



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

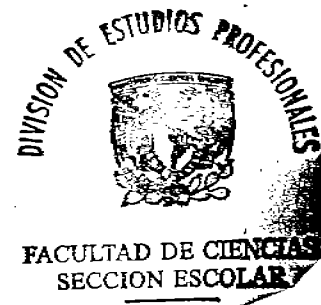
EFEECTO DE LA D-GLUCOSA SOBRE LOS  
MECANISMOS RESPONSABLES DE LA  
GÉNESIS DEL ELECTORRETINOGRAMA  
(ERG) EN LA RETINA DEL ACOCIL  
Procambarus clarkii EN CONDICIONES "in vitro"

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 :  
BIANCA JULIETA VIZCARRA CHACÓN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

2006





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

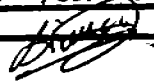
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Bianca Julieta  
Vizcarra Chacón

FECHA: 17 - Febrero - 2006

FIRMA: 



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "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"

realizado por Vizcarra Chacón Bianca Julieta

con número de cuenta 09712502-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María Luisa Fanjul Peña

Propietario Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Propietario M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Suplente M. en C. Enrique Moreno Sáenz

Suplente Biól. Carmen Sánchez Soto

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

A mis papás, Rosario y Jesús,  
y a mi hermana Diana

## AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer a mis papás y mi hermana por su cariño, por sus consejos y por apoyarme siempre. Por interesarse en mis proyectos de vida y profesionales. Porque me han brindado todo y gracias a ellos he llegado hasta aquí. Gracias.

A David por acompañarme durante el proceso de realización de este trabajo. Por su ayuda, que fue de gran utilidad para el avance del mismo. Por su cariño, comprensión, apoyo, paciencia y por hacerme más divertido el día. Siempre voy a tener presente su frase: "todo lo que hagas, hazlo bien". Por brindarme parte de su tiempo y darme siempre su opinión sincera. Muchas gracias. También te dedico este trabajo. Gracias.

A la Dra. María Luisa Fanjul por ayudarme a tener confianza en mí misma y porque sus palabras son la motivación que siempre hace falta para continuar con un proyecto. Gracias por compartir sus conocimientos, su experiencia y su alegría. Por hacer del área de trabajo un lugar agradable lleno de respeto. Por escucharme, tomar en cuenta mis opiniones y apoyarme. Gracias.

A los sinodales por la revisión de ésta tesis, por sus comentarios y sugerencias, ya que fueron de gran utilidad para el mejoramiento del presente trabajo. Gracias.

A Marlen, porque parte de esta tesis alguna vez formó parte de un proyecto de tesis conjunta. Por tu amistad y apoyo. A las personas que han formado parte de este laboratorio y que me han brindado su amistad y apoyo. Gracias.

A Elsa por ser más que una maestra para mí, ya que su amistad es muy valiosa. A Julio por su apoyo técnico y su amistad, por su paciencia y honestidad.

A mis amigos, por preocuparse siempre del avance de mis proyectos. Por brindarme su apoyo y amistad. Por hacerme pasar momentos agradables.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM. Bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul Peña. Fue apoyado por el proyecto CONACYT 46193 y PAPIIT IN208405-3.

# ÍNDICE

	Pags.
1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1. Generalidades de los acociles y su estudio .....	3
2.2. Organización del sistema nervioso del acocil .....	3
2.3. Sistema endocrino del acocil .....	4
2.3.1. Complejo órgano X – glándula sinusal .....	6
2.4. Organización estructural de los ojos compuestos .....	7
2.4.1. Electroretinograma (ERG) .....	10
2.4.2. Fototransducción en invertebrados .....	11
2.5. Ritmos biológicos .....	13
2.5.1. Ritmos circadianos y relojes biológicos .....	13
2.5.2. Ritmos circadianos en los acociles .....	14
2.5.3. Ritmo de amplitud ERG .....	15
2.5.3.1. Ritmo circadiano en la ganancia de los fotorreceptores .....	16
2.5.3.2. Ritmo circadiano en la posición de los pigmentos de blindaje .....	18
2.5.3.2.1. Control fisiológico del movimiento de los pigmentos de blindaje .....	19
2.5.3.2.1.1. Pigmento proximal (PP) .....	19
2.5.3.2.1.2. Pigmento distal (PD) .....	21
2.5.4. Origen de la señal de tiempo circadiano para la génesis del ritmo de amplitud ERG .....	23
2.6. Homeostásis de glucosa en crustáceos .....	24
2.6.1. Hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH) .....	25
2.6.2. Ritmicidad circadiana del contenido de CHH y glucosa en hemolinfa .....	29
2.7. Metabolismo de glucosa en la retina de invertebrados .....	30
2.8. Depósitos de glucógeno en la retina de crustáceos .....	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	34
4. HIPÓTESIS .....	35
5. OBJETIVOS .....	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
6.1. Animales .....	37
6.2. Fotoperiodo .....	37
6.3. Disección de la retina .....	37
6.4. D-glucosa .....	38
6.5. Registro del ERG .....	38
6.5.1. Equipo de registro electrofisiológico .....	40
6.5.2. Análisis de los datos .....	40
6.6. Determinación de la posición de los pigmentos de blindaje .....	41
6.7. Histoquímica .....	43
7. RESULTADOS .....	45
7.1. Efecto de la D-glucosa sobre la amplitud de los componentes del ERG: H-I y H-II ....	45
7.1.1. Curso temporal del efecto de la D-glucosa sobre la amplitud de H-I y H-II .....	45
7.1.2. Comparación de los cambios de amplitud del ERG entre el minuto -10 y 60 .....	49



7.1.3. Relación dosis-respuesta .....	49
7.1.4. Regresión múltiple y correlación .....	52
7.2. Efecto de la D-glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje .....	55
7.3. Localización de depósitos de glucógeno en la retina .....	58
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
8.1. Efecto de la D-glucosa sobre la amplitud del ERG .....	60
8.2. Efecto de la D-glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje .....	62
8.3. Depósitos de glucógeno en retina .....	65
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>10. ANEXO .....</b>	<b>68</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>70</b>

