



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFEECTO DE DOS PÉPTIDOS HIPERGLICEMICOS
SOBRE LA RETINA DEL ACOCIL Procambarus clarkii
EN CONDICIONES in vitro A DOS HORAS DEL
NICTÉMERO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARLEN VALDES FUENTES



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Valdés
Fuentes
Marlen
52 71 07 30
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
096277490

2. Datos del tutor

Dra
María Luisa
Fanjul
Peña

3. Datos del sinodal 1

M en C
Julio Alejandro
Prieto
Sagredo

4. Datos del sinodal 2

M en C
Enrique
Moreno
Sáenz

5. Datos del sinodal 3

Dra
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

6. Datos del sinodal 4

M en C
José Luis
Arreola
Ramírez

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de dos péptidos hiperglicémicos sobre la retina del acocil Procambarus clarkii
en condiciones in vitro a dos horas del nictémero
67 p
2006

Agradezco a mis sinodales M. en C. Julio Prieto, M. en C. Enrique Moreno, Dra. Elsa Escamilla, Dr. José Luis Arreola y en especial a la Dra. Ma. Luisa Fanjul, por el tiempo otorgado a la revisión de esta tesis.

Le agradezco especialmente al Dr. Alberto Huberman por habernos proporcionado gentilmente la isoforma I de la CHH para realizar los experimentos.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Dr. María Luisa Fanjul Peña y el apoyo financiero del proyecto CONACYT 46193 y PAPIIT IN208405.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi hermosa familia

A mis papas, Margarita y Felipe,
por quererme y apoyarme siempre.

A mis hermanos, Erika y Felipe,
por creer en mí.

Por que sin su ayuda y cariño no sería lo que soy.

Gracias por confiar en mí.

Mahn Valdez R

Agradecimientos

Les agradezco a cada una de las personas que me ayudaron a concluir este trabajo. Especialmente a la Dra. Ma. Luisa Fanjul, quien me ayudado desde el inicio, por confiar en mi y darme la oportunidad de conocerla, a Julio por sus consejos y ayuda, pues es muy valiosa para mi formación y a Elsa por su ayuda y amistad que han hecho que mi estancia en el laboratorio sea muy amena y agradable.

A Bianca porque parte de esta tesis alguna vez formó parte de un proyecto de tesis conjunta. Por tu amistad, ayuda y apoyo. A todos los integrantes que han formado y forman parte del laboratorio de Neurofisiología, por su comprensión ayuda y amistad.

A todos y cada uno de mis amigos (as) a quienes he conocido y han convivido conmigo durante mi formación personal y profesional.

Gracias familia (mami, papi, Eri, Felipe, Chiquis y Cami), amigos (Siomara, Alma, Elsa, Ramón, Gaby, Aixchel, Magally, Bianca, Gaby Rodríguez, Julio, Leo, Rosy, a mis amigos de la prepa, Roberto Rafael, Alex H., Alfonso, José Luis, Eve, a todos los que han creído en mi y que no están en esta lista, pues son personas a las que quiero y aprecio, gracias a todos!!!!

Y finalmente a la H. Universidad por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de prepararme y formarme profesionalmente.

Marlen Valdés Fuentes.

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Generalidades del acocil (<i>Procambarus clarkii</i>)	2
2.2. Sistema Nervioso	2
2.3. Sistema Endocrino	3
2.3.1 Complejo Órgano X- Glándula Sinusal	3
2.4. Ritmos Biológicos	4
2.4.1 Generalidades	4
2.4.2 Clasificación	5
2.4.3 Ritmos Circadianos	6
2.4.4 Bases Moleculares de la ritmicidad	7
2.4.5 Ritmos en el acocil	8
2.5. Morfología de la Retina	9
2.5.1 Efectores Pigmentarios	10
2.5.1.1 Pigmentos de Blindaje y Reflejo Pupilar	11
2.5.2 Pigmento Proximal (PP)	12
2.5.3 Pigmento Distal (PD)	13
2.5.4 Respuesta Eléctrica a la Luz, Electroretinograma (ERG)	14
2.5.5 Ritmo de amplitud del Electroretinograma (ERG)	15
2.6. Metabolismo de Glúcidos	16
2.6.1 Glucógeno en Retina de Invertebrados	17
2.6.2 Metabolismo de la Glucosa en retina de Invertebrados	18
2.7. Péptidos Hiperglicemicos	19
2.7.1 Hormona Hiperglicemiante de los Crustáceos (CHH)	19
2.7.1.1 Localización y expresión de la CHH	19
2.7.1.2 Mecanismos de regulación y liberación de la CHH	20
2.7.1.3 Hormona Hiperglicemiante de Crustáceos y neuromodulación ..	21
2.7.1.4 Ritmo Circadiano del contenido de CHH	22
2.7.2. Glucagon	22
2.7.2.1 Estructura del Glucagon	23
2.7.2.2 Expresión del precursor de glucagon, regulación y liberación	23
2.7.2.3 Receptor de Glucagon	24
2.7.2.4 Mecanismo molecular de la regulación de glucosa y glucagon ..	26
3. Planteamiento del Problema	28
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
6. Material y Método	32
6.1 Animales	32
6.2 Fotoperiodo	32
6.3 Disección de la Retina	32

6.4 Registro del Electrorretinograma (ERG)	32
6.5 Equipo Electrofisiológico	32
6.6 Análisis de Datos	33
6.7 Histología	33
6.8 Determinación de la posición de los pigmentos	34
7. Resultados	37
7.1 Efecto de la CHH y el glucagon sobre la amplitud del ERG	37
7.1.1 Curso temporal del efecto de la CHH	37
7.1.2 Curso temporal del efecto del Glucagon	41
7.2 Amplitud del ERG entre el minuto -10 y 60	44
7.3 Curva dosis-respuesta	44
7.4 Efecto del Glucagon sobre la posición de los pigmentos	48
7.5 Localización de depósitos de glucógeno en la retina	48
8. Discusión	52
8.1 Hormona Hiperglicemiante de los Crustáceos	52
8.2 Glucagon	55
8.2.1 Efecto del glucagon sobre los movimientos de los pigmentos de blindaje	56
9. Conclusión	58
10. Anexo No. 1	59
11. Literatura Citada	60

1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la Hormona Hiperglicemiante de Crustáceos (CHH) y el glucagon sobre la génesis del electroretinograma (ERG) en el acocil *Procambarus clarkii* en condiciones *in vitro* durante el día y la noche. Los acociles fueron sincronizados con ciclos LO 12:12 y se dividieron en diferentes grupos experimentales. En el primer grupo se determinó el efecto de cinco concentraciones de CHH-I (100pM, 1, 10, 20 y 50nM) y tres concentraciones de glucagon (4, 6 y 8µM) sobre la amplitud del ERG, utilizando un protocolo de estimulación luminosa. En el segundo grupo se determinó el efecto del glucagon sobre los movimientos de los pigmentos proximal (PP) y distal (PD), de acuerdo con el protocolo descrito por Frixione et al. (1979). En un tercer grupo y a las mismas horas circadianas se investigó la presencia de depósitos de carbohidratos (glucógeno) en la retina, mediante la técnica histoquímica de Ácido Periódico de Shiff (PAS). Los resultados de este trabajo sugieren que el efecto de la CHH-I en el ERG produce, una mayor disponibilidad de posibles receptores GLUT durante el día o un efecto neuromodulador sobre la respuesta visual. Por otro lado, tanto el efecto de glucagon sobre el ERG, como sobre los pigmentos blindantes son coincidentes, pues, durante el día subjetivo la aplicación de este neuropéptido produce un aumento significativo en la amplitud del ERG y una retracción de los pigmentos, lo que aumenta la sensibilidad de los fotorreceptores, mientras que en la noche subjetiva, produce una disminución significativa en ambos parámetros, disminuyendo su sensibilidad.

Las retinas tanto del día como de la noche muestran una reacción positiva al ácido periódico, tanto en el rabdomo como en las células del cono cristalino y de la membrana basal, indicando que esta estructura posee parte del sustrato metabólico necesario para la obtención de glucosa.

2. Introducción

2.1 Generalidades del acocil (*Procambarus clarkii*)

El acocil *Procambarus clarkii* es un crustáceo dulceacuícola de hábitos nocturnos, perteneciente al orden Decapoda representando a la familia Cambaridae del grupo Astacidae. Estos animales se han logrado adaptar a una gran variedad de ambientes, como ríos, cavernas, lagos, canales de riego, entre otros (Castañón et al., 1996). En algunos casos, estos organismos son considerados como especie clave en su hábitat, pues marcan un impacto biológico importante debido a sus actividades tróficas (Holdich 2002). Los acociles se encuentran ampliamente distribuidos en ambos hemisferios terrestres, lo que nos habla de sus adaptaciones fisiológica, ecológicas y conductuales. *Procambarus clarkii* se distribuye desde el norte de México hasta la zona central de los Estados Unidos. Los acociles han sido un modelo biológico clave en el desarrollo de la neurobiología, pues este invertebrado permite el montaje de técnicas sencillas para el estudio de neuronas identificadas y su interacción con otros grupos celulares. Su estudio ha aportado información sobre la actividad neural y ritmos biológicos entre otros temas (Gherardi 2002).

La morfología externa de los crustáceos decapodos está compuesta por dos regiones, anterior (cefalotórax) y posterior (abdomen). Presenta veinte segmentos corporales, un par de anténulas, un par de antenas, mandíbula, maxilulas, tres pares de maxilípedos, cinco pares de pleópodos, de los cuales los tres anteriores son quelados y los cuatro posteriores están adaptados para caminar, cinco pares de pleópodos, un par de urópodos y el telson (Holdich, 2002).

2.2 Sistema Nervioso.

El sistema nervioso del acocil está formado por tres tipos de neuronas: las neuronas sensoriales, las motoras y las interneuronas. Las diferentes neuronas están asociadas con tejido glial y sus somas se localizan en órganos sensoriales o en ganglios. Los ganglios están organizados en neurópilos, cada uno incluye axones, dendritas, sinapsis y grupos periféricos de somas celulares (Vogt, 2002).

El sistema nervioso central del acocil es ganglionar, está compuesto de un cerebro y un cordón central ventral longitudinal en forma de escalera (Fig. 1A), localizado debajo del tracto digestivo, formado por ganglios bilaterales unidos por una línea media por comisuras y longitudinalmente por conectivos (Sandeman, 1982). El cerebro está dividido en protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. El cerebro está situado en la parte anterior del cefalotórax y está conectado al ganglio subesofágico. El ganglio subesofágico da origen a la cadena ganglionar ventral, que consiste de cinco ganglios torácicos y seis abdominales, unidos por nervios conectivos. El cerebro da origen a cinco nervios pareados y dos no pareados. Entre los nervios pareados se incluye al nervio óptico, nervio oculomotor, nervio

antenuar, nervio antenal y nervio tegumentario (Fig. 1B). El ganglio subesofágico tiene once raíces nerviosas de cada lado. Siete nervios corren a la glándula antenal, mandíbula, maxilula y maxila y maxilípedos 1-3 y cuatro nervios corren a los músculos dorsoventrales y longitudinales del tórax (Vogt, 2002).

Los lóbulos ópticos se encuentran en los tallos oculares y están constituidos por neurópilos bien diferenciados, debajo de la retina se encuentra la lámina ganglionaris, inmediatamente después se sitúan la médula externa, la médula interna, la médula terminalis y el cuerpo hemielipsoidal (Fig. 1C) (Sandeman, 1982).

2.3 Sistema Endocrino

Consiste de algunos órganos que son de origen neural o epitelial. Los órganos neuroendocrinos están compuestos de centros somáticos de neuronas neurosecretoras que sintetizan hormonas, las cuales en algunos casos envían sus secreciones a centros secretores comunicados con el aparato circulatorio constituyendo órganos neurohemales. Los órganos neuroendocrinos en acociles incluyen el complejo órgano X- glándula sinusal, el órgano post-comisural y el órgano pericárdico. Mientras que los órganos epiteliales son grupos de células epiteliales modificadas e incluyen al órgano mandibular, el órgano Y y la glándula androgénica (Vogt, 2002).

2.3.1. Complejo Órgano X – Glándula Sinusal

El complejo Órgano X - Glándula Sinusal es el centro neuroendocrino principal en los acociles (Fig.1C). Es un conglomerado de 100-150 células neurosecretoras, localizado a la periferia de la médula terminalis (Aréchiga et al. 1993). Los axones neuronales proyectan dentro de la glándula sinusal que está situada dorsolateralmente sobre la médula externa e interna y está compuesta por terminales axónicas y senos venosos (Vogt, 2002). Diferentes péptidos se sintetizan por el órgano X y se transportan a la glándula sinusal donde son almacenados y liberados (Yasuda et al.,1994). Este centro neurohemal regula muchos procesos fisiológicos importantes, produciendo una variedad de factores humorales que son liberados a la hemolinfa por mecanismos de exocitosis actuando en diferentes procesos, tales como cambios de color externo, ciclo de muda, desarrollo gonadal, adaptación a la luz y niveles de glucosa, entre otros. (Huberman et al., 1993).

Algunos de los neuropéptidos que se sintetizan y liberan en el complejo OX-GS pertenecen a dos familias diferentes; las cromatoforotropinas, que incluyen a la hormona concentradora de pigmento rojo (RPCH) y la hormona dispersora del pigmento distal (PDH), así como los miembros de la familia de la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH), que incluyen a la CHH, a la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogénesis o gonadal (VIH/GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) (Van Herp, 1998; Vogt, 2002).

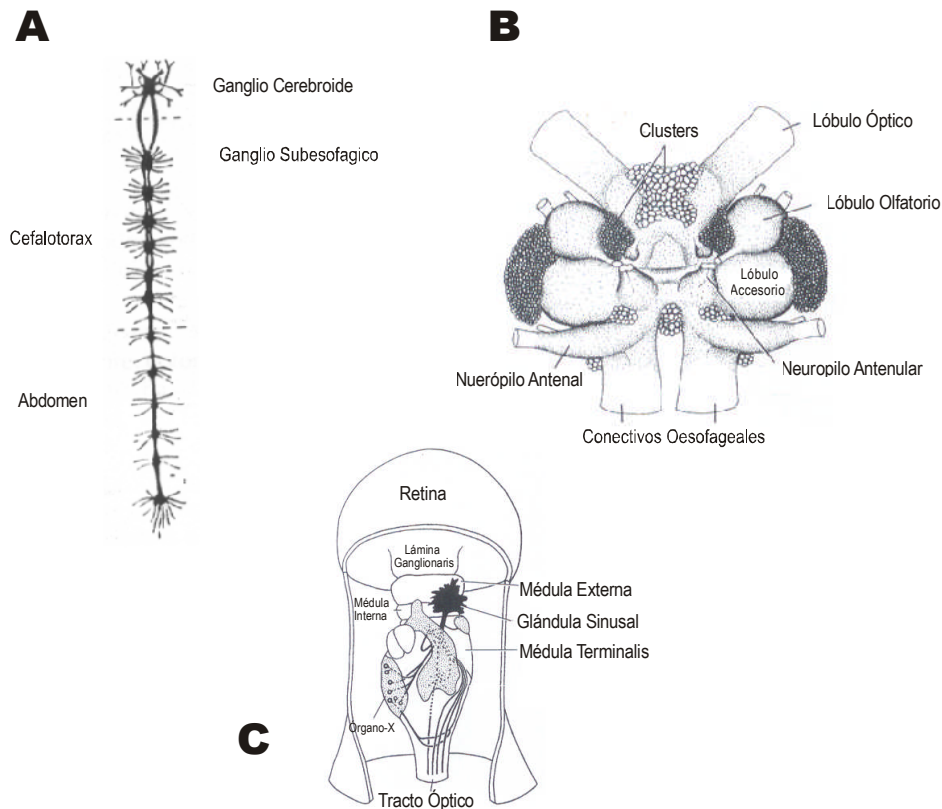


Figura 1. Sistema nervioso de crustáceos decapodos. A) Sistema Nervioso Central (Modificado de Sandeman, 1982), B) Ganglio Supraesofágico de acocil (vista ventral) y C) Tallo óptico (Vogt, 2002).

2.4 Ritmos Biológicos

2.4.1. Generalidades

Podemos definir a un ritmo biológico como la recurrencia de un fenómeno biológico a intervalos regulares de tiempo. Estos ritmos son de naturaleza endógena y deben sincronizarse a cambios rítmicos en el ambiente mediante señales externas periódicas. Aquella señal externa que sincroniza un ritmo es denominada “zeitgeber” (del alemán, dador de tiempo). Aunque se han identificado ritmos con duraciones que van desde algunas horas hasta años, los más estudiados y sobresalientes son los que se relacionan con ciclos diarios, estos son llamados ritmos circadianos. (Aschoff, 1981).

Algunos parámetros utilizados en el estudio y caracterización de los ritmos biológicos son:

1. **Periodo:** Es el tiempo entre una fase y otra equivalente. El periodo endógeno (espontáneo) se denomina (τ , tau), y se expresa cuando no hay una señal de tiempo externa (zeitgeber). Este fenómeno es llamado “oscilación libre o espontánea”. Al periodo de la señal de tiempo externa se le llama T.
2. **Amplitud:** Es la diferencia entre los valores máximo y mínimo de una variable en oscilación. Cuando el ritmo se ajusta a una función sinusoidal o cosinusoidal, la amplitud es la diferencia entre el valor medio del ritmo (mesor) y el valor máximo de la variable.

3. Mesor: Es el valor medio de la función sinusoidal o cosinoidal a la que ha ajustado un ritmo.
4. Fase: Es un valor de referencia del instante en el que inicia una oscilación. Dicho instante es arbitrario, pero uno de los más utilizados es la acrofase, que corresponde al momento en el que la variable alcanza su valor más alto en el ciclo.
5. Ángulo de fase: Corresponde a la diferencia de fase existente entre 2 oscilaciones. Es usual medir el ángulo de fase entre el ritmo observable y el zeitgeber (Moore-Ede et al., 1982)

2.4.2 Clasificación

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo con la duración del periodo del ciclo (τ). Sin embargo, Enright (1981) clasificó los ritmos en función a la frecuencia con la que se presentan en:

1. Ultradianos: con frecuencia mayor a 1 ciclo en un día. Tienen periodos menores a 19h.
2. Circadianos: con frecuencia cercana a 1 ciclo en un día. Tienen periodos cercanos a 24h, en el intervalo de 19h a 29h.
3. Infradianos: con frecuencias menores a 1 ciclo en un día. Tienen periodos mayores que 29h (Enright 1981; citado en Aschoff, 1981).

Otra forma de clasificar a los ritmos biológicos es en base a su periodo (T) y en relación a ciclos geofísicos externos, pues pueden persistir bajo condiciones ambientales constantes. En aquellos ritmos biológicos que son el resultado de la adaptación del organismo a las variaciones cíclicas en el ambiente en condiciones naturales, la frecuencia del ritmo endógeno es igual a la de los ciclos geofísicos con los que se relacionan (Aréchiga, 1993). Sin embargo cuando se estudian en condiciones constantes, por ejemplo, en el laboratorio, tales ritmos biológicos se presentan con una frecuencia cercana, pero no necesariamente igual. Debido a que el periodo de oscilación espontánea (T) es aproximado, mas no igual, al periodo del ciclo ambiental al que se sincroniza (T). El prefijo *circa* (aproximadamente igual a) se aplica a los ritmos que se repiten con una frecuencia cercana a las de las mareas, al del día y la noche, a del mes lunar y al ciclo anual, consecuencia de la translación de la tierra. En esta forma existen ritmos circamareales, circadianos, circalunares y circanuales; esto nos indica que son endógenos (Brady, 1979).

2.4.3 Ritmos circadianos.

La palabra circadiano deriva de dos vocablos latinos: (*circa*) cerca de; (*dies*) día, propuesto por Franz Halberg en 1959. Los ritmos circadianos como ya se mencionó anteriormente son aquellos que se presentan con periodos aproximados a las 24 horas. Ejemplo de ellos son los ritmos de secreción del cortisol, la melatonina, los ciclos sueño-vigilia y actividad-reposo, así como numerosos ritmos metabólicos en vertebrados e invertebrados. Además se ha comprobado la sincronización y su carácter endógeno de este tipo de ritmos a factores externos (Moore-Ede et al, 1982).

Las características de los ritmos circadianos son:

- Endógenos y programados genéticamente.
- Susceptibles de ser sincronizados.
- Al ser endógenos persisten en oscilación espontánea en ausencia de señales externas.
- En general y en condiciones de oscuridad constante el periodo es mayor de 24 horas para especies diurnas y menor en especies nocturnas.
- Son capaces de compensar cambios de temperatura.
- Generalmente desaparecen bajo luz intensa constante.

Para que estos ritmos se generen y sincronicen a los cambios del medio se necesita de un reloj biológico interno. En la búsqueda de receptores y rutas que influyan con el reloj biológico, se han descubierto estructuras independientes de vías o rutas sensoriales primarias. 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. (Moore-Ede et al., 1982). El control de los ritmos circadianos se da a tres niveles de integración: 1) La generación de una señal por un marcapaso circadiano; 2) La sincronización del ritmo por influencia del medio y 3) Un acoplamiento de marcadores circadianos con los sistemas responsables de la expresión del ritmo. *Drosophila* ha sido el mejor modelo molecular estudiado, para entender la generación de los ritmos (Daan y Aschoff, 2001).

La organización celular de los marcapasos circadianos han sido mas ampliamente estudiados en los ojos de moluscos, y el núcleo supraquiasmático en los mamíferos, mientras que el acoplamiento de la ritmicidad han sido estudias en aves y mamíferos (Moore-Ede et al., 1982).

2.4.4 Bases moleculares de la ritmicidad

Mediante estudios en mutantes se han localizado diferentes genes responsables de la generación y sincronización de los ritmos. Los estudios realizados en *Drosophila* identificaron un primer gene candidato a la generación de la ritmicidad circadiana, encontrado que el gen *per* es un generador de ritmicidad (Turek y Takahashi, 2001). La proteína que expresa el gene, PER, ha sido identificada por pruebas de inmunocitoquímica, en áreas relacionadas con la ritmicidad. Posteriormente se han encontrado e identificado diferentes genes y proteínas reloj que participan en este proceso. En este organismo el mecanismo molecular se lleva a cabo en neuronas laterales del cerebro y consiste en dos asas de retroalimentación de genes que oscilan de manera circadiana, los genes involucrados en este mecanismo son *period (per)*, *timeless (tim)*, *clock (clk)*, *cycle (cyc)* y *cryptochromo (cry)*. La primera

asa de retroalimentación se inicia cuando se acumulan las proteínas PER y TIM en el citoplasma, donde forman dímeros que se translocan al núcleo para regular de forma negativa su propia transcripción, al inhibir al activador transcripcional constituido por el dímero CLK/CYC. En la segunda asa, CLK reprime su propia transcripción al formar un dímero con CYC y el complejo PER/TIM, que funciona como un antirepresor que activa su síntesis y hace oscilar los niveles de CLK. Todos los elementos tienen su pico y son activos en la noche, la luz activa a la proteína CRY que causa una rápida degradación de TIM (Fig. 2) (Ashmore y Sehgal, 2003).

