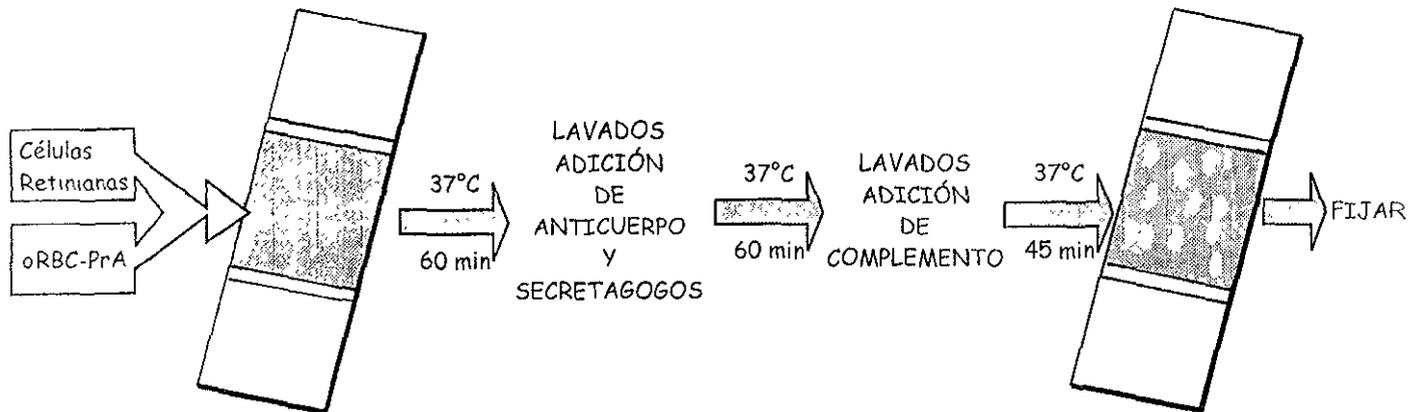


Figura 5.- Representación esquemática de la técnica de RHPA. oRBC-PrA: Eritrocitos de borrego marcados con la proteína-A.

### 6.3.7. INMUNOCITOQUÍMICA.

Con el fin de identificar y obtener la cantidad de células que presentaron placa y el porcentaje de éstas que eran inmunorreactivas al anticuerpo contra CHH, se realizó una inmunocitoquímica. Para ello primero se llevó a cabo la técnica de RHPA, de la misma manera que se describió anteriormente. Antes de la fijación de las células se marcaron las células con y sin inmunoplaqueta. En este caso en lugar de fijar las células con glutaraldehído se fijaron con paraformaldehído durante 12 h., posteriormente se les quitaron los cubreobjetos y se realizó una incubación con el amortiguador TBS y Tritón al 0.3% durante una hora, después se hicieron tres lavados de 5 min con amortiguador TBS y bloqueador de proteínas al 1% (suero normal de cabra; BioGenex), y se dejaron incubando toda la noche a 4°C en TBS con bloqueador de proteínas al 2% en presencia del anticuerpo contra CHH en dilución 1:500. La técnica continuó realizándose como en la inmunohistoquímica (descrita anteriormente). Finalmente cada célula, la cual ya había sido identificada mediante el marcaje de los portaobjetos y fotografías de cada célula con placa, se volvió a observar al microscopio para determinar si fue positiva o no al anticuerpo contra CHH.

### 6.3.7. ANÁLISIS DE DATOS.

Por cada cámara, se midió el área de por lo menos 80 inmunoplaquetas, el tamaño de éstas es proporcional a la cantidad de sustancia secretada, se cuantificó el número de células secretoras y no secretoras para obtener un porcentaje, por lo menos se midieron 400 células en total. La respuesta secretora promedio tanto de las células retinianas como de las células del pedículo ocular se evaluó mediante el índice de secreción (I.S.), que se obtuvo multiplicando el área promedio de las inmunoplaquetas por F, donde  $F = \# \text{ de células secretoras} \div \# \text{ total de células}$ . Éste se comparó en los diferentes tratamientos

$$I.S. = ( F ) X ( \bar{X} \text{ del área de las placas } )$$

#### 6.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

A los resultados obtenidos se les aplicó una prueba estadística de ANOVA de una vía seguida de una prueba de contrastes de *Scheffé*, así como una prueba de correlación para determinar el índice de correlación  $\rho$ . Estos análisis se llevaron a cabo con el programa Statistica.

## 7. RESULTADOS.

### 7.1. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los datos obtenidos con inmunohistoquímica y microscopio de luz mostraron que la inmunopositividad a CHH se localizó en la retina, únicamente en la zona que corresponde a las células del tapetum, además de presentarse en la GS, el OX y en el tracto OX-GS. Lo anterior se presentó tanto en los organismos PO2 como juveniles.

Las estructuras que resultaron positivas a 5-HT, en ambas etapas del desarrollo, fueron varios elementos de la retina como lo son el cono cristalino, el citoplasma y los axones de las células reticulares. La GS, el OX y el tracto OX-GS no mostraron positividad a la 5-HT a ninguna hora de muestreo en ninguna de las dos etapas. Estos datos no fueron cuantificados.

### 7.2. INMUNOFLUORESCENCIA.

Se encontraron cambios cíclicos en la  $\hat{V}_v$  de la inmunofluorescencia a 5-HT y CHH, en las estructuras, tanto del PO2 como del juvenil, estos cambios dependieron de la hora del día. En la figura 6 se muestran los cambios cíclicos en la inmunofluorescencia a 5-HT y CHH, en la retina (figs. 6A y 6B) y en el complejo OX-GS (figs. 6C y 6D). Algunos de los valores que se obtuvieron para el PO2 en las diferentes estructuras se encontraron invertidos en espejo en la etapa juvenil. En el órgano-X fue la única estructura, tanto en los organismos PO2 como juveniles, en la que se localizó la fluorescencia doble para 5-HT y CHH a la misma hora. Un fenómeno similar pero invertido (es decir en horas externas opuestas) se encontró en el estadio PO2 con respecto al estadio juvenil (figuras 6C y 6D).

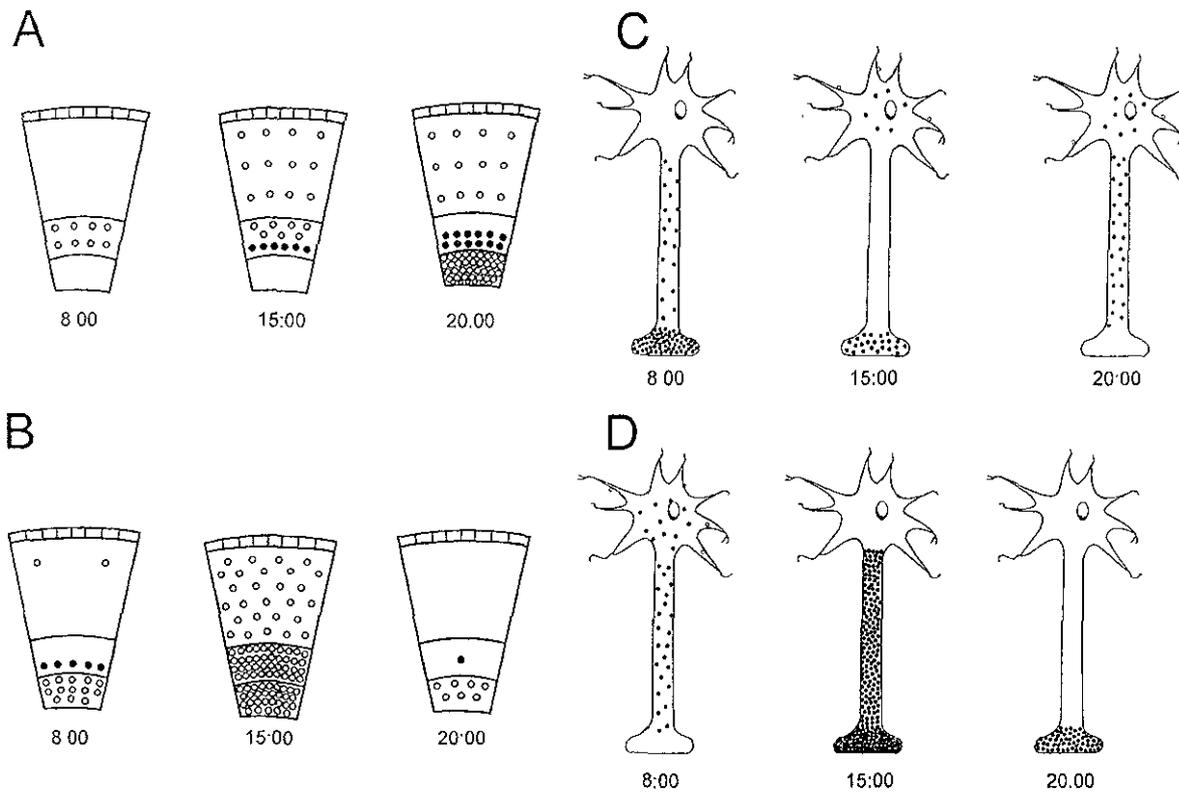


Figura 6.- A) Retina de la etapa PO2. B) Retina de la etapa juvenil. C) Complejo OX-GS de la etapa PO2. D) Complejo OX-GS de la etapa juvenil. ○ 5-HT, ● CHH a tres horas del día. La densidad de los círculos ejemplifica el porcentaje mostrado en la tabla 1.

### 7.2.1 ETAPA PO2.

La positividad a la 5-HT se localizó en la retina distal en particular en la zona que corresponde al cono cristalino, a las 15:00 y 20:00 h ( $\hat{V}_v$  7.92 y 7.91% respectivamente) sin mostrar diferencias estadísticas significativas; en la retina media que corresponde a la región del citoplasma de las células retinulares, se presentó a las 8:00 h ( $\hat{V}_v$  16.82%) y a las 15:00 h ( $\hat{V}_v$  14.23%); en la retina proximal se encontró una  $\hat{V}_v$  del 91.71% en la zona correspondiente a los axones de las células retinulares a las 20:00 h (figs. 7A, 7B 7C). En estas estructuras las diferencias significativas a las tres horas de muestreo se pueden observar en la tabla 1 y en la figura 8A.

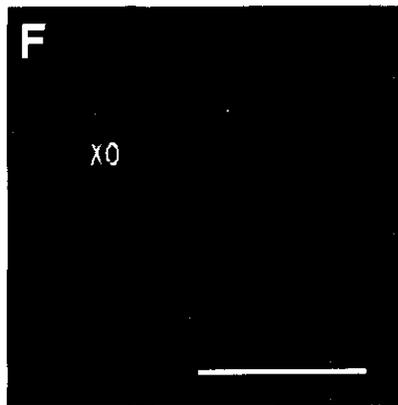
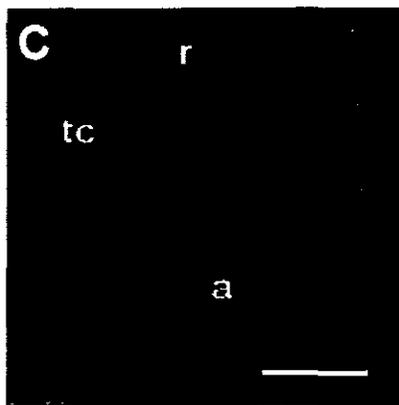
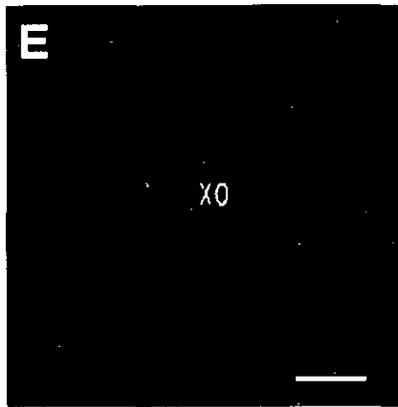
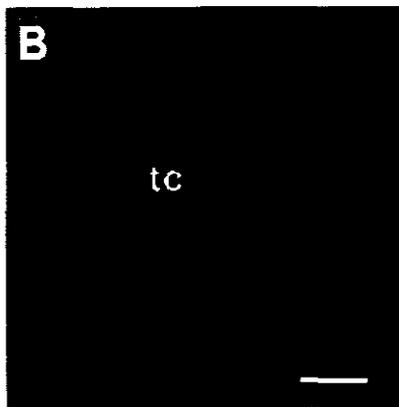
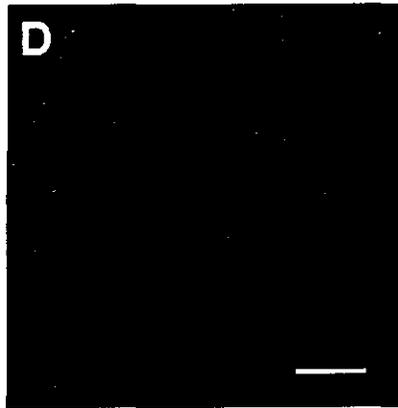
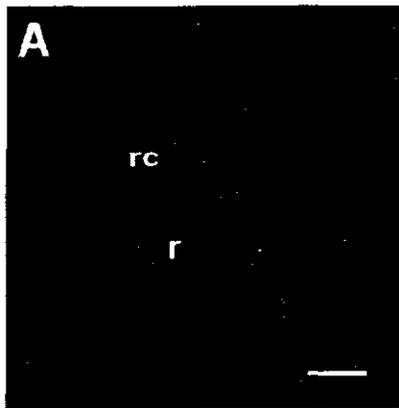
En el órgano-X se observó muy poca fluorescencia, esta positividad a 5-HT sólo se vio en el microscopio confocal, a las 15:00 h ( $\hat{V}_v$  0.82%) y 20:00 h ( $\hat{V}_v$  0.51%) (figs. 7D, 7E, 7F). Los datos no mostraron diferencia significativa (tabla 1, fig. 8B).

La prueba estadística de ANOVA reveló que hay diferencias significativas en la inmunorreactividad a 5-HT a las tres horas del día ( $F=1819$ ,  $p<0.05$ ).