## 1. RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la D-glucosa sobre los mecanismos responsables de la génesis del ERG en la retina del acocil *Procambarus clarkii* en condiciones *in vitro* durante el día y la noche. Los organismos se sincronizaron a ciclos LO 12:12 y se dividieron en dos grupos experimentales: A y B. En A se determinó el efecto de cuatro diferentes concentraciones de glucosa (0.054, 0.11, 0.22 y 0.44 mM) sobre la amplitud del ERG en sus dos componentes, H-I (generado en el rabdomo) y H-II (generado en las células retinulares). En B se determinó el efecto de la glucosa 0.44 mM sobre el movimiento de los pigmentos de blindaje: proximal (PP) y distal (PD). En A, la retina permaneció en condiciones de oscuridad y perfusión (con VH+HEPES) constantes durante dos horas, después de las cuales se estimuló con un tren de pulsos de luz de la misma intensidad cada diez minutos en tres condiciones para un mismo experimento: 1) antes de la incubación con D-glucosa (min. -10), 2) incubación con D-glucosa o VH+HEPES (del min. 0 al 60) y 3) lavado de la solución aplicada (del min. 60 al 120). Para cada condición experimental, es decir, control (VH+HEPES) y las diferentes concentraciones de glucosa, se registraron los ERGs de cinco retinas tanto para el día como para la noche. En el grupo experimental B, se siguió el mismo procedimiento experimental, excepto por los estímulos de luz; las retinas se fijaron de acuerdo con el método descrito por Frixione et al. (1979) antes de la aplicación de una solución de glucosa 0.44 mM, una hora después de la incubación con esta solución y una hora después del lavado; y se determinó el índice del pigmento proximal (IPP) así como el del distal (IPD), en retinas del día y de la noche. Se investigó la presencia de depósitos de glucógeno en la retina a las mismas horas en que se registraron los ERGs y la posición de los pigmentos, con la técnica histoquímica: reacción de ácido periódico de Schiff (PAS). Los resultados indican que la D-glucosa tiene un efecto sobre la amplitud del ERG en sus dos componentes, así como sobre la posición de los pigmentos de blindaje, este efecto depende de la hora del día, parece ser de naturaleza circadiana y está determinado por el umbral de sensibilidad a la luz. Durante el día tanto la glucosa 0.22 como 0.44 mM producen un ligero incremento sobre la amplitud del ERG, sin embargo, este efecto no es estadísticamente significativo. Durante la noche, la glucosa 0.22 y 0.44 mM incrementan la amplitud del ERG, este efecto es mayor que el encontrado durante el día y solo es estadísticamente significativo con glucosa 0.44 mM. El efecto de la glucosa 0.44 mM sobre la posición de los pigmentos durante la noche muestra resultados contradictorios, ya que produce la dispersión tanto del PP como del PD, lo que conlleva a una menor entrada de fotones, sin embargo, la amplitud del ERG aumenta. Durante el día subjetivo la

glucosa 0.44 mM produce la retracción únicamente del PD. Esto indica un efecto circadiano diferencial de la glucosa sobre el umbral de los fotorreceptores, aumentando su sensibilidad a la luz a pesar de la menor entrada de fotones durante la noche, pero no así durante el día en donde la retracción del PD no influye de manera significativa sobre la amplitud del ERG. Las retinas del día y la noche muestran una tinción positiva a la reacción PAS, tanto en el rabadomo como en las células del cono cristalino y la membrana basal, lo que indica que la retina tiene sus propios depósitos de glucógeno.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

### **2.1. Generalidades de los acociles y su estudio.**

Los acociles son crustáceos pertenecientes al Orden Decapoda, dentro del cual se encuentra el género *Procambarus*. Este género ocupa diversos ambientes, incluyendo los subterráneos, praderas húmedas, marismas inundadas estacionalmente, lagos y ríos; en particular la especie *Procambarus clarkii*, puede habitar desde aguas salobres hasta aguas dulces. Esta especie se distribuye principalmente en el noreste de México y en la zona sur del centro de Estados Unidos (Huner, 2002). Se caracteriza por tener hábitos nocturnos, es decir, tiene periodos de reposo durante el día y periodos de actividad durante la noche. Además, construye madrigueras y túneles.

En general, los crustáceos decápodos (langostas, camarones, cangrejos y acociles) se han empleado para la investigación neurobiológica (Sandeman, 1982). En particular, el sistema nervioso del acocil ha servido como modelo neurobiológico. Varias de sus neuronas han sido bien estudiadas empleando técnicas de registro intracelular, lo que permite analizar las propiedades fisiológicas de las neuronas y sus conexiones tanto eferentes como aferentes (Govin, 1992). Por ejemplo, el ganglio estomatogástrico, es considerado uno de los centros integrativos mejor conocido, ya que se ha logrado determinar las distintas funciones que desempeñan cada una de las neuronas que lo conforman (Vogt, 2002). En 1970's el acocil fue usado como un modelo útil para examinar la fisiología y organización de los relojes biológicos, debido al avance en el conocimiento sobre la fisiología del sistema nervioso de este organismo (Gherardi, 2002). La especie *Procambarus clarkii* ha servido como modelo para el estudio de los mecanismos endógenos de generación y expresión de los ritmos circadianos fisiológicos y conductuales.

### **2.2. Organización del sistema nervioso del acocil.**

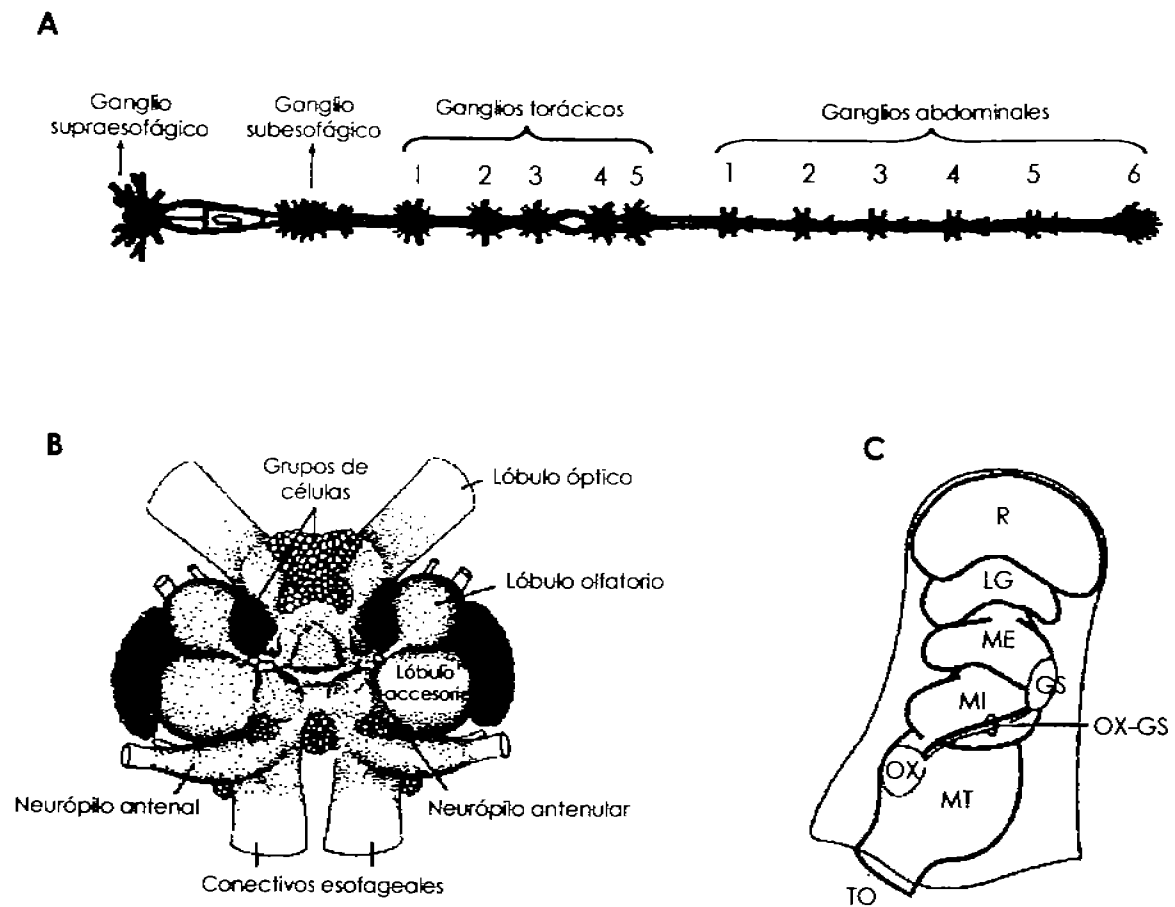
El sistema nervioso de los crustáceos, anatómicamente es un sistema en escalera, formado por ganglios bilaterales unidos en pares por comisuras y de forma longitudinal a otros pares de ganglios, por conectivos (Sandeman, 1982). Los ganglios son asociaciones de neuronas con tejido glial, penetrados por vasos y senos sanguíneos; y envueltos por el perineuro, una vaina delgada compuesta de fibras de colágeno y capas celulares. Los