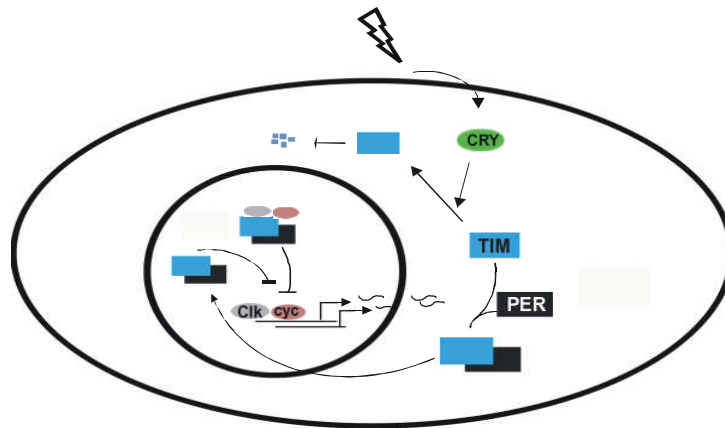


Fig. 2. Reloj molecular propuesto para *Drosophila*, explicación ver texto. Modificado de Ashmore y Sehgal, 2003.

A diferencia de *Drosophila*, en mamíferos, los componentes constituyentes del reloj molecular son tres genes *per*, dos genes *cry*, *clock* y un gen *Bmal*, que se encuentran en el núcleo supraquiasmático y los niveles más altos se encuentran durante el día, actuando a través de asas de retroalimentación negativa (Duffield, 2003). En los acociles, solo se tienen reportes acerca de la proteína CRY, en el protocerebro, y en el complejo médula terminalis-cuerpo hemielipsoidal de los lóbulos ópticos (Fanjul-Moles et al., 2004).

4.4.5. Ritmos en el acocil

Los mecanismos reguladores de los ritmos circadianos de crustáceos decapodos han sido explorados por varias décadas. Como se ha mencionado anteriormente la importancia del sistema neuroendocrino en el control diario de ritmos en invertebrados, fue de interés para muchos científicos, ya en 1911, Demoll sugirió que el cambio de color en artrópodos era un fenómeno periódico controlado por el sistema nervioso. Kalmus en 1938 concluyó que el tallo ocular era el sistema neurosecretor que controlaba la actividad rítmica en acociles y Welsh en 1940 propuso la idea de centros nerviosos, controlados por factores humorales para la migración rítmica de los pigmentos en el acocil. La actividad circadiana se expresa en diversos procesos fisiológicos como la locomoción, diferentes respuestas sensoriales, cambios en la posición de los pigmentos de blindaje en retina y el tegumento,

la amplitud en el ERG, la frecuencia cardíaca y algunas funciones endocrinas y metabólicas (Larimer y Smith, 1980; Aréchiga et al., 1985; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

La existencia de un ritmo circadiano endógeno ha sido descrita para muchos mecanismos moduladores. La retracción o dispersión de los pigmentos retinianos, así como la secreción de diferentes neurohormonas durante la fase nocturna o diurna en condiciones constantes tienen una clara ritmicidad circadiana. Algunas de estas funciones rítmicas presentan acrofases nocturnas, como la locomoción, la respuesta eléctrica de los fotorreceptores (ERG) y la secreción de algunas hormonas como la CHH y la RPCH. Otras funciones fisiológicas muestran el nadir durante el día, como es el caso de la dispersión de los pigmentos retinales y tegumentarios, además la secreción de la hormona neurodresora (NDH) y la PDH (Gorles-Kallen y Voorter, 1985; Aréchiga et al., 1993; Rodríguez-Sosa et al., 1994)

En crustáceos decapodos varias estructuras han sido implicadas como sitios de actividad circadiana. El tallo ocular fue propuesto como la principal estructura. Los experimentos utilizando la ablación han mostrado la persistencia de algunos ritmos. Sánchez y Fuentes Pardo (1977) documentaron la persistencia de un ritmo circadiano de la amplitud del ERG en tallos oculares aislados, y un ritmo similar de la secreción de la NDH (Aréchiga et al., 1977) y la RPCH (Rodríguez-Sosa et al., 1994). También ha sido descrita, la actividad circadiana en retinas aisladas proponiendo dos sitios generadores de ritmicidad circadiana, el primero en la retina y lámina ganglionaris, generando la ritmicidad fotorreceptora, y el otro sitio en la lámina terminalis, como responsable del ritmo en la neurosecreción (Aréchiga et al., 1993). Otra estructura propuesta como un generador de ritmicidad circadiana es el ganglio supraesofágico, pues su ablación o la interrupción de sus conectivos, muestra una supresión en la ritmicidad circadiana de los acociles (Page y Larimer, 1972; Larimer y Smith, 1980).

Los niveles de glucosa en sangre, controlados por la CHH, la migración del pigmento distal, que se lleva a cabo bajo control neurohumoral de la PDH y la RPCH, entre otros procesos fisiológicos, son controlados por el sistema circadiano. (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985).

Algunos agentes moduladores se conocen como inductores de respuestas específicas, como la serotonina (5-HT) que es capaz de provocar una respuesta en la flexión de los músculos abdominales y la NDH, que deprime la actividad locomotora, y su acción en diferentes sitios del sistema nervioso central y periférico.

2.5 Morfología de la retina

Los acociles adultos poseen ojos de tipo compuesto y pedunculado. Cada ojo está formado por unidades estructurales llamadas omatidias. Lo conforman cerca de 2500 omatidias (citado en Escamilla-Chimal, 2001) y cada una posee sus propios elementos ópticos. Cada omatidia está

constituida por el aparato dióptrico, conformado por la córnea y el cono cristalino, una retina fotosensible, pigmentos de blindaje y células tapetales (Vogt, 2002).

La córnea es una cutícula transparente de aproximadamente 60 μ m de ancho que cubre el ojo; mientras que el cono cristalino lo forman cuatro células y puede terminar directamente sobre los fotorreceptores, a este lo rodean células del pigmento distal, que se van a extender de forma paralela hasta la lámina basal (Fig. 3) (Shaw y Stowe, 1982; Vogt, 2002).

La omatidia es la unidad funcional y está constituido por un rabdomo central formado por el conjunto de las vellosidades de siete células retinulares, cada una de estas tiene un rabdómero, es decir la membrana de cada una se encuentra plegada y forma microvellosidades, orientadas hacia la región interna formando el rabdomo (Fig. 3B) (Eguchi, 1965; Rao, 1985). Existe una octava célula retinular de tamaño reducido que no participa en la formación del rabdomo (Vogt, 2002). La función del rabdomo es la absorción de la luz, pues la molécula de rodopsina, el pigmento fotosensible que capta la luz, se encuentra en dichas microvellosidades y desencadena la fototransducción. Entre las células retinulares se encuentran las células tapetales, que son células gliales y de sostén. Dentro de las células retinulares (R1-R7) se encuentra el pigmento proximal (Rao, 1985). El pigmento distal está constituido por un grupo de gránulos oscuros localizados dentro de las células del pigmento distal que corren paralelamente a las células retinulares. Cada una de las omatidias se encuentra sobre una membrana basal la cual es atravesada por axones de las células retinulares, formando grupos de axones (cartuchos) que proyectan hacia la lámina ganglionaris (Sandeman, 1982; Vogt, 2002). Las células tapetales contienen también gránulos de pigmento que no absorbe la luz sino que la refleja (pigmento reflejante) (Rao, 1985).

Por debajo de la retina se localiza un espacio vascular, enseguida se encuentra la lámina ganglionaris, así como otros neurópilos bien definidos, la médula externa, la médula interna y la médula terminalis que ya forma parte del protocerebro (protocerebro anterior) contribuyendo a 1) la respuesta eléctrica a la luz y 2) la apertura o cierre de la pseudopupila (reflejo fotomotor) (Maynard, 1962).

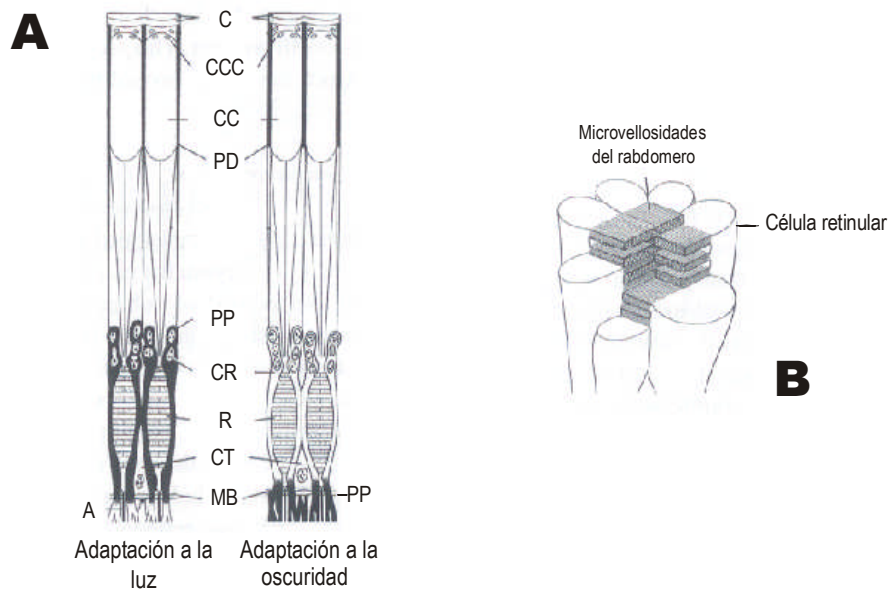


Figura 3. A) Esquema de omatidas, adaptado a la luz (izquierda) o a la oscuridad (derecha), mostrando la dispersión y retracción de los pigmentos distal y proximal. B) Células retinulares formando un rabdomo, las microvellosidades están orientadas hacia la región interna del rabdomo. C, córnea; CCC, células del cono cristalino; CC, cono cristalino; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; CR, célula retinular; R, rabdomo; CT, células tapetales; MB, membrana basal y A, axones (Tomado de Vogt, 2002)

2.5.1 Efectores Pigmentarios

Entre los efectores pigmentarios se encuentran los cromatóforos epiteliales y algunas células de la omatidia. Son células especializadas capaces de modificar la cantidad y movimiento del pigmento que contienen y contribuir a cambios adaptativos de color, ante cambios en el medio (Rao, 1985).

2.5.1.1. Pigmentos de Blindaje a la luz y Reflejo Pupilar

Como se definió anteriormente en los crustáceos y en particular en el acocil, existen tres pigmentos de blindaje en los componentes del ojo que modulan el flujo de fotones, provocando modificaciones estructurales, tales como, cambios en la membrana fotosensible del rabdomo, rearrreglos en componentes del citoesqueleto, transformación del retículo endoplásmico liso, redistribución de los gránulos de pigmentos de blindaje, entre otros organelos citoplasmáticos. Todos estos elementos son parte del proceso de adaptación del ojo a la luz y a la oscuridad. A través de estas respuestas fotomecánicas, la migración de los pigmentos blindantes ha sido ampliamente estudiada en una gran variedad de crustáceos con ayuda de métodos histológicos (Frixione y Pérez-Olvera, 1991). Trabajos realizados en moscas por Kirschfeld y Franceschini en 1969 demostraron que en la periferia de las células retinulares, los gránulos de pigmentos se dispersaban en la oscuridad y

que durante los primeros segundos de adaptación a la luz estos gránulos se movían hacia los rabdomos, mecanismo análogo al reflejo pupilar en los mamíferos. Lo anterior demostró que el sistema de migración de pigmentos en la pseudopupila de las moscas actúa como un mecanismo de control automático, regulado por vía refleja. Posteriormente en 1976, reportaron que después de un bloqueo en la síntesis de pigmentos homocromáticos, no se mostraban cambios ante la adaptación de luz-oscuridad en la pseudopupila, atribuyendo este efecto a la ausencia de los gránulos de pigmentos en estos mutantes (Kirschfeld y Franceschini, 1969, 1976 citado en Stavenga, 1979).

Bajo iluminación el pigmento proximal se dispersa, impidiendo el paso de la luz hacia el fotorreceptor, mientras que en la oscuridad se encuentra retraído en los axones de las células retinulares, de esta forma el rabdomo queda expuesto a la luz. En la oscuridad el pigmento distal se retrae hacia el extremo distal de las células accesorias, y se dispersa bajo iluminación. Mientras que el pigmento reflejante no tiene un efecto modulador (Rao, 1985).

Aréchiga y Rodríguez-Sosa (1997) demostraron que el curso temporal de la migración de ambos pigmentos era diferente. La retracción del pigmento proximal en la oscuridad era mucho más rápida que la del pigmento distal, así los componentes del ojo podían operar dentro de tres rangos de intensidad, y la función de los fotorreceptores, a bajos niveles de iluminación estaría determinada por el flujo de fotones sobre el rabdomo, el estado de adaptación a la luz y la ganancia de la transducción fotoeléctrica. De esta forma los desplazamientos del pigmento proximal son el resultado de la acción directa de la luz sobre los fotorreceptores, las células del pigmento distal son los efectores de un reflejo neuroendocrino iniciado por fotorreceptores extrarretinales y bajo el control de dos neurohormonas, la RPCH y la PDH (Aréchiga et al., 1985).

La posición del pigmento puede ser expresada cuantitativamente por un índice, que toma valores que van de 1 cuando este se encuentra disperso al máximo, adaptado a la luz o 0 cuando está completamente agregado, adaptado a la oscuridad, aunque una fracción del pigmento usualmente se mantiene en la membrana basal (Frixione y Aréchiga, 1981).

2.5.2. Pigmento proximal

El pigmento proximal (PP) se desplaza como resultado de la acción directa de luz sobre los fotorreceptores (Porrás et al., 2001). La respuesta a la adaptación a la luz es descrita como un movimiento monofásico y consiste de dos etapas con diferentes propiedades. En la primera fase los gránulos se retraen o dispersan rápidamente (respuesta "todo o nada"), mientras que la segunda fase continua con un movimiento más lento, indicando el nivel de iluminación (Frixione y Pérez-Olvera, 1991). Cuando la primera etapa de la dispersión se completa, el pigmento se expande hasta dos terceras partes del rabdomo de cada una de las omatidias y lo aísla ópticamente de la luz que se refleja

en las células tapetales, intercaladas entre los extremos proximales de las omatidias. La dispersión de pigmento evita la sobre-exposición del fotorreceptor y la saturación del pigmento visual cuando el pigmento distal ha comenzado a moverse a la posición de adaptación a la luz (Aréchiga 1977b). Durante la adaptación a la oscuridad los pigmentos migran proximalmente y se agregan dentro de los axones de las células retinulares por debajo de la membrana basal (Frixione y Aréchiga, 1981). En la región cercana al núcleo el pigmento aparece disperso irregularmente, mientras que en el axón y el citoplasma alrededor del extremo proximal del rabdomo, los gránulos están situados alrededor de un paquete longitudinal grueso de microtúbulos (Frixione et al., 1979).

En la oscuridad la migración del pigmento está sujeta a una periodicidad circadiana (Aréchiga, 1977a), pero se ha propuesto que también está regulada por otros mecanismos, en los que se involucra al Na^+ y Ca^{2+} . Existe un gradiente despolarizante, llamado potencial de receptor (RP), que es generado por un incremento en la conductancia de la membrana (G_m) causado por la distribución de iones a través de la membrana celular (Shaw y Stowe, 1982). En el mecanismo de fototransducción de los crustáceos, existe una interacción entre la luz y la actividad del Na^+ , K^+ y el sistema ATPasa (Picones y Aréchiga, 1990). Tras la inyección intracelular de Na^+ se han reportado incrementos en la actividad del Ca^{2+} citoplasmático, actuando en la respuesta electrofisiológica de la adaptación a la luz en fotorreceptores de *O. limosus* (Frixione y Pérez-Olvera, 1991). La respuesta provocada por la iluminación sobre los pigmentos, es activada a través de Na^+ inducida por la liberación de Ca^{2+} de reservas intracelulares. Cuando la concentración interna de Ca^{2+} incrementa, la producción de inositol trisfosfato (InsP_3) puede causar la entrada de Na^+ , el cual induce la liberación de Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico liso (Frixione y Ruiz, 1988), permitiendo la dispersión de los gránulos de pigmento asociados a los microtúbulos dentro de las células retinulares en el citoplasma (Frixione y Aréchiga, 1981; Frixione y Tsusumi, 1982; Frixione y Pérez-Olvera, 1991).

Los fotorreceptores son influenciados por agentes humorales, como la serotonina (5-HT) que es capaz de disparar la retracción del pigmento proximal. Se han identificado axones inmunopositivos a 5-HT cerca de los axones de los fotorreceptores en la lámina ganglionaris, y por otra parte se ha reportado que la 5-HT produce un aumento en la conductancia inducida por la luz, provocando una mayor sensibilidad (Frixione y Hernández, 1989; Aréchiga et al., 1990). La concentración de 5-HT en el tallo óptico y el cerebro muestran un ritmo circadiano en el acocil *Procambarus clarkii* (Castañón-Cervantes et al., 1999) además, en el tallo óptico la concentración de 5-HT es mayor durante la noche (Fingerman y Fingerman, 1977).

2.5.3. Pigmento distal

La dispersión o retracción del pigmento distal es una respuesta fotomecánica mediada por dos reflejos neuroendocrinos, el primero es disparado por la luz, actuando a través de fotorreceptores extrarretinales, resultando la liberación de PDH y por consiguiente la promoción de la dispersión del pigmento distal (Aréchiga, 1977b; Aréchiga et al., 1985). El segundo reflejo es disparado en respuesta a la oscuridad y es mediada por la liberación de la RPCH, resultando una retracción del pigmento distal. Esta migración del pigmento distal puede ser una consecuencia de la ritmicidad circadiana en la secreción de la PDH y RPCH (Garfias et al., 1995). El contenido de PDH en los tallos oculares del acocil es más alto durante el día que por la noche, mientras que la RPCH es mayor en la noche que durante el día (Aréchiga y Mena, 1975). Los niveles altos de RPCH se mantienen aproximadamente toda la noche y se incrementan después del encendido de la luz (Rodríguez-Sosa et al., 1994). Ambos pigmentos se retraen durante la noche y se dispersan durante el día, persistiendo bajo condiciones de iluminación constante (Aréchiga et al., 1993).

El control eferente de la actividad retiniana es sugerido por la caracterización de axones inmunopositivos a un anticuerpo contra la RPCH, este octapéptido promueve la retracción radial de los gránulos de pigmento dentro de los cromatóforos tegumentarios y actúa sobre las células del pigmento distal, promoviendo su retracción. La región con inmunopositividad de RPCH ha sido identificada en la lámina ganglionaris en la región final de los axones en los fotorreceptores y en la región proximal de las células del pigmento distal (Preciado et al., 1994; Garfias et al., 1995) así como en neuronas del tallo óptico (Mangerich, et al., 1986;). La inyección de RPHC aumenta la amplitud del ERG en el acocil *Orconectes limosus* (Gaus y Stieve, 1992) y *Procambarus clarkii* adaptados a la oscuridad y a la luz, proponiendo un efecto directo sobre los fotorreceptores en la fototransducción y un efecto indirecto sobre el pigmento distal (Garfias et al., 1995).

El mecanismo por el cual la RPCH promueve la agregación del PD es debido a la entrada y liberación de Ca^{2+} intracelular que interactúa con otros mensajeros intracelulares, como los nucleótidos cíclicos (Porrás et al, 2001).

Estudios de la acción de la RPCH en los eritróforos del langostino *Macrobachium potiuna*, sugieren que esta hormona induce la agregación de los gránulos de pigmento, depende de Ca^{2+} y posiblemente la fosforilación de las moléculas responsables del movimiento de gránulos de pigmento. Existen algunos reportes en donde la agregación de los gránulos de pigmento esta regulados por Ca^{2+} dependientes de ATP. Se ha logrado determinar que la dispersión de los gránulos de pigmento contenidos en los eritróforos requiere un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, así como un descenso en la concentración de Ca^{2+} intracelular (Kotz y McNiven, 1994; Porrás et al., 2001).

2.5.4 Respuesta eléctrica a la luz, Electrorretinograma (ERG)

El ojo es un órgano sensorial complejo, sin embargo es un buen objeto de estudios experimentales ya que el estímulo aplicado, la luz, puede ser controlado. Cuando el ojo responde a la luz, muchas células nerviosas en la retina generan cambios en el potencial eléctrico (Naka y Kuwabara, 1959). En muchos estudios sobre la sensibilidad del ojo del acocil a la luz, se han utilizado registros de electroretinograma (ERG) para analizar las respuestas de los fotorreceptores; por tal motivo el ERG constituye una herramienta útil para éste tipo de estudios, pues permite hacer estudios crónicos en animales íntegros a largo plazo, así como en retinas aisladas, además de haber sido considerado como un marcador del metabolismo de la retina.

El electroretinograma es la respuesta extracelular del ojo ante un estímulo luminoso. Esta respuesta se origina como una diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo activo en el ojo y un electrodo indiferente. Esta diferencia de voltaje, producida por las estructuras visuales del ojo del acocil, como las omatidias, el rabdomo y las células retinulares, puede registrarse debido a que el líquido extracelular se comporta como un conductor ante el estímulo luminoso (Oakley y Shafer, 1992)

Naka y Kuwabara registraron el ERG en el acocil, sobre la superficie de la córnea, encontrando que el ERG consiste de dos componentes que denominaron como H-I y H-II (Fig. 4). H-I respondía solo al encendido de la iluminación, mientras que la amplitud de H-II se mantenía durante el estímulo. Registrando con microelectrodos y ubicándolos en diferentes regiones de la retina, encontraron que los componentes antes descritos eran originados por diversas estructuras, proponiendo al rabdomo como la estructura que origina H-I y las células retinulares para H-II (Naka y Kuwabara, 1959). Confirmando estos resultados Eguchi (1965) encontró que la respuesta a la luz, es generalmente monofásica y compuesta de dos componentes, un pico inicial rápido (fase dinámica) inmediatamente seguido de la iluminación y una meseta lenta (fase estática) que permanecía mientras duraba el estímulo.