La fluorescencia a CHH se encontró en la retina media, únicamente en la región correspondiente a las células tapetales, a las 15:00 h ( $\hat{V}_v$  12.68%) y a las 20:00 h ( $\hat{V}_v$  28.17%) (figs. 7A, 7B, 7C). El análisis de varianza reveló diferencias estadísticamente significativas. Lo anterior se puede observar en la tabla 1, y en la figura 8A.

De la misma manera, la CHH se localizó en la GS, OX, y fibras del tracto OX-GS (figs. 7D, 7E, 7F), habiendo diferencias significativas en la GS entre las 8:00 ( $\hat{V}_v$  53.01%) vs 15:00 ( $\hat{V}_v$  27.71%) y 20:00 ( $\hat{V}_v$  0%) y las 15:00 vs 20:00 h; en el tracto OX-GS la diferencia se encontró entre las 8:00 ( $\hat{V}_v$  11.89%) y 20:00 ( $\hat{V}_v$  16.29%) vs las 15:00 h. El OX fue positivo a CHH a las 15:00 ( $\hat{V}_v$  1.995%) y 20:00 ( $\hat{V}_v$  2.18%), encontrando diferencias significativas entre estas dos horas

Figura 7.- Microfotografías confocales en las que se muestran los cambios diarios a la inmunofluorescencia a 5-HT (verde) y CHH (rojo) en el acocil de la etapa PO2. A) Retina a las 8:00 h B) Retina a las 15:00 h. C) Retina a las 20:00 h. D) órgano-X a las 8:00 h, negativo a los dos anticuerpos. E) órgano-X a las 15:00 h. F) órgano-X 20:00 h. (rc) citoplasma de las células retinulares que expresan 5-HT, (r) rabdómos sin inmunorreactividad, (tc) células tapetales positivas a CHH, (a) axones de las células retinulares que expresan positividad a 5-HT, (xo) células del órgano-X positivas a CHH con terminales nerviosas que expresan 5-HT, la tinción amarilla corresponde a sitios en los cuales la 5-HT y CHH coinciden. La barra representa 19.5  $\mu\text{m}$ .



contra las 8 00 h (tabla 1, fig. 8B)

Las estructuras positivas a 5-HT y CHH coinciden con las observadas en el microscopio confocal, excepto el OX en las 15:00 h para 5-HT y CHH y a las 20.00 h para 5-HT. La prueba de ANOVA reveló que hay diferencias significativas en la inmunorreactividad a CHH ( $F=74.4$ ,  $p<0.05$ ) a las tres horas del día.

### 7.2.2. ETAPA JUVENIL.

Las estructuras de este estadio que mostraron inmunofluorescencia a 5-HT (figs. 9A, 9B, 9C), fueron en la retina distal que corresponde al cono cristalino presentando diferencias significativas entre las 15:00 ( $\hat{V}v$  18.33%) vs las 8:00 ( $\hat{V}v$  1.49%) y 20:00 ( $\hat{V}v$  0%). En la retina media se encontró una  $\hat{V}v$  75.05% de 5-HT a las 15:00 h en el citoplasma de las células retinulares. Estos datos mostraron una diferencia significativa entre esta hora y las 8:00 y 20:00 h. En la retina proximal (aOXnes de las células retinulares) también se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las tres horas de muestreo, 8:00 ( $\hat{V}v$  33.04%), 15:00 ( $\hat{V}v$  75.05%) y 20:00 ( $\hat{V}v$  18.53%). Lo anterior se muestra en la tabla 1 y en la figura 8C.

En el resto del pedúnculo ocular únicamente se localizó la positividad a 5-HT en el OX a las 08:00 ( $\hat{V}v$  0.93%) (figs. 9D, 9E, 9F), por lo que el ANOVA mostró diferencias significativas entre esta hora con respecto a las 15:00 y 20:00 h en las cuales el porcentaje fue de cero (tabla 1, fig. 8D). La prueba estadística de ANOVA reveló que hay diferencias significativas a las tres horas del día para la inmunorreactividad a 5-HT ( $F=249$ ,  $p<0.05$ ).

En la retina hay una región en la cual se observó más inmunorreactividad anti-5-HT, la cual también se observó en el PO2, esta misma región se puede observar en preparaciones realizadas con la técnica de inmunohistoquímica de luz (ABC).

Tabla 1. Porcentaje de la Fracción o Densidad de Volumen inmunorreactiva que expresa 5-HT y CHH a diferentes horas del día, en las etapas PO2 y juvenil

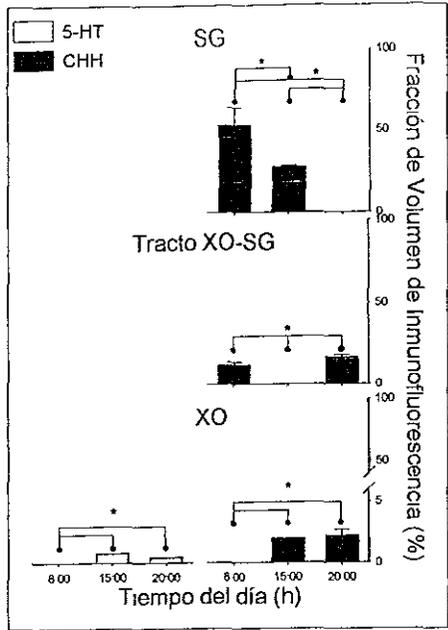
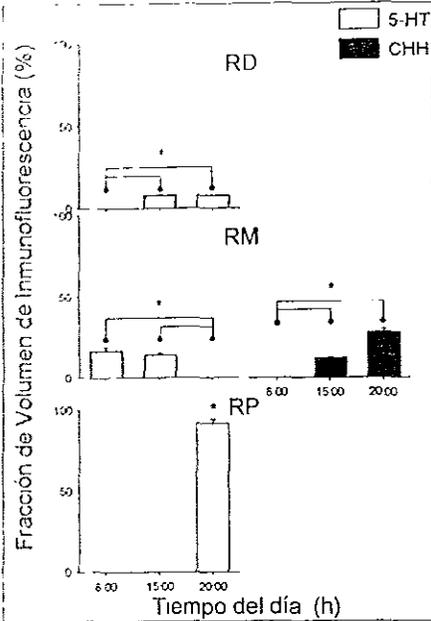
Etapa	Tiempo de día (h)	Anti-	Retina distal (RD)	Retina medial (RM)	Retina proximal (RP)	OX	Tracto OX-GS	GS
PO2	8:00	5-HT	0	16.8±2.2	0	0	0	0
		CHH	0	0	0	0	11.9±1.7	53±11
	15:00	5-HT	7.9±0.2	14.2±0.9	0	0.8	0	0
		CHH	0	12.7±0.5	0	1.99*	0	27.7±0.8
	20:00	5-HT	7.9±0.1	0	91.7±2.8	0.5*	0	0
		CHH	0	28.2±1.9	0	2.2±0.5*	16.3±1.4	0
Juvenil	8:00	5-HT	1.49±0.1	0	33±0.3	0.93*	0	0
		CHH	0	9.2±0.2	0	3.6±0.2	14.7±1.2	0
	15:00	5-HT	18.3±1.4	75±7.6	75±7.6	0	0	0
		CHH	0	0	0	0	82.4±0.6	95.1±5
	20:00	5-HT	0	0	18.5±0.4	0	0	0
		CHH	0	3.2±0.02	0	0	0	45.9±2.6

Los valores son la media ± la desviación estándar.

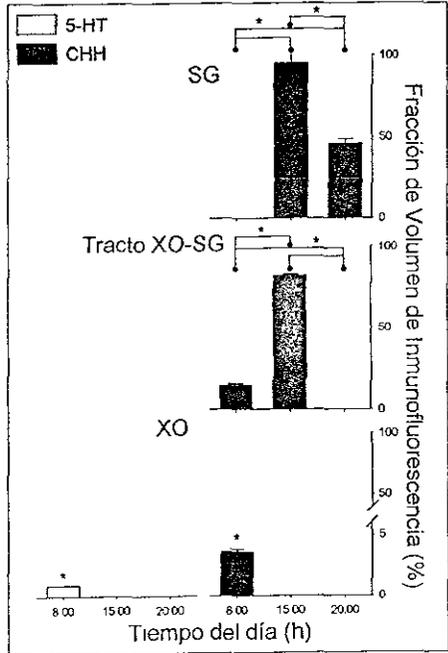
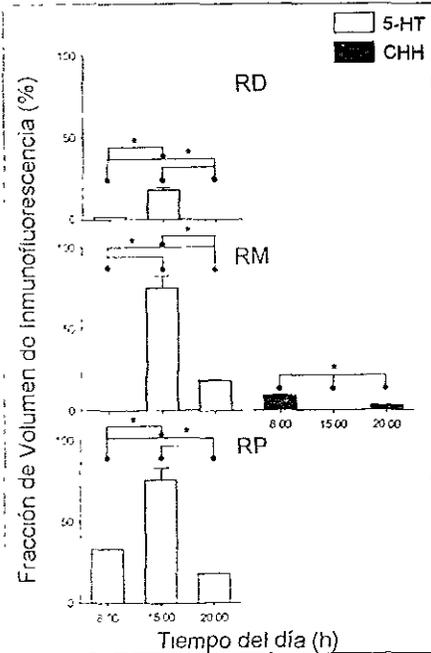
Nota: \* estos valores son datos únicos.

Figura 8.- Gráficas que muestran la Fracción de Volumen de inmunorreactividad a 5-HT y CHH en las diferentes estructuras del tallo ocular de los estadios PO2 y juvenil. Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar, el asterisco indica las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

PO2



JUVENIL



Las estructuras positivas a CHH fueron, al igual que en el PO2, la retina media sólo en la región que corresponde a las células del tapetum (figs. 9A, 9B, 9C), presentando diferencias significativas entre las tres horas del día, las 08:00 ( $\hat{V}v$  9.17%), las 15:00 ( $\hat{V}v$  0%) y las 20:00 ( $\hat{V}v$  3.24%). Lo anterior se muestra en la tabla 1 y en la figura 8C.

En el resto del tallo ocular, se encontraron diversas estructuras fluorescentes a CHH (figs. 9D, 9E, 9F), entre las que se encuentran la GS con diferencias significativas iguales que las células del tapetum, entre las tres horas de muestreo las 8:00 ( $\hat{V}v$  0%), las 15:00 ( $\hat{V}v$  95.12%) y las 20:00 ( $\hat{V}v$  45.92%); el OX sólo mostró positividad a CHH a las 8:00 ( $\hat{V}v$  3.58%); por último el tracto OX-GS también fue positivo y mostró diferencias significativas entre las tres horas 8.00 ( $\hat{V}v$  14.7%), 15:00 ( $\hat{V}v$  82.36%) y 20:00, en la que el porcentaje fue de cero (tabla 1, fig. 8D). El ANOVA reveló que en la inmunorreactividad a CHH ( $F=122.6$ ,  $p<0.05$ ) hay diferencias significativas a las tres horas del día.

Los dos tipos de controles fueron negativos para 5-HT y CHH en ambas etapas del desarrollo. Lo cual también demuestra que ambos anticuerpos son específicos.

### 7.3. RHPA EN LA ETAPA JUVENIL.

#### 7.3.1. RETINA.

Los resultados obtenidos en el acocil juvenil muestran que en la retina, hay células secretoras de CHH (fig. 10). El porcentaje de células formadoras de inmunoplasma fue alrededor del 30% con respecto al número total de células retinianas. Este porcentaje es inversamente proporcional a la concentración de 5-HT, mostrando diferencias significativas a 10 (27%) y 50  $\mu$ M de 5-HT (26%) con respecto del control (tabla 2). Tanto el área de las inmunoplasmas, como el índice

Figura 9.- Microfotografías confocales que muestran cambios diarios en la inmunofluorescencia a 5-HT (verde) y CHH (rojo) de estructuras del tallo ocular del acocil juvenil. A) retina a las 8:00 h., B) retina a las 15:00 h., C) retina a las 20:00 h., D) órgano-X a las 8:00 h., E) y F) órgano-X a las 15:00 y 20:00 h respectivamente, los cuales fueron negativos a ambas neurohormonas. (tc) células tapetales positivas a CHH, (rc) citoplasma y (a) axones de las células retinulares que expresan 5-HT, (r) rabdomos son negativos a ambos anticuerpos, (xo) células del órgano-X positivas a CHH con terminales axónicas que contienen material positivo a 5-HT. La barra representa 19.5µm.

Tabla 2. RHPA de la etapa juvenil

Secreción	Retina				Pedúnculo Ocular			
	Control	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M	Control	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Células con inmunoplaca (%)	30 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3	27 $\pm$ 1*	26 $\pm$ 1*	25 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2*	31 $\pm$ 3*	23 $\pm$ 2
Area de la Inmunoplaca (m $\mu$ <sup>2</sup> )	557 $\pm$ 41	603 $\pm$ 52 ↑8%	719 $\pm$ 14* ↑29%	841 $\pm$ 59* ↑51%	519 $\pm$ 32	550 $\pm$ 21 ↑5%	615 $\pm$ 37* ↑18%	518 $\pm$ 30 =

Los datos son la media  $\pm$  la desviación estándar, el asterisco muestra las diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0.05$ );  $\uparrow$  indica el aumento del área con respecto al control; (n=5).