ganglios están típicamente organizados en neurópilos, cada uno incluye axones, dendritas, sinapsis y grupos periféricos de somas celulares, que se encuentran en la parte externa rodeando al neurópilo (Vogt, 2002). El primer par de ganglios, los ganglios supraesofágicos, se encuentran fusionados, se localizan en la parte anterior del cefalotórax y son conocidos como el cerebro. Los ganglios supraesofágicos se conectan con otro par de ganglios, los ganglios subesofágicos, por medio de dos conectivos circumesofágicos. Los ganglios subesofágicos dan lugar al cordón nervioso ventral doble localizado por debajo del tracto alimenticio, este cordón nervioso está formado por cinco pares de ganglios torácicos y seis pares de ganglios abdominales (Vogt, 2002). En los acociles los pares de ganglios torácicos y abdominales están fusionados a través de la línea media, pero separados longitudinalmente por un par de conectivos (Sandeman, 1982) (Fig.1A).

El cerebro se divide en tres regiones: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. A su vez, el protocerebro se divide en lateral y anterior. El protocerebro lateral se encuentra localizado en los tallos ópticos, mientras que el protocerebro anterior, deutocerebro y tritocerebro se localizan en la parte anterior del cefalotórax. En el cerebro se encuentran los lóbulos ópticos, olfatorios y accesorios y los neurópilos antenal y antenular (Vogt, 2002) (Fig.1B). Los lóbulos ópticos localizados en los tallos ópticos, se conectan con el cerebro (o ganglio supraesofágico) por el tracto o nervio óptico. El lóbulo óptico está formado por cinco neurópilos serialmente ordenados, el neurópilo que se encuentra inmediatamente por debajo de la retina es la lámina ganglionaris, debajo de éste se encuentran la médula externa, médula interna, médula terminal y adyacente a este el cuerpo hemielipsoidal (Sandeman, 1982) (Fig. 1C).

### **2.3. Sistema endocrino del acocil.**

El sistema endocrino del acocil está organizado jerárquicamente, consiste de varios órganos endocrinos de origen neuronal o epitelial. Los órganos neuroendocrinos son realmente órganos neurohemales; están constituidos principalmente por terminales axónicas de células neuroendocrinas, especialmente cercanas al sistema vascular y son estructuras de almacén y liberación de neurohormonas. Los órganos neuroendocrinos del acocil incluyen el complejo órgano X – glándula sinusal, el órgano postcomisural y el órgano pericardial.



**Figura 1.** A) Sistema nervioso central de los decápodos, se muestran el ganglio supraesofágico o cerebroide, el ganglio subesofágico y la cadena ganglionar (Tomado de Sandeman, 1982). B) Vista ventral del cerebro (o ganglio supraesofágico) de acocil (Tomado de Vogt, 2002). C) Tallo óptico. R, retina; LG, lámina ganglionaris; MI, médula interna; ME, médula externa; MT, médula terminalis; OX, órgano X; GS, glándula sinusal; OX-GS, tracto órgano X - glándula sinusal; TO, tracto óptico (Tomado de Escamilla et al., 2001).

Los órganos endocrinos epiteliales están formados por grupos de células epiteliales modificadas en acinos glandulares que sintetizan hormonas y las liberan dentro de senos sanguíneos adyacentes. El órgano mandibular, el órgano-Y y la glándula androgénica son órganos endocrinos epiteliales. Las hormonas liberadas por los órganos neuroendocrinos y los órganos endocrinos epiteliales son de naturaleza peptídica, siendo las neurohormonas numéricamente predominantes (Vogt, 2002).

### **2.3.1. Complejo órgano X – glándula sinusal.**

Estudios realizados por un gran número de investigadores han revelado que el complejo órgano X - glándula sinusal es la principal estructura endocrina de los crustáceos, ya que representa la fuente más importante de neurohormonas. Este complejo se localiza en los tallos ópticos. El órgano X es un conglomerado de 150 a 200 somas neuronales que se encargan de sintetizar las neurohormonas, se localiza en la periferia de la médula terminal; las terminales axónicas de éstas neuronas forman lo que se conoce como glándula sinusal. Esta glándula, situada dorsolateralmente entre la médula externa e interna, se encarga de almacenar y liberar las neurohormonas al sistema vascular espacialmente cercano a la glándula sinusal (Fig. 1C). Los neuropéptidos sintetizados en los somas que forman el órgano X, son transportados a lo largo de los axones agrupados en el tracto órgano X - glándula sinusal hacia la glándula sinusal. La glándula sinusal además de estar constituida en gran parte por las terminales axónicas del órgano X, está formada por axones que provienen de otras áreas del tallo óptico y el cerebro (Fingerman, 1992; Vogt, 2002).