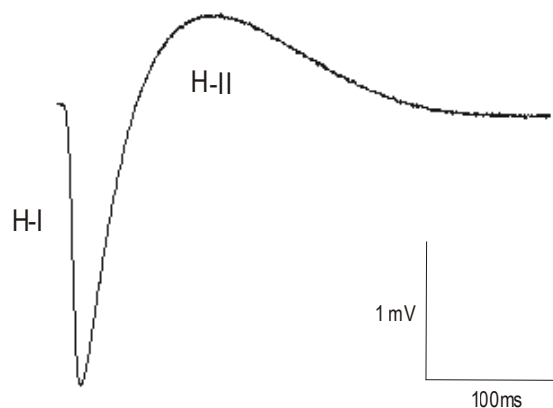


Figura 4. Electrorretinograma (ERG) de acocil *Procambarus clarkii*. En el registro se muestran los dos componentes que lo conforman, H-I, originado en el rabdomo y H-II en las células retinulares.

2.5.5 Ritmo de amplitud del Electrorretinograma (ERG)

El ritmo circadiano del ERG en los crustáceos, principalmente en el acocil, usando animales intactos, se han identificado dos aspectos de la expresión del ritmo, 1) un ritmo de fototransducción en los fotorreceptores de la retina, y 2) un ritmo circadiano en la pseudopupila para recibir fotones, mediada por la posición de dos grupos de pigmentos intracelulares, PP y PD (Aréchiga et al., 1993).

La amplitud de la respuesta de los fotorreceptores a los pulsos de luz de una intensidad dada depende de ciertos mecanismos, como la ganancia de los fotorreceptores y la posición del PP y del PD pues son capaces de cambiar la sensibilidad a la luz de la retina. La ritmicidad endógena es más conspicua en el PP bajo oscuridad constante y en el PD bajo iluminación continua (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997).

El ritmo circadiano de sensibilidad visual se ha documentado tanto en los fotorreceptores de la retina como en interneuronas visuales del lóbulo óptico. En acociles *P. clarkii*, así como en *P. bouvieri* y *C. maenas* intactos, se encontró que existía una mayor sensibilidad en los fotorreceptores durante la noche que en el día (Aréchiga y Wiersma, 1969). Tal efecto en la amplitud del ERG, se mantiene en condiciones de iluminación u oscuridad constantes (Aréchiga et al., 1993).

Se ha sugerido que éste ritmo subyace en mecanismos de control de naturaleza neuroendocrina y neuronal (Fanjul-Moles y Prieto Sagredo, 2003). El ritmo circadiano de la respuesta de los fotorreceptores a la luz persiste en los tallos oculares aislados mantenidos en oscuridad constante, sugiriendo un origen local de la ritmicidad (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Aréchiga et al., 1993).

La retina se ha propuesto como un posible generador de la ritmicidad circadiana, pues su actividad eléctrica varía a lo largo de un ciclo de 24 horas. Aréchiga y Rodríguez-Sosa (1998), encontraron una ritmicidad circadiana en la retina aislada, conservada en cultivo, lo que indicaría que este ritmo circadiano estaría controlado por un reloj biológico endógeno.

Se han propuesto otras estructuras como osciladores circadianos responsables de éste ritmo, que podrían estar localizadas en cierto número de células neurosecretoras ubicadas en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1975) probablemente el protocerebro (Barrera-Mera, 1978) y el tallo óptico, específicamente el complejo OX-GS (Aréchiga et al. 1993).

2.6 Metabolismo de glúcidos

La disponibilidad de la glucosa y la función visual están relacionadas, pues es el principal sustrato energético para las neuronas y la retina. La D-glucosa en los acociles se obtiene a través de la dieta, por las células epiteliales del intestino o directamente del hepatopáncreas donde es conservado como glucógeno o sintetizado por la vía gluconeogénica (Verri et al., 2001).

Usualmente en los crustáceos existe poca glucosa libre, la mayoría es fosforilada. Cuando una molécula de glucosa entra al citoplasma se convierte rápidamente a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por la hexoquinasa. Se pueden utilizar tres vías metabólicas básicas: 1) glicogénesis, 2) glicólisis o 3) la vía de las pentosas. La recurrencia de cada una de estas rutas, depende de cada una de las necesidades de los animales (o tejidos). En el músculo y las branquias de los crustáceos y en periodos como la premuda, la glicólisis es la principal ruta catabólica de la glucosa. Así cuando se requiere ATP, la glicólisis puede ser activada y cuando la G-6-P y el ATP son abundantes, se forma glucógeno. La ruta de las pentosas genera reductores en forma de NADPH y la ribosa-5-fosfato involucrada en la síntesis de nucleótidos (Santos y Keller, 1993a).

En los invertebrados el efecto de la glucosa es a nivel periférico y neural, sin embargo aunque se conocen algunos mecanismos de transporte no existen reportes acerca de receptores de glucosa en los invertebrados. Se conocen dos sistemas de transporte, uno que actúa a través de canales sensibles a K^+ , implicados con el metabolismo celular y la actividad eléctrica y están asociados a la regulación y liberación de neurotransmisores (Glowik et al., 1997) o mediante un sistema de transporte acoplado a Na^+ reportado en el hepatopáncreas (Verri et al., 2001).

La secreción de la CHH es esencial para el control homeostático de la D-glucosa, en particular incrementando los niveles de glucosa en la hemolinfa, regulando la glicemia induciendo o inhibiendo los niveles de glucosa desde el hepatopáncreas y los depósitos de glicógeno (Santos y Keller, 1993a).

Las concentraciones de glucosa varían homeostáticamente dentro de un ritmo circadiano, así como en respuesta al estrés, a través de la CHH. En crustáceos decapodos los niveles de glucosa son bajos en comparación con mamíferos, en *Procambarus clarkii* se reportan niveles alrededor de 0.9 ± 0.2 mM (García et al., 1993), 0.03-0.19 mM en *Orconectes limosus* (Keller y Orth, 1990), 0.1-0.3 mM en *Carcinus maenas* (Lüschen et al., 1993) 0.8mM en *Cancer pagurus* (Webster, 1996), 0.77–1.39 mM en *Cancer borealis* (Glowik et al., 1997), 0.77–1.39 mM en *Penaeus monodon* (Hall y Van Ham, 1998) y 1.1–1.4 mM en *Homarus americanus* (Morgulis, 1923) (Morgulis, 1923; Keller y Orth, 1990; Lüschen et al., 1993; Webster, 1996 y Hall y Van Ham, 1998, citado en Verri et al., 2001).

2.6.1 Glucógeno en retina de invertebrados

Se ha reportado poco acerca de depósitos de glucógeno en la retina de invertebrados. Mediante pruebas de microscopia se han podido observar partículas de glucógeno en ciertas regiones de la misma. Las propiedades de tinción histoquímica del cono cristalino en un crustáceo isopodo, sugieren que está compuesto de un complejo proteína-carbohidrato (Nemaniac, 1975). En *Artemia* mediante microscopía de luz y electrónica se han localizado partículas de glucógeno en los conos de la retina (Eloffson y Odselius, 1975). En los acociles, no se han realizado pruebas histoquímicas para la

localización de depósitos de glucógeno, aunque en el cono cristalino pueden observarse partículas de 150 a 300 Å que podrían ser ribonucleoproteínas o glucógeno (Röhlich y Torö, 1965) (Röhlich y Torö, 1965; Nemaniac, 1975 ; Elofsson y Odselius, 1975 citado en Roach, 1976)

Las células gliales y la matriz extracelular de vertebrados e invertebrados tienen como característica, la presencia de depósitos de glucógeno y un gran número de vesículas y estructuras granulares en su estructura. En el sistema visual del cangrejo *Ucides cordatus*, se pudo observar material positivo a la reacción de ácido peródico de Schiff (PAS) en la membrana basal entre los axones de la retina, en los límites externos de la lámina, la médula externa e interna, entre los quiasmas externos e internos y entre las fibras del tracto protocerebral (da Silva et al., 2001).

2.6.2 Metabolismo de la glucosa en retina de invertebrados

En la electrofisiología de la retina y el metabolismo de la glucosa en los invertebrados, se ha empleado como modelo la retina de la abeja *Apis mellifera*, ya que las células gliales y las células fotorreceptoras constituyen dos compartimentos metabólicos distintos. En las células gliales, aún cuando no responden a la luz, se observa que el metabolismo del glicógeno cambia cuando se estimulan los fotorreceptores. De esta forma el metabolismo de la glucosa se realiza en las células gliales, por la ruta glucolítica o es almacenada en forma de glicógeno (Tsacopoulos, et al., 1988; Evêquoz-Mercier y Tsacopoulos, 1991). Dimitracos y Tsacopoulos (1985) observaron que el metabolismo energético en los fotorreceptores es aerobio, ya que la anoxia y la inhibición de la función mitocondrial, eliminan la actividad eléctrica inducida por la luz. Se ha observado una mayor cantidad de mitocondrias y poco glucógeno en células fotorreceptoras, mientras que las células gliales poseen una mayor cantidad de glicógeno y menor cantidad de mitocondrias (Tsacopoulos, et al., 1997b).

En los fotorreceptores hay un incremento en el metabolismo oxidativo (Brazitikos y Tsacopoulos, 1991) y se liberan señales químicas tales como, glutamato (Tsacopoulos y Magistretti, 1996) y amonio, que son transportados por sistemas de transporte de membrana, activándose la glucólisis en las células gliales (Tsacopoulos et al., 1997a, 1988).

Una vez que el glutamato y el amonio (NH_4^+) entran en las células gliales, promueven la actividad de tres enzimas, la enzima fosfofructocinasa (PFK), alanina aminotransferasa (ALAT) y glutamato deshidrogenasa (GDH) (Tsacopoulos, 2002). La glucosa-6-fosfato en las células gliales se metaboliza a piruvato, pero este puede entrar al ciclo de Krebs, convertirse a lactato, o ser transaminado a alanina, utilizando la enzima ALAT y la GDH. La alanina sintetizada en la glía es liberada y tomada por los fotorreceptores, a través de mecanismo de transporte dependientes de Na^+ . En los fotorreceptores la alanina se convierte a piruvato, por acción de la enzima ALAT, el piruvato entonces puede entrar al ciclo de krebs y así completar la oxidación (Tsacopoulos et al., 1994).

Por otra parte el glutamato es transportado dentro de la célula glial mediante un gradiente electroquímico de Na^+ , este es transformado a α -cetoglutarato por la GDH y permite la conversión de piruvato a alanina. Ambos metabolitos contribuyen a la homeostasis del potencial redox de la célula (Tsacopoulos et al., 1994, 1997a; Tsacopoulos, 2002).

2.7 Péptidos Hiperglicemicos

2.7.1 Hormona Hiperglicemiante de los Crustáceos (CHH)

La CHH, como se ha mencionado antes, es uno de los neuropéptidos sintetizados en el órgano X (OX) y transportados, vía tracto axonal, hacia la glándula sinusal (GS) (Ollivaux y Soyez, 2000). La CHH juega un papel central en los procesos metabólicos, principalmente en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, así como en el control de la reproducción, muda y osmoregulación (Chang et al., 1999). Por otra parte juega también un papel importante en las condiciones de estrés, como el producido por cambios en la temperatura y la anoxia (Santos y Keller, 1993b)

2.7.1.1 Localización y expresión de la Hormona Hiperglicemiante de Crustáceos

En crustáceos el tallo ocular es la principal zona de distribución de las células neurosecretoras, así como el ganglio subesofágico, torácico y abdominal. Esta vía neurosecretora ha sido caracterizada por estudios de inmunocitoquímica, en diferentes especies de crustáceos (Santos y Keller, 1993a). Los centros productores de CHH ubicadas en células que forman parte de la medula terminalis órgano X (MTOX), fueron encontrados en grupos de 35 células, situadas en la parte latero-ventral sobre la MTOX y sus axones corren hacia la glándula sinusal, donde es liberada por procesos de exocitosis. Por microscopia de luz y fluorescencia se ha podido caracterizar a la CHH como material granular distribuido en el citoplasma (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981).

Se han identificado células en la segunda raíz torácica, localizadas en el ganglio subesofágico inmunoreactivas a la CHH (Chang et al, 1999), también se ha demostrado su expresión en el cordón ventral de *Homarus americanus* (De Kleijn et al, 1995), por inmunorreactividad en el cerebro, el ganglio torácico y el órgano pericardico de *Carcinus maenas* (Keller et al., 1985), así como en la retina del acocil *Procambarus clarkii*, específicamente en las células tapetales (Escamilla-Chimal, et al., 2002).

La CHH es una neurohormona de 72 residuos peptídicos, seis cisteínas formando tres puentes disulfuro, con un peso molecular de aproximadamente 8.3 KD (Yasuda et al., 1994), actúa vía regulación de glicemia a través de mecanismos clásicos de movilización de glucógeno (Soyez, et al., 1994), pues la CHH muestra una alta afinidad a proteínas de alto peso molecular en la hemolinfa, posiblemente a subunidades de hemocianina, las cuales pueden funcionar como transportadores (Kallen et al., 1990). La presencia y posteriormente la secuenciación de CHH han sido determinadas en *Carcinus maenas*, *Homarus americanus*, *Orconectes limosus* y *Procambarus bouvieri*. En

Procambarus clarkii han determinado la secuencia de aminoácidos de dos isformas de la CHH, CHH-I y CHH-II. Ambas variantes contienen 72 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuro, variando solo en la epimerización D/L de la posición tres de la fenilalanina (Yasuda et al., 1994) encontrándose en una proporción 3:1. La isomerización de L-fenilalanina a D-fenilalanina, es un evento post-traducción, antes de que los gránulos en el órgano X migren hacia la glándula sinusal (Soyez et al., 2000), además les confiere una actividad biológica diferente (Serrano et al., 2004). Las diferentes secuencias de CHH en diversas especies, muestran un alto grado de homología, por ejemplo *O. limosus* y *C. maenas* tienen un 81% de homología (Santos y Keller, 1993a).

2.7.1.2 Mecanismos de regulación y liberación de la CHH

La CHH induce hiperglicemia causada por una rápida movilización de glucosa desde las reservas de carbohidratos, sugiriendo la posibilidad de que la CHH pudiera actuar en diversas vías metabólicas (Keller et al., 1985). La CHH tiene un efecto sobre la enzima glucógeno sintasa I, inhibiendo su actividad y promoviendo la obtención de glucosa desde glucógeno, mediado por la glucógeno fosforilasa (Sedlmeier, 1982). En músculo y hepatopáncreas esta hormona es capaz de activar a la adenilato ciclasa y guanilato ciclasa, aumentando la concentración intracelular de AMPc y GMPc (Kummer y Keller, 1993), activando proteínas cinasas dependientes de nucleótidos cíclicos lo que conduce a la fosforilación de la glucógeno sintasa y de la cinasa fosforilasa que a su vez fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa, liberando glucosa hacia la hemolinfa (Sedlmeier, 1982). El aumento en la concentración de glucosa como resultado de la alimentación, tiene como consecuencia una disminución de los niveles de CHH en la hemolinfa de *O. Limosus*, este descenso de CHH activa a la glucógeno sintasa, resultando en un incremento del contenido de glucógeno en diferentes tejidos (Fig. 5) (Santos y Keller, 1993a).

Se ha demostrado un mecanismo de retroalimentación negativa en *Cancer borealis*, así la D-glucosa actúa sobre las células productoras de CHH, regulando su liberación y por lo tanto la concentración de glucosa en la hemolinfa. La D-glucosa activa corrientes de K⁺, que inducen una hiperpolarización, de esta forma se inhibe la liberación de CHH y por consecuencia la movilización de glucosa desde depósitos de glucógeno. Cuando la concentración de glucosa en la hemolinfa es baja, las células que poseen CHH se despolarizan induciendo su liberación. (Glowik et al., 1997).

Existe un mecanismo de retroalimentación positiva entre la glucosa, el lactato y la CHH, pues estos participan en la regulación de la liberación de CHH en *C. maenas*. El incremento del lactato en sangre, produce una liberación de CHH, la hormona entonces puede estimular la glucogenólisis, incrementado la disponibilidad de glucosa. Cuando la glucosa es liberada es metabolizada, entonces

el exceso de glucosa inhibe la liberación de la CHH desde la glándula sinusal por una retroalimentación negativa (Santos y Keller, 1993b).

2.7.1.3 Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos y neuromodulación.

Las fluctuaciones en la liberación de CHH son debidas a factores ambientales y endógenos mediada por neuromoduladores. Se conoce que la serotonina (5-HT), la dopamina, así como la leu-encefalina modulan la actividad de la secreción de CHH. Se ha demostrado que la 5-HT actúa de manera dosis dependiente, aumentando la liberación de CHH del tallo ocular (Lee et al., 2001). Se ha demostrado inmunoreactividad a 5-HT en ramificaciones axonales, de las células productoras de CHH del órgano X en el acocil (Escamilla-Chimal et al., 2002), así como en las terminales de la MT-OX del acocil *Procambarus clarkii*. La dopamina en *Procambarus clarkii* inhibe la secreción de CHH (Sarojini et al., 1995). La leu-encefalina y la met-encefalina, inhiben la liberación de CHH desde la glándula sinusal en *Orconectes limosus*. Ambas inhiben la liberación vía contactos sinápticos, localizados dentro del neuropilo de la médula terminalis y no en la glándula sinusal. (Ollivaux et al., 2002).

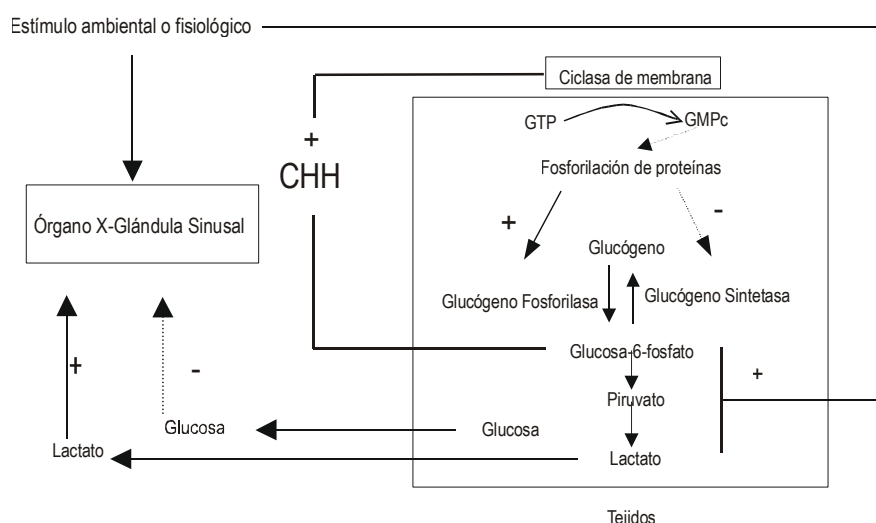


Figura 5. Regulación de los niveles de CHH por regulación interna o externa, los signos representan la estimulación (+) o inhibición (-). Ruta metabólica que ha sido simplificada de acuerdo con Santos y Keller, 1993a.

2.7.1.4 Ritmo circadiano del contenido de CHH

La síntesis y secreción de CHH muestra un control circadiano así como la concentración de glucosa en diferentes especies de acocil (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985). En condiciones normales los niveles de glucosa son bajos durante el día e incrementan durante las primeras horas de la noche y están relacionados con los cambios en la secreción de CHH (Kallen et al., 1988). En el acocil *Orconectes limosus* los niveles de CHH en la hemolinfa permanecen constantes durante el periodo

luminoso y en las tres primeras horas de oscuridad, se incrementa tres veces de valor basal. La concentración de glucosa es baja durante el día e incrementa hasta cuatro veces del valor basal durante las tres o cuatro horas después de haber iniciado el periodo de oscuridad (Kallen et al., 1990).

Análisis morfométricos y de microscopia de luz y electrónica, realizados en el acocil *Astacus leptodactylus*, indican tres categorías de inmunopositividad, representando diferentes etapas del proceso de síntesis de CHH, relacionados con la ritmicidad en la concentración de glucosa en hemolinfa. Las células con actividad de síntesis de CHH comienzan su actividad dos horas después de comenzar el periodo de oscuridad, resultando una transferencia de gránulos de CHH hacia los axones. Estos gránulos en la glándula sinusal al tener actividad excitotica, causa una liberación fuerte de CHH hacia la hemolinfa, y cuatro horas después esta CHH causa una hiperglicemia (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985). Para el acocil *Procambarus clarkii*, se demostró por inmunorreactividad a CHH, que existen diferencias cíclicas, tanto en su presencia como en densidad (Escamilla-Chimal et al., 2001).

2.7.2 Glucagon

Descrito por Roger Unger en 1950, el glucagon fue caracterizado como el péptido opuesto a los efectos de la insulina (Aronoff et al., 2004). La información acerca de la estructura primaria del glucagon, así como las funciones regulatorias y la caracterización de los sitios de unión son idénticos en muchos mamíferos, excepto para el cobayo. Existe muy poca información acerca del glucagon en invertebrados, por tal motivo la investigación sobre esta hormona se han llevado a cabo usando principalmente modelos de mamíferos (Strand, 1998).

Los islotes de Langerhans en el páncreas son glándulas endocrinas que secretan dos hormonas peptídicas de fundamental importancia para la regulación del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Estas hormonas son la insulina y el glucagon, cada una secretada por diferentes grupos de células. El glucagon es el principal péptido pancreático, producido por las células alfa que actúan directamente sobre las células beta del páncreas para regular la secreción de insulina. El principal efecto del glucagon es la promoción de liberación de glucosa del hígado al torrente sanguíneo a través de la movilización de las reservas de glucógeno, por otra parte estimula la gluconeogénesis. La acción del glucagon es de particular importancia durante periodos en que el aporte de glucosa es insuficiente. Ante esta baja, se inicia su liberación y así restaurar la concentración normal de glucosa (Candy, 1980; Strand, 1998).

2.7.2.1 Estructura del Glucagon

Es una hormona peptídica de 29 aminoácidos, que posee un alto grado de conservación. Es procesado a partir del proglucagon. La actividad biológica del glucagon requiere de la integridad en la

molécula, pues el C-terminal es esencial para el anclaje y el N-terminal, principalmente la histidina, para la unión selectiva y el acoplamiento del efector (Christophe, 1996).

2.7.2.2 Expresión del precursor de glucagon, regulación y liberación.

En la mayoría de las especies, existe un solo gen para el RNAm de preproglucagon, este gen se expresa en el sistema nervioso central. El preproglucagon es un polinucleótido de 9.4 kilobases, compuesto de seis exones y cinco intrones y en los mamíferos se encuentra localizado en el cromosoma 2. La prohormona consta de una secuencia del péptido señal de 20 aminoácidos seguida por la secuencia del proglucagon de 160 aminoácidos (Fig. 6) (Strand, 1998). El proglucagon, es expresado en varios tejidos como el cerebro, el intestino y principalmente en el páncreas (Nian et al., 2002).

El gen del proglucagon además del glucagon (proglucagon 32-62) contiene un péptido pancreático liberador de glucagon (GRPP) y un fragmento mayor de proglucagon (MPGF) que contiene dos péptidos glucagon-like GLP-1 y GLP-2 (Sivarajah et al., 2001).