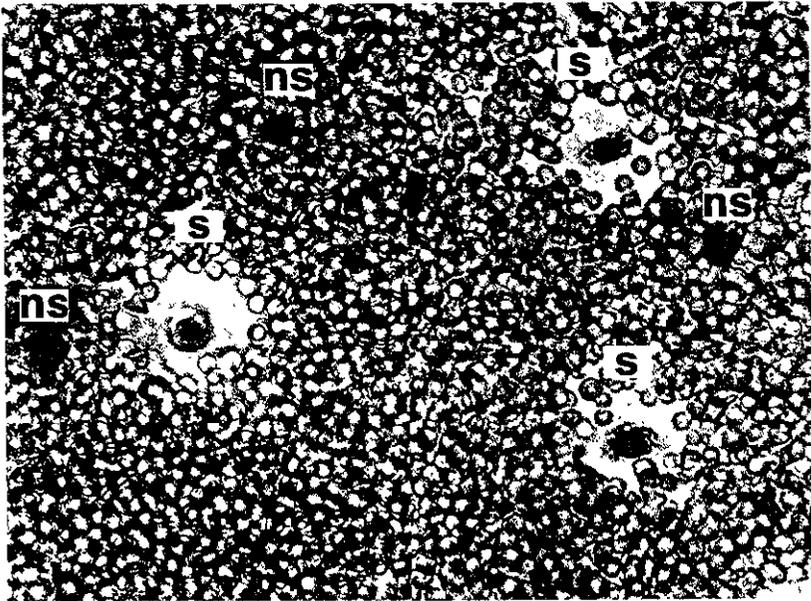


Figura 10.- Microfotografía en la que se observan las células secretoras con inmunoplaaca (s) y las células no secretoras (ns), en la monocapa de eritrocitos, 40X

de secreción (I.S.) aumentan al aumentar la concentración de 5-HT, presentando diferencias significativas en el área para las concentraciones de 10 ( $719\mu\text{m}^2$ ) y 50  $\mu\text{M}$  ( $841\mu\text{m}^2$ ) con respecto del control ( $557\mu\text{m}^2$ ) (tabla 2). El índice de secreción, que nos indica la cantidad total de hormona secretada en una condición dada, también aumentó en presencia de 5-HT, de acuerdo con la concentración del neurotransmisor; el I.S. en 5 ( $179\pm 6$ , aumentó un 8% con respecto al control), 10 ( $191\pm 2$ , aumentó un 15.7% con respecto al control) y 50 $\mu\text{M}$  ( $216\pm 10$ , aumentó un 31% con respecto al control) presentaron diferencias significativas entre las tres concentraciones, al igual que en las concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{M}$  de 5-HT vs control ( $165\pm 14$ ) (fig. 11A). El I.S. aumenta conforme aumenta la concentración de 5-HT. El coeficiente de correlación calculado para esta curva dosis-respuesta ( $\rho=0.89$ ) muestra una asociación estadísticamente significativa entre estas dos variables (fig. 12A). Con lo anterior se demuestra que en la retina la 5-HT modifica la secreción celular de CHH.

Los controles que carecían de KCl y/o de CHH no presentaron inmunoplaaca.

Los resultados de la inmunocitoquímica mostraron que el 100% de las células con placa presentaron positividad al anticuerpo contra CHH y de las células que no tenían placa un 14% fueron positivas al anti-CHH.

### 7.3.2. PEDÚNCULO OCULAR.

El pedúnculo ocular, al igual que en la retina, presentó células secretoras de CHH cuya tasa de secreción depende de la concentración de 5-HT (tabla 2, fig. 11B). El porcentaje de células secretoras no varía mucho con respecto a la retina, este porcentaje aumentó en las concentraciones de 5 (30%) y 10  $\mu\text{M}$  de 5-HT (31%) presentando diferencias significativas con respecto al control (25%); sin embargo, en 50  $\mu\text{M}$  de 5-HT no hubo diferencia significativa comparado con el

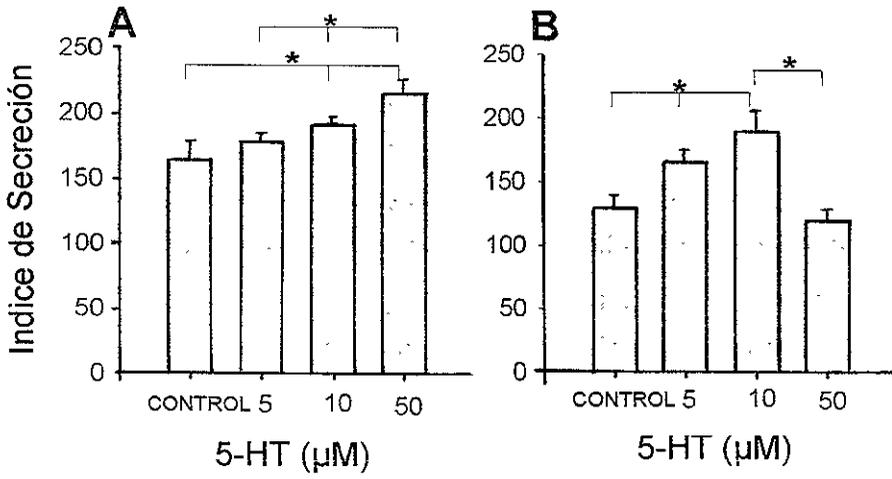


Figura 11.- Gráficas que muestran el índice de secreción resultado del RHPA con las diferentes concentraciones de 5-HT. A) retina y B) pedúnculo ocular.

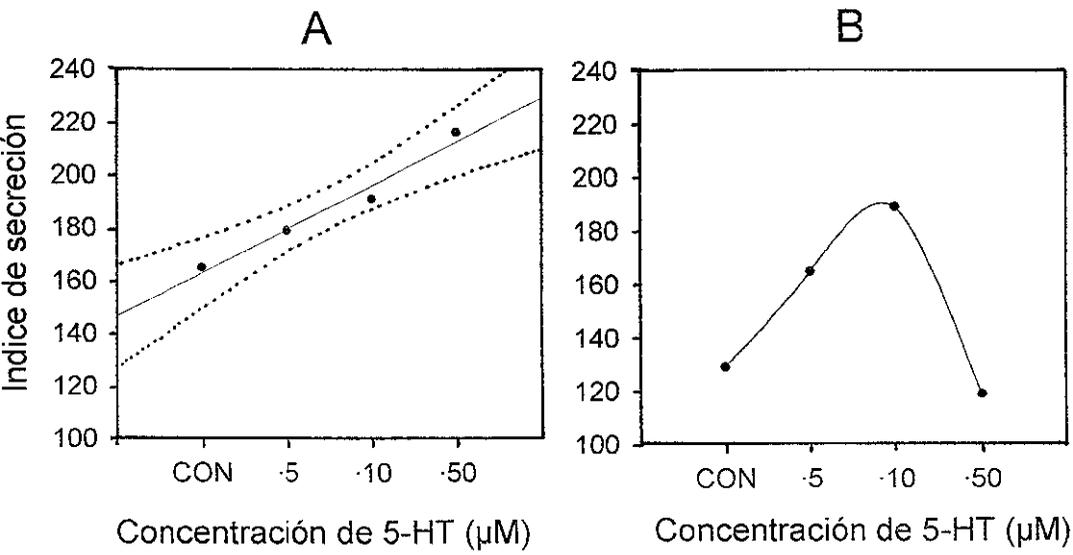


Figura 12.- Curvas dosis-respuesta del índice de secreción dependiente de la concentración de 5-HT. A) Retina, se comporta linealmente. B) Pedúnculo Ocular, presenta un comportamiento parabólico. CON.- grupo control; (n=5).

control (tabla 2). El área de inmunoplasmas, al igual que el porcentaje, aumentó en 5 (550  $\mu\text{m}^2$ ) y 10  $\mu\text{M}$  (615  $\mu\text{m}^2$ ) y disminuyó en 50  $\mu\text{M}$  (518  $\mu\text{m}^2$ ), pero solamente se observaron diferencias significativas en 10  $\mu\text{M}$  de 5-HT, en 50  $\mu\text{M}$  volvió a disminuir a 518  $\mu\text{m}^2$  (tabla 2). El I.S., de la misma manera que el porcentaje y que el área de inmunoplasmas, aumentó en 5 (165 $\pm$ 10) y 10  $\mu\text{M}$  (189 $\pm$ 16), disminuyendo en 50 $\mu\text{M}$  (119 $\pm$ 9) con respecto al control (129 $\pm$ 11), las diferencias significativas se muestran entre el control contra 5 y 10  $\mu\text{M}$  y entre 10 y 50  $\mu\text{M}$  de 5-HT (figs. 11B, 12B). El coeficiente de correlación para esta curva dosis-respuesta fue  $\rho=0.03$ .

Al igual que en retina, los controles (sin KCl, y/o sin CHH) no presentaron inmunoplasma. La inmunocitoquímica mostró que el 100% de las células con inmunoplasma fueron positivas a CHH y que el 20% de las células que no tenían inmunoplasma fueron positivas a CHH.

## 8. DISCUSIÓN.

Los principales hallazgos de esta tesis son: 1) la localización y cuantificación *in situ* de inmunorreactividad a CHH en las células tapetales de la retina, de terminales nerviosas inmunorreactivas a 5-HT en el OX de la médula terminal y de la inmunorreacción a CHH en los axones y terminales del tracto OX-GS. 2) La localización *in vitro* de células retinianas secretoras de CHH sensibles a la 5-HT.

Los cambios en la cantidad de inmunorreactividad a 5-HT y a la CHH, indica la existencia de ritmos diarios en la presencia y cantidad de 5-HT y CHH. En el órgano-X de la médula terminal la inmunorreactividad a 5-HT y CHH coincide a la misma hora del día.

La inmunorreactividad a 5-HT, localizada en el cono cristalino, en los axones de las células retinulares y en el OX, comprueba resultados previos de nuestro laboratorio (Escamilla-Chimai et al., 1998) y confirma lo reportado para otras especies de crustáceos (Sandeman et al., 1988).

La cuantificación estereológica de la fluorescencia en las diferentes estructuras de los dos estadios de acocil, muestra cambios cíclicos en la cantidad de 5-HT y de CHH. Aunque el análisis de este estudio exploró únicamente tres horas del día, las características de estos cambios indican que las dos neurohormonas participan en los mecanismos responsables de la maduración del ritmo ERG. La amplitud del ritmo ERG del acocil juvenil oscila de manera circadiana alcanzando los valores máximos en la noche. Sin embargo durante los primeros estadios del desarrollo la amplitud ERG muestra oscilaciones ultradianas que en el estadio PO2 están super impuestas en un ciclo circadiano cuya fase máxima se encuentra en el día. Los resultados de esta tesis muestran

como los picos máximos en la cantidad de material inmunorreactivo de ambas neurohormonas están invertidos con respecto a los de los organismos juveniles. Lo anterior coincide con el cambio de 180°, antes señalado y que sucede en los ritmos circadianos de actividad y amplitud ERG cuando el acocil madura al estadio juvenil. Este fenómeno ha sido atribuido a un cambio de comportamiento nictemeral, probablemente debido a mecanismos de maduración que determinan que el acocil cambie del comportamiento diurno del estadio PO2, al comportamiento nocturno del organismo juvenil; (Fanjul-Moles et al., 1987; Fanjul-Moles, 1998).

Otros autores (Castañón-Cervantes et al., 1999) demostraron, en la misma especie, un ritmo circadiano en la concentración de 5-HT que cambia durante el desarrollo. Cuando este ritmo se analizó en condiciones LD 12:12 el estadio PO2 mostró un ritmo unimodal con el zenit a las 20:00, que en los juveniles se hacía bimodal con un zenit a las 04:00 y un segundo pico a las 12:00. Los hallazgos de este estudio se interpretaron como debidos a cambios cíclicos en la actividad de neuronas serotoninérgicas centrales que al modular el complejo OX-GS, modularían los cambios circadianos en amplitud del ritmo ERG. Los cambios cíclicos en la cantidad de 5-HT entre estadios encontrados en esta tesis confirman lo anterior, demostrando la existencia de estructuras serotoninérgicas *in situ* en uno de los posibles marcapasos de este ritmo, el tallo ocular, estructuras que cambian durante el desarrollo y cuya maduración debe estar comprometida con los procesos fisiológicos que determinan el acoplamiento entre el marcapaso y los efectores de la expresión de los ritmos de sensibilidad a la luz.

Gorgels-Kallen y Van Herp (1981) y Gorgels-Kallen y Meij (1985) reportaron la presencia de inmunoreactividad a CHH en un grupo de células neurosecretoras del OX de la médula terminal, así como en el tracto OX-GS y la GS de estadios larvales y post-larvales del acocil *Astacus leptodactylus*. Por otra

parte Georges–Kallen y Meij (1985), trabajando en la misma especie, reportaron un ritmo diario en la secreción de CHH dependiente del OX-GS. Los resultados de esta tesis confirman lo anterior en otra especie de acocil, *Procambarus clarkii*. Sin embargo este es el primer estudio que reporta la presencia de inmunorreactividad a CHH en células de la retina, las células del pigmento reflector, también conocidas como células tapetales. Estudios anteriores sobre el desarrollo del acocil indican que estas células no están claramente diferenciadas ni localizadas antes del estadio PO2, estadio en el cual su localización es ya similar a la que se encuentra en el animal adulto. Existen evidencias crecientes que la reflexión de la luz es únicamente una de las funciones de las células del tapetum y que estas células están ligadas metabólicamente a las células retinulares (Meyer-Rochow, 1999).

Los resultados de este estudio mostraron coincidencias en los cambios cíclicos en la cantidad de 5-HT y CHH en los axones de las células retinulares y las células tapetales, así como entre las células tapetales y el OX de la médula terminal. Estos cambios ocurren con una diferencia de 180° entre ambos estadios estudiados y deben estar también relacionados con los cambios cíclicos en la maduración de los ritmos oculares. Sin embargo, es difícil explicar la coincidencia entre la CHH de las células de la retina y las del OX. Hasta el momento no se ha reportado una comunicación neural o humoral entre ambas estructuras, Odseilius y Elofsson (1981) reportaron que en los crustáceos decápodos la membrana basal es una barrera incompleta hacia la hemolinfa. Estos autores proponen que la porción celular de la membrana basal tiene como función el proporcionar nutrientes y regular el paso de las macromoléculas y de hormonas hacia las células de la retina. Debido a lo anterior se podría especular que la CHH producida por las células del OX podría traspasar esta barrera y entrar en las células tapetales para contribuir a diferentes funciones metabólicas relacionadas

con la sensibilidad del ojo. Otra hipótesis, más interesante es la posibilidad de que las células del tapetum sean las sintetizadoras de la CHH, pues se ha reportado más de una isoforma de CHH en *P. clarkii* (Yasuda et al., 1994). Es interesante el hecho de que recientemente se han demostrado diferentes locus de síntesis de esta hormona como el cordón ganglionar en *H. americanus* (De Kleijn et al., 1995; Reddy et al., 1997), el ganglio cerebroide, los ganglios torácicos y los órganos pericárdicos de *C. maenas* (Keller et al., 1985).