Los neuropéptidos sintetizados y liberados por el complejo órgano X – glándula sinusal pertenecen a dos familias funcionalmente distintas: 1) las cromatoforotropinas, que incluyen la hormona concentradora de pigmento rojo (RPCH) y las hormonas dispersoras del pigmento distal (PDH), 2) miembros de la familia de la hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH), la cual incluye no solo a la CHH, sino también a la hormona inhibidora de la muda (MIH), la hormona inhibidora de la vitelogenina o gonadal (VIH/GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH). Estudios inmunocitoquímicos y de hibridización *in situ* muestran que las células neuroendocrinas

individuales del órgano X tienen la capacidad de sintetizar varios neuropéptidos (Van Herp, 1998).

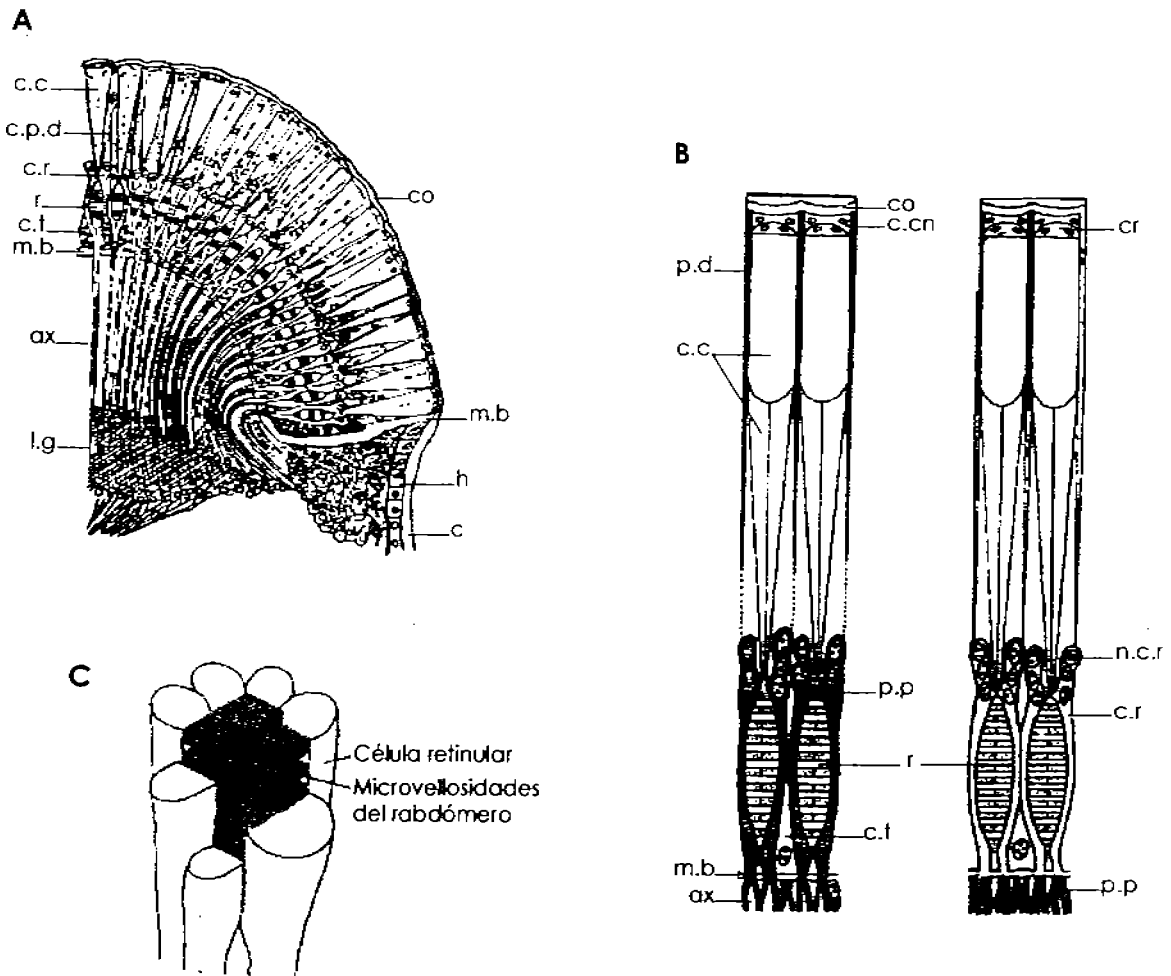
#### **2.4. Organización estructural de los ojos compuestos.**

El acocil tiene dos ojos compuestos, uno sobre cada tallo óptico, los cuales pueden moverse mediante músculos oculomotores. Los ojos compuestos están formados por unidades ópticas llamadas omatidias. Cada omatidia está compuesta de cuatro elementos: (1) el aparato dióptrico, (2) una retina fotosensible, (3) pigmentos de blindaje y (4) células tapetales (Vogt, 2002) (Fig. 2A, B).

El aparato dióptrico se encuentra en el extremo distal de las omatidias, lo constituyen la córnea, que es la forma transparente de la cutícula y el cono cristalino, que se encuentra debajo de la córnea. El cono cristalino guía la luz hacia las células fotorreceptoras, consiste de cuatro células cercanamente yuxtapuestas, la parte central de cada una de estas células es transparente. El cono cristalino está rodeado por dos células del pigmento distal (células accesorias), llamadas así por contener gránulos de pigmento distal (PD), estas células se encuentran en una posición paralela a los fotorreceptores, desde la córnea hasta la lámina basal (Shaw y Stowe, 1982; Govin, 1992; Vogt, 2002)(Fig. 2A, B).

La retina fotosensible de cada omatidia consiste de siete células retinulares o células fotorreceptoras arregladas concéntricamente; cada una de ellas posee microvellosidades o evaginaciones tubulares de membrana celular en su cara interna. El conjunto de microvellosidades de una célula retinular es conocido como rabdómero. Las microvellosidades (o rabdómero) de cada una de las células retinulares están orientadas hacia el centro de la omatidia en capas de orientación casi opuesta, esta orientación es perpendicular al eje óptico de la omatidia. Las capas de microvellosidades interdigitadas y orientadas hacia el centro de la omatidia forman lo que se conoce como rabdomo, por lo que el rabdomo de cada omatidia está formado por siete rabdómeros, cada uno originado de una célula retinular. El rabdomo absorbe la luz, ya que los pigmentos fotosensibles, rodopsina, están localizados en las membranas de las microvellosidades y es aquí donde se encuentra la maquinaria de fototransducción. El rabdomo en sección transversal aparece como una estructura cuadrada y en sección longitudinal se puede apreciar el arreglo de las microvellosidades en capas (Fig. 2C). Existe una octava célula retinular de tamaño reducido