El principal regulador de la secreción del glucagon es la disminución de la glucosa en sangre, mientras que la insulina es un potente inhibidor de su secreción. La secreción y liberación del glucagon intestinal y pancreático ocurre en forma sincrónica. El glucagon actúa como un factor hiperglicémico por la estimulación de glucosa hepática liberada a través de la glucogenólisis o gluconeogénesis. En la gluconeogénesis se lleva a cabo una conversión de aminoácidos o de glicerol a glucosa, debido a la acción del glucagon sobre las enzimas hepáticas involucradas en esta reacción. Este efecto es el opuesto al de la insulina. El tejido adiposo es otro blanco del glucagon que actúa como agente lipolítico, pues libera ácidos grasos libres y glicerol que pueden servir como sustratos para la gluconeogénesis; Así, a través de la lipólisis, el glucagon actúa como un factor hiperglicémico. Esta acción se lleva a cabo en la ausencia de insulina, pero se ha reportado que el glucagon está acoplado con la secreción de insulina para suprimir su secreción, cuando el glucagon es dominante (Strand, 1998).

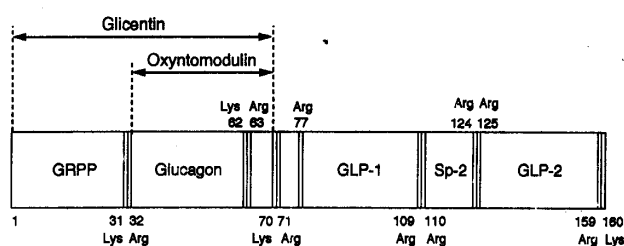


Figura 6. Esquema de la estructura de proglucagon de humano (Yahaiara, et al., 1996).

2.7.2.3 Receptor de Glucagon

El modelo con el cual se han podido caracterizar los sitios de unión a glucagon es en vertebrados, principalmente en rata. Todos los receptores poseen un dominio N-terminal extracelular y siete dominios transmembranales separados por pequeños loops intracelulares y extracelulares. (Svoboda et al., 1999). El gen del receptor de glucagon carece de intrones, en rata consta de 12 exones, siete de los cuales codifican para dichos dominios transmembranales conformados por 485 aminoácidos. El receptor de glucagon hepático es una glicoproteína de 63 kD, posee cuatro sitios de unión N- glicosilados y una secuencia específica para el tercer loop intracelular (RLAR) requerida para la activación de la proteína G (Segre y Goldring, 1993; citado en Strand, 1998). Todos estos receptores pertenecen a la familia de receptores clase A (rhodopsina-like) y muestran una secuencia similar en los dominios transmembranales (Svoboda, 1999). La secuencia de aminoácidos entre ratas y ratones es de 93% de similitud, mientras que para los receptores entre humanos y ratón solo es 80% (Mayo, et al., 2003).

Los sitios propuestos para la distribución del receptor de glucagon en mamíferos, son principalmente el hígado, riñón, corazón, tejido adiposo, timo, glándula adrenal, páncreas, corteza cerebral, y en el tracto gastrointestinal (Svoboda et al., 1999; Dunphy et al., 1998). En cerebro de rata, se han detectado sitios de unión en el hipocampo, la hipófisis anterior, la amígdala, el septum, la médula, el tálamo, el bulbo olfatorio y el hipotálamo (Hoosein y Gurd, 1984b, citado en Mayo et al., 2003), así como en la retina (Fernández-Durango et al., 1990). Utilizando un anticuerpo anti-glucagon encontraron inmunorreactividad positiva en retina de ratón y rata, en células de la capa celular ganglionar y en la capa nuclear interna, así como en células de Müller (Das et al., 1985). En pollo las células amácrinas de la retina presentan un marcaje positivo a glucagon (Feldkaemper et al., 2004), indicando que el glucagon pueda intervenir en la neuromodulación y/o metabolismo de las células de la retina (Das et al., 1985). En la tortuga, se encontró inmunorreactividad a glucagon en la periferia de la retina, formando circunferencias de marcaje densas orientadas hacia la fibra nerviosa del plexus, además utilizando microscopia electrónica revelaron que la inmunopositividad a glucagon, contenido en procesos del epitelio ciliar, se encontraba en vesículas densas (Wetzel y Eldred, 1997) .

La presencia de receptores de glucagon en la retina de la abeja *Apis mellifica*, ya ha sido sugerida por Bounias M. y Pacheco H. en 1979, probando el efecto del glucagon de vertebrados sobre el metabolismo de los carbohidratos, concluyendo que el glucagon puede representar una hormona clave para la degradación del glucógeno almacenado (Bounias M y Pacheco, 1979, citado en Maier et al., 1990). Por otra parte en la almeja *Mytilus edulis* se detectó inmunorreactividad a glucagon en el ganglio cerebral, principalmente en dos centros, el primero es un el área anterior del ganglio y el

segundo fue encontrado en el área ineterolateral. La presencia de células positivas anti-glucagon en el sistema nervioso central del molusco *Lymnaea stagnalis* fueron identificadas en los lóbulos laterales, en el cerebro y el ganglio visceral, sólo un limitado núcleo de células positivas fue detectado en el ganglio cerebral y en algunas fibras del neuróplilo. Hasta ahora existen algunos trabajos que demuestran que los anticuerpos contra varios péptidos biológicamente activos de vertebrados e invertebrados dan reacciones inmunopositivas en los sistemas nerviosos de ambos grupos de animales (Kellner et al., 2002).

En el acocil *Astacus leptodactylus* se caracterizó el sistema peptidérgico del ganglio óptico, mediante la aplicación de anticuerpos contra péptidos biológicamente activos de vertebrados e invertebrados. Específicamente para glucagon se utilizó el anticuerpo anti-glucagon y se encontró inmunorreactividad en células de la lámina ganglionaris, el quiasma óptico y la médula externa. Las interneuronas de la médula externa y de la médula interna presentan tres grupos de células que tienen una reacción positiva: dos grupos distales al órgano X, situado en la médula externa y uno proximal a este. También las células neurosecretoras del órgano X tienen inmunorreactividad positiva. Entre las células neurosecretoras de la médula terminalis (MT) sólo células aisladas son positivas. También se encontró inmunorreactividad en unas pocas fibras en el neurópilo de la medula terminales. Aunque una parte de los grupos que exhiben inmunoreacción positiva en *A. leptodactylus* son conocidas por ser neuronas neurosecretoras clásicas, como el órgano X, otra parte de las células se encuentran entre las neuronas de la lamina ganglionaris, médula externa y médula interna, las cuales hasta ahora han sido consideradas como interneuronas (Van Deijnen et al. 1985).

2.7.2.4 Mecanismo molecular de la regulación de glucosa por glucagon

Cuando las concentraciones de glucosa en sangre son bajas, el glucagon estimula la liberación de glucosa por un incremento en la glucogenólisis y la gluconeogénesis, al mismo tiempo inhibe la síntesis de glucógeno en hepatocitos en cultivo de rata (Christophe, 1996).

En la glucogenólisis, el glucógeno almacenado, es convertido a glucosa-1-fosfato y después a glucosa-6-fosfato (G-6-P), por acción de la enzima glucógeno fosforilasa. La subsiguiente conversión de G-6-P a glucosa ocurre por la acción de la glucosa-6-fosfatasa (Alberts et al., 2002). Cuando se unen el glucagon a su receptor, que se encuentra sobre la superficie celular, provoca ciertos cambios conformacionales en el receptor, pues este, está acoplado a proteínas G. Se conocen dos clases de proteínas G que están involucradas con la transducción de señales, $G_{s\alpha}$ y G_q . Por un lado la proteína $G_{s\alpha}$ estimula la acción de la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMPc intracelular, provocando la actividad de la proteína cinasa A (PKA), que activa a la enzima glucógeno fosforilasa, subsecuentemente se fosforila el glucógeno e incrementa la producción de G-6-P y finalmente su

conversión a glucosa, mientras que la proteína G_q provoca la activación de la fosfolipasa C, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato, y la subsiguiente liberación de calcio intracelular (Jiang y Zhang, 2003). Cuando el glucagon promueve la actividad de la PKA, afecta un mecanismo que involucra la movilización de iones Ca^{2+} (Fig. 7). Cuando el glucagon y las proteínas G asociadas activan fosfolipasa-C (PLC), conduce a un incremento de la hidrólisis del fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP_2), produciendo inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) que unido a una proteína cinasa-C (PKC), fosforila el IP_3 , produciéndose también una liberación de iones Ca^{2+} .

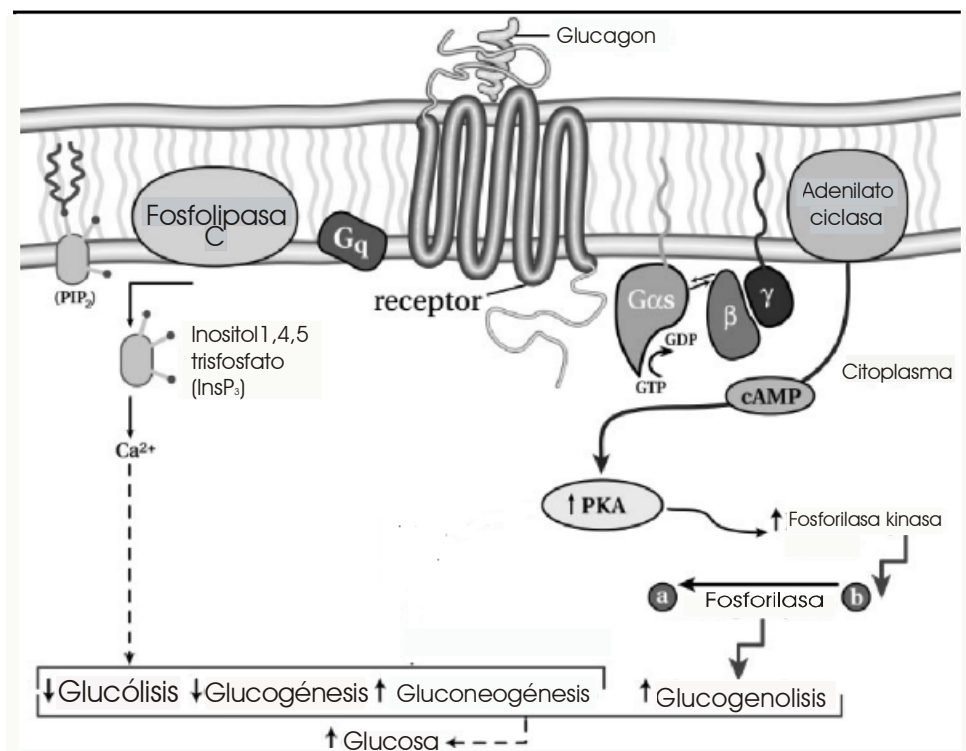


Figura 7. Vía de señalización por glucagon, en vertebrados. Ver texto.(Modificado de Jiang y Zhang, 2003)

3. Planteamiento del Problema

La relación entre la respuesta eléctrica a la luz y el metabolismo de la glucosa en la retina de los crustáceos ha sido poco investigado. Se ha propuesto que al igual que en los vertebrados (Rungger-Brändle, et al., 1996; Coffe, et al., 2004) en la retina de los invertebrados existen depósitos de glucógeno (Evêquoz-Mercier y Tsacopoulos, 1991), relacionados con células gliales de la misma retina (Da Silva, et al., 2001) las cuales podrían estar involucradas en la movilización de glucosa. En el acocil *P. clarkii* se han encontrado tanto la inmunorreactividad a CHH, como la secreción de CHH en células retinianas no identificadas aisladas (Escamilla-Chimal et al., 2002). La síntesis y expresión circadiana de esta hormona se ha comprobado únicamente en el lóbulo óptico, y se desconoce, si la CHH presente en la retina proviene de la circulación o es sintetizada *in situ*.

La retina del acocil se ha propuesto como un posible oscilador circadiano. Esta estructura es capaz de expresar un ritmo del ERG por varios días en condiciones *in vitro* (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998) inclusive en un medio carente de glucosa (Fuentes-Pardo et al., 1985). Lo anterior indica una cierta capacidad para sostener un ritmo metabólico en la utilización de carbohidratos, lo que sugieren una independencia metabólica local, complementaria a la regulación central de glicemia. Así se podría asegurar el aporte metabólico necesario para la respuesta visual, en las horas de mayor gasto energético del animal.

Se ha propuesto a la glucosa como un sustrato de los mecanismos responsables de la génesis del ERG del acocil *P. clarkii*. La aplicación exógena de D-glucosa sobre la retina *in vitro* causó tanto un aumento en la amplitud del ERG, así como la dispersión significativa del pigmento distal durante el periodo de oscuridad (Vizcarra-Chacón, 2006). Este aumento se caracterizó por una latencia larga, lo que indica un efecto en la movilización de glucosa a partir de los depósitos de glucógeno. En los acociles íntegros, se han demostrado ritmos en la concentración de glucosa y CHH en la hemolinfa, con picos durante la noche (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985), estos ritmos están relacionados con la actividad nocturna de este animal. El ritmo del ERG presenta sus puntos máximos durante este periodo (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998), esto podría indicar que existe una relación entre los cambios cíclicos de glucosa, CHH y la sensibilidad de la retina a la luz. Sin embargo se desconoce si la CHH contribuye al ritmo del ERG mediante algún efecto directo o indirecto sobre la magnitud del ERG. En un trabajo previo del laboratorio (Sánchez-Ortiz, 2004) se encontró que la aplicación exógena de CHH-II produce un decremento inmediato en la magnitud de la respuesta del ERG en la noche subjetiva del acocil. Es necesario determinar los cambios del ERG tanto a CHH-I como a glucagon, el

Planteamiento del Problema

péptido análogo a la CHH en vertebrados, que se ha encontrado presente en los tejidos de invertebrados y en la retina de vertebrados ectotermos. Además, se deben investigar los efectos de estos péptidos sobre los reflejos pararreceptores que determinan la cantidad de luz de entrada a la retina.

4. HIPÓTESIS

Si péptidos hiperglicemiantes como la CHH-I y el glucagon intervienen en la movilización de glucosa en la retina, su aplicación producirá respuestas caracterizadas por una latencia larga.

Si estos péptidos hiperglicemiantes actúan como neuromoduladores en los procesos de fototransducción y/o transmisión de información en la retina, la respuesta del ojo a la aplicación de dichos péptidos, se caracterizara por poseer una latencia más corta.

5. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto del glucagon y la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH-I) sobre los mecanismos responsables de la génesis del ERG en la retina aislada de *Procambarus clarkii*.

Específicos

Cuantificar los cambios temporales a corto plazo en la actividad eléctrica de la retina aislada (*in vitro*) del acocil *Procambarus clarkii*, traducidos en la amplitud de los dos componentes del ERG (H-I y H-II), a diferentes concentraciones de glucagon y CHH-I, durante la noche y día subjetivos.

Determinar el efecto del glucagon sobre la posición de los pigmentos accesorios, pigmento distal y proximal, en la retina aislada, durante la noche y el día subjetivos, a las mismas horas que se registra el ERG y determinar su relación con los cambios observados en la amplitud de los componentes del ERG (H-I y H-II).

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Animales

Se emplearon 60 acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii* en intermuda, sin distinción de sexo, fueron colectados en Río Conchos, en Saucillo Chihuahua, mantenidos en acuarios de 50 litros, oxigenados con ayuda de una bomba, a una temperatura constante de 20° C, en un ciclo de luz-oscuridad (LO)12:12 y alimentados cada tercer día con verduras (zanahoria, chayote y calabaza).

6.2 Fotoperiodo

Tanto para la amplitud del ERG como la posición de los pigmentos se usaron dos grupos experimentales con un fotoperíodo específico. El tiempo en el que se determinó tanto la amplitud del ERG como la posición de los pigmentos fue en el día a las 10:00 y en la noche a las 24:00. El primer grupo experimental (día subjetivo) consistía en un ciclo LO 12:12 con encendido de la luz a las 07:00 hrs y apagado a las 19:00 hrs; para el segundo grupo experimental (noche subjetiva) se invirtió el fotoperíodo, consistía en un ciclo LO 12:12 encendido de luz a las 19:00 hrs y apagado a las 07:00 hrs, de tal manera que los registros realizados se hicieran durante el día.

6.3 Disección de la Retina

Los acociles se colocaron en hielo 20 minutos para su inmovilización, inmediatamente después se cortó el tallo ocular, en presencia de Van-Harreveld + HEPES (NaCl 197.77 mM, KCl 5.37 mM, CaCl₂ 13.51mM, MgCl₂ 2.63 mM, HEPES 10 mM, pH 7.55). Para las retinas usadas en el ERG se perforaba la superficie de la córnea, con ayuda de una punta delgada metálica, para la posterior inserción de un electrodo de registro. La retina y la lámina ganglionaris fueron separadas del resto del tallo óptico utilizando una navaja de afeitar, este corte se realizaba en la unión entre la córnea y el exoesqueleto quitinoso, colocándola *in vitro* en una cámara de registro. Las disecciones se hacían, para el primer grupo experimental a las 8:00 (día subjetivo) y a el segundo grupo a las 22:00 (noche subjetiva).

6.4 Registro del Elctrorretinograma (ERG)

La preparación *in vitro* colocada en una cámara de registro estaba aislada en una jaula de Faraday. Posterior a esto, se insertó el electrodo de registro de tungsteno dentro de la retina aislada con perfusión constante de solución Van Harreveld + HEPES a una temperatura de aproximadamente 17°C. Se realizaron cinco experimentos para cada condición, con ambos grupos experimentales. Una vez

montada la retina aislada, se mantuvo con el sistema de perfusión y temperatura controlada, con ayuda de un sistema de refrigeración; bajo condiciones de oscuridad constante durante dos horas. Al inicio de la fase experimental se dio un tren de estímulos luminosos a la retina (tiempo -10 o control), posteriormente se interrumpió el sistema de perfusión durante una hora y se aplicaron 100 μ L de cada solución utilizada (Van Harrevelde+Hepes (control), CHH-I 100pM, CHH-I 1nM, CHH-I 10nM, CHH-I 20nM, CHH-I 50nM, Glucagon 4 μ M, Glucagon 6 μ M y Glucagon 8 μ M (Glucagon (1-29) (humano, bovino, porcino) BACHEM California) en la cual la retina fue estimulada con el mismo tren de estímulos luminosos cada diez minutos hasta completar una hora de registro (min 0 al 60), al término de esta hora se reinició la perfusión continuando la estimulación cada 10 minutos durante una hora más (min 60 al 120). De tal manera que los ERGs del día subjetivo se registraron de 10:00 a 12:00 mientras que los registros para la noche subjetiva fueron de 24:00 a 02:00.

6.5 Equipo Electrofisiológico

Tanto el electrodo de tungsteno (de registro), insertado en la retina, como el electrodo de referencia (de plata), colocado en el medio de perfusión, estaban conectados a un amplificador GRASS P 5 Series, mediante una sonda de alta impedancia GRASS Modelo HIP511GA. La señal era amplificada y enviada a un digitalizador Instrutech VR10, los registros a su vez, eran grabados en una videograbadora SHARP VC-A206 y enviados a un osciloscopio HAMEG, Modelo HM205-3, para la visualización de los registros. Las retinas aisladas eran estimuladas con cuatro pulsos de luz de 10 mseg cada 7 segundos, provenientes de un fotoestimulador GRASS P533 Plus, automatizado por un estimulador GRASS S48, estos registros se capturaban en una computadora PC-XT a través del programa VR-111 Versión 1.0.

6.6 Análisis de los datos

Cada grupo de ERGs, se capturaba en un archivo independiente del programa VR-111, Versión 1.0, y el conjunto de archivos, que correspondía a cada uno de los tiempos (min -10 a 120) eran transferidos, para su análisis el programa Fetchdat Versión 5.5, en donde se medían cada uno de los componentes del ERG. Utilizando los valores obtenidos para HI y HII en milivoltios fueron procesados en una hoja de cálculo del programa Corel Quatro Pro Versión 4.0 se calculó la media y desviación estándar de la amplitud de H-I y H-II de los ERGs registrados, con los datos promediados y porcentualizados se hicieron las gráficas de amplitud del ERG con en el programa Sigma Plot 5.0. El análisis estadístico que

se aplicó para los datos se realizó en el programa Statistica Versión 6.0. En donde se aplicó una prueba de Bartlett y posterior a esto, se aplicó la prueba estadística ANOVA.

6.7 Histología

Para la localización de glucógeno en la retina, a cada grupo experimental (día y noche subjetivos) se le realizó la reacción de ácido periódico de Schiff (PAS).

Los tallos oculares, se disectaron a las 10:00 y 24:00 respectivamente, fijados en formol al 10% en PBS (buffer de fosfatos) a temperatura ambiente y después de las primeras dos horas, se removió la quitina de los tallos oculares. Posteriormente, el tejido se deshidrató en un tren de alcoholes: alcohol al 50% (24 hrs), alcohol al 70% (24 hrs), alcohol al 96% (12 hrs), alcohol al 100% (12 hrs) y xilol al 100% (30min). Una vez deshidratado el tejido, se llevo a cabo la inclusión en paraplast al 100% (de 12 a 24 horas) dentro de una estufa de incubación a una temperatura de 59° C.

Una vez incluido el tejido, se realizaron los cortes histológicos longitudinales de un grosor de 4 μ m con un microtomo marca Leica. Se obtuvieron tiras de 7 cortes sucesivos y se colocaron en portaobjetos. Los tejidos fueron rehidratados en un tren de alcoholes al 100% (10 min), alcohol al 96% (10 min), alcohol al 70% (5 min), alcohol al 50% (5 min) y finalmente agua destilada. Una vez hidratado se realizó la reacción de ácido periódico de Schiff (Anexo No.1).

Las muestras después de hidratadas se oxidaron en la solución de ácido periódico (5min), enjuagando en agua destilada. Por 15 minutos se colocaron en el reactivo de Schiff de Coleman, lavándose en agua corriente por 10 minutos. Para contrastar se usó la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se lavaron las muestras con agua corriente(15min). A continuación se deshidrataron y aclararon a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios, 2 minutos cada uno. Finalmente se montó con un medio resinoso, para observar estas preparaciones en el microscopio de luz y tomar fotografías con una cámara adaptada al microscopio, las fotografías fueron capturadas en el programa RSI.

6.8 Determinación de la posición de los pigmentos

Se determinó el efecto del glucagon para la concentración de 4 μ M y 6 μ M sobre la posición de los pigmentos distal y proximal. Divididos en grupos experimentales (Control, 4 μ M y 6 μ M), tanto para el día subjetivo como la noche subjetiva, se usaron 18 acociles.