Estudios previos en diferentes especies de acocil han demostrado una correlación entre los cambios cíclicos de la dinámica de secreción de las células productoras de CHH en el OX de la médula terminal y los niveles de glucosa en hemolinfa (Georges-Kallen y Voorter, 1985). Estos estudios indican que la acumulación de material peptidérgico en las células productoras de CHH en el acocil *Astacus leptodactylus* recibe un estímulo 2 h antes del apagado de la luz, de lo que resulta una transferencia de gránulos CHH a los axones del tracto OX-GS. De acuerdo con estos autores los gránulos alcanzan la glándula sinusal después del inicio de la obscuridad, cuando sucede una liberación de CHH a la hemolinfa. Aunque en esta tesis solo se exploraron tres horas parece haber una consistencia entre los resultados de estos autores y los nuestros.

En la etapa juvenil sólo hay un pico de CHH en las células del OX acompañado por una ligera positividad de CHH en el tracto OX-GS a las 8:00 h, una hora después del encendido de la luz, después a las 15:00 h la positividad a CHH en el OX desaparece, pero el tracto OX-GS y la GS presentan un aumento en la inmunorreactividad a CHH (fig. 4 y 5D), lo cual podría indicar que hay una transferencia de CHH a la GS, más tarde a las 20:00 h, una hora después del inicio de la obscuridad, solamente se encuentra positividad a CHH en la GS con un decremento que va del 95.12 al 45.92%, lo cual sugiere que se está dando una liberación a la hemolinfa. Estos resultados coinciden también con los

reportes de Strolenberg et al. (1977) y con los de Kallen et al. (1990). Estos autores reportan hiperglicemia en *Astacus leptodactylus* después del apagado de la luz. Por otra parte hay una coincidencia entre los tiempos encontrados en nuestros resultados y los tiempos reportados para la síntesis y liberación de CHH en el acocil *Orconectes limosus* (Ollivaux y Soyez, 2000).

La colocalización de 5-HT en terminales nerviosas sobre neuronas inmunorreactivas a CHH en el OX, está de acuerdo con los trabajos de otros autores que han reportado resultados similares en diferentes especies de acocil como *Astacus leptodactylus*. Elofsson (1983) y Sandeman et al. (1988) localizaron inmunoreactividad a 5-HT en somas y fibras de la médula terminalis, en donde las células neurosecretoras del OX reciben sus entradas sinápticas (Andrew y Saleuddin, 1978; Andrew, 1983). Por otra parte, se ha demostrado que hay estructuras sinápticas serotoninérgicas entre las células productoras de CHH en el OX del acocil *Astacus leptodactylus* (Van Herp y Kallen, 1991). Aunado a lo anterior se han realizado experimentos en los cuales la inyección de 5-HT produce liberación de CHH en las terminales axónicas de la GS en varios crustáceos (Strolenberg y Van Herp, 1977; Martin, 1978; Kallen, 1988; Chi-Ying et al, 2000). Por lo anterior se podría postular, como lo han propuesto Gorgels-Kallen y Meij (1985) para *Astacus*, que la 5-HT puede inducir la transferencia de gránulos de la MT-OX a la GS vía modulación sináptica en *Procambarus* por medio de mecanismos rítmicos diarios, en donde el estímulo de la 5-HT en la actividad sintética de la CHH, en el OX ocurre entre las 15:00 y 20:00 horas.

Los resultados del ensayo hemolítico inverso refuerzan los experimentos de inmunorreactividad *in situ*, demostrando por primera vez que hay una subpoblación de células retinianas que al ser inmunorreactivas a CHH, secretan este péptido en el acocil *P. clarkii*. Por otra parte, sustentan experimentos anteriores que han demostrado la secreción de CHH en el OX de otras especies

de acocil (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981; Gorgels-Kallen y Voorter, 1984; Gorgels-Kallen y Meij, 1989; Van Herp, 1998), demostrándolo por primera vez en *P. clarkii*. En este trabajo la regulación serotoninérgica de la secreción de CHH, en las células disociadas del pedúnculo ocular, como lo demuestran los cambios en el área de la inmunoplaaca, en el porcentaje y en el índice de secreción de CHH en forma dosis dependiente a la concentración de 5-HT coincide con lo reportado por Tensen y colaboradores (1991). Estos autores proponen que la 5-HT está relacionada con la liberación de sustancias peptidérgicas de la GS en los crustáceos (CHH) y va acorde con lo reportado para el acocil *Astacus leptodactylus*, en el que la liberación de CHH del órgano-X depende de la 5-HT (Strolenberg y Van Herp, 1977; Van Herp y Strolenberg, 1980). Por otra parte nuestros resultados coinciden con otros estudios realizados en *Procambarus clarkii*, en los cuales se ha demostrado que una hora después de haber inyectado 5-HT en el acocil, la glucosa alcanza su máxima concentración en hemolinfa (Chi-Ying et al., 2000).

La discrepancia entre las curva dosis respuesta 5-HT-CHH en las células de retina y las de pedúnculo ocular (Fig. 12), aunque especulativo podría deberse a características cinéticas de la respuesta distintas en las dos estructuras estudiadas, lo que sugiere diferencias en las características de receptores a CHH, que como se señaló anteriormente la CHH puede presentar al menos dos isoformas. Sin embargo, estos resultados muestran que muy probablemente la 5-HT esté jugando un papel muy semejante tanto en el complejo OX-GS como en retina.

Es interesante señalar que el RHPA es una técnica que solamente se había realizado en cultivo celular de mamíferos, en particular en ratas. El haber podido llevar a cabo esta técnica en cultivos celulares de invertebrados, en particular en el acocil, permitirá realizar muchos otros experimentos para tratar de entender y dilucidar muchos otros aspectos de la biología y en particular de la neurofisiología de estos organismos.

## 9. CONCLUSIONES.

Las técnicas de cuantificación de inmunorreactividad *in situ* permiten concluir:

1.- La 5-HT y la CHH presentan cambios diarios en la cantidad de inmunorreactividad, en la retina y en el complejo XO-SG.

2.- Los cambios colocalizados en la inmunorreactividad a la 5-HT y CHH encontrados en las estructuras marcapaso indican la expresión de ritmos diarios.

3.- Los cambios temporales en 5-HT y CHH en las dos etapas del desarrollo sugieren que estos ritmos son de naturaleza circadiana.

4.- La técnica de RHPA nos muestra que en la retina y el pedúnculo ocular existen células secretoras de CHH.

5.- Los resultados encontrados con el RHPA, en los que se usaron varias concentraciones de 5-HT permiten concluir que la 5-HT modula la secreción de CHH.

6.- Por lo anterior podemos proponer que los estadios PO2 y juvenil del acocil *Procambarus clarkii*, son marcadores de la maduración del sistema circadiano y que la 5-HT es un modulador de este sistema, función en la que probablemente también esté involucrada la CHH. Por lo tanto las hipótesis fueron confirmadas.

## 10. LITERATURA CITADA.

- AGUILAR-GARCÍA A. La Suposición de Homocedasticidad en el Modelo de la Regresión Lineal. (Tesis, Actuaría). Facultad de Ciencias, UNAM. 1981.
- ANDREWS EA. (1907). The Attached Young of the Crayfish *Cambarus clarkii* and *Cambarus diogenes*. *Am. Nat.* 40:343-356.
- ANDREW RD, SALEUDDIN ASM. (1978). Structure and Innervation of a Crustacean Neurosecretory Cell. *Can. J. Zool.* 56:423-430.
- ANDREW RD. (1983). Neurosecretory Pathways Suppling the Neurohemal Organs in Crustacea. En: *Neurohemal Organs of Arthropods: Their Development, Evolution, Structure, and Functions*. (ed. Gupta, AP). Springfield, IL:Charles C. Thomas. pp. 90-117.
- ARÉCHIGA H. (1977). Modulation of Visual Input in the Crayfish. En: *Identified Neurons and Behavior in Arthropods*. (ed. Hoyle G). Plenum Press, New York. pp. 387-403.
- ARÉCHIGA H, BAÑUELOS E, FRIXIONE E, PICONES A, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1990). Modulation of Crayfish Retinal Sensitivity by 5-Hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150:123-143.
- ARÉCHIGA H, FERNÁNDEZ-QUIRÓZ F, FERNÁNDEZ DE MIGUEL F RODRÍGUEZ-SOSA L. (1993). The Circadian System of Crustaceans. *Chronobiol. Int.* 10(1):1-19.
- ARÉCHIGA H, FUENTES B. (1970). Correlative Changes Between Retinal Shielding Pigments Position and Electroretinogram in Crayfish. *Physiologist.* 13:137.
- ARÉCHIGA H, YANAGISAWA K. (1973). Inhibition of Visual Units in the Crayfish. *Vision Res.* 13:731-744.

- ASCHOFF J. (1981). A Survey on Biological Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4 Biological Rhythms. (ed. Aschoff J). Plenum Press, New York and London. pp. 3-10.
- BARLOW RB, BOLANOWSKI SJ, BRACHMAN ML. (1977). Efferent Optic Nerve Fibers Mediate Circadian Rhythms in *Limulus* Eye. *Science*. 197:86-89.
- BARTLETT MS. (1937). Some Examples of Statistical Methods of Research in Agriculture and Applied Biology. *J Roy Stat Soc Suppl* 4, pp. 121.
- BELTZ BS, KRAVITZ EA. (1983). Mapping of Serotonin-Like Immunoreactivity in the Lobster Nervous System. *J. Neuroscience*. 3(3):585-602.
- BELTZ BS, KRAVITZ EA. (1987). Physiological Identification, Morphological Analysis, and Development of Identified Serotonin-Proctolin Containing Neurons in the Lobster Ventral Nerve Cord. *J. Neuroscience*. 7(2):533-546.
- CASTAÑÓN-CERVANTES O, LUGO C, AGUILAR M, GONZALEZ-MORAN G, FANJUL-MOLES ML. (1995). Photoperiodic Induction on the Growth Rate and Gonads Maturation in the Crayfish *Procambarus clarkii* During Ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A:139-146.
- CASTAÑÓN-CERVANTES O, BATTELLE BA, FANJUL-MOLES ML. (1999). Rhythmic Changes in the Serotonin Content of the Brain and Eyestalk of Crayfish During Development. *J. Exp. Biol.* 202:2823-2830.
- CHANG ES, KELLER R, CHANG SA. (1998). Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. *Gen. Comp. Endocrin.* 111(3):359-366.
- CHARMANTIER-DAURES M, CHARMANTIER G, JANSSEN KPC, AIKEN DE, VAN HERP F. (1994). Involvement of Eyestalk Factors in the Neuroendocrine Control of Osmoregulation in Adult American Lobster *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94:281-293.

- CHI-YING L, SHIOU-MEI Y, CHING-SHEYEN L, WEN-JR H. (2000). Serotonergic Regulation of Blood Glucose Levels in the Crayfish, *Procambarus clarkii*: Site of Action and Receptor Characterization. *J. Exp. Zool.* 286:596-605.
- COOKE IM, SULLIVAN RE. (1982). Hormones and Neurosecretion. En: *Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, New York. pp. 205-290.
- COOPER JR, BLOOM FE, ROTH RH. (1996). Serotonin (5-Hydroxytryptamine) and Histamine. En: *The Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York, USA. pp. 352-409.
- CRONIN LE. (1947). Anatomy and Histology of the Male Reproductive System of *Callinectes sapidus* Rathbun. *J. Morphol.* 81:209-239.
- DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP RG. (1993). Bioestadística Médica. El Manual Moderno, S. A. Trad. QFB Carsolio Pacheco MR. México, D. F.
- DE KLEIJN DPV, DE LEEUW EPH, VAN DEN BERG MC, MARTENS GJM, VAN HERP F. (1995). Cloning and Expression of two mRNAs Encoding Structurally Different Hyperglycemic Hormone Precursors in the Lobster *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1260:62-66.
- ELOFSSON R, DAHL E. (1970). The Optic Neuropiles and Chiasmata of Crustacea. *Z. Zellforsch.* 107:343-360.
- ELOFSSON R, LAXMYR L, ROSENGREN E, HANSSON CH. (1982). Identification and Quantitative Measurements of Biogenic Amines and Dopa in the Central Nervous System and Haemolymph of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comp Biochem Physiol*, 71C(2):195-201.
- ELOFSSON R, ODSELIUS R. (1975). The Anostracan Rhabdom and the Basement Membrane. An Ultrastructural Study of the *Artemia* Compound Eye (Crustacea). *Acta Zoologica (Stockolm)*. 56:141-153.