**Figura 2.** A) Esquema de un corte longitudinal del ojo compuesto del acocil. ax, axones de las células retinulares (Tomado de Schraermeyer, 1992). B) Representación esquemática de omatidias, se muestra la redistribución de los pigmentos proximal y distal en relación a la adaptación a la luz (izquierda) y a la adaptación a la oscuridad (derecha) (Tomado de Waterman, 1961). C) Rabdómeros interdigitados de las distintas células retinulares que dan lugar a dos grupos de microvellosidades dispuestos perpendicularmente entre sí y forman lo que se conoce como rabdomo (Tomado de Randall et al., 1998). c, cutícula; c.c, cono cristalino; c.cn, células corneágenas; co, córnea; c.p.d, célula del pigmento distal; cr, células del cono cristalino; c.r, célula retinular; c.t, célula tapetal; h, hipodermis; m.b, membrana basal; n.c.r, núcleo de célula retinular; l.g, lámina ganglionaris; p.d, pigmento distal; p.p, pigmento proximal; r, rabdomo.

que no participa en la formación del rabdomo, aunque posee un rabdomero pequeño; se encuentra en una posición excéntrica y contiene pigmentos fotosensibles que absorben a 440 nm lo que permite que el acocil sea sensible a la luz ultravioleta (UV) (Govin, 1992; Vogt, 2002).

Las células retinulares se encuentran localizadas sobre la lámina basal y están comunicadas entre sí a través de desmosomas en zonas específicas. Las siete células retinulares que participan en la formación del rabdomo contienen gránulos de pigmento denominado pigmento proximal (PP). Los axones de las ocho células retinulares pasan en grupos a través de perforaciones en la lámina basal, es decir, las ocho células retinulares de cada omatidia divergen justo sobre la lámina basal, penetran esta, y forman fascículos de ocho axones por debajo de la misma, los fascículos se fusionan para formar grupos de axones y proyectan hacia la lámina ganglionaris. La lámina basal es también referida como membrana basal ya que se encuentran asociadas a ella prolongaciones de las células del pigmento distal y del cono cristalino (Shaw y Stowe, 1982). Por debajo de la lámina se sitúa una red de canales vasculares que contienen hemolinfa (se denomina hemolinfa para indicar la falta de separación entre el sistema circulatorio y linfático) (Shaw y Stowe, 1982; Sandeman, 1982; Vogt, 2002).

El PP localizado dentro de las células retinulares y el PD dentro células del pigmento distal, son melaninas y omocromos, ambos son conocidos como pigmentos de blindaje, ya que pueden desplazarse, modulando el flujo de fotones que llega a las membranas fotosensibles en los rabdomos. En la oscuridad el PP se encuentra retraído en los axones de las células retinulares, por debajo de la lámina basal, permitiendo que el rabdomo quede expuesto a la luz; bajo iluminación el PP se dispersa, blindando el paso de la luz hacia el fotorreceptor. De igual forma, en la oscuridad el PD se retrae hacia el extremo distal de las células accesorias, y se dispersa bajo iluminación. De esta forma, ambos pigmentos impiden o permiten el paso de fotones hacia los fotorreceptores, dependiendo de la iluminación (Goodwin, 1960; Rao, 1985) (Fig. 2B).

Las células tapetales, consideradas células gliales (Escamilla-Chimal et al., 2001), están localizadas basalmente entre las células retinulares, formando una capa simple conocida como tapetum. Contienen gránulos de pigmento que reflejan la luz, por lo que se

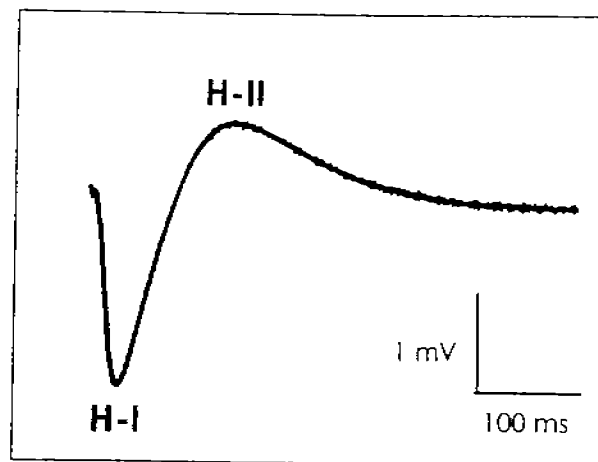
denomina pigmento reflejante, el cual es una mezcla de purinas y pterinas. Estos gránulos de pigmento no migran, es decir, no se retraen o dispersan, dependiendo del nivel de iluminación (Shaw y Stowe, 1982; Vogt, 2002; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997) (Fig. 2A, B).

#### **2.4.1. Electrorretinograma (ERG).**

El ERG es el registro extracelular de la respuesta eléctrica de las células fotorreceptoras ante un estímulo luminoso, por lo que este registro refleja la sensibilidad de los fotorreceptores a la iluminación. El ERG se obtiene colocando un electrodo de registro en o cerca de las células fotorreceptoras y un electrodo indiferente o de referencia colocado en el fluido extracelular lejos de los fotorreceptores. La respuesta eléctrica extracelular, es decir, la suma de las corrientes eléctricas de los fotorreceptores, se registra como una diferencia de potencial eléctrico (voltaje) entre ambos electrodos, este voltaje puede ser registrado debido a que el líquido extracelular se comporta como un conductor (Shaw y Stowe, 1982; Oakley y Schafer, 1992).

El registro del ERG se ha empleado en varios trabajos realizados en otros grupos de animales, para estudiar la relación que existe entre el metabolismo de la glucosa y la electrofisiología de la retina en condiciones *in vitro* e *in vivo*, demostrando que la disponibilidad de glucosa y la función retinal están relacionadas. Por lo tanto, el ERG es una herramienta útil para estudiar el metabolismo de la glucosa en la retina reflejada en la electrofisiología de la misma (ERG) (López y Sannita, 1997; Macaluso et al., 1992; Niemeyer, 1997).

El ERG del acocil *Procambarus clarkii* fue registrado por Naka y Kuwabara (1956). colocando un electrodo en la superficie corneal del ojo. Encontraron que el ERG consiste de dos componentes: H-I y H-II. H-I responde sólo al encendido de la iluminación, mientras que la amplitud de H-II se mantiene durante el estímulo luminoso. Posteriormente (1959). al registrar el ERG colocando microelectrodos en la región donde se encuentran los fotorreceptores, entre el extremo distal de las células retinulares y la lámina basal. encontraron que ambos componentes se originan de diferentes estructuras: H-I se origina en el rabdomo y H-II en las células retinulares (Naka y Kuwabara, 1959) (Fig. 3).