Para cada grupo experimental se usaron 3 acociles. Los tallos oculares de cada animal se disectaron, posterior a esto se aislaron las retinas, utilizando el mismo procedimiento que para el registro

de ERG. Las disecciones se hicieron a las 08:00 (día subjetivo) y a las 22:00 (noche subjetiva). Las retinas de cada animal eran colocadas en cámaras que contenían Van Harreveld + HEPES, estas a su vez eran subdivididas en grupos. El grupo 1) Control, correspondía al conjunto de retinas del lado izquierdo y grupo 2) Experimental, al grupo de retinas del lado derecho, las cámaras estaban independientes una de la otra. Una vez montados los grupos de retinas fueron mantenidos en oscuridad constante durante dos horas a una temperatura de 20 °C, haciendo cambios de solución Van-Harreveld+HEPES manualmente, con ayuda de una pipeta, cada 10 minutos a ambas cámaras (grupo experimental y grupo control). A las 10:00 y 24:00, dos horas después de haber realizado la disección, se toma una retina de cada grupo (experimental y control) para fijarla, sumergiéndola por 5 minutos en agua destilada hirviendo colocándolas después en formaldehído al 10% por lo menos 24 horas. Después de haber tomado y fijado el primer par de retinas se reemplazaron 200 μ L de Van Harreveld + HEPES por 200 μ L de Glucagon 4 μ M y 6 μ M en el grupo experimental y 200 μ L de Van Harreveld + HEPES en el grupo control. A las 23:00 y 01:00, una hora después de haber aplicado el glucagon y el Van Harreveld + HEPES, se fijó una retina más de cada grupo (grupo experimental y grupo control), seguido a esto, se retiraron 200 μ L de líquido a ambas cámaras y se aplicó 200 μ L de Van Harreveld + HEPES a cada uno de los grupos. Durante una hora más (lavado) se retiraron 100 μ L de Van Harreveld + HEPES cada 10 min y se aplicaba la misma cantidad de solución. A las 12:00 y 2:00, se fijó la última retina de cada grupo. Una vez transcurridos por lo menos 24 horas en formol, cada una de las retinas fue cortada longitudinalmente por la mitad, con ayuda de una navaja de afeitar. Usando una cámara digital se tomó una fotografía a cada mitad, a través de un microscopio estereoscópico. Las fotografías se observaron en el programa Sigma Scan Pro Versión 4.0, en donde se midió el grado de dispersión o retracción de los pigmentos, obteniendo así, el índice del pigmento distal (DPI) y del pigmento proximal (PPI).

De acuerdo con el método descrito por Frixione et al. 1979 y Porras et al., 2001, el DPI se obtuvo del cociente de dos distancias: 1) la distancia existente desde la córnea al extremo proximal del pigmento distal (d_1) y 2) la distancia desde las células de la córnea a la membrana basal (d_2) ($DPI=d_1/d_2$). El PPI se obtuvo del cociente de 1) la distancia entre el extremo distal del pigmento proximal y la membrana basal (a), entre, 2) la distancia entre el extremo distal de los fotorreceptores a la membrana basal (b) ($PPI=a/b$).

Los índices pueden tomar valores desde 1.0, cuando el pigmento esta totalmente disperso en el estado de adaptación a la luz, a 0.0, cuando el pigmento está retraído completamente en la condición de adaptación a la oscuridad. Una fracción de pigmento usualmente permanece sobre la membrana basal

después de la retracción normal, por lo que es más común encontrar valores del índice de 0.10 a 0.15 que el 0.0 absoluto para los ojos adaptados a la oscuridad (Frixione y Aréchiga, 1981; Garfias et al., 1999)

7. Resultados

7.1 Efecto de la CHH y el glucagon sobre la amplitud del ERG.

7.1.1 Curso temporal del efecto de la CHH.

El curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG, H-I y H-II se muestran en la figura 8 para los experimentos del día subjetivo (10:00) y en la figura 9 para los experimentos de la noche subjetiva (24:00). Se muestra la condición control (VH+HEPES) y experimental (CHH-I, 100 pM, 1, 10, 20 y 50 nM). Cada punto muestra el promedio \pm desviación estandar (DE). Los cinco experimentos propuestos para esta condición, no fueron completados ya que la disponibilidad de la CHH no fue suficiente para la conclusión de estos.

Durante el día, en la condición control (Fig. 8A) la amplitud de ambos componentes del ERG en los primeros 60 minutos disminuye hasta un 20 %, al iniciar el lavado la amplitud de HI y HII aumenta gradualmente hasta alcanzar valores cercanos a 100%, correspondiente al minuto 120.

Para la condición experimental con CHH-I 100pM (Fig. 8B) se realizaron dos experimentos, en donde el componente H-I no tubo un cambio evidente, la amplitud decrece pero no más del 10%, manteniéndose cercano a 100%, mientras que HII aumentó hasta un 30% en el minuto 20 después de la aplicación de CHH-I, manteniéndose constante hasta el minuto 60, punto donde comienza a decrecer la respuesta, justo minutos antes de comenzar el lavado.

Los experimentos para CHH-I 1nM (Fig. 8C) correspondientes a dos experimentos se observa un aumento de aproximadamente 30% en el minuto 20, manteniéndose hasta caer 20% en el minuto 70 sin llegar a recuperarse.

Los cambios en la amplitud, de cuatro experimentos, para la condición CHH-I 10nM (Fig. 8D) se observa un aumento de hasta un 30 % manteniéndose constante hasta el minuto 90 donde se observa un incremento para HI y un decremento para HII, cercanos al 10%.

Para la condición CHH-I 20nM (Fig. 8E), se realizaron tres experimentos, manteniéndose ambos componentes en valores cercanos a 100%. Finalmente para la condición CHH-I 50nM (Fig. 8F), se observa un ligero aumento, cercano al 10% para HII, inmediatamente después de haber aplicado la CHH-I, después del minuto 40, comienza un descenso hasta el minuto 80, donde HI cae aproximadamente un 10% hasta el minuto 120, mientras que HII se acerca a valores cercanos a 100%.

Durante la noche la amplitud de H-I y H-II en el experimento control (Fig.9A), permanecen constantes a lo largo del experimento, en valores cercanos al 100% hasta el minuto 110, después del cual hay un ligero decremento en la amplitud. Para todos los experimentos los dos componentes se

mantuvieron de manera similar. Para el experimento realizado con CHH-I 100pM (Fig. 9B), se observa un incremento de hasta un 20%, aún después del lavado los componentes siguen incrementando, hasta llegar al minuto 90, en donde HII decrementa un 20%.

Para los dos experimentos con CHH-I 1nM (Fig. 9C), los valores se mantienen cercanos a 100% en ambos componentes, hasta el minuto 40, donde HI tiene un aumento de sensibilidad de 20% hasta el final del experimento, mientras que HII se mantiene en valores cercanos a 100%.

Los tres experimentos realizados para la condición CHH-I 10nM (Fig. 9D), muestran un comportamiento similar al de los componentes de la condición anterior, un aumento progresivo de 20% hasta el final del experimento, mientras que HII se mantiene en valores cercanos al 90%, después del minuto 90 y hasta el minuto 120.

Se realizaron tres experimentos para CHH-I 20nM (Fig. 9E) donde se observa claramente una caída de hasta 30% para ambos componentes, después del lavado se presenta un aumento en la sensibilidad, pero no llega a 100%.

Para CHH-I 50nM (Fig. 9F), se muestra el promedio de cinco experimentos, un aumento del 10% inmediatamente después de la aplicación de la CHH-I, manteniéndose cercano a valores cercanos a 100 % durante todo el experimento.

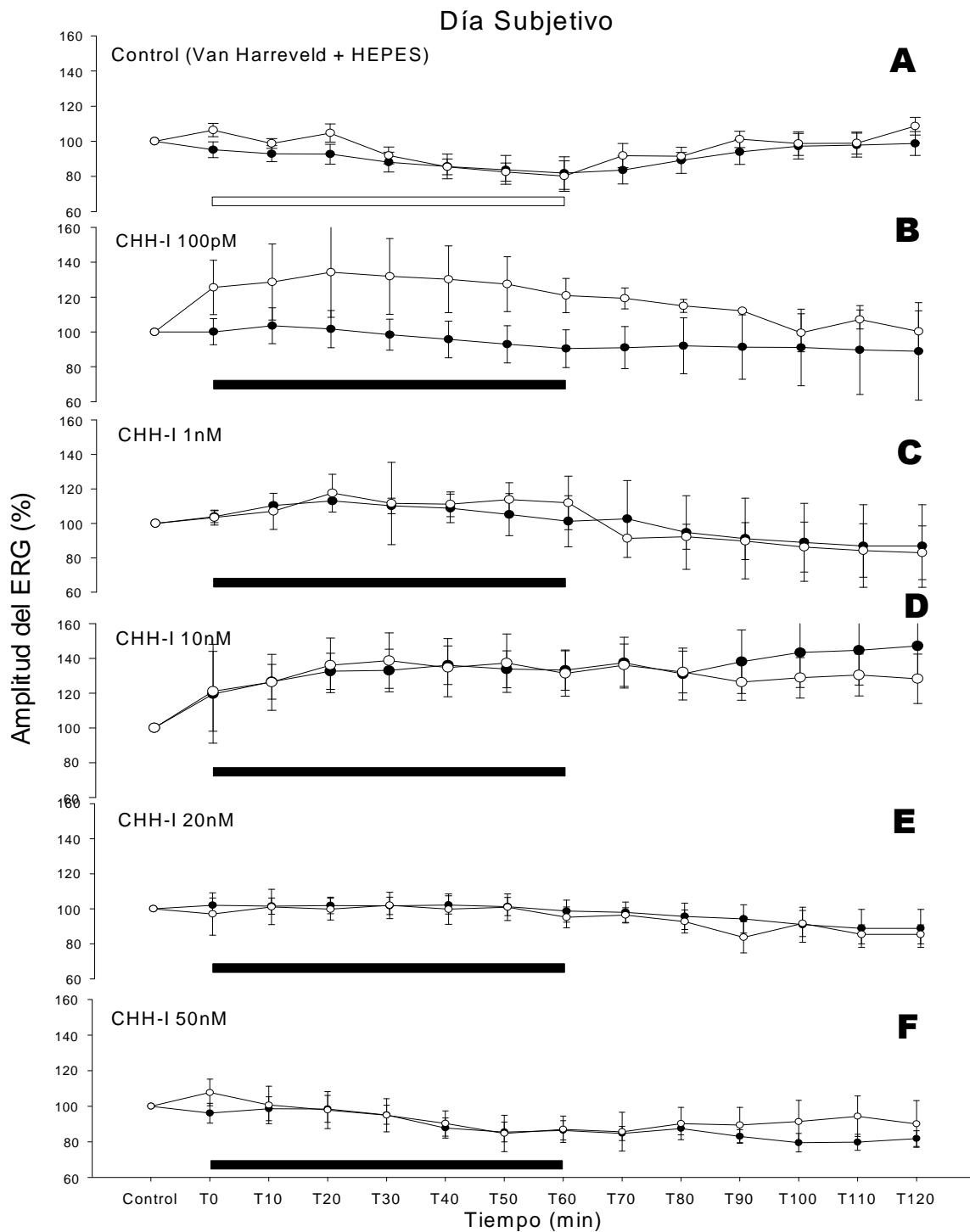


Figura 8. Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG. Los círculos cerrados (●) corresponden a H-I y los círculos abiertos (○) a H-II. Experimento control (A) y CHH-I 100pM (B), 1nM (C), 10nM (D), 20nM (E) y 50nM (F) durante el día (10:00). La barra indica el tiempo de exposición con VH+HEPES (□) y CHH-I (■). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar.

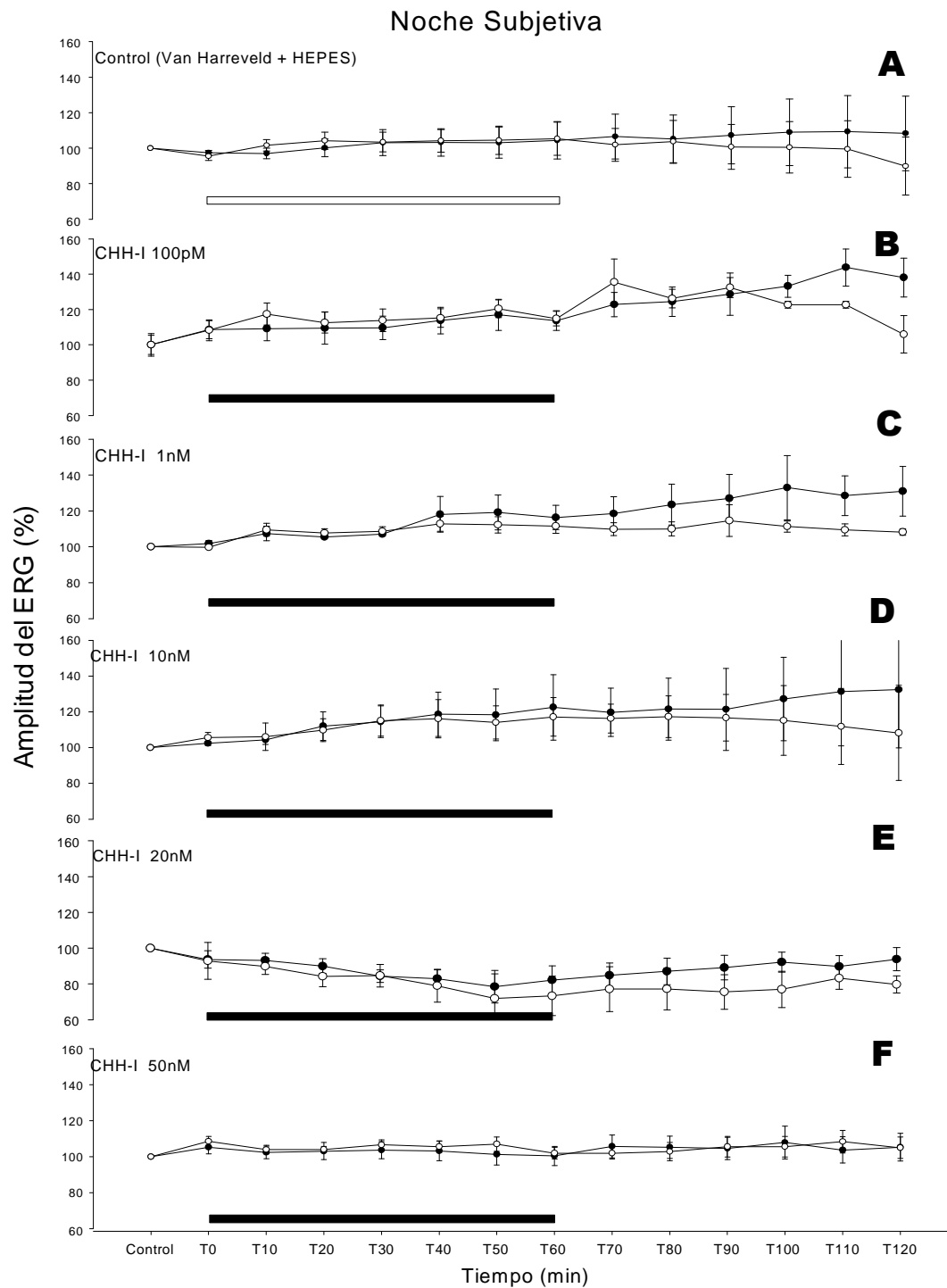


Figura 9. Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG. Los círculos cerrados (●) corresponden a H-I y los círculos abiertos (○) a H-II. Experimento control (A) y CHH-I 100pM (B), 1nM (C), 10nM (D), 20nM (E) y 50nM (F) durante la noche (24:00). La barra indica el tiempo de exposición con VH+HEPES (□) y glucagon (■). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar.

7.1.2 Curso temporal del efecto del Glucagon

El curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG, HI y HII, ante el efecto de tres concentraciones de glucagon (4, 6 y 8 μM) para los experimentos durante el día (10:00) (Fig. 10) y durante la noche (24:00) (Fig. 11). Los puntos representan el promedio porcentualizado de cinco retinas \pm DE, ambos componentes muestran un comportamiento similar en todos los experimentos.

Las gráficas que representan las condiciones control, tanto para los experimentos durante el día (Fig. 10A) así como durante la noche (Fig. 11A), serán los mismos que se presentaron anteriormente con los resultados para los experimentos con CHH-I, por tal motivo se continuó inmediatamente con los resultados de las condiciones experimentales.

Durante el día con la condición de glucagon 4 μM (Fig. 10B) se observa un aumento en la amplitud del ERG, inmediatamente después de su aplicación, creciendo un 15%, manteniéndose hasta el minuto 20, cuando se presenta un descenso del 25% hasta el minuto 70, donde se mantiene en valores cercanos a 93%.

Para la condición de glucagon 6 μM (Fig. 10C) se observa un claro descenso en la sensibilidad de la amplitud de aproximadamente 20% 20 minutos después de la aplicación del glucagon, aún después del lavado, en el minuto 60, continua esta caída hasta el minuto 110, donde comienza un ascenso pero sin recuperarse, donde se comienza a recuperar pero no llega a 100%.

Para la condición de glucagon 8 μM (Fig. 10D) se observa un aumento inicial de aproximadamente 10%, al minuto 40 se presenta una ligera caída, tomando valores constantes cercanos a 100%.

Para los experimentos realizados en la noche subjetiva (24:00) la concentración de glucagon 4 μM (Fig. 11B), se observa un aumento de aproximadamente del 10%, manteniéndose hasta el minuto 40, cuando cae para retomar valores cercanos al 100%.

Para la condición con glucagon 6 μM (Fig. 11C), tiene un aumento inicial del 5%, al minuto 40 se observa un descenso de aproximadamente 10 % manteniéndose hasta el final del experimento en el minuto 120.

Los experimentos con glucagon 8 μM (Fig. 11D), muestra un incremento de aproximadamente 10%, manteniéndose constante hasta el minuto 50, donde se observa un descenso del 10% hasta el final del experimento, sin recuperarse.

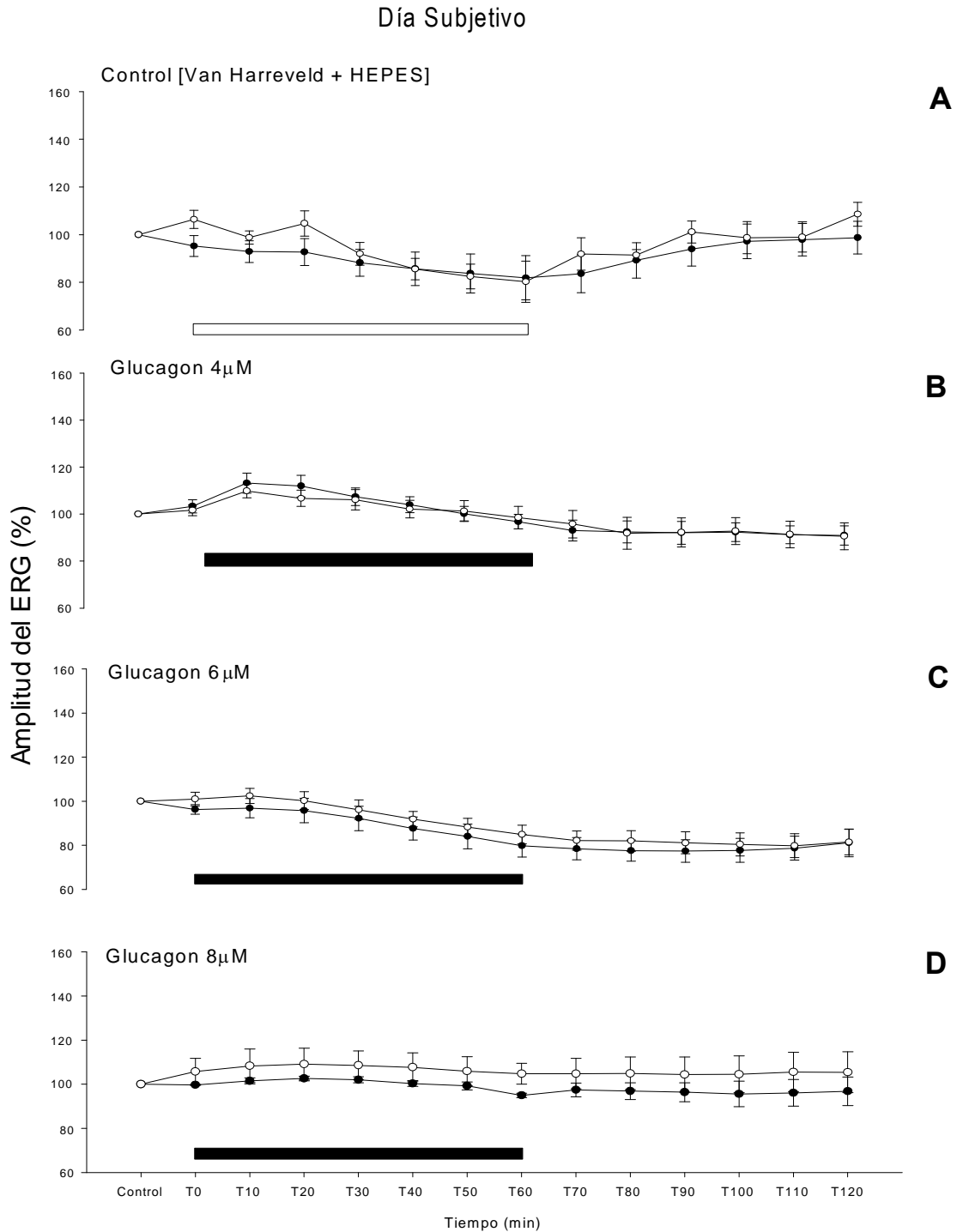


Figura 10. Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG. Los círculos cerrados (●) corresponden a H-I y los círculos abiertos (○) a H-II. Experimento control (A) y glucagon 4 μ M (B), 6 μ M (C) y 8 μ M (D), durante el día 10:00. La barra indica el tiempo de exposición con VH+HEPES (□) y glucagon (■). Cada punto representa el promedio de cinco experimentos \pm desviación estándar.