- ELOFSSON R. (1983). 5-HT-Like Immunoreactivity in the Central Nervous System of the Crayfish, *Pacifastacus lemniscus*. *Cell Tissue Res.* 232:221-236.
- ENRIGHT JT. (1981). Metodology. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4. Biological Rhythms. (ed. Aschoff J). Plenum Press, New York. pp. 11-20.
- ESCAMILLA-CHIMAL EG, GARCÍA-RIVERA CC, AGUILAR-MORALES M, ROMERO-DÍAZ VJ, FANJUL-MOLES ML. (1998). The Retina of Crayfish *Procambarus clarkii* during Development Show Serotonin and Tryptophan Hydroxylase-like Immunoreactivity Daily Changes. *Biological Rhythm Research.* 29(5):471-479.
- ESCAMILLA-CHIMAL EG, VAN HERP F, FANJUL-MOLES ML. (2001). Daily Variations in Crustacean Hyperglycemic Hormone and Serotonin (5-HT) Immunoreactivity During the Development of Crayfish. *J. Exp. Biol.* 204:(en prensa).
- ESKIN A, LIN C, McADOO J. (1982). "Mechanisms of Shifting the Phase of a Circadian Rhythm by Serotonin: Involvement of cAMP". *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, pp. 660-664.
- FANJUL-MOLES ML, MIRANDA-ANAYA M, FUENTES-PARDO B. (1992). Effect of Monochromatic Light upon the ERG Circadian Rhythm During Ontogeny in Crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A(1):99-106.
- FANJUL-MOLES ML, MORENO-SAENZ E, VILLALOBOS-HARIART N, FUENTES-PARDO B. (1987). ERG Circadian Rhythm in the Course of Ontogeny in Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A(2):213-219.
- FANJUL-MOLES ML. (1998). Ontogenetic Study of a Circadian Rhythm in Crayfish: Clock Pacemaker and Entrainment. *Trends in Comp. Biochem. Physiol.* 5:153-160.
- FINGERMAN M. (1966). Neurosecretory Control of Pigmentary Effectors in

- Crustaceans. *Am. Zool.* 6:169-179.
- FINGERMAN M. (1997). Crustacean Endocrinology: A Retrospective, Prospective, and Introspective Analysis. *Physiol. Zool.* 70(3):257-269.
- FRIXIONE E, HERNÁNDEZ J. (1989). Modulation of Screening-Pigment Position in Crayfish Photoreceptors by Serotonin: Possible involvement of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Activity. *J. Exp. Biol.* 143:459-473.
- FUENTES-PARDO B, FANJUL-MOLES ML, MORENO-SÁENZ E. (1992). Synchronization by Light of the ERG Circadian Rhythm During Ontogeny in the Crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 23(2):81-91.
- GHIDALIA W. (1985). Structural and Biological Aspects of Pigments. En: *The Biology of Crustacea* Vol. 9. Integument, Pigments, and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press Inc, New York. pp. 301-394.
- GODDARD JS. (1988). Food and Feeding. En: *Freshwater Crayfish. Biology Management and Exploitation*. Part I: General Biology. (eds. Holdich DM, Lowery RS). Timber Press. pp. 145-166.
- GOLDBERG JI, KARTER SB. (1989). Expression and Function of the Neurotransmitter Serotonin During Development of the *Helisoma* Nervous System. *Develop. Biol.* 131:483-495.
- GOLDBERG JI, NATVIG P, KATER SB. (1986). Embryonic and Postembryonic Development of the Serotonine Phenotype in *Helisoma*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12:1163.
- GORGELS-KALLEN JL, MEIJ TA. (1989). Immunocytochemical Study of the Hyperglycemic Hormone (CHH)-Producing System in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus* During Larval and Postlarval Development. *J. Morphol.* 183:155-163.
- GORGELS-KALLEN JL, VAN HERP F. (1981). Localization of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the X-organ Sinus Gland Complex in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). *J.*

- Morphol.* 170:347-355.
- GORGELS-KALLEN JL, VOORTER CHEM. (1984). Secretory Stages of Individual CHH-Producing Cell in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus*, Determined by Means of Immunocytochemistry. *Cell Tissue Res.* 237:291-298.
- GORGELS-KALLEN JL, VOORTER CHEM. (1985). The Secretory Dynamics of the CHH-Producing Cell Group in the Eyestalk of the Crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the Course of the Day/Night Cycle. *Cell Tissue Res.* 241: 361-366.
- GOUNDERSEN HJG, BENTSEN TF, KORBO L, MARCUSSEN N, MOLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, SORENSEN FB, VESTERBY A, WEST MJ. (1988). Some New, Simple and Efficient zstereological Methods and their Use in Pathological Research and Diagnosis. *APMIS.* 96:379-394.
- HAFNER GS, TOKARSKI T, HAMMOND-SOLTIS G. (1982). Development of Crayfish Retina: a Light and Electron Microscopic Study. *J. Morphol.* 173:101-120.
- HALBERG F, ENGELI M., HAMBURGER C., HILLMAN D. (1965). Spectral Resolution of Low-Frequency, Small Amplitude Rhythms in Excreted 17-Ketosteroid; Probable Androgen-Induced Circaseptan Desynchronization. *Acta Endocrinol*, Suppl. 103.
- HAMANN A. (1974). Die Neuroendokrine Steuerung Tagesrhythmischer Blutzuckerschwankungen Durch die Sinusdruse beim Flusskrebs. *J. Comp. Physiol.* 89:197-214.
- HIRIART M, RAMÍREZ-MEDELES MC. (1991). Functional Subpopulations of Individual Pancreatic B-Cell in Culture. *Endocrinol.* 128(6):3193-3198.
- HOGGER JB. (1988). Ecology, Population Biology and Behaviour. En: *Freshwater Crayfish. Biology, Management and Exploitation.* Part I: General Biology. (eds. Holdich DM, Lowery RS). Timber Pres. p. 114-144.

- HOWARD CV, REED MG. (1998). Unbiased Stereology. Bios Scientific Publisher. Springer.
- KALLEN JL. (1988). Quelques Espects de la Régulation du Systeme Neuroendocrine Produisant la CHH et de la Relation entre le Rythme Circadien et la Glycemie. En: *Aspects Récents de la Biologie des Crustacés. Actes de Colloques*, 8 (eds. Le Gal Y, Van Wormhoudt A). Plozané: IFREMER. pp. 105-107.
- KALLEN JL, ABRAHAMSE SL, VAN HERP F. (1990). Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.* 179:351-357.
- KALLEN JL, RIGIANI N, TROMPENAARS HJAJ. (1988). Aspects of Entrainment of CHH Cell Activity and Hemolymph Glucose Levels in Crayfish. *Biol. Bull.* 175:137-143.
- KELLER R. (1992). Crustacean Neuropeptides: Structures, Functions and Comparative aspects. *Experientia*. 48:439-448.
- KELLER R, JAROS PP, KEGEL G. (1985). Crustacean Hyperglycemic Neuropeptides. *Am. Zool.* 25:207-221.
- KELLER R, SEDLMEIER D. (1988). A Metabolic Hormone in Crustaceans: the Hyperglycemic Neuropeptide. En: *Endocrinology of Selected Invertebrate Types* (eds. Laufer EH, Downer RGH). Alan R. Liss, New York USA. pp. 315-326.
- KLEINHOLZ LH, KELLER R. (1973). Comparative Studies in Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21:554-564.
- KLEINHOLZ LH, KIMBALL F, MCGARVEY M. (1967). Initial Characterization and Separation of Hyperglycemic (Diabetogenic) Hormone from the Crustacean Eyestalk. *Gen. Comp. Endocrinol.* 8:75-85.
- KLEINHOLZ LH. (1985). Biochemistry of Crustacean Hormones. En: *The*

- Biology of Crustacea*. Vol. 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, New York. pp. 464-522.
- KNOWLES FG. (1953). Endocrine Activity in the Crustacean Nervous System. *Proc. R. Soc. London, Ser. B*. 141B:248-267.
- KULKARNI GK, FINGERMAN M. (1992). Quantitative Analysis by Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography of Serotonin in the Brain of the Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* 182:341-347.
- LARIMER JL, SMITH TF. (1980). Circadian Rhythm of Retinal Sensitivity in Crayfish: Modulation by the Cerebral and Optic Ganglia. *J. Comp. Physiol.* 136:313-326.
- MARTIN G. (1978). Action de la Sérotonine sur la Glycémie et sur la Libération des Néurosecrétions Contenues Dans la Glande du Sinus de *Porcellio dilatatus*. Brandt (Crustacé, Isopode, Onisocoïde). *C. R. Soc. Biol.* 172:304-308.
- MAYNARD DM. (1965). Integration in Crustacean Ganglia. *Symp Soc Exp Biol*, 20:111-149.
- MAYNARD DM. (1962). Organization of Neuropil. *Zoologist*. 2:79-96.
- McGEER PL, ECCLES SJC, McGEER EG. (1987). Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain. New York USA, Plenum Press.
- MEYER-ROCHOW VB. (1999). Compound Eye: Circadian Rhythmicity, Illumination, and Obscurity. En: *Atlas of Arthropod Sensory Receptors* (eds. Eguchi E, Tominaga Y). Springer-Verlag, Tokio. pp. 97-124.
- NADAKAVUKAREN JJ, LICKEY ME, JORDAN WP. (1986). Regulation of the Circadian Clock in the *Aplysia* Eye: Mimicry of Neural Action by Serotonin. *J. Neurosci.* 6:14-21.
- NASSEL DR. (1992). The Retina and Retinal Projection on the Lamina Ganglionaris of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Neurol.* 167:341-360

- NEILL JD, FRAWLEY LS. (1983). Detection of Hormone Release from Individual Cells in Mixed Populations Using a Reverse Hemolytic Plaque Assay. *Endocrinol.* 112:1135-1137.
- NICHOLLS GJ, MARTIN AR, WALLACE BC. (1992). From Neuron to Brain. 3ed. *Sinaver Associates, Inc.* Suderland, Massachusetts U.S.A.
- ODSELIUS R, ELOFSSON R. (1981). The Basement Membrane of the Insect and Crustacean Compound Eye: Definition, Fine Structure, and Comparative Morphology. *Cell Tissue Res.* 216:205-214.
- OLLIVAUX C, SOYEZ D. (2000). Dynamics of Biosynthesis and Release of Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms in the X-Organ-Sinus Gland Complex of the Crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267:5106-5114.
- PAGE TL, LARIMER JL. (1975). Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. II. The Locomotor Activity Rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:59-80.
- PITTENDRIGH CS, MINIS DH. (1964). The Entrainment of Circadian Oscillations by Light and Their Role as Photoperiodic Clocks. *Am. Nat.* 98(902):261-294.
- PRIESTLEY JV. (1997). Immunocytochemical Techniques for the Study of the Nervous System. En: *Neurochemistry* (eds. Turner AJ, Bachelard HS). Oxford University Press, Oxford. pp. 71-120.
- RAO KR. (1985). Pigmentary Effectors. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, New York. pp. 395-463.
- REDDY PS, PRESTWICH GD, CHANG ES. (1997). Crustacean Hyperglycemic Hormone Gene Expression in the lobster *Homarus americanus*. En: *Advances in Comparative Endocrinology*. Vol 1. (eds. Kawashima S, Kikuyama S). Moduzzi Editore, Bologna. pp. 51-56.
- REINBERG A, SMOLENSKY M. (1993). Introduction to Cronobiology. En: *Biological Rhythms and Medicine*. (eds. Reinberg A, Smolensky M).

- Springer-Verlag, New York. pp. 1-21.
- RODRÍGUEZ-SOSA L, VEGA MT, ARÉCHIGA H. (1994). Circadian Rhythm of Content of Red Pigment-Concentrating Hormone in the Crayfish Eyestalk. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C(1):101-108.
- RUDOLPH PH, SPAZIANI E. (1990). Distribution of Serotonergic Neurons in the Eyestalk and Brain of the Crab, *Cancer antennarius*. *Comp. Biochem. Physiol.* 97C(2):241-245.
- SÁENZ F, GARCÍA U, ARÉCHIGA H. (1997). Modulation of Electrical Activity by 5-Hydroxytryptamine in Crayfish Neurosecretory Cells. *J. Exp. Biol.* 200:3079-3090.
- SANDEMAN DC. (1982). Organization of the Central Nervous System. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, New York. pp. 1-62.
- SANDEMAN DC, SANDEMAN RE, AITKEN AR. (1988). Atlas of Serotonin-Containing Neurons in the Optic Lobes and Brain of the Crayfish *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* 269:465-478.
- SANDEMAN RE, SANDEMAN DC. (1990). Development and Identified Neural System in the Crayfish Brain. *Front. Crust. Neurobiol.* 498-508.
- SANTOS EA, KELLER R. (1993). Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) and the Regulation of Carbohydrate Metabolism: Current Perspective. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:405-411.
- SCHWARTZ JH. (1985). Chemical Messengers: Small Molecules and Peptides. En: *Principles of Neural Science*. (eds. Kandel ER, Schwartz JH). Elsevier Science Publishers B.V, New York USA. pp. 148-158.
- SHAW SR, STOWE S. (1982). Photoreception. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman D). Academic Press, New York. pp. 292-356.
- SHIVERS RR. (1967). Fine Structure of Crayfish Optic Ganglia. *The University*

of *Kansas Science Bulletin*. XLVII(10):677-733.

- SKINNER DM. (1985). Molting and Regeneration. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, New York. pp. 44-146.
- SOUTHARD RC, HAGGARD J, CRIDER ME, WHITEHEART SW, COOPER RL. (2000). Influence of Serotonin on the Kinetics of Vesicular Release. *Brain Research*. 871:16-28.
- STROLENBERG GECM, VAN HELDEN HPM, VAN HERP F. (1977). The Ultrastructure of the Sinus Gland of the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann). *Cell Tissue Res*. 180:203-210.
- STROLENBERG GECM, VAN HERP F. (1977). Mise en Évidence du Phénomène d' Exocytose dans la Glande du Sinus d' *Astacus leptodactylus* (Nordmann) sous l' Influence d' Injections de Sérotonine. *Acad. Sci. Paris* 284D:5760.
- SUKÔ T. (1953). Studies on the Development of the Crayfish I. The Development of Secondary Sex Characters in Appendages. *Sci. Rep. Saitama Univ.* 1(2):78-97.
- SUKÔ T. (1954). Studies on the Development of the Crayfish. II The Development of Eggs-Cell Before Fertilization. *Sci Rep Saitama Univ.* 1(2):77-96.
- TENSEN CP, COENEN T, VAN HERP F. (1991). Detection of mRNA Encoding Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Eyestalk of the Crayfish *Orconectes limosus* Using Non-Radioactive In Situ Hybridization. *Neurosc. Letters*. 124:178-182.
- THOMPSON E. (1930). Quantitative Microscopic Analysis. *J. Geol.* 38:193.
- VAN HERP F, KALLEN JL. (1991). Neuropeptides and Neurotransmitters in the X-Organ Sinus Gland Complex, an Important Neuroendocrine Integration Center in the Eyestalk of Crustacea. En: *Comparative Aspects of Neuropeptides Functions* (eds. Stefano GB, Florey E). Manchester

- University Press, Manchester. pp. 211-221.
- VAN HERP F, STROLENBERG GECM (1980). Functional Aspects of the Neurosecretory System in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus* Whit Special Reference to the Hyperglycemic Hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40,abs 364 .
- VAN HERP F. (1998). Molecular Cytological and Physiological Aspects of the Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* (eds. Coast GM, Webster SG). Cambridge University Press, U.K. pp. 53-70.
- WALKER RJ, HOLDEN-DYE L. (1989). Commentary on the Evolution of Transmitters, Receptors and Ion Channels in Invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 93A(1):25-39.
- WEBSTER SG. (1998). Neuropeptides Inhibiting Growth and Reproduction in Crustaceans. En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology. Society for Experimental Biology Seminar Series, Vol.56* (eds. Coast GM, Webster SC). Cambridge University Press, U.K. pp. 33-51.
- WELSH JH. (1930). Diurnal Rhythms of the Distal Pigment Cell in the Eyes of Certain Crustaceans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 16:386-395.
- YASUDA A, YASUDA Y, FUJITA T, NAYA Y. (1994). Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Crayfish (*Procambarus clarkii*) Multiplicity of Molecular Forms by Stereo-inversion and Diverse Function. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:387-398.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**11. APÉNDICE. Publicación en revista internacional arbitrada.**