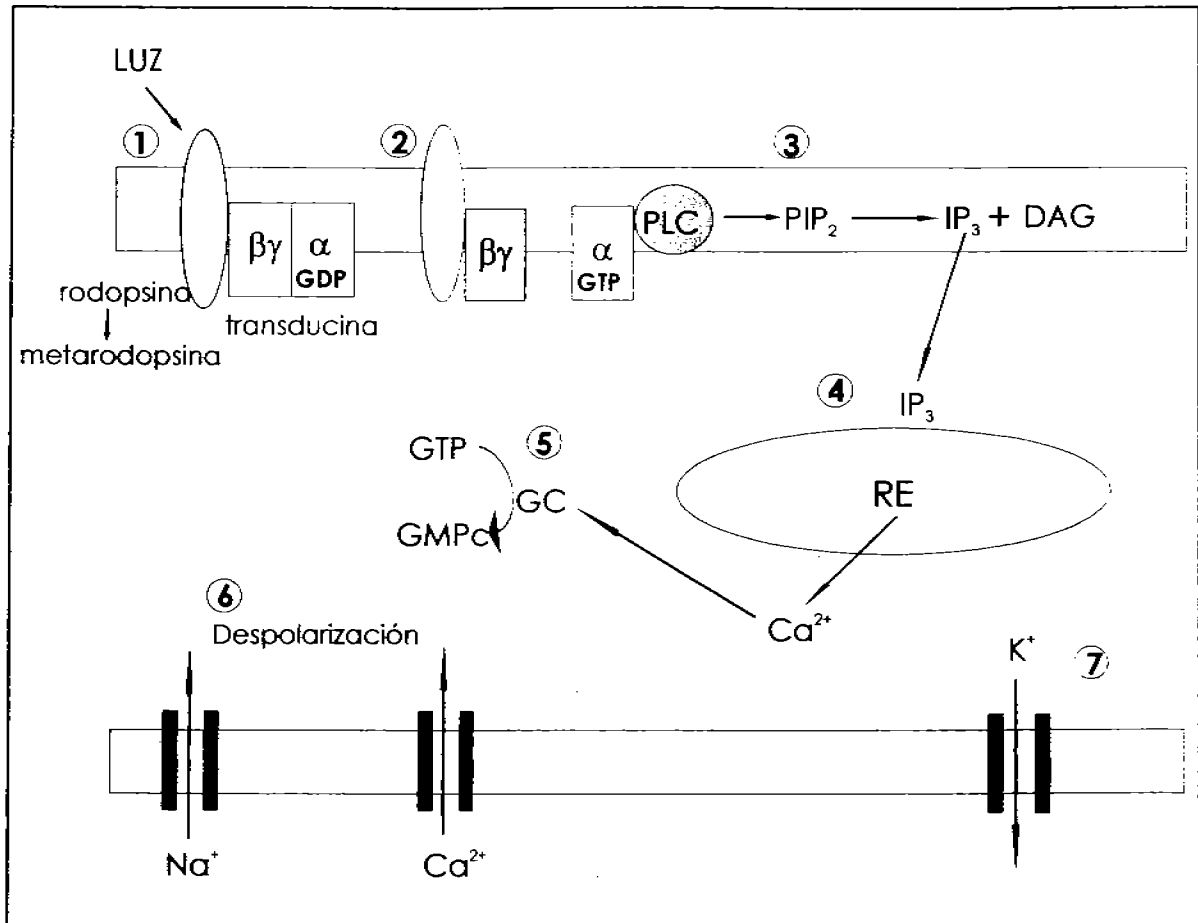


**Figura 3.** Electroretinograma (ERG) registrado en el ojo compuesto del acocil *Procambarus clarkii*, ante un estímulo de luz blanca. Se muestran los dos componentes del ERG: H-I y H-II. H-I se origina en el rabdomo, mientras que H-II en las células retinulares.

#### 2.4.2. Fototransducción en invertebrados.

La fototransducción en invertebrados se ha estudiado en los fotorreceptores de *Limulus* y en general se considera que el proceso de fototransducción, es decir, la conversión del estímulo luminoso en una señal eléctrica, se inicia por la conversión de la rodopsina a metarodopsina II, durante la fotoestimulación de la retina. La metarodopsina II activa a una proteína G o transducina, catalizando el intercambio de GDP por GTP, dicha proteína G a su vez activa a una fosfolipasa C (PLC). La PLC cataliza la hidrólisis del fosfatidil-4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) de la membrana, en dos moléculas mensajeras, el inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG). Se ha propuesto que el IP<sub>3</sub> abre canales de calcio en el retículo endoplásmico, permitiendo la liberación de calcio hacia el citosol (Frixione y Ruiz, 1988; Baumann y Walz, 1989; Pérez-León y Salceda, 1998; Garger et al., 2004). El incremento en la concentración de calcio intracelular activa a la guanilato ciclasa (GC) la cual produce cGMP. La cascada de fototransducción finaliza con la apertura de canales iónicos dependientes de cGMP en la membrana plasmática, lo que conduce a la despolarización del fotorreceptor (Garger et al., 2004). La despolarización de la membrana fotorreceptora por estímulos de luz es conocida como potencial de receptor y constituye la respuesta eléctrica del fotorreceptor a estímulos luminosos. Es generada por una corriente

de entrada de cationes,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , pero principalmente  $\text{Na}^+$  (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Gomez y Nasi, 1996) y modificada por corrientes de salida de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (Fig. 4).



**Figura 4.** Modelo de cascada de excitación en *Limulus*. La cascada es iniciada con la isomerización de rodopsina a metarodopsina II por la luz. La metarodopsina II cataliza el intercambio de GDP por GTP en múltiples proteínas G, de tipo Gq. Gqα-GTP se une y activa a la fosfolipasa C (PLC). Este complejo permite la hidrólisis del fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para producir inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> abre canales de Ca<sup>2+</sup> en el retículo endoplásmico (RE), como consecuencia el Ca<sup>2+</sup> es liberado hacia el citoplasma. La liberación de Ca<sup>2+</sup> activa a la guanilato ciclasa (GC). El incremento en cGMP abre canales iónicos cuya apertura depende de nucleótidos cíclicos en la membrana plasmática, lo que conduce a la despolarización del fotorreceptor. La despolarización de la membrana, que constituye la respuesta eléctrica ante un estímulo luminoso (potencial de receptor) es generada por la entrada de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (principalmente Na<sup>+</sup>) y modificada por la salida de K<sup>+</sup>.