Noche Subjetiva

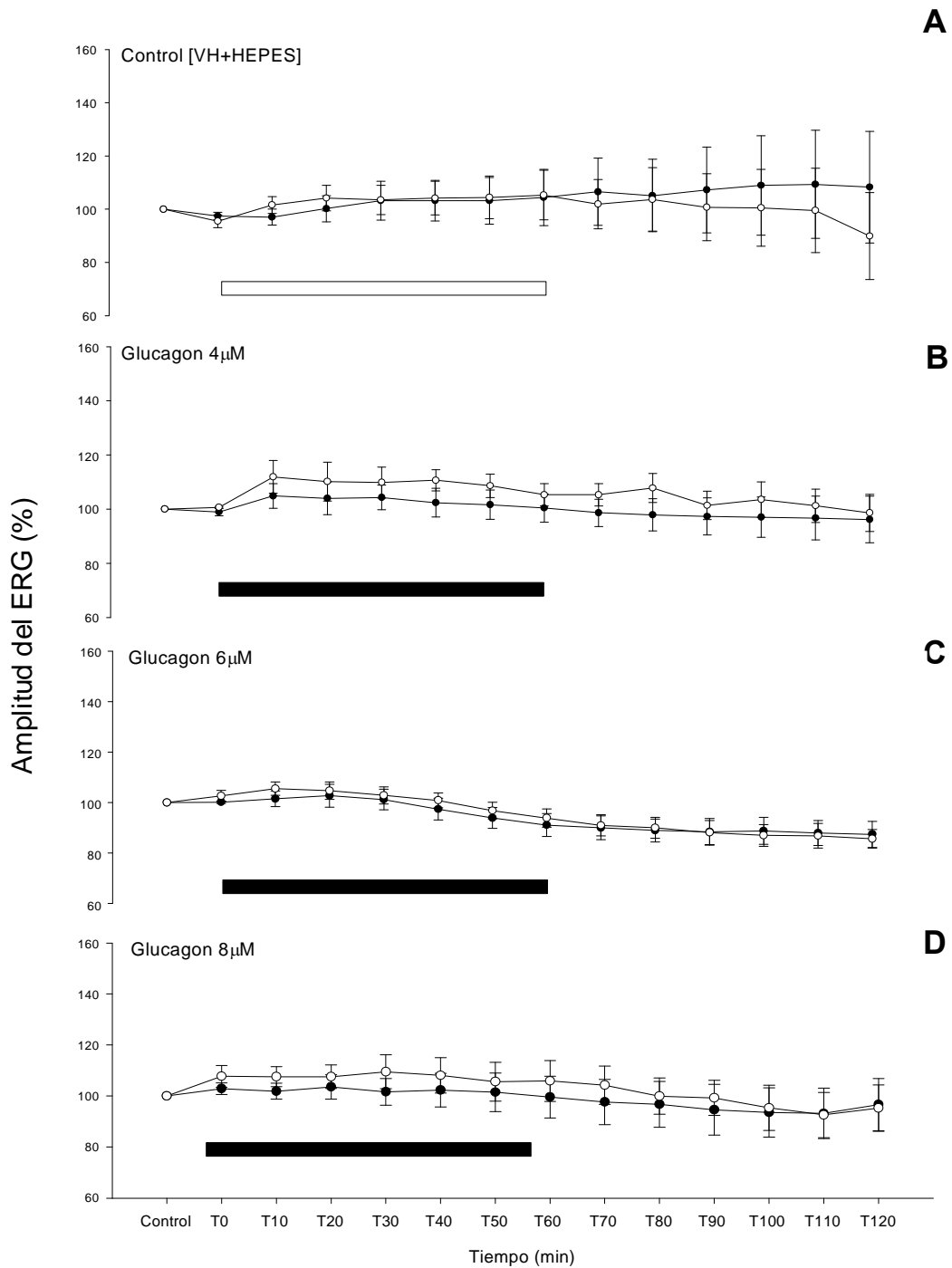


Figura 11. Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG. Los círculos cerrados (●) corresponden a H-I y los círculos abiertos (○) a H-II. Experimento control (A) y glucagon 4 μ M (B), 6 μ M (C) y 8 μ M (D), durante la noche (24:00). La barra indica el tiempo de exposición con VH+HEPES (□) y glucagon (■). Cada punto representa el promedio de cinco experimentos \pm desviación estándar.

7.3 Amplitud del ERG entre el minuto -10 y 60.

En la figura 12 se muestran los cambios de voltaje en la retina ante el estímulo luminoso en los minutos -10 y 60 minutos después de la incubación con VH+HEPES o glucagon (4, 6 y 8 μM), durante el día (10:00) y la noche (24:00). El registro que se muestra es representativo para cada condición experimental. Para la condición control (VH+HEPES) durante el día (Fig. 12A) se presenta una disminución en la amplitud del ERG, mientras que para la condición de la noche HI no presenta ningún cambio en la sensibilidad y HII aumenta ligeramente (Fig. 12E). Para la condición experimental con glucagon 6 μM (Fig. 12C) durante el día, presenta una disminución en la amplitud del ERG, así como para glucagon 4 μM (Fig. 12F) y 6 μM (Fig. 12G), durante la noche. Al aplicar glucagon 4 μM (Fig. 12B) como 8 μM (Fig. 12D), durante el día, así como para 8 μM (Fig. 12H), durante la noche, el registro al minuto -10 y 60 no tiene ninguna diferencia.

7.4 Curva dosis-respuesta

La curva dosis-respuesta para las diferentes concentraciones de glucagon (4, 6 y 8 μM), muestra los cambios de la amplitud de los componentes del ERG (HI y HII) en los minutos -10 (control) y durante la exposición a VH+HEPES o glucagon en los minutos 20, 40, 60, así como durante el lavado en los minutos 80, 100 y 120, para cada condición experimental y control durante el día (Fig. 13) y la noche (Fig. 14). Cada barra corresponde al promedio porcentualizado de la amplitud de cada uno de los componentes H-I (barra negra) y H-II (barra blanca). Se aplicó la prueba estadística ANOVA para comparar los valores del minuto -10 y los puntos antes mencionados, para cada una de las condiciones experimentales.

Para los experimentos realizados durante el día (10:00), se encontró diferencia significativa en la condición con glucagon 4 μM (Fig. 13B) en el componente HI al minuto 10 ($P < 0.025$), y minuto 20 ($P < 0.05$), así como para glucagon 6 μM (Fig. 13C) en el minuto 60, 80, 100 y 120 para ambos componentes del ERG, ($P < 0.025$).

Para los experimentos realizados durante la noche (24:00), únicamente se encontró diferencia significativa en el componente HII del minuto 100 ($P < 0.05$) y minuto 120 ($P < 0.025$), al aplicar glucagon 6 μM (Fig. 14C).

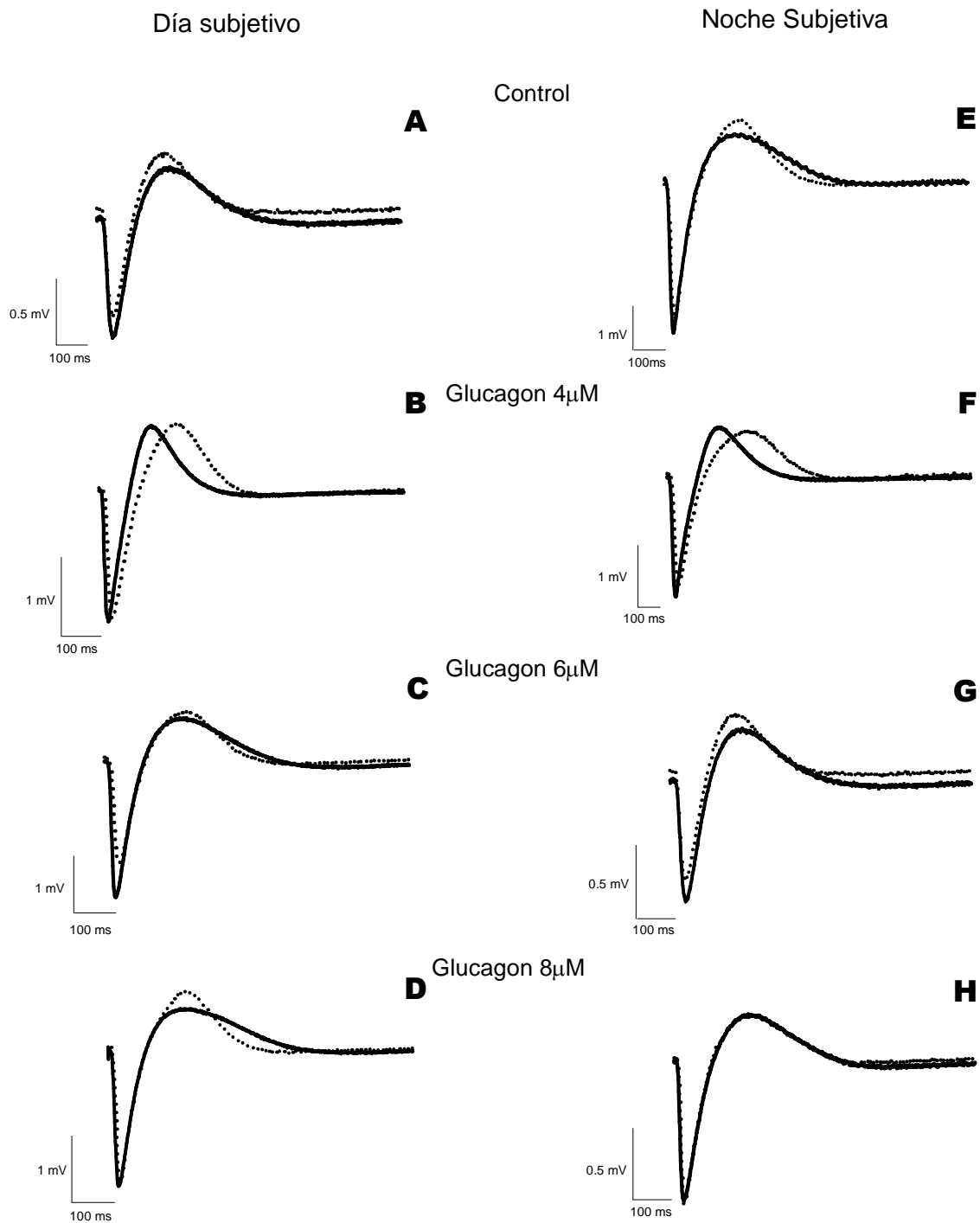


Figura 12. ERG. Cambios en la amplitud durante el minuto -10 antes de la aplicación de VH+HEPES o glucagon (4 μ M, 6 μ M y 8 μ M) y 60 minutos después, durante el día (A, B, C y D) y noche subjetivos (E, F, G y H). La línea continua representa el minuto -10, mientras que los trazos punteados corresponden al minuto 60.

Día Subjetivo

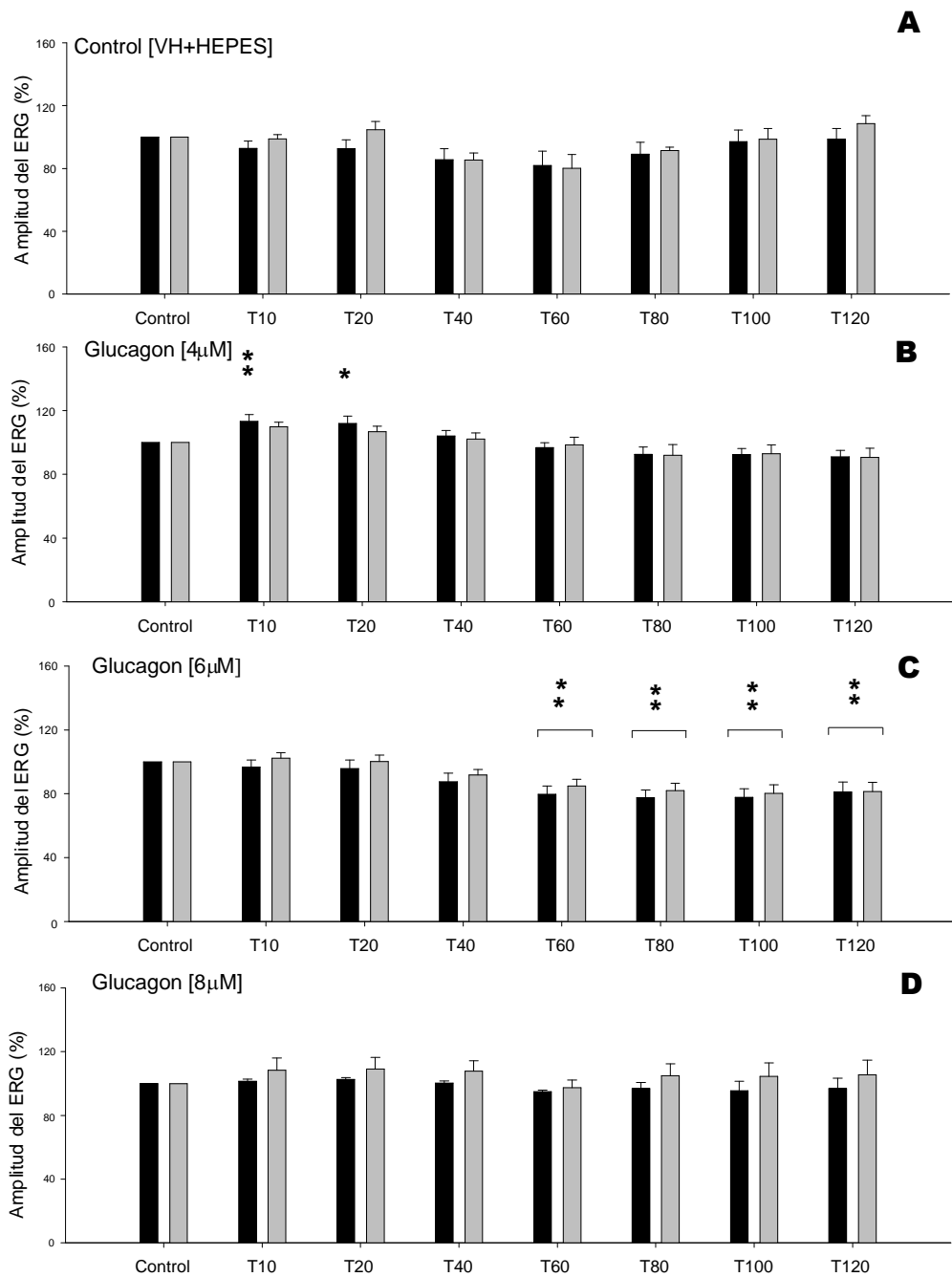


Figura 13. Relación dosis-respuesta para cada concentración de glucagon 4 μ M (B), 6 μ M (C) y 8 μ M (D) y la amplitud de los componentes, HI (■) y HII (□) del ERG, durante el día (10:00). Cada barra representa el promedio de 5 registros \pm desviación estándar. Diferencia significativa con respecto a la amplitud del minuto -10, $P < 0.025$ (*) y 0.05 (*).

Noche Subjetiva

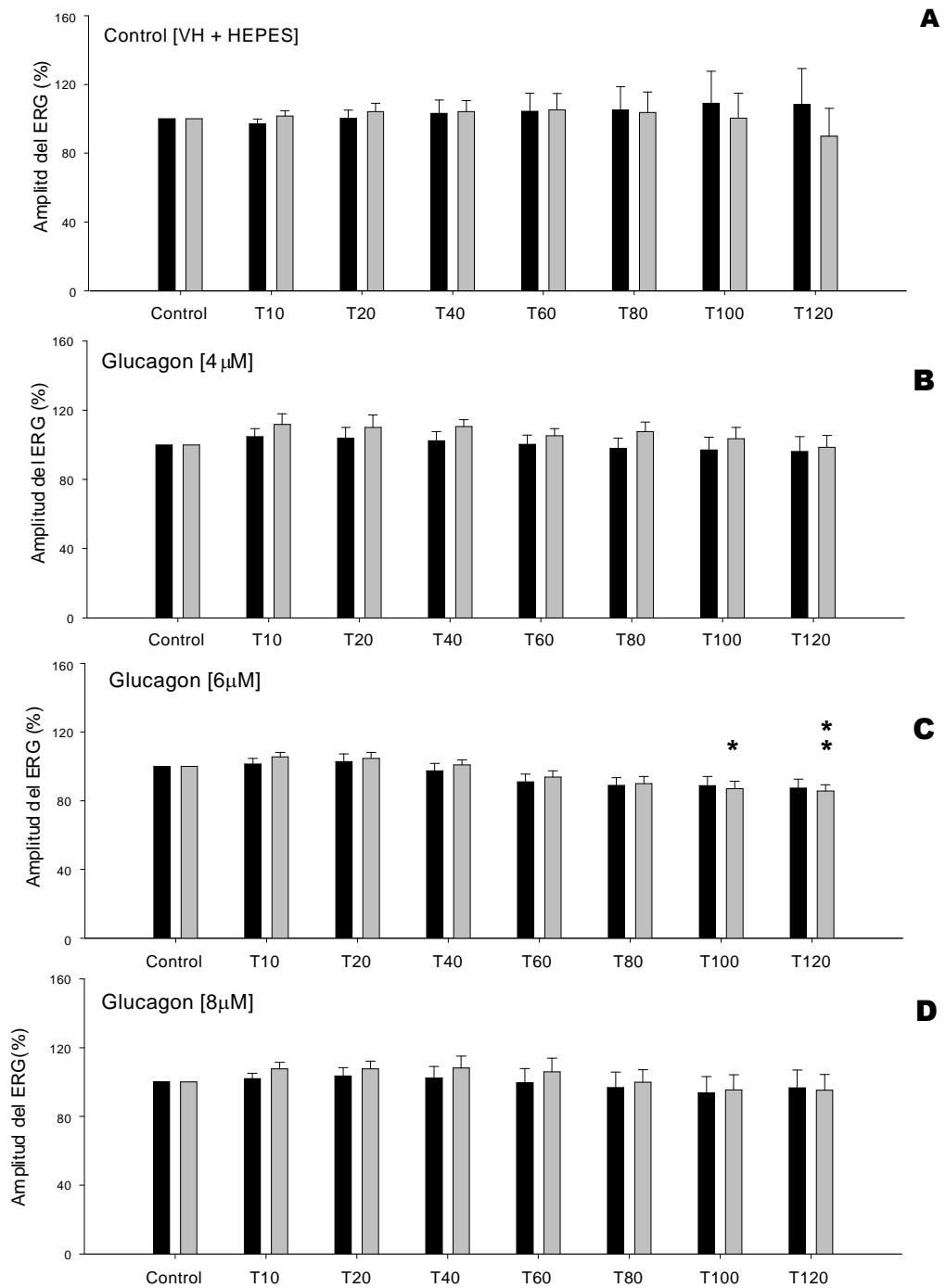


Figura 14. Relación dosis-respuesta para cada concentración de glucagon 4 μM (B), 6 μM (C) y 8 μM (D) y la amplitud de los componentes HI (■) y HII (□) del ERG, durante la noche (24:00). Cada barra representa el promedio de 5 registros \pm desviación estándar. Diferencia significativa con respecto a la amplitud del minuto -10, $P < 0.025$ (*) y 0.05 (*).

7.5 Efecto del Glucagon sobre la posición de los pigmentos

Debido a la poca disponibilidad del glucagon sólo se realizaron 2 experimentos para observar el efecto de este sobre la posición de los pigmentos de blindaje. Las concentraciones de glucagon que se utilizaron para la realización del experimento fueron 4 y 6 μ M para el día y la noche, respectivamente. La figura 15 muestra el curso temporal del efecto del glucagon sobre la posición de los pigmentos distal y proximal. Para todos los experimentos se obtuvo el valor del índice del pigmento distal (IPD) y proximal (IPP) (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1985).

Durante el día (10:00) (Fig. 15A) tanto el pigmento distal (IPD=0.55), como el pigmento proximal (IPP=0.71), se encuentran dispersos, una hora después de la incubación con glucagon 4 μ M, tanto el pigmento distal, como el proximal se retraen (IPD=0.18, IPP=0.35), después de eliminar el glucagon ambos pigmentos se vuelven a dispersar (IPD=0.5, IPP=0.76).

En los experimentos realizados durante la noche subjetiva (24:00) (Fig. 15B) se puede observar que antes de la aplicación del glucagon los pigmentos distal y proximal se encuentran en una posición retraída (IPD=0.11, IPP=0.125), después de una hora de incubación con glucagon (6 μ M) tanto el pigmento distal, como el proximal se dispersan (IPD=0.56, IPP=0.62), una hora después de lavado continuo, con VH+ HEPES, se siguen dispersando ambos pigmentos (IPD=0.719, IPP=0.77).

La figura 16 muestra secciones longitudinales de retinas, durante el día subjetivo (10:00) con glucagon 4 μ M y durante la noche subjetiva (24:00) con glucagon 6 μ M. Antes (Fig. 16A,D) durante la aplicación de glucagon (Fig. 16B,E) y después del lavado con VH+HEPES (Fig.16C,F).

7.6 Localización de depósitos de glucógeno en la retina.

La prueba inmunohistoquímica de reacción de ácido periódico de Schiff (PAS) se aplicó para determina la localización de depósitos de glucógeno en la retina, durante el día (10:00) (Fig. 17A-C) y la noche (24:00) (Fig 17D-F). En los cortes histológicos realizados que fueron positivos para esta prueba, puede observarse el pigmento proximal dentro de las células retinulares, disperso durante el día y retraído hacia los axones en la oscuridad, aunque queda un poco de pigmento en la membrana basal. Se muestra una tinción de color púrpura, tanto en los rdbomos como en los conos cristalinos y la membrana basal, lo que indicaría que en estas células se encuentran depósitos de carbohidratos, posiblemente depósitos de glucógeno. También se observan los núcleos de las células retinulares teñidos en color azul.