3124

Manuscript page	MS order	Page total	Reprints
45			

The Journal of Experimental Biology 204 000-000 (2001)  
 Printed in Great Britain © The Company of Biologists Limited 2001  
 JEB3124

Please return this Proof and your Manuscript.  
 (Keep a photocopy of your proof for reference)

1

## DAILY VARIATIONS IN CRUSTACEAN HYPERGLYCAEMIC HORMONE AND SEROTONIN IMMUNOREACTIVITY DURING THE DEVELOPMENT OF CRAYFISH

ELSA G. ESCAMILLA-CHIMAL<sup>1</sup>, FRANÇOIS VAN HERP<sup>2</sup> AND MARÍA-LUISA FANJUL-MOLES<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Lab. Neurofisiología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 41-630, CP 11000 México, DF México and <sup>2</sup>Moleculaire Dierfysiologie, Faculteit der Wetenschappen, Katholieke Universiteit, Toernooiveld, 6525 ED Nijmegen, The Netherlands

\*Author for correspondence (e-mail mlfm@hp.fciencias.unam.mx)

Accepted 15 December 2000

### Summary

The present study investigated changes in crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) and serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) immunoreactivity in the retina and the X-organ/sinus gland complex (XO-SG) of the crayfish *Procambarus clarkii* at two developmental stages, post-embryonic stage two (PO2) and the juvenile stage, at three different times of day, under a photoperiod cycle of 12h:12h L:D, using qualitative and quantitative immunohistochemical methods. In the retina, CHH immunoreactivity is located in the tapetal cells, while 5-HT immunoreactivity is found in the retinal cells. In the XO-SG, CHH-immunoreactivity is localized to the CHH-producing cell perikarya and in their axons and endings in the sinus gland, while 5-HT immunoreactivity is restricted to axon endings branching into the perikarya of the CHH-

producing cells. A stereological analysis demonstrates that the PO2 and juvenile stages show significant differences in the amount of the immunoreactive CHH and 5-HT material at the three selected time points, indicating daily and related changes in the levels of CHH and 5-HT in the XO-SG and the retina. Our findings therefore support the idea that daily rhythms in the secretory activity of the XO-SG complex affect the circadian sensitivity of the eye. Furthermore, the differences found between the PO2 and juvenile stages suggest that both CHH and 5-HT are key factors in the development of the circadian rhythm of retinal sensitivity.

Key words: crustacean, *Procambarus clarkii*, hyperglycaemic hormone, serotonin, crayfish, immunoreactivity, development.

### Introduction

It has been proposed that serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a circadian modulator of the visual system of invertebrates (Nadakovskan et al., 1986). In Crustacea, particularly in adult crayfish (*Procambarus clarkii*), the daily secretions of different neurohormones in the X-organ/sinus gland complex (XO-SG) seem to affect the circadian sensitivity of the eye (for a review, see Aréchiga et al., 1993). Interestingly, Kulkarni and Fingerman (Kulkarni and Fingerman, 1992) have suggested that there may be interactions between 5-HT, light and some neurohormones, such as red pigment dispersing hormone and distal retinal pigment light-adapting hormone. The crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) is a well-studied hormone synthesized and released by the XO-SG (for a review, see Van Herp, 1998), and circadian changes in its secretion that correlate with a circadian blood glucose rhythm (Hamann, 1974) have been reported in different species of crayfish (Kallen et al., 1988). However, the role of this hormone in the mechanisms underlying the sensitivity of the circadian rhythm of the eye of *Procambarus clarkii* have not been explored, and we still lack data on possible interactions between CHH and 5-HT.

One approach to investigating this interaction is an ontogenetic study of the daily changes in levels of both hormones. Previous developmental studies on various crayfish circadian rhythms have shown that two particular stages of development, the second post-embryonic stage (PO2) and the juvenile stage, are key stages in the final maturation and expression of several circadian rhythms, e.g. the electroretinogram (ERG) circadian rhythm (Fanjul-Moles et al., 1987), the locomotor circadian rhythm (for a review, see Fanjul-Moles, 1998) and the 5-HT circadian rhythm (Castañón-Cervantes et al., 1999). Changes in the parameters of these rhythms, such as period, phase and amplitude, occur between the PO2 and juvenile stages and may be considered as maturation markers of the effectors responsible for the overt rhythm and of their coupling to the pacemakers. In the case of the ERG rhythm, these effectors are the photoreceptors in the eye, the sensitivity of which depends on the neurohormones released from the XO-SG (Fanjul-Moles et al., 1987). One of these neurohormones could be CHH, although there are no reports indicating its presence in the eyestalk of *Procambarus clarkii* during ontogeny. However Gorgels-Kallen and Meij (Gorgels-Kallen and Meij, 1985) have described an increase in

See  
 vis.

al

al

a/

1/1

the number of CHH-immunopositive cells in the XO-SG complex during post-larval development of the crayfish *Astacus leptodactylus* and an increase in haemolymph glucose concentration in adult crayfish after injection of an extract of larval eyestalks. On the basis of these results, these authors proposed that a hyperglycaemic factor is present in the eyestalk of *Astacus leptodactylus* immediately after hatching, and that levels of this factor subsequently increase during development. Hence, the present study aimed to investigate (i) whether CHH and 5-HT are present in the major structures involved in the ERG circadian rhythm (the XO-SG complex and the retina) and (ii) whether the daily variations in 5-HT immunoreactivity, reported elsewhere for the retina (Escamilla-Chimal et al., 1998), also occur in the XO-SG complex and are related to daily variations in CHH immunoreactivity within the same structures. Differences between PO2 and juvenile crayfish may indicate that CHH and 5-HT are involved in the mechanisms underlying the ERG circadian rhythm. This study was performed in the two post-embryonic stages considered as essential in the development of crayfish, the PO2 and juvenile instars. It is between these two stages that the maturation of the overt circadian rhythms occurs

## Materials and methods

### Animals and experimental design

*See ms.* *Procamburus clarkii* (24 animals), born and raised in our laboratory from different mothers, were maintained under identical light:dark cycles (L:D 12h:12h, lights on at 07 00 h) and temperature (20–22 °C). The animals were separated into two developmental groups according to previous criteria (Fanjul-Moles, 1998): 12 post-embryonic stage two instars (PO2; 10–14 days old) and 12 juveniles (2 months old). Four specimens of each group were selected at random at three times of day: 08 00, 15 00 and 20:00 h. At each time point, they were adapted to darkness for 30 min and then anaesthetized on ice. The optic lobes were dissected and fixed in 10 % formaldehyde in 0.1 mol l<sup>-1</sup> phosphate buffer (PBS) for 12 h.

### Histological procedures

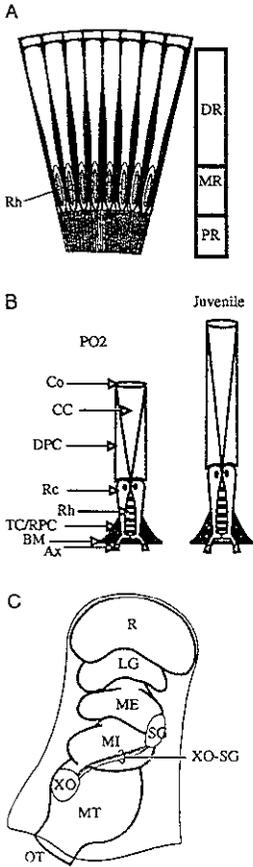
The fixed material was routinely treated and embedded in Paraplast. Both eyestalks of each specimen were sectioned longitudinally (4 µm thick) with a calibrated microtome. Serial sections were collected, mounted on gelatin-coated glass slides and rehydrated. As a first approach to localizing CHH and 5-HT, one specimen of PO2 and one of the juvenile stage per time point were processed for immunohistochemistry according to the ABC method (Priesley, 1997) using one eyestalk to visualize each antigen. To localize CHH, sections were incubated for 18 h at 4 °C with the primary antiserum, a rabbit polyclonal anti-*Astacus*-CHH serum (Gorgels-Kallen and Van Herp, 1981) diluted 1:500 in PBS. They were then rinsed in PBS, incubated with a biotinylated anti-rabbit IgG for 20 min, labelled with alkaline phosphatase/streptavidin substrate complex (Biogenex), and finally rinsed in PBS and stained with Fast Red and Mayer's haematoxylin. The 5-HT-

immunoreactive structures were visualized using the same ABC method, but these tissues were incubated in a polyclonal rabbit 5-HT serum (1:80 dilution) as described elsewhere (Escamilla-Chimal et al., 1998). These procedures were performed simultaneously in pairs of control tissues without the primary antibody. The sections were mounted in Vikel under glass coverslips. To localize the immunoreactive material, the cells and fibres of the retina and XO-SG were studied by light microscopy.

To quantify CHH and 5-HT immunoreactivity, a double immunofluorescence technique was applied to each eyestalk of the remaining 18 specimens. The sections were incubated for 18 h at 4 °C in monoclonal mouse anti-5-HT serum (Dako, dilution 1:10) and polyclonal rabbit anti-*Astacus*-CHH serum (dilution 1:500). To visualize the primary immunoreactions, the sections were incubated for 2 min at 59 °C and then for 6 h in goat anti-mouse FITC (Dako, dilution 1:10) and for 1 h in goat anti-rabbit Texas Red (Rockland, 1:50) at room temperature. The slices were preserved with fluorescent mounting medium (Dako). The specificity of the immunoreaction was tested using two methods: (i) control sections were treated in the same way, except that the primary antiserum was omitted, and (ii) sections were treated by preadsorption of the 5-HT antiserum with an excess of 5-HT/creatinine sulphate complex (Sigma; 500 µg ml<sup>-1</sup>) or by preadsorption of the CHH antiserum with a crude extract of the sinus gland of *P. clarkii* (Kleinholz et al., 1967).

### Stereological image analysis and quantification

One series of at least three consecutive sections was selected from each eyestalk of all the PO2 stage and juvenile specimens and examined for double immunofluorescence. The first section was selected at random, and the second and third sections were subsequently taken with a sampling distance of five sections between them. The immunofluorescent double-labelled sections were studied with a Nikon epifluorescent microscope (Labophot 2). From each histological section, three video images of each of the structures described below were captured, using the ×40 objective, and digitized by means of a Hamamatsu, Argus 20 image processor system, relayed to a PC via a Buzz video capture system, captured with MGI Video Wave software and further analyzed stereologically using Sigma Scan Pro (Jandel, version 3.0). Total retinal area was divided into the regions shown in the inset of Fig. 1A and described elsewhere (Escamilla-Chimal et al., 1998): proximal (PR, basal membrane and retinal cells axons), medial (MR, tapetal cells, reticular cells and rhabdoms) or distal (DR, distal tip of rhabdoms, crystalline cone cells and cone roots). These three regions of the retina, as well as the sinus gland, the XO-SG tract and the medulla terminalis/X-organ (MT-XO) were assessed on coded eyestalk, with experimental conditions unknown to the observer. The volume fraction of green (5-HT) or red (CHH) fluorescent material in each of these structures was estimated using the point counting technique (Gundersen et al., 1988). Briefly, the total area of each of the structures was defined as the reference space where the boundaries of the



See ms. /  
See ms.  
Fig 1. (A) Schematic representation of a set of ommatidia and reticular cell axons PR, proximal region, MR, medial region, DR distal region, Rh, rhabdom (B) Comparison of the ommatidia typical of post-embryonic stage two (PO2) and juvenile crayfish. Note the elongation of the dioptric system and the increase in size of the main rhabdom in juveniles Co, cornea, CC, crystalline cone, DPC, distal pigment cell, RC, reticular cell, Rh, rhabdom, TC, tapetal cell, RPC, reflecting pigment cell, BM, basement membrane, Ax, reticular cell axon (C) The eyestalk of a juvenile crayfish R, retina, LG, lamina ganglionaris, ME, medulla externa, MI, medulla interna, MT, medulla terminalis, SG, sinus gland; XO, X organ, XO-SG X-organ-sinus gland tract, SG, sinus gland, OT, optic tract

fluorescent regions of interest were outlined, and the volume fraction ( $V_v$ ) of 5-HT and CHH immunoreactivity for each structure was estimated according to the method of Thompson (Thompson, 1930) using the equation:

$$\hat{V}_v(Y.ref) = L_p(Y.ref) = P(Y)/P(ref),$$

See ms

where  $P(Y)$  is the number of points contacting the phase of interest,  $P(ref)$  is the number of points hitting the reference space,  $L_p$  is (to be defined) and  $(Y.ref)$  is (to be defined). Point counting is used to estimate areas, which are themselves estimators of volumes (Howard and Reed, 1998). In the present study, the volume fraction expresses the relative amount of CHH- or 5-HT-immunoreactive material in each of the structures. The criterion for selecting the immunoreactivity targets was a minimum ratio of background (black, 0 pixels) to green fluorescence (150 pixels) and red fluorescence (200 pixels). The results were verified using a Nikon confocal microscope (MRC 2100). Data are presented as the mean and the standard deviation (S.D.) of the immunofluorescent volume fraction, expressed as a percentage. For statistical analysis, analysis of variance (ANOVA) was followed by Scheffé *post-hoc* comparisons.

Results

Qualitative analysis

Light microscope localization revealed that CHH immunoreactivity was localized not only in the XO-SG complex but also in basally located tapetal cells of the retina (see Fig. 2). In both developmental stages, the immunopositive CHH perikarya in the eyestalk form a distinct group that lies at the latero-ventral side of the medulla terminalis (MT). The axons originating from these cells form an immunopositive tract that runs up to the sinus gland (SG), where CHH immunoreactivity is observed. Interestingly, only the basally located cells of the retina showed CHH immunoreactivity. This immunoreaction was specific because none of cell populations gave a signal in control incubations. Although no statistical test was performed for this qualitative light microscopic part of the study, we detected differences in the total areas of immunoreactivity between the PO2 and juvenile groups in the retina and XO-SG complex and in the number of cells in all the structures studied (not shown). However, in the two developmental stages, the general organization of both organs was similar. Fig. 1B,C shows a schematic representation of a typical ommatidium of the PO2 stage, of a juvenile crayfish and of the SG-XO complex in the eyestalk of the juvenile crayfish.