## 2.5. Ritmos biológicos.

Un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo (Kalmus, 1935, citado en Aschoff, 1984). Los ritmos biológicos son ubicuos, se manifiestan tanto a nivel de células, tejidos, órganos, así como en todo el organismo y tienen periodos (valor del intervalo de tiempo que pasa entre dos acontecimientos idénticos) que van desde fracciones de segundo hasta años.

Los ritmos biológicos se han clasificado de acuerdo a su frecuencia y a su periodo. Halberg en 1965 (en Aschoff, 1984) clasificó a los ritmos de acuerdo con su periodo y en relación con los ciclos geofísicos: (1) ciclo de rotación terrestre - *ritmos diarios*, (2) ciclos producidos por la interacción de la Tierra con la luna que generan las mareas - *ritmos mareales*, (3) la rotación de la luna que genera las fases lunares - *ritmos lunares* y (4) el movimiento de translación de la Tierra alrededor del sol - *ritmos estacionales*. Debido a que el periodo de los ritmos en condiciones constantes (luz, temperatura, etc.), es aproximado pero no igual al del ciclo ambiental con el que se sincroniza, Halberg introdujo el prefijo *circa*, por lo que los ritmos anteriormente mencionados se conocen como ritmos circadianos, circamareales, circalunares y circaanuales. Enright (1981) clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación: (1) *ritmos ultradianos*: tienen periodos menores a 19 hrs, por lo que ocurren varias veces al día, (2) *ritmos circadiano*: su periodo es cercano a las 24 hrs y (3) *ritmos infradianos*: su periodo es mayor a 29 hrs.

### 2.5.1. Ritmos circadianos y relojes biológicos.

Los ritmos circadianos, como son las fluctuaciones en las actividades conductuales y fisiológicas que ocurren con un periodo cercano a las 24 hrs, son los más estudiados y su valor de periodo les permite sincronizarse a los ciclos ambientales que posean un valor de periodo de 24 hrs, como son los ciclos de luz/oscuridad. Estos ritmos no son simplemente una reacción a las fluctuaciones ambientales, sino que son generados por un mecanismo endógeno llamado reloj biológico. El reloj biológico es un sistema que mide el tiempo y genera señales de tiempo periódicas que controlan una variedad de funciones corporales, lo que permite que los ritmos persistan en ausencia de señales ambientales (luz, temperatura,

alimentación, etc.). Una de las propiedades del reloj es la capacidad de sincronizarse con los ciclos diarios ambientales, es decir, que el reloj se ajusta al tiempo local con respecto a los ciclos ambientales, esto permite que los organismos se adapten a estos ciclos diarios. Otra de las propiedades del reloj es la compensación de la temperatura, es decir, la habilidad del reloj para correr a la misma velocidad en cierto intervalo de temperatura (Aréchiga et al., 1993; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997; Hardin, 2000).

Los relojes biológicos, que permiten optimizar el acoplamiento del organismo al ambiente, poseen tres componentes: (1) vía de entrada (sincronizadora) que transmite las señales ambientales a un segundo elemento conocido como (2) marcapaso, el cual opera en ausencia de las señales ambientales, genera las oscilaciones y activa a las (3) vías eefectoras o de salida que expresan la ritmicidad en un tiempo específico del ciclo circadiano (Hardin, 2000).

La organización del reloj biológico, el cual se encarga de la ritmicidad circadiana parece estar distribuida en diferentes osciladores que son capaces de generar cada uno ritmicidad endógena y que están en fase con el efecto sincronizador del ambiente. Se ha propuesto y varios trabajos fundamentan esta propuesta, que existen interacciones entre los diferentes osciladores en un organismo lo que da lugar a un control multifactorial de la ritmicidad circadiana (Aréchiga, 1977a; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002)

### **2.5.2. Ritmos circadianos en los acociles.**

Las diferentes especies de acociles, incluyendo la especie *Procambarus clarkii* son nocturnas. Estas especies y en general los crustáceos, manifiestan una gran variedad de ritmos circadianos conductuales y fisiológicos, modulados por factores ambientales. Ejemplos de estos ritmos son: la actividad locomotora, la migración de los pigmentos de blindaje, la amplitud del electroretinograma (ERG), la frecuencia cardíaca, la secreción de neurohormonas desde el complejo órgano X – glándula sinusal, y diversas funciones metabólicas y endocrinas (Aréchiga et al., 1993; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

Como ya se mencionó, estos ritmos están controlados por un reloj biológico, el cual, es el resultado de la integración de un grupo de osciladores circadianos independientes, que interactúan entre sí, cada uno de ellos expresa una ritmicidad circadiana. La existencia de

tales osciladores circadianos independientes se ha demostrado en trabajos experimentales, mostrando que ellos son capaces de mantener la ritmicidad *in vitro*. Estos osciladores son, el tallo óptico, en donde se encuentra el órgano X – glándula sinusal (principal órgano endocrino de los crustáceos) y la retina. El tallo óptico aislado es capaz de mantener un ritmo circadiano de actividad neurosecretora; mientras que la retina aislada mantiene su ritmo circadiano de sensibilidad a la luz. Un candidato a oscilador circadiano es el ganglio supraesofágico, sin embargo, no se han reportado experimentos *in vitro* que demuestren que este ganglio tenga la función de oscilador; incluso después de lesionar este ganglio, algunos ritmos circadianos persisten (Aréchiga et al., 1993; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002). Existen varios trabajos experimentales que sugieren que tanto el sistema nervioso central como el neuroendocrino controlan la generación y coordinación de muchos ritmos circadianos en los acociles (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

### **2.5.3. Ritmo de amplitud ERG.**

El ritmo circadiano de sensibilidad visual se ha documentado tanto a nivel de fotorreceptores en la retina, así como en las interneuronas visuales (fibras de acción sostenida) por Aréchiga y Wiersma (1969), en acociles de la especie *Procambarus clarkii*. En este ritmo, la sensibilidad de los fotorreceptores retinales es mucho más grande durante la noche que durante el día (Aréchiga y Wiersma, 1969), de manera que el ritmo de amplitud del ERG, es decir, el ritmo de sensibilidad visual, muestra una clara relación con las variaciones día-noche. Esta ritmicidad persiste bajo condiciones de iluminación y oscuridad constantes (Aréchiga et al., 1993), indicando que este ritmo está controlado por un reloj biológico endógeno.

Se han identificado dos componentes en la expresión de este ritmo en el acocil:

1. Un ritmo en la ganancia de los fotorreceptores de la retina, es decir, cambios rítmicos circadianos en la conductancia por fotón absorbido; y
2. Un ritmo circadiano en la capacidad de la retina para recibir el flujo de fotones, que depende de la apertura de la pseudopupila, la cual está determinada por la posición relativa de dos grupos de pigmentos intracelulares, los pigmentos de blindaje, el PP y el PD (Aréchiga et al., 1993).