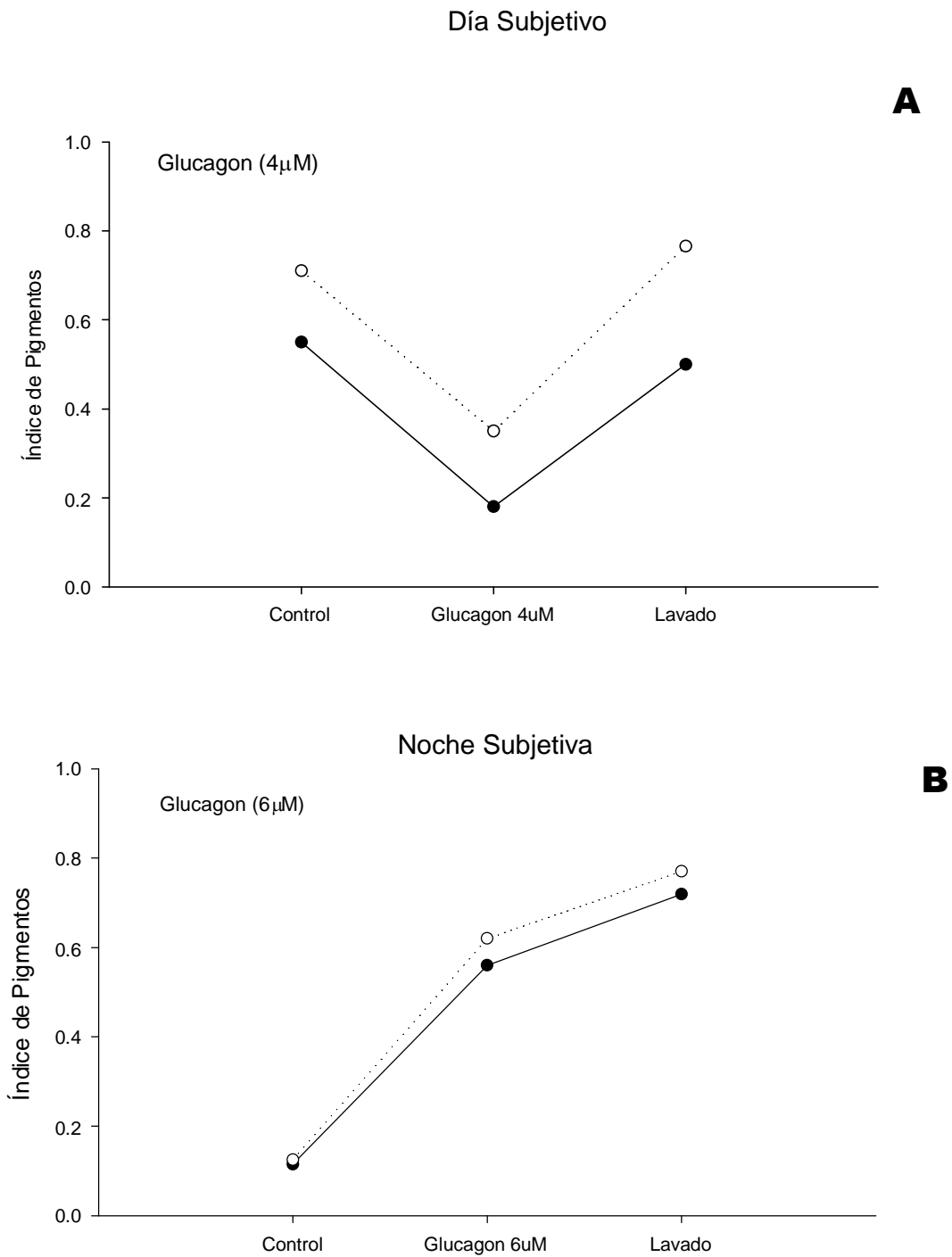


Figura 15. Curso temporal de los cambios en e movimiento de los pigmentos distal y proximal. A, Durante el día subjetivo (10:00), con la aplicación de glucagon 4µM y B, durante la noche subjetiva (24:00) con glucagon 6µM. (●)IPD: Índice del Pigmento Distal; (○)IPP: Índice del Pigmento Proximal.

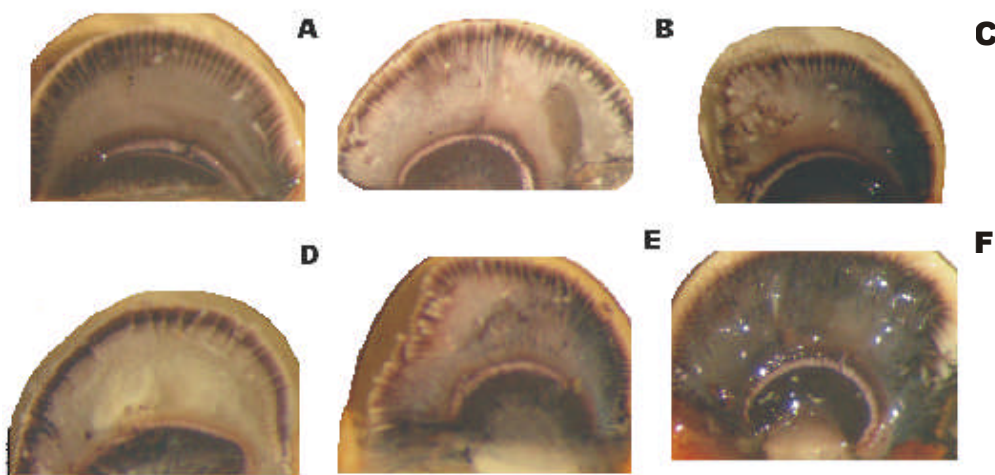


Fig. 16 Secciones longitudinales de retinas A, D) antes de la aplicación de glucagon, una hora después de la aplicación de glucagon B) 4 μ M y E) 6 μ M C, F) una hora después del lavado durante el día (A-C) y durante la noche (D-F).

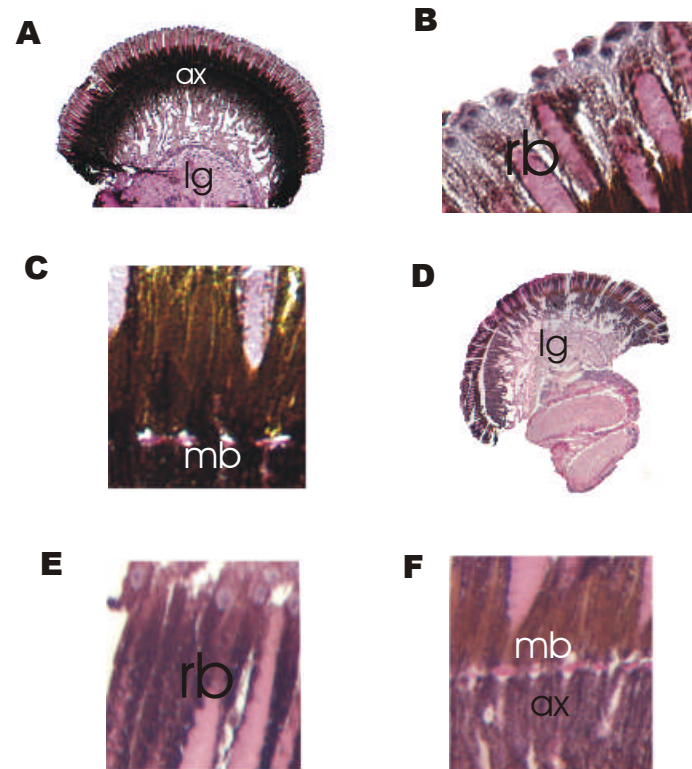


Fig. 17 Corte histológicos de retina de acocil adulto procesados con la técnica de reacción de ácido periódico de Schiff (PAS). Mostrando A-C los cortes realizados durante el día (10:00) y D-F los de la noche (24:00). ax, axones; lg, lamina ganglionaris; rb, rabdomo y mb, membrana basal. A y D, muestra reconstrucciones en 4X, mientras que B, C, D y F muestran microfotografías en 40X.

8. Discusión

Los resultados de esta tesis muestran el efecto de dos péptidos hiperglicemiantes, la CHH-I y el glucagon sobre los componentes HI y HII del ERG. Esto confirma que el ERG es un parámetro sensible que permite medir la actividad eléctrica del ojo en el acocil bajo diferentes condiciones experimentales (Naka y Kuwabara, 1959) como lo han demostrado trabajos previos (Gaus y Stieve, 1992). En este trabajo la amplitud del ERG se utilizó como un posible marcador del metabolismo de la retina, el cual debe cambiar de la noche al día, puesto que ritmos metabólicos como son, la concentración de glucosa y CHH en la hemolinfa, presentan acrofases nocturnas, tiempo en el cual el acocil esta activo y muestra una mayor sensibilidad a la luz (Kallen et al., 1990; Aréchiga et al., 1993; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998).

8.1 Hormona Hiperglicemiante de los Crustáceos

En este trabajo se utilizaron cinco concentraciones de CHH-I, y tres de glucagon. Debido a la escasa disponibilidad de CHH únicamente se pudieron llevar a cabo algunos experimentos de los cinco propuestos para cada una de las concentraciones de CHH-I. Estos fueron 2 experimentos para 100pM y 1nM y tres para CHH-I 10 y 20nM. Por lo anterior, los datos no pudieron someterse a un análisis estadístico riguroso. Sin embargo, los resultados sugieren un efecto de la CHH-I sobre los fotorreceptores retinianos; este efecto parece depender de la dosis utilizada.

Durante el periodo del día, para la condición control hay una disminución de la amplitud, del minuto 10 al 60, al reiniciar la perfusión, los valores de la amplitud del ERG comienzan a incrementar, manteniéndose en valores cercanos al 100% (Fig. 8A), este efecto podría estar dado por la acción del ritmo circadiano, mientras que los valores de la amplitud para la condición de oscuridad, los dos componentes del ERG, HI y HII se mantienen constantes a lo largo del experimento (Fig. 9A).

Al comparar los controles con los resultados experimentales se encontró que la aplicación exógena de CHH-I, tanto en el día como en la noche subjetiva, a las concentraciones de 100pM, 1 y 10nM (Fig. 8B-D, 9B-D) produce un incremento en el porcentaje de amplitud del ERG, en tanto que las concentraciones de 20 y 50nM tienen el efecto contrario. En el día subjetivo estas concentraciones, producen un incremento de hasta un 20% (Fig. 8E, F) y en la noche subjetiva la CHH-I (20nM) (Fig. 9E) provoca un incremento de hasta un 30%, recuperándose la respuesta después del lavado; en tanto que los efectos

observados con CHH-I (50nM) (Fig. 9F) se mantienen en valores cercanos al 100%. Se ha propuesto que la CHH contribuye al ritmo de amplitud del ERG mediante algún efecto directo o indirecto. En un trabajo previo del laboratorio (Sánchez-Ortiz, 2004) se encontró que la aplicación exógena de 10nM de CHH-II produce un decremento de hasta un 20%, recuperándose inmediatamente después del lavado, al tiempo 60 durante la noche subjetiva del acocil. Estos resultados parecen contradictorios con los resultados de esta tesis, sin embargo, no son comparables puesto que las isoformas CHH-I y CHH-II poseen características funcionales distintas (Yasuda et al., 1994; Ollivaux y Soyez, 2000; Serrano et al., 2004).

El efecto de la CHH sobre el ERG no es fácil de interpretar. En el hepatopáncreas la CHH tiene un efecto directo sobre la enzima glucógeno sintasa I, inhibiendo su actividad y estimulando la actividad de la glucógeno fosforilasa, y por tanto promoviendo la obtención de glucosa a partir del glucógeno (Sedlmeier, 1982; Fanjul-Moles, 2006). Estos resultados podrían sugerir la acción catabólica de la CHH-I sobre las reservas de glucógeno de retina, produciéndose así la glucosa, como un sustrato metabólico para el mantenimiento de la actividad funcional de la retina en las condiciones de mayor requerimiento energético, como es la noche subjetiva del animal. Esto lo consideraremos como una acción indirecta de la CHH sobre la amplitud del ERG, pues es mediada por su acción metabólica. Tanto en vertebrados como en invertebrados se han reportado la presencia de depósitos de glucógeno (Evêquoz-Mercier y Tsacopoulos 1991, Coffe et al., 2004), lo que sugiere la presencia en esta estructura del sustrato y las vías anabólicas y catabólicas para la utilización de glucosa. Este carbohidrato indirectamente y debido a la producción de energía, podría ser utilizado por los fotorreceptores para los mecanismos subyacentes en la respuesta eléctrica a la luz, lo que se traduciría en un aumento en la amplitud del ERG. Lo anterior se ha demostrado en vertebrados, en preparaciones de retina, donde la magnitud del ERG depende de la dosis de glucosa exógena (López y Sannita, 1997). En los invertebrados como la abeja *Apis mellifera*, se han logrado determinar los mecanismos directos entre un sustrato metabólico dependiente de glucosa (alanina) y la fototransducción (Tsacopoulos, 2002).

En esta tesis, como lo demuestran las figuras 15 y 16 se confirmó a nivel histológico la presencia de depósitos de glucógeno en la retina del acocil, observándose un marcaje positivo a la reacción de ácido periódico (PAS) tanto en el rbdomo como en las células del cono cristalino y la membrana basal (Fig. 16). Por otra parte estudios bioquímicos preliminares de nuestro laboratorio en colaboración con otros grupos de investigación (Salceda, et al) indican también la presencia de glucógeno en esta estructura. Tanto estos

estudios como los resultados de esta tesis que prueban la presencia de glucógeno, en los rbdomos de *P. clarkii*, sugieren su posible utilización como un sustrato energético utilizado por los fotorreceptores. Sin embargo, no se ha estudiado aún si existe algún ritmo en el almacenamiento de glucógeno en la retina y si en la fase de mayor requerimiento energético estas posibles reservas están depletadas.

Como se mencionó anteriormente en el acocil los cambios en la sensibilidad del ERG, así como los niveles de concentración de glucosa y CHH en la hemolinfa siguen un patrón rítmico circadiano con una acrofase nocturna (Gorlges-Kallen, 1985; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998). Debido a que las concentraciones de CHH reportada en algunas especies son bajas (*Palaemon elegans*, $1.13 \text{ pmol ml}^{-1}$ en la hemolinfa durante el día, (Lorenzon et al., 2004), y en *Procambarus clarkii* estas concentraciones varían notablemente del día a la noche (Fanjul-Moles y Escamilla-Chimal, 2005) los resultados de ésta tesis sugieren dos hipótesis. Una primera sugiere que los cambios observados durante el día sean debidos a que ante la baja concentración, tanto de glucosa como de CHH, exista una mayor disponibilidad de posibles receptores GLUT, para unirse a la glucosa y favorecer su entrada al receptor. Sin embargo, no es fácil tratar de explicar el efecto inhibitorio de la CHH a concentraciones altas (50nM) durante la noche subjetiva, este efecto no puede explicarse como producido por una saturación de los receptores (Fig. 9F).

Una segunda hipótesis sería un efecto neuromodulador de la CHH sobre la respuesta visual. Al comparar la latencia de la respuesta a la CHH-I con la latencia del ERG a la glucosa (Vizcarra-Chacón, 2006) la latencia del cambio de la amplitud del ERG a CHH es mucho mas corto (10min) que a la glucosa (latencia mínima 20min). Esto podría sugerir un efecto neuromodulador similar al reportado para otros péptidos, que podría involucrar a más de un neurotransmisor. Otros péptidos como las cromatoforotropinas actúan modulando la entrada de luz a los fotorreceptores, bien en forma directa o indirecta a través de los parareceptores. Además, monoaminas como la serotonina, cuya presencia se ha comprobado en la retina y lámina ganglionaris (Rodríguez-Sosa, et al., 1997; Escamilla-Chimal et al., 2001, 2002) modula también esta respuesta, al favorecer la retracción del pigmento proximal. Por otra parte esta monoamina, tiene un efecto directo sobre la membrana fotosensible incrementando su conductancia y mediando la generación del potencial de receptor (Aréchiga et al., 1990).

8.2 Glucagon

En este trabajo también se estudio la relación que existe entre la fototransducción y el papel del glucagon, como posible modulador. Hasta el momento no hay reportes sobre el efecto del glucagon sobre la respuesta eléctrica retiniana en el acocil. Se ha propuesto al glucagon como un neuromodulador en retina de rata (Das et al., 1985), donde actúa vía glucógenolisis o gluconeogénesis (Jian y Zhang, 2003) actuando directamente en receptores de membrana específicos. En la retina, principalmente de vertebrados, mediante métodos inmunoquímicos se han reportado receptores a glucagon (Fernández-Durango et al., 1990; Christophe, 1996; Wetzel y Eldred, 1997; Feldkaemper et al., 2004; Fischer et al., 2005). En invertebrados se ha reportado inmunorreactividad a glucagon en el ganglio cerebroide del molusco *M. edulis* (Kellner, et al., 2002) así como en células del lóbulo óptico del acocil *Astacus leptodactylus* en la lámina ganglionaris, el quiasma óptico y la médula externa (Van Deijnen et al., 1985).

En este trabajo se encontró que al aplicarse este péptido (4 μ M) en el día subjetivo, hay un aumento significativo del componente HI, en el minuto 10 ($P<0.025$) y minuto 20 ($P<0.05$), seguido de un decremento hasta el final del experimento (Fig. 13B), mientras que para la concentración de glucagon 6 μ M, se observó un decremento significativo ($P<0.025$) en ambos componentes del ERG. Sin embargo, durante la noche únicamente se obtuvo una diferencia significativa en el componente HII a concentraciones de 6 μ M (Fig. 14C), donde se observó una disminución en el minuto 100 ($P<0.05$) y 120 ($P<0.025$). Estos datos nos podrían sugerir que existiera algún receptor específico a este péptido en la retina, que al actuar sobre proteínas G, modulando la vía del AMPc, como se explicó en la introducción, produciría efectos excitatorios o inhibitorios sobre la respuesta a la luz. Se sabe que el receptor a glucagon actúa acoplado a proteínas G. Esta proteína G_q provoca la activación de la fosfolipasa C, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato, y la subsiguiente liberación de calcio intracelular (Jiang y Zhang, 2003). Cuando el glucagon promueve la actividad de la PKA, afecta un mecanismo que involucra la movilización de iones Ca²⁺. En acociles se conoce que un aumento en la concentración de Ca²⁺, disminuye la sensibilidad visual (Fuentes-Pardo et al., 1984); También se ha demostrado, que un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular reduce la ganancia de los fotorreceptores y también contribuye a una disminución en la conductancia de K⁺, disminuyendo así la respuesta visual (Miller y Glantz, 2000). Por otro lado el mecanismo por el cual la RPCH promueve la agregación del PD es debido a la entrada de Ca²⁺ y liberación de Ca²⁺ intracelular e

interactuando con otros mensajeros intracelulares, como los nucleótidos cíclicos (Nery y Castrucci, 1997, citado en Porras et al, 2001).

8.2.1 Efecto del glucagon sobre los movimientos de los pigmentos blindantes

Las retinas que se utilizaron tanto para los experimentos de ERG como para medir el índice de los pigmentos, se colocaron en condiciones de oscuridad constante durante todo el experimento. Las concentraciones que se utilizaron se basaron en las respuestas máximas del ERG de esta misma tesis. Se ha reportado que el IPP puede tomar valores de 0.10-0.15 en estado de adaptación a la oscuridad, pues una fracción del pigmento permanece sobre la membrana basal, mientras que en estado de adaptación a la luz toma valores de 1.0, mientras que el IPD toma valores de 0.65 a 0.75 durante la adaptación a la luz y 0.1 durante la adaptación a la oscuridad (Frixione y Aréchiga 1981; Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982; Garfias et al., 1985; Porras et al., 2001).

Como lo muestra la figura 16, antes de la aplicación de glucagon 4 μ M durante el día subjetivo(10:00) o con glucagon 6 μ M, durante la noche subjetiva (24:00) ambos pigmentos se quedan en adaptación a la luz (Fig. 16A) o a la oscuridad (Fig. 16D), como se esperaba.

En las condiciones de experimentación y puesto que la retina está en condiciones *in vitro* no se espera la secreción de hormonas cromatoforotróficas, lo que demostró en los experimentos control, presentado un índice de IPD=0.55 y IPP=0.71 en el día y un índice de IPD=0.11 y IPP=0.125, en la noche, después de haber permanecido 2 horas en la oscuridad. Sin embargo y paradójicamente después de la aplicación de glucagon 4 y 6 μ M, tanto en el día como en la noche subjetiva, se encontró una retracción de los pigmentos (IPD=0.18, IPP=0.35) y una dispersión de los mismos (IPD=0.56, IPP=0.62), respectivamente (Fig. 16B, E), efecto contrario al esperado. Se han reportado axones inmunopositivos a 5-HT cerca de los axones de las células retinulares, como se ha mencionado anteriormente se propone que la 5-HT induce la retracción del pigmento proximal, y aumenta la sensibilidad de los fotorreceptores a la fotoestimulación, actuando sobre la conductancia de los mismos (Aréchiga et al., 1990; Escamilla-Chimal et al., 2001). Los resultados de esta tesis parecen sugerir un efecto modulador del glucagon sobre los pigmentos de blindaje, lo cual se traducirá en los cambios en la amplitud del ERG.

Durante el día subjetivo, después de una hora de lavado continuo con VH+HEPES, ambos pigmentos, distal y proximal, vuelven a dispersarse (IPD=0.5, IPP=0.766), mientras que para la noche subjetiva, continua un desplazamiento mayor de ambos pigmentos (IPD=0.719, IPP=0.77)

Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos en el ERG, durante el día subjetivo la aplicación de glucagon $4\mu\text{M}$ aumenta significativamente la amplitud del ERG en los primeros 10 minutos, coincidiendo con la retracción de los pigmentos y así favorecer al aumento en la sensibilidad de los fotorreceptores, después de una hora de lavado (Fig. 13B) se observó una disminución de la sensibilidad en los fotorreceptores, que se podría sugerir es por la acción blindante de los pigmentos (Fig. 13B y Fig. 16B), de igual forma con la concentración de $6\mu\text{M}$, donde fue significativo este descenso (Fig. 13C). Pues se ha reportado que cuando la dispersión del pigmento distal toma valores de IPD de 0.65 a 0.75 la fotosensibilidad de las células retinulares disminuye una unidad logarítmica (Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982). Mientras que para la noche subjetiva, los experimentos utilizados para el ERG a una concentración de $6\mu\text{M}$, se encontró una disminución significativa en los minutos 100 y 120, que coinciden con la dispersión observada en la retina una hora después del lavado continuo, disminuyendo así la sensibilidad de los fotorreceptores, a pesar de que a esta hora esperaríamos encontrar un aumento del ERG debido al efecto circadiano.

El efecto del glucagon sobre la posición del pigmento distal del acocil es similar al efecto de la glucosa sobre los mismos (Vizcarra-Chacón, 2006) aunque de mayor duración. En una preparación similar y siguiendo el mismo protocolo experimental, este autor encontró que este efecto es similar antes del lavado pero desaparece con el mismo. Por lo anterior los resultados de esta tesis parecen sugerir dos tipos de efectos de este péptido sobre la respuesta parareceptora. Uno a largo plazo, en el que se activaría la movilización de glucosa para ser utilizada por los diferentes elementos que intervienen en la respuesta parareceptora y receptora. Este efecto se puede observar aún después del lavado y parece apoyar la hipótesis I. El segundo que refuerza la hipótesis II es a corto plazo que produce un incremento inmediato en la respuesta del ERG y que podría ser debido a una acción neurotransmisora o neuromoduladora como aquella propuesta para otros neurotransmisores como la serotonina.

9. Conclusión

1. La aplicación exógena de CHH-I a ambas horas del día produce un incremento en la amplitud del ERG, quizá debido a un aumento en la concentración de glucosa en la retina . La presencia de depósitos de glucógeno en esta estructura, especialmente en los rabdomos señala a este carbohidrato como un posible sustrato para la acción catabólica de CHH.
2. El efecto del glucagon sobre el ERG como sobre los pigmentos de blindaje fueron coincidentes. Durante el día este péptido produce tanto un aumento en la amplitud del ERG y una retracción de los pigmentos y por la noche se produce una disminución de la amplitud del ERG y una dispersión de los pigmentos disminuyendo la sensibilidad.