See ms

The locations of 5-HT-immunoreactive structures in PO2 and juvenile crayfish confirmed previous reports (Escamilla-Chimal et al., 1998). A positive reaction was present not only in several elements of the retina, namely in the crystalline cone and in the cytoplasm and axons of the reticular cells, but also in the MT-XO, where 5-HT endings project to the periphery of the CHH perikarya. In contrast, the SG did not show 5-HT immunoreactivity in either age stage or at any sampling time.

The extent of 5-HT fluorescence varied according to the time of day.

*Quantitative analysis*

Volume fraction (*V<sub>v</sub>*) estimation of green and red fluorescent material revealed cyclic differences in the amount of CHH- and 5-HT-immunoreactive material in the structures of the two developmental stages and in the relationship between the two, depending on the time of day. Figs 2A-F and 3A-F show confocal microscopic images of the tapetal cells, reticular cell axons and X-organ of the PO2 and juvenile crayfish at 08:00, 15:00 and 20:00 h

Fig. 4 shows the cyclic changes in the relative amounts of 5-HT and CHH immunoreactivity in the retina and XO-SG complex of PO2 and juvenile crayfish at the three time points. Fig. 5 displays these data to provide a general overview.

*Retina*

In PO2 crayfish (see Figs 4, 5A), the stereological analysis revealed no statistical differences between 5-HT immunoreactivity in the reticular cells of the middle portions of the retina at 08:00 and 15:00 h (*MRV<sub>v</sub>*, 16.82% and 14.23% respectively). Positive CHH immunoreactivity in the tapetal cells (*MRV<sub>v</sub>*, 12.68%) and positive 5-HT immunoreactivity in the crystalline cone (7.92% of the distal retina) were observed at 15:00 h. At 20:00 h, 5-HT immunoreactivity persisted in the crystalline cone, accompanied by a peak in 5-HT immunofluorescence in the reticular cell axons (*PRV<sub>v</sub>*, 91.71%). At this time point, there was an almost twofold increase in the volume fraction of CHH fluorescence in the medial retina, localized to the tapetal cells (28.17%)

These values were reversed in juveniles (Figs 4, 5B). A maximal level of CHH immunofluorescence in the tapetal cells

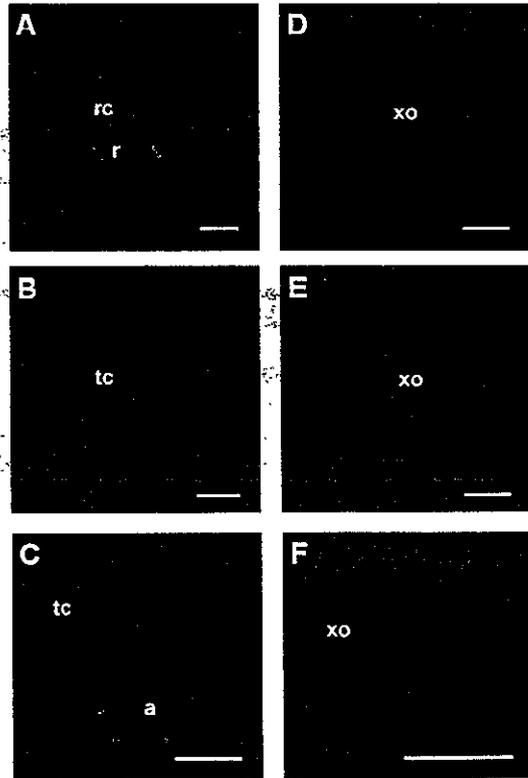


Fig 2 The retina and X-organ/sinus gland complex of a post-embryonic stage two (PO2) crayfish showing daily changes in crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) (red) and serotonin (5-HT) (green) immunoreactivity (A) 08:00 h, reticular cell cytoplasm (rc) expressing 5-HT. Note that the rhodoms (r) did not express immunoreactivity (B) 15:00 h, tapetal cells (tc) expressing CHH (C) 20:00 h, tapetal cells (tc) expressing CHH and reticular cell axons (a) expressing 5-HT. (D) The X-organ at 08:00 h (note the absence of immunoreactivity). XO, X-organ. (E) X-organ cells (xo) at 15:00 h expressing CHH, with nerve terminals expressing 5-HT. The yellow stain corresponds to sites where CHH and 5-HT co-occur (F) X-organ cells (xo) at 20:00 h expressing CHH. Scale bars, 19.5 μm

of the medial retina (Vv, 9.17%) was accompanied by intermediate values of 5-HT immunofluorescence in the reticular cells axons (PRVv, 33.04%) and slight 5-HT immunoreactivity in the crystalline cone (DRVv, 1.49%) at 08:00h. At 15:00h, the amount of 5-HT-immunoreactive material was higher in the crystalline cone (DRVv, 18.33%) and was maximal in the cytoplasm and axons of the reticular cells (MRVv, 75%). At 20:00h, fluorescence was still detectable in the axons of the reticular cells, in the proximal retina, the relative amount was greatly reduced (Vv, 18.53%). Meanwhile, the tapetal cells again showed a slight fluorescence in the CHH immunoreactive cell bodies (MRVv, 3.24% of medial retina).

*X-organ/sinus gland complex*

As shown in Fig. 4 and in Fig. 5C, PO2 animals showed a maximal relative amount of CHH immunoreactivity in the SG

(Vv, 53%), a small amount of CHH in the XO-SG tract (Vv, 11.89%) and no reaction at the level of the perikarya at 08:00h. Levels in the SG and XO-SG tract decreased at 15:00h, when the SG expressed only 27.7% and the XO-SG tract was CHH-immunonegative. At this time of day, the XO was slightly immunopositive (Vv, 1.99%) At 20:00h, the average relative amount of CHH was unchanged in the XO (Vv, 2.18%), but this was accompanied by higher levels of CHH in the XO-SG tract (Vv, 16.29%), there was no CHH-immunoreactive material in the SG. We found a small relative amount of 5-HT immunoreactivity in the XO at 15:00h (Vv, 0.82%) and 20:00h (Vv, 0.51%), simultaneous with CHH immunoreactivity (Fig. 2E,F)

The situation was reversed in juveniles (see Figs 4, 5D). At 08:00h, CHH fluorescence in the XO (Vv, 3.58%) was accompanied by some fluorescence in the XO-SG tract (Vv,

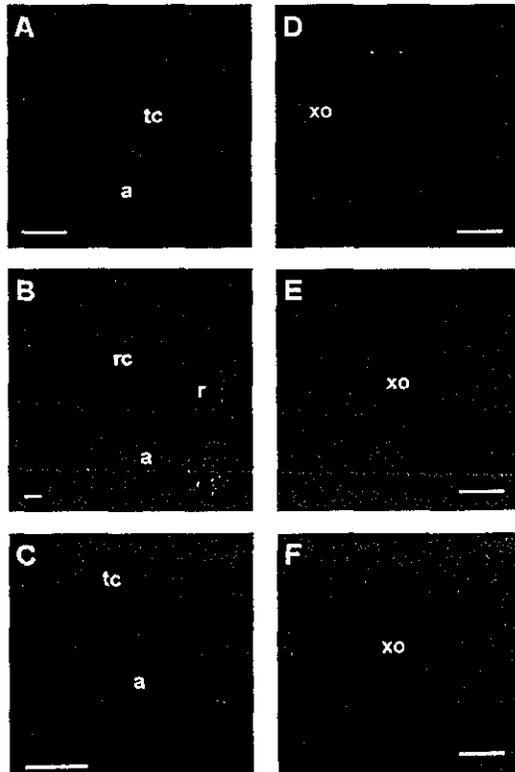


Fig 3 The eyestalk of a juvenile crayfish showing daily changes in serotonin (5-HT) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) immunoreactivity. (A) The retina at 08:00h; tapetal cells (tc) expressing CHH and reticular cell axons (a) expressing 5-HT (B) The retina at 15:00h, reticular cell cytoplasm (rc) and axons (a) expressing 5-HT. Note that the rhabdons (r) expressed no immunoreactivity (C) The middle retina at 20:00h, tapetal cells (tc) expressing CHH and reticular cell axons (a) expressing 5-HT (D) The X-organ (xo) at 08:00h; CHH cells expressing the hormone are surrounded by axon terminals containing 5-HT-immunoreactive material (E,F) The X-organ at 15:00 (E) and 20:00h (F) showing the absence of immunoreactivity Scale bars, 19.5µm

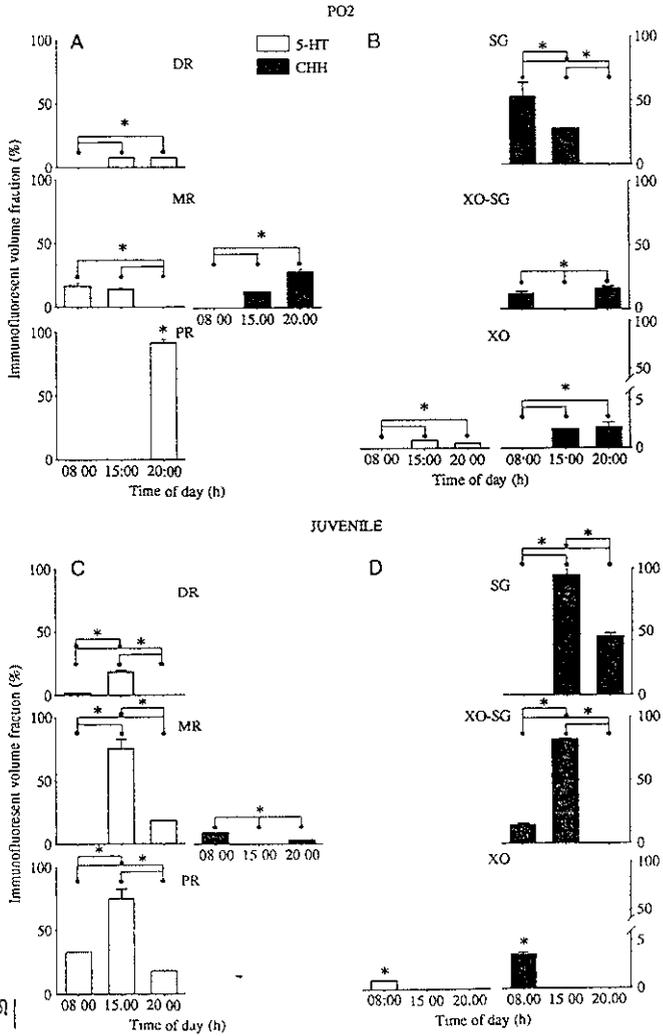


Fig 4. Relationship between the time of day and serotonin (5-HT; open columns) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH; filled columns) immunoreactivity as a fraction of the total volume of the proximal (PR), medial (MR) and distal (DR) rena, and of the volume of the sinus gland (SG), the X-organ/sinus gland tract (XO-SG) and the X-organ (XO) of post-embryonic stage two (PO2) (A,B) and juvenile (C,D) crayfish. Values are means  $\pm$  1 s.d. (N=3). Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). See text for further explanation.

to  
To  
can  
See  
ms.

14.7%) and no immunoreactivity in the SG. Relative amounts of fluorescence in the SG and XO-SG tract reached maximal values (Vv, 95.12% and 83.36%, respectively) at 15.00h and

decreased again to 45.9% and 0%, respectively, at 20.00h. Confocal microscopy demonstrated 5-HT-immunoreactive fibres (Vv, 0.93%) in the XO only at 08.00h (Fig. 3D)

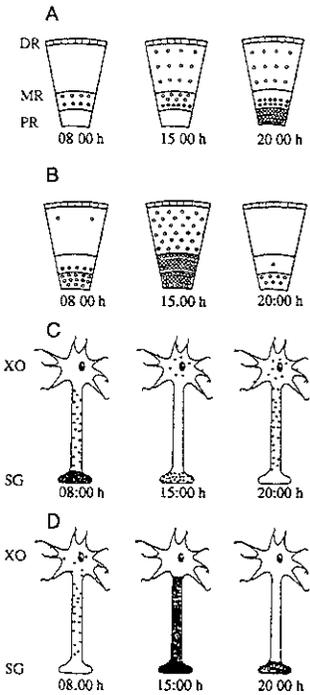


Fig 5 Overview of the daily changes in crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) and serotonin (5-HT) immunoreactivity (A) The retina of post-embryonic stage two (PO2) crayfish, (B) the retina of the juvenile stage (C) the X-organ (Simard and complex (XO-SG)) of the PO2 stage. (D) the XO-SG complex of the juvenile stage (C) 5-HT, (●) CHH. The density of the symbols represents the degree of immunoreactivity DR, distal retina. MR, medial retina. PR, proximal retina.

CHH immunoreactivity in the basally located tapetal cells and 5-HT immunoreactivity in the reticular cells of the retina, (ii) the presence of 5-HT-immunoreactive nerve terminals branching into the CHH-immunoreactive cells of the MT-XO; and (iii) CHH immunoreactivity in the axons and terminals in the XO-SG tract and the SG. Stereological quantification of the immunofluorescent material in the respective regions in PO2 and juvenile developmental instars demonstrated cyclic differences in the presence and density of immunoreactivity for CHH and 5-HT, which exhibited maxima 12h and 6h out of phase, respectively. Although only three times of day were examined, this phenomenon may be an indication of the involvement of CHH and 5-HT in the mechanisms responsible of the maturation of the ERG circadian rhythm.