10. Anexo No. 1

Ácido Periódico de Shiff (PAS)

1- Solución ácido periódico al 5%

Ácido periódico 0.5 g

Agua destilada 100 ml

2- Solución de ácido clorhídrico 1N

Ácido clorhídrico, g.esp. 1.19 83.5 ml

Agua destilada 916.5 ml

3- Reactivo Shiff de Coleman

Fucsina básica 1.0 g

Agua destilada, calentar a 60° C 200.0 ml

Llevar a punto de ebullición, enfriar y luego se
agregar:

Metabisulfito de potasio 2.0 g

Ácido clorhídrico 1N..... 10.0 ml

Dejar aclarar durante 24hrs y adicionar carbón activado (0.5 g). Agitar durante 1min, luego filtrar a través de papel filtro grueso, hasta que la solución aparezca incolora.

11. Literatura Citada

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD** (2002) *Transmisión de señales entre células*. En: Biología molecular de la célula. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 771-813.
- Aréchiga H** (1977a) *Circadian rhythmicity in the nervous system of crustaceans*. Federation Proceedings. 36(7): 2036-2041.
- Aréchiga H** (1977b) *Modulation of visual input in the crayfish*. En: Identified neurons and behavior of arthropods. (ed. Hoyle G). Plenum Press, Nueva York. pp. 387-403.
- Aréchiga H** (1993) *Circadian rhythms*. Current Opinion in Neurobiology 3:1005-1010.
- Aréchiga H y Mena F** (1975) *Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish*. Journal of Comparative Biochemical Physiology 52A:581-584.
- Aréchiga H y Rodríguez-Sosa L** (1997) *Coupling of Environmental and Endogenous Factors in the Control of Rhythmic Behaviour in Decapod Crustaceans*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 77:17-29.
- Aréchiga H y Rodríguez-Sosa L** (1998) *Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish*. Proc. Royal Society London B. 265: 1819-1823.
- Aréchiga H y Wiersma CA** (1969) *Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units*. Journal of Neurobiology 1:71-85.
- Aréchiga H, Bañuelos E, Frixione E, Picones A y Rodríguez-Sosa L** (1990) *Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine*. Journal of Experimental Biology 150: 123-143.
- Aréchiga H, Cortes JL, García U y Rodríguez-Sosa L** (1985) *Neuroendocrine correlates of Circadian Rhythmicity in Crustaceans*. American Zoology 25: 265-274.
- Aréchiga H, Fernández-Quiróz F, Fernández de Miguel F, Rodríguez-Sosa I** (1993) *The Circadian System of Crustacean*. Cronobiology International 10(1):1-19.
- Aronoff SL, Berkowitz K, Shereiner B y Want L** (1994) *Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon*. Diabetes Spectrum 17(3):183-190.
- Aschoff J** (1981) A survey in biological rhythm. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4. Biological rhythms (Ed. Aschoff). Plenum Press. Nueva York.
- Ashmore LJ y Sehgal** (2003) *A fly's eye view of circadian entrainment*. Journal of Biological Rhythms 18(3):206-216.
- Barrera-Mera B** (1978) *Neural coupling between left and right electroretinographic circadian oscillations in the crayfish P. bouvieri*. Comparative Biochemical Physiology 61A:427-432.
- Brady J.** (1979) *Daily, Tidal, Lunar and Annual Rhythms*. En Biological Clocks. Studies in Biology (ed: Brady J). Pp: 5-21.
- Brazitikos PD y Tsacopoulos M** (1991) *Metabolic signaling between photoreceptors and glial cells in the retina of the drone (Apis mellifera)*. Brain Research 567: 33-41.
- Candy DJ** (1980) *Hormonal Regulation*. En: Biological Functions of carbohydrates (ed. Candy DJ). Blackie Glasgow and London. 171-186.
- Castañón-Cervantes O, Battelle B y Fanjul-Moles ML** (1999) *Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development*. Journal of Experimental Biology 202:2823-2830.
- Castañón-Cervantes O, Escamilla-Chimal EG, García Rivera CC** (1996) *El Cultivo del Acocil*. Ciencia y Desarrollo (130) Septiembre-Octubre:76-80.

- Coffe V, Carbajal RC y Salceda R** (2004) *Glycogen metabolism in the rat retina*. Journal of Neurochemistry 88:885-890.
- Chang ES, Chang SA, Beltz BS y Kravitz EA** (1999) *Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots*. Journal of Comparative Neurology 414: 50-56.
- Christophe J** (1996) *Glucagon and its receptor in various tissues*. Annales of the New York Academic of Sciences 805:31-43.
- Da Silva SF, Taffarel M y Allodi S** (2001) *Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix*. Biology of the Cell 93: 293-299.
- Daan S y Aschoff J** (2001) *The entrainment of Circadian System*. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Circadian Clocks. Vol 12 (ed. Takahashi JS, Turek FW y Moore RY) Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. Pp: 7-40.
- Das A, Pansky B y Budd CG** (1985) *Glucagon-like immunoreactivity in mouse and rat retina*. Neuroscience Letters. 60:215-28.
- De Kleijn DP, de Leeuw EP, van den Berq MC, Martens GJ y Van Herp F** (1995) *Cloning and expresión of two mRNAs encoding structurally different crustacean hyperglycemic hormone in the lobster Homarus americanus*. Biochimica Biophysica Acta 126(1):62-66.
- Dimitracos SA y Tsacopoulos M** (1985) *The recovery from a transient inhibition of the oxidative metabolism of the photoreceptors of the drone (Apis mellifera)*. Journal of Experimental Biology 119: 165-181.
- Duffield GE** (2003) *DNA Microarray analyses of circadian timing: The genomic basis of biological time*. Journal of Neuroendocrinology 15:991-1002.
- Dunphy JL, Taylor RG y Fuller PJ** (1998) *Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression*. Mol Cell Endocrinol 141(1-2):179-186.
- Eguchi E.** (1965) *Rhabdom Structure and Receptor Potentials in Single Crayfish Retinular Cells*. Journal of Cell and Comparative Physiology. 66: 411-430.
- Escamilla-Chimal EG, Hiriart M, Sánchez-Soto C y Fanjul-Moles ML** (2002) *Serotonin modulation of CHH secretion by isolated cells of the crayfish retina and optic lobe*. General and Comparative Endocrinology 125: 283-290.
- Escamilla-Chimal EG, Van Herp F y Fanjul-Moles ML** (2001) *Daily variations in crustacean hyperglycemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish*. Journal of Experimental Biology 204: 1073-1081.
- Escamilla-Chimal EG.** (2001) *Cambios cíclicos en serotonina y CHH en el tallo ocular del acocil Procambours clarkii en diferentes estados del desarrollo*. Tesis de Doctorado, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 88 Pp.
- Evêquoz-Mercier V y Tsacopoulos M** (1991) *The light-induced increase of carbohydrate metabolism in glial cells of the honeybee retina is not mediated by K⁺ movement nor by cAMP*. Journal of General Physiology 98: 497-515.
- Fanjul-Moles ML** (2006) *Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update*. Comparative Biochemistry and Physiology C 142:390-400.
- Fanjul-Moles ML y Escamilla-Chimal EG** (2005) *The retina of crayfish shows hyperglycemic hormone circadian rhythms*. 37th Annual General Meeting of the European Brain and Behaviour Society. Trinity college Dublin, Ireland. Sep, 2005
- Fanjul-Moles ML y Prieto-Sagredo JA** (2003) *The circadian system of crayfish: A developmental approach*. Microscopy Research and Technique 60: 291-301.

- Fanjul-Moles ML, Escamilla-Chimal EG, Gloria-Soria A y Hernández-Herrera G** (2004) *The crayfish Procamburus clarkii CRY shows daily and circadian variation*. The Journal of Experimental Biology 207:1453-1460.
- Feldkaemper MP, Budkhardt E y Schaeffel F** (2004) *Localization and regulation of glucagon receptors in the chick eye and preproglucagon and glucagon receptor expression in the mouse eye*. Experimental Eye Research 79:321-329.
- Fernández-Durango R, Sánchez D y Fernández-Cruz** (1990) *Identification of Glucagon Receptor in Rat Retina*. Journal of Neurochemistry 54(4):1233-1237.
- Fingerman SW y Fingerman M** (1977). *Circadian variation in the levels of red pigment dispersing hormone and 5-hydroxytryptamine in the eyestalks of the fiddler crab, Uca pugnator*. Comp. Biochem. Physiol. 56C: 5-8.
- Fischer AJ, Omar G, Walton NA, Verrill TA y Unson CG** (2005) *Glucagon-expressing neurons within the retina regulate the proliferation of neural progenitors in the circumferential marginal zone of the avian eye*. The Journal of Neuroscience. 25(44):10157-10166.
- Frixione E y Aréchiga H** (1981). *Ionic dependence of screening pigment migrations in crayfish retinal photoreceptors*. Journal Comparative Physiology 144: 35-43.
- Frixione E y Hernandez J** (1989). *Modulation of screening-pigment position in crayfish photoreceptors by serotonin: possible involvement of Na⁺/K⁺ – ATPase activity*. Journal of Experimental Biology 143: 459-473.
- Frixione E y Pérez-Olvera O** (1991). *Light-adapting migration of the screening-pigment in crayfish photoreceptors is a two-stage movement comprising an all-or-nothing initial phase*. Journal of Neurobiology 22(3): 238-248.
- Frixione E y Tsutsumi V** (1982). *Photomechanical responses in crustacean retinula cells: the role of microtubules*. Vision Res. 22: 1507-1514.
- Frixione E, Aréchiga H y Tsutsumi V** (1979). *Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish*. Journal of Neurobiology 10(6): 573-590.
- Fuentes-Pardo B, Hernández-Falcón J y Noguero L** (1984). *Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty-four hour cycle*. Comparative Biochemical Physiology 78A(4):723-727.
- Fuentes-Pardo B, Verdugo-Díaz L e Inclán-Rubio V**(1985). *Effect of external level of calcium on ERG circadian rhythm in isolated eyestalk of crayfish*. Comparative Biochemical Physiology 82A(2):385-389.
- García E, Benítez A y Onetti CG** (1993). *Responsiveness to D-glucose in neurosecretory cells of crustaceans*. Journal of Neurophysiology 70(2): 758-764.
- Garfias A, Rodríguez-Sosa L y Aréchiga H** (1995). *Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone*. Journal of Experimental Biology 198: 1447-1454.
- Gaus G y Stieve H** (1992). *The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish Orconectes limosus*. Z. Naturforsch. 47c: 300-303.
- Gherardi F**. (2002). *Behaviour*. En: Biology Freshwater Crayfish. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp: 258-281.
- Glowik RM, Golowasch J, Keller R y Marder E** (1997) *D-Glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab Cancer borealis and negative feedback regulation of blood glucose level*. Journal of Experimental Biology 200: 1421-1431.
- Gorgels-Kallen JL y 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)*. Journal of Morphology 170: 347-355.
- Gorgels-Kallen JL y Voorter EM**. (1985) *The secretory dynamics of the CHH-producing cell group in the crayfish, Astacus leptodactylus, in the course of the day/night cycle*. Cell Tissue and Research 241: 361-366.

- Hernández-Falcón J y Fuentes-Pardo B** (1991). *Crayfish reticular cells: Influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential*. *Comparative Biochemical Physiology* 100A(4):823-832.
- Holdich DM.** (2002). *Background and Functional Morphology*. En: *Biology Freshwater Crayfish*. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp: 3-27.
- Huberman A, Aguilar MB, Brew K, Shabanowitz J y Hunt DF.** (1993) *Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the mexican crayfish Procambarus clarkii (Ortmann): Interspecies comparison*. *Peptides* 14:7-16.
- Jiang G y Zhang BB** (2003) *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. *Am J. Physiol Endocrinol. Metab.* 284: E671-E678.
- Kallen JL, Abrahamse L y Van Herp F** (1990) *Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish*. *The Biological Bulletin* 179: 351-357.
- Kallen JL, Rigiani NR y Trompenaars HJ** (1988) *Aspects of entrainment of CHH cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish*. *The Biological Bulletin* 175: 137-143.
- Keller R, Jaros PP y Kegel G** (1985) *Crustacean hyperglycemic neuropeptides*. *American Zoology* 25: 207-221.
- Kellner K, Heude-Berthelin C y Mathieu M** (2002) *Immunocytochemical demonstration of glucagon-like peptides in Mytilus edulis cerebral ganglia and an in vitro effect of vertebrate glucagon on glycogen metabolism*. *Tissue & Cell* 34(2):109-116.
- Kotz KJ y McNiven MA** (1994) *Intracellular calcium and cAMP regulate directional pigment movements in teleost erythrocytes*. *Journal Cell Biology*. 124: 463-474.
- Kummer G y Keller R** (1993) *High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab Carcinus maenas and the crayfish Orconectes limosus*. *Peptides*. 14: 103-108.
- Larimer JL y Smith JT** (1980) *Circadian Rhythm of Retinal Sensitivity in Crayfish: Modulation by the Cerebral and Optic Ganglia*. *Journal of Comparative Physiology* 136: 313-326.
- Lee C, Yang P y Zou H** (2001) *Serotonergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish, Procambarus clarkii*. *Physiol. and Biochem. Zool.* 74(3): 376-382.
- López L y Sannita WG** (1997) *Glucose availability and the electrophysiology of the human visual system*. *Clinical Neuroscience* 4:336-340.
- Lorenzon S, Edomi P, Guilianini PG, Mettullo R y Ferrero EA** (2004). *Variation of crustacean hyperglucemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp Palaemon elegans following stress*. *Journal of Experimental Biology* 207: 4205-4213.
- Maier V, Fuchs J, Pfeiffer EF y Bounias M.** (1990). *Glucagon as a non species-specific regulator of the glycaemia in honeybee (Apis mellifica)*. *Diabete & Metabolismse (Paris)*, 16:428-434.
- Mangerich S, Keller R y Dirksen H** (1986). *Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans*. *Cell Tissue Res.* 245: 377-386.
- Maynard DM.** (1962) *Organization of Neuropil*. *Zoologist*. 2:79-96.
- Mayo K, Miller LJ, Bataille D, Dalle S, Göke B, Thorens D y Drucker DJ** (2003). *International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family*. *Pharmacological Reviews*. 55(1):167-194.
- Miller CS y Glantz RM** (2000). *Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish*. *Vis Nerusci* 17:353-368.

- Moore-Ede MC, Sulzman FM y Fuller CA** (1982) *Characteristics of Circadian Cloks*. En *The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system* (Ed: Moore-Ede MC, Sulzman FM y Fuller CA). Harvard University Press, Londres. 1-112.
- Naka K y Kuwabara M** (1959) *Two Components from the Compound Eye of the Crayfish*. *Journal of Experimental Biology* 36:51-61.
- Nian M, Gu J, Irwin DM y Drucker DJ** (2002) *Human glucagon gene promoter sequences regulating tissue-specific versus nutrient-regulated gene expression* *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 282: R173–R183.
- Oakley B y Shafer R.** (1992) *Experimental Neurobiology: A Laboratory Manual*. The University of Michigan Press. U.S.A. pp:165-201.
- Ollivaux C y Soyez D** (2000) *Dinamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ - sinus gland complex of the crayfish Orconectes limosus*. *European Journal of Biochemistry* 267: 5106-5114.
- Ollivaux C, Dircksen H, Toullec J y Soyez D** (2002) *Enkephalinergic control of the secretory activity of neurons producing stereoisomers of crustacean hyperglycemic hormone in the eyestalk of the crayfish Orconectes limosus*. *J. Comp. Neurol.* 444: 1-9.
- Page TL y Larimer J** (1972). *Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm*. *J. Comp. Physiol.* 97: 81-86.
- Picones A y Aréchiga H** (1990). *Electrophysiological properties of crayfish retinal photoreceptors*. *Journal of Experimental Biology* 15:111-122.
- Porras MG, López-Colomé AM, Aréchiga H** (2001). *Red pigment-concentrating hormone induces a calcium-mediated retraction of distal retinal pigments in the crayfish*. *Journal Comparative Physiology A* 187:349-357.
- Preciado M, Tsutsumi V y Aréchiga H** (1994) *Ultrastructural features of neurosecretory cells in the medulla externa of the crayfish eyestalk*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 432-442.
- Rao KR.** (1985). *Pigmentary Effectors*. En: *The Biology of Crustacea, Vol. 9. Integument, Pigments and Hormonal Processes*. Eds. Bliss DE, Atwood HL y Sandeman DC. Academic Press. NY. pp:395-641.
- Roach JLM** (1976) *Junctional structures in the crystalline cone of the crayfish compound eye*. *Cell Tiss. Res.* 173: 309-314.
- Rodríguez-Sosa L y Aréchiga H** (1982). *Range of modulation of light sensitivity by accessory pigments in the crayfish compound eye*. *Vision Research* 22:1515-1524.
- Rodríguez-Sosa L, de la Vega MT y Aréchiga H** (1994). *Circadian rhythm of content of red pigment-concentrating hormone in the crayfish eyestalk*. *Comparative Biochemical Physiology* 109C(1):101-108.
- Rodríguez-Sosa L, Picones A, Calderón-Rosete G, Islas S y Aréchiga H.** (1997). *Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk*. *Journal of Experimental Biology.* 200:3067-3077.
- Rungger-Brandle E, Kolb H y Niemeyer G** (1996) *Histochemical demonstration of glycogen in neurons of the cal retina*. *Vis Sci* 37(5):702-715.
- Sánchez JA y Fuentes-Pardo B** (1977). *Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 56: 601-605.
- Sánchez-Ortiz M.** (2004). *Efecto de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos sobre la actividad eléctrica de la retina del acocil Procamburus clarkii "in vitro"*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM.

- 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 y Sandeman DC. Academic Press. NY. pp:1-61.
- Santos EA y Keller R** (1993a) *Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism current perspectives*. Comparative Biochemistry and Physiology A. 106(3): 405-411.
- Santos EA y Keller R** (1993b) *Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone: evidence for dual feedback control system*. Journal of Comparative Physiology B. 163: 374-379.
- Sarojini R, Nagabhushanam R y Fingerman M** (1995) *Dopaminergic and Enkephalinergetic Involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, Procambarus clarkii*. General and Comparative Endocrinology 97:160-170.
- Sedlmeier D** (1982) *The Mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH) II. Involvement of glycogen synthase*. General and Comparative Endocrinology 47: 426-432.
- Serrano L, Grousset E, Charmantier G y Spanings-Pierrot C** (2004) *Occurrence of L-and D-Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms in the Eyestalk X-Organ/SinusGland Complex During the ontogeny of the Crayfish Astacus leptodactylus*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 52(9):1129-1140.
- Shaw SR y Stowe S.** (1982) *Photoreception*. En: The Biology of Crustacea, Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. Eds. Bliss DE, Atwood HL y Sandeman DC. Academic Press. NY. pp:291-367.
- Sivarajah P, Wheeler MB e Irwin DM** (2001) *Evolution of receptors for proglucagon-derived peptides:isolation of frog glucagon receptors*. Comparative Biochemistry and Physiology B. Biochem Mol Biol. 128(3):517-527.
- Soyez D, Toullec JY, Ollivaux C y Géraud G** (2000) *L a D amino acid isomerization in a peptide hormone is a late post-translational event occurring in specialized neuroseretory cells*. The Journal of Biological Chemistry 275 (48): 37870-37875.
- Soyez D, Van Herp F, Rossier J, Le Caer JP, Tensen CP y Lafont R** (1994) *Evidence for a conformational polymorphism of invertebrate neurohormones. D-amino acid residue in crustacean hyperglycemic peptides*. Journal of Biological Chemistry 269(28): 18295-18298.
- Stavenga DG** (1979) *Pseudopupils of compound eyes*. En: (ed. Autrum H.) Comparative Physiology and evolution of vision in invertebrates. A:Invertebrate Photoreceptors. Springer-Verlag Berlin.Pp 387-439.
- Strand FL** (1998) *Gut and Brain Neuropeptides I. Neuropeptide Families: Gastrin/CCK; VIP/Secretin/Glucagon; PP/PYY/NPY; BN/GRP*. En (ed.Strand) Neuropeptides, regulators of physiological processes. A Bradford Book The MIT press Cambridge, Massachusetts. 383-429.
- Svoboda M, Portois L y Malaisse WJ** (1999) *Glucose regulation of the expresión of the glucagon receptor gene*. Molecular Genetics and Metabolism 68:258-267.
- Tsacopoulos M** (2002) *Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review*. Journal of Physiology (Paris) 96: 283-288.
- Tsacopoulos M y Magistretti PJ** (1996). *Metabolic coupling between glia and neurons*. The Journal of Neuroscience 16 (3): 877-885.
- Tsacopoulos M, Evêquoz-Mercier V, Perrottet P y Buchner E** (1988) *Honeybee retinal glial cells transform glucose and supply the neurons with metabolic substrate*. Proceedings of the National Academic of Science 85: 8727-8731.
- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL y Poitry S** (1997a). *Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell*. The Journal of Neurosciense 17(7) 2383-2390.

- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P y Veuthey AL** (1997b) *The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons*. *Glia*. 21: 84-91.
- Tsacopoulos M, Veuthey AL, Saravelos SG, Perrottet P y Tsoupras G** (1994) *Glial cells transform glucose to alanine, which fuels the neurons in the honeybee retina*. *The Journal of Neuroscience* 14(3): 1339-1351.
- Turek FW y Takahashi JS** (2001) *Introduction to circadian rhythms*. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology. Circadian Clocks*. Vol 12 (ed. Takahashi JS, Turek FW y Moore RY) Kluwer Academic Plenum Publishers, New York. Pp: 3-6
- Van Deijnen JE, Vek F y Van Herp F** (1985) *An immunocytochemical study of the optic ganglia of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordmann 1842) with antisera against biologically active peptides of vertebrates and invertebrates*. *Cell and Tissue Research* 240:175-183.
- 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.
- Verri T, Mandal A, Zilli L, Bossa D, Mandal PK, Ingrosso L, Zonno V, Vilella S, Ahearn GA y Storelli C** (2001) *D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 130: 585-606.
- Vizcarra-Chacón BJ** (2006) *Efecto de la D-glucosa sobre los mecanismos responsables de la génesis del electroretinograma (ERG) en la retina del acocil Procambarus clarkii en condiciones "in vitro"*. Tesis de licenciatura (Biología) Facultad de Ciencias, UNAM. 78pp.
- Vogt G** (2002) *Functional Anatomy*. En: *Biology Freshwater Crayfish*. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp: 53-141.
- Wetzel RK y Eldred WD** (1997) *Specialized neuropeptide Y and glucagon-like immunoreactive amacrine cells in the peripheral retina of the turtle*. *Visual Neuroscience* Sep-Oct; 14(5):867-877.
- Yahaijara N, Mochizuki T, Satoh T, Imai S, Sasaki K, Kakuyama H, Hosoe H, Takatsuke N, Iguchi K, Luo W-Q, Kurokawa N y Yanaihara C** (1996) *Synthesis and biochemical characterization of proglucagon-related peptides*. *Annals of the New York Academy of Sciences* (805):20-29.
- Yasuda A, Yasuda Y, Fujita T y Naya Y** (1994) *Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (Procambarus clarkii): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions*. *General and Comparative Endocrinology* 95: 387-398.