The amplitude of the ERG of juvenile crayfish varies in a circadian manner, reaching its highest values at night. However, during the early stages of development (PO2), the ERG shows ultradian oscillations that are superimposed on a circadian cycle, with maximal values during the day; i.e. at this stage, the crayfish behaves like a diurnal animal (Fanjul-Moles et al., 1987; Fanjul-Moles, 1998). Castañón-Cervantes et al. (Castañón-Cervantes et al., 1999) demonstrated a clear unimodal circadian rhythm for 5-HT concentration in the eyestalk of PO2 crayfish; this rhythm became bimodal in juveniles. When these rhythms were determined under 12h:12h L:D cycles, the maximal phase of the rhythm in the PO2 stage was at 20:00h; the juveniles showed a maximum at 04:00h and a second peak at 12:00h. The findings of this study were interpreted as cyclic changes in the activity of serotonergic neurons in the brain related to the motor activity patterns of crayfish and as a brain serotonergic modulation of the XO-SG determining the circadian rhythm of the ERG. The cyclic changes in 5-HT levels reported here confirm the above results. Furthermore, *in situ* serotonergic structures are revealed that may be involved in the expression of the overt ERG circadian rhythm, showing quantitative differences between the PO2 and juvenile crayfish. The maturation of these structures could be involved in the physiological processes determining the coupling between the pacemaker and the effectors of the expression of this rhythm.

Gorgels-Kallen and Van Herp (Gorgels-Kallen and Van Herp, 1981) and Gorgels-Kallen and Meij (Gorgels-Kallen and Meij, 1985) have reported the presence of CHH immunoreactivity using light and fluorescence microscopy in adult and post-larval crayfish (*Astacus leptodactylus*). They described CHH immunoreactivity in a group of neurosecretory cells in the MT-XO, in fibres forming part of the XO-SG tract and in the axon terminals making up the SG in that crayfish species. The present study confirms these findings in another species of crayfish, *Procambarus clarkii*, during postembryonic development. However, this is the first study to our knowledge that reports the presence of CHH immunoreactivity in accessory cells of the retina, the reflecting pigments cells. These cells are sometimes referred to as secondary pigment cells or tapetal cells and, in adult crayfish, they are located in a single layer around the ommatidia (Rao,

Discussion

The present study enabled us to visualize and quantify (i)

trif  
See  
int.

1985). Previous studies on crayfish development (Hafner et al., 1982; Escamilla-Chimal et al., 1998) indicate that these cells are neither clearly differentiated nor located in the retina before the PO2 developmental stage. However, in this instar, their location is similar to that in adults. There is mounting evidence that reflecting light is only one of the functions of tapetal cells and that pigment and reticular cell(s) are metabolically linked, the former subserving the latter (for a review, see Meyer-Rochow, 1999).

The relationship between the cyclic changes in 5-HT and CHH immunofluorescence occurs at the same time of day in the reticular cell axons and the tapetal cells, but in the case of PO2 crayfish this relationship occurs only at 20:00 (Fig. 5A). This finding led us to conclude that this phenomenon must be related to the maturation of the daily sensitivity cycle of the eye. Interestingly, in the present work, CHH immunoreactivity in the tapetal cells and in the MT-XO of PO2 and juvenile instars occurs at the same time of day, but 12 h out of phase (Fig. 5C,D). Even though, to our knowledge, there are no reports of neural communication between the retina accessory cells and the XO-SG complex, a humoral communication between these structures is possible. In decapod crustaceans, the basement membrane seems to be an incomplete barrier to the haemolymph (Odselius and Elofsson, 1981). These authors proposed that one function of the cellular portion of the basement membrane is to satisfy the nutritional and hormonal requirements of the accessory cells of the retina. Hence, it is possible that CHH produced by the XO and bypassing this barrier could enter the tapetal cells and serve a different metabolic function related to the eye's sensitivity. However, an alternative and most interesting hypothesis should not be excluded. It is possible that the tapetal cells could be a supplementary locus for CHH synthesis. In spite of the fact that the tapetal cells are not considered to be neural cells in crayfish, as in other decapods, these cells must emanate from the medial proliferation zone where the ommatidia, the lamina ganglionaris and the medulla externa originate. During differentiation of the ommatidia, the proximal group of cells, in contact with the lamina ganglionaris, gives rise to sensory cells and the reflecting pigment (Elofsson, 1969). New neural and paraneural sources of CHH apart from the cystalk neurosecretory tissues have recently been reported (Chang et al., 1999; Chung et al., 1999). Hence, our proposition seems plausible and deserves further experiments to validate it.

In previous studies on a different species of crayfish, a correlation was reported between the daily changes in the secretory dynamics of the CHH-producing cells in the MT-XO and haemolymph glucose levels (Gorgels-Kallen and Voorter, 1985). These studies indicated that the accumulation of CHH peptidergic material in the CHH-producing cells in adult *Astacus leptodactylus* is stimulated 2 h before the beginning of darkness, resulting in a transfer of CHH granules into the axons of the XO-SG tract. According to these authors, these granules reach the axon terminals in the sinus gland after the onset of

darkness, when a strong release of CHH occurs into the haemolymph. Although, in the present study, only three times of day were examined, there seems to be agreement between all the above data and our findings in *Procambarus clarkii* juveniles. At this developmental stage, the only peak of immunofluorescence in the CHH-producing cells of the MT-XO, accompanied by slight CHH immunoreactivity in the XO-SG tract, was at 08:00 h, 1 h after lights-on. MT-XO CHH immunoreactivity subsequently disappeared, but the SG and the XO-SG tract showed their highest values of CHH immunoreactivity (see Figs 4, 5D), indicating a transfer of CHH to the SG terminals. Later, at 20:00 h, 1 h after the onset of darkness, the MT-XO and the XO-SG tract showed no CHH immunoreactivity and immunoreactivity in the SG decreased from 95.5 to 45.92%, suggesting the previously described release of CHH into the haemolymph. Serotonin-like immunoreactive somata and fibres have been localized in the medulla terminalis (Elofsson, 1983; Sandeman et al., 1988), where the X-organ neurosecretory cells receive their synaptic input (Andrew and Saleuddin, 1978; Andrew, 1983). In addition, ultrastructural studies have demonstrated serotonergic synaptic structures on the axonal ramifications of the CHH-producing cells in the X-organ of crayfish *Astacus leptodactylus* (Van Herp and Kallen, 1991). Furthermore, physiological experiments in which 5-HT was injected produced a release of CHH from the SG axon terminals in several species of crustacean (Strolenberg and Van Herp, 1977; Martin, 1978; Kallen, 1988). Hence, one can postulate, as already proposed by Gorgels-Kallen et al. (Gorgels-Kallen et al., 1985), that 5-HT may induce the transfer of CHH granules from the MT-XO to the SG via synaptic modulation. As summarized in Fig. 5C, the SG of the PO2 instar of *P. clarkii* has its highest level of CHH immunoreactivity at 08:00 h, and this is followed by a subsequent reduction in the level at 15:00 h, indicating a release of CHH after the onset of light. Moreover, the CHH and 5-HT immunoreactivity found in the XO-MT suggests that the 5-HT stimulus to the synthesis of CHH occurs during the afternoon (between 15:00 and 20:00 h), i.e. the situation is reversed with respect to that in juveniles (08:00 h, Fig. 4). These findings may indicate a phase reversal during the maturation of the CHH rhythm similar to that reported for the ERG and motor activity rhythms, and in coincidence with the crayfish changing from diurnal to nocturnal behaviour. The present results need further physiological experiments to clarify the role of CHH in the mechanisms responsible for the genesis of the sensitivity rhythm of the crayfish eye.

The authors are greatly indebted to Arturo Hernández-Cruz and Roman Vidal-Tamayo for their technical assistance in confocal microscopy. We also thank Julio Prieto-Sagredo for his technical help in the laboratory and in preparing the figures. Isabel Pérez-Monfort corrected the final version of the manuscript. This work is part of the doctoral thesis of Elsa G. Escamilla-Chimal and was partially supported by PAPIIT IN 209397 and CONACYT 0112P-N9506.

See ins.

See ins.

References

Andrew, R. D. (1983). Neurosecretory pathways supplying the neurohemal organs in Crustacea. In *Neurohemal Organs of Arthropods: Their Development, Evolution, Structure and Functions* (ed. A. P. Gupta), pp. 90-117. Springfield, IL: Charles C. Thomas.

Andrew, R. D. and Saleuddin, A. S. M. (1978). Structure and innervation of a crustacean neurosecretory cell. *Can. J. Zool.* **56**, 423-430.

Aréchiga, H., Fernández-Quiroz, F., Fernández De Miguel, F. and Rodríguez-Sosa, L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* **10**, 1-19.

Castañón-Cervantes, O., Battelle, B. A. and Fanjul-Moles, M. L. (1999). Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.* **202**, 2823-2830.

Chang, E. S., Chang, S. A., Beltz, B. S. and Kravitz, E. A. (1999). Crustacean Hyperglycemic Hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. *J. Comp. Neurol.* **414**, 50-56.

Chung, S., Dirksen, H. and Webster, S. G. (1999). A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13103-13107.

Elofsson, R. (1969). The development of the compound eyes of *Penaeus duorarum* (Crustacea: Decapoda) with remarks on the nervous system. *Z. Zellforsch.* **97**, 323-350.

Elofsson, R. (1983). 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus lenusculus*. *Cell Tissue Res.* **232**, 221-236.

Escamilla-Chimal, E. G., Garcia-Rivera, C. C., Aguilar-Morales, M., Romero-Diaz, V. J. and Fanjul-Moles, M. L. (1998). The retina of crayfish *Procambarus clarkii* during development shows serotonin and tryptophan hydroxylase-like immunoreactivity daily changes. *Biol. Rhythm Res.* **29**, 471-479.

Fanjul-Moles, M. L. (1998). Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: clock pacemaker and entrainment. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **5**, 153-160.

Fanjul-Moles, M. L., Moreno-Séñez, E., Villalobos-Hiriart, N. and Fuentes-Pardo, B. (1987). Circadian rhythm in the course of the ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **88A**, 213-219.

Gorgets-Kallen, J. L. and Meij, T. A. (1985). Immunocytochemical study of the hyperglycemic hormone (CHH)-producing system in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* during larval and postlarval development. *J. Morph.* **183**, 155-163.

Gorgets-Kallen, J. L. and Van Herp, F. (1981). Localization of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the XO sinus gland complex in the eyestalk of the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). *J. Morph.* **170**, 347-355.

Gorgets-Kallen, J. L. and others (1985).

Gorgets-Kallen, J. L. and Voorter, Ch. E. M. (1985). The secretory dynamics of the CHH-producing cell group in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the course of the day/night cycle. *Cell Tissue Res.* **241**, 361-366.

Gundersen, H. J. G., Bentsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B., Vesterbj, A. and West, M. J. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 379-394.

Hafner, G. S., Tokarski, T. and Hammond-Soldis, G. (1982). Development of crayfish retina: a light and electron microscopic study. *J. Morph.* **173**, 101-120.

Hamann, A. (1974). Die neuroendokrine Steuerung tagesrhythmischer Blutzuckerschwankungen durch die Sinusdrüse beim Flusskrebs. *J. Comp. Physiol.* **89**, 197-214.

Howard, C. V. and Reed, M. G. (1998). *Unbiased Stereology* (Oxford) Bios Scientific Publisher, Springer.

Kallen, J. L. (1988). Quelques aspects de la régulation du système neuroendocrine produisant la CHH et de la relation entre le rythme circadien et la glycémie. In *Aspects Récents de la Biologie des Crustacés. Actes de Colloques 8* (ed. Y. Le Gal and A. Van Wormhoudt), pp. 105-107. Plouzané IFRÉMER.

Kallen, J. L., Rigan, N. and Trompenaars, H. J. A. J. (1988). Aspects of entrainment of CHH cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish. *Biol. Bull.* **175**, 137-143.

Kleinholz, L. H., Kimball, F. and McGarvey, M. (1967). Initial characterization and separation of hyperglycemic (diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. *Gen. Comp. Endocr.* **8**, 75-81.

Kulkarni, G. K. and Fingerma, M. (1992). Quantitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* **182**, 341-347.

Martin, G. (1978). Action de la sérotonine sur la glycémie et sur la libération des neurosecretions contenues dans la glande du sinus de *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacé, Isopode, Oniscocoide). *C.R. Soc. Biol.* **172**, 304-308.

Meyer-Rochow, V. B. (1999). Compound eye: circadian rhythmicity, illumination and obscurity. In *Atlas of Arthropod Sensory Receptors* (ed. E. Eguchi and Y. Tomnaga), pp. 97-124. Tokyo Springer-Verlag.

Nadakavukaren, J. J., Lickey, M. E. and Jordan, W. P. (1986). Regulation of the circadian clock in the *Aplysia* eye: mimicry of neural action by serotonin. *J. Neurosci.* **6**, 14-21.

Odsellus, R. and Elofsson, R. (1981). The basement membrane of the insect and crustacean compound eye: definition, fine structure and comparative morphology. *Cell Tissue Res.* **216**, 205-214.

Priestley, J. V. (1997). Immunocytochemical techniques for the study of the nervous system. In *Neurochemistry* (ed. A. J. Turner and H. S. Bachelard), pp. 71-120. Oxford, Oxford University Press.

Rao, K. R. (1985). Pigmentary effectors. In *The Biology of Crustacea*, vol. 9. *Integument, Pigments and Hormonal Processes* (ed. D. E. Bliss and L. H. Mantel), pp. 395-463. New York Academic Press.

Sandeman, D. C., Sandeman, R. E. and Aitken, A. R. (1988). Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* **269**, 465-478.

Strolenberg, G. E. C. M. and Van Herp, F. (1977). Mise en évidence du phénomène d'exocytose dans la glande du sinus d'*Astacus leptodactylus* sous l'influence d'injection de sérotonine. *C.R. Acad. Sci. D.* **284**, 57-60.

Thompson, E. (1930). Quantitative microscopic analysis. *J. Geol.* **38**, 193.

Van Herp, F. (1998). Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. In *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* (ed. G. M. Coast and S. G. Webster), pp. 53-70. Cambridge: Cambridge University Press.

Van Herp, F. and Kallen, J. L. (1991). Neuropeptides and neurotransmitters in the X-organ sinus gland complex, an important neuroendocrine integration center in the eyestalk of Crustacea. In *Comparative Aspects of Neuropeptides Functions* (ed. G. B. Stefano and L. Florey), pp. 211-221. Manchester: Manchester University Press.

TC

See us

See us

SM