### 2.5.3.1. Ritmo circadiano en la ganancia de los fotorreceptores.

Como ya se mencionó, uno de los componentes en la expresión del ritmo circadiano de sensibilidad visual en los fotorreceptores del acocil, es un ritmo en la ganancia de los mismos. Este ritmo está controlado por diversos factores que se mencionarán a continuación.

Uno de los factores que determinan los cambios en la sensibilidad visual son los cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , un incremento en la concentración intracelular de este catión disminuye la sensibilidad visual (Fuentes-Pardo et al., 1985). Miller y Glantz (2000) registraron el potencial de membrana de los fotorreceptores del acocil *Pacifastacus leniusculus* durante la adaptación continua a la luz y encontraron que el potencial de membrana se despolariza. La despolarización de la membrana se debe en parte, a un incremento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Este catión, a su vez, reduce la ganancia de los fotorreceptores, es decir, la conductancia por fotón absorbido y también contribuye a una disminución en la conductancia a  $K^+$ . Además hay una reducción del gradiente de  $K^+$  debido a un ligero incremento en la concentración de  $K^+$  extracelular. Todo esto conduce a una reducción de la respuesta visual. Como ya se mencionó, el potencial de receptor (respuesta eléctrica obtenida por fotoestimulación) es generado por una corriente de entrada de cationes,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , pero principalmente  $Na^+$  (Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991) y modificado por corrientes de salida de  $K^+$  dependientes de voltaje. En condiciones de adaptación continua a la luz, la conductancia al  $K^+$  disminuye, por lo que no se permite que este ión salga de la célula, por lo que la membrana se despolariza, es decir, se hace positiva con respecto al exterior, y como consecuencia la célula se hace menos excitable.

Se ha propuesto que uno de los mecanismos moleculares en el control de la fotosensibilidad rítmica circadiana de los fotorreceptores retinales del acocil *Procambarus clarkii* es la translocación de las subunidades de las proteínas G del tipo Gq, las cuales desempeñan un papel central en la fototransducción. Las proteínas G o transducinas se localizan en el interior de la membrana plasmática y están presentes en forma heterotrimérica. Cuando la rodopsina (pigmento visual) absorbe un fotón, su cromóforo 11-cis-retinal se convierte en todo-trans-retinal, así mismo la opsina se convierte en

metarodopsina, la cual activa a una proteína G. Como consecuencia, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G, la cual posee un sitio de unión a GTP y actividad GTPasa, reemplaza GDP por GTP lo que conduce a la disociación de la proteína G en:  $\alpha$ -GTP y el dímero  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  unida a GTP activa a la fosfolipasa C, la cual continua con el proceso de fototransducción. Cuando el GTP unido a la subunidad  $\alpha$ , es hidrolizado a GDP, la subunidad  $\alpha$  se vuelve inactiva y se une nuevamente al dímero  $\beta\gamma$ . Terakita y colaboradores (1996) encontraron que la subunidad  $Gq\alpha$  se localiza en las membranas de los rbdomos en condiciones de oscuridad, mientras que bajo iluminación la mitad de las moléculas de la subunidad  $Gq\alpha$  son transferidas como una forma soluble hacia el citoplasma. Posteriormente Terakita y colaboradores (1998) encontraron que la cantidad de la subunidad  $G\beta$ , la cual se combina con  $Gq\alpha$ , desciende en las membranas rbdoméricas y al mismo tiempo incrementa en el citoplasma durante la luminosa. El perfil de translocación es similar al reportado para la  $Gq\alpha$ , es decir, se transloca desde las membranas rbdoméricas hacia el citosol en la luz y regresa a las membranas en la oscuridad. Ya que ambas subunidades son necesarias para que las proteínas G sean activadas por la metarodopsina en el rbdomo, la translocación de la subunidad  $G\beta$  modulada por luz controla la cantidad de  $Gq\alpha$  que pueda ser activada por la rodopsina durante la fotoestimulación, siendo este un mecanismo molecular para regular la fototransducción y la fotosensibilidad de las células fotorreceptoras.

Otro factor que controla los cambios en la conductancia de los fotorreceptores es de tipo neurohormonal. La 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT), considerada una neurohormona y neurotransmisor en los crustáceos, ha sido encontrada en varios ganglios del sistema nervioso central y en los tallos ópticos de los crustáceos. Su contenido en el tallo óptico, en cerebro y en hemolinfa sigue un patrón rítmico circadiano. El contenido de 5-HT en el tallo óptico es mucho más alto durante la noche (Fingerman y Fingerman, 1977; Castañón-Cervantes et al., 1999). Se ha comprobado el efecto de esta amina sobre la sensibilidad de los fotorreceptores retinales del acocil *Procambarus clarkii*, después de la inyección a la hemolinfa de los acociles o después de la aplicación tópica a los tallos ópticos y retinas aisladas. El efecto se midió como un incremento en la amplitud del potencial de receptor, es decir, un incremento en la conductancia del fotorreceptor ante

estímulos de luz. Se han observado fibras inmunoreactivas a serotonina cerca de los axones de los fotorreceptores. Sin embargo, debido a que no se han demostrado sinapsis a este nivel, una posibilidad es que la serotonina actúe como una neurohormona liberada localmente (Aréchiga et al., 1990).

Un fenómeno que no está directamente relacionado con los cambios rítmicos en la conductancia de los fotorreceptores pero que contribuye a los cambios en la sensibilidad visual, es la plasticidad de los rabdomeros. Esta se manifiesta en la habilidad para aumentar su volumen en la oscuridad y reducirlo en la luz por la resíntesis y destrucción de la membrana (Eguchi, 1965; Shaw y Stowe, 1982; Nässel y Waterman, 1979). Así, la luz y la oscuridad afectan la estructura de los fotorreceptores, ya que la membrana fototransductiva (rabdomeros) está siendo continuamente renovada, por lo que existe una relación de los efectos circadianos de los ciclos luz/oscuridad sobre el ciclo diario de resíntesis de la membrana (Shaw y Stowe, 1982). Matsushita y colaboradores (1999) descubrieron en el cangrejo *Hemigrapsus sanguineus* que el número de vesículas que contienen opsina incrementa en los somas de las células retinulares al acercarse la fase de oscuridad.

#### **2.5.3.2. Ritmo circadiano en la posición de los pigmentos de blindaje: PP y PD.**

Como ya se mencionó, el PP y PD están retraídos en la oscuridad y dispersos bajo iluminación. En la oscuridad el PP se encuentra retraído hacia los axones de las células retinulares, por debajo de la lámina basal, permitiendo que el rabdomo quede expuesto a la luz. Bajo iluminación el PP se dispersa, blindando el paso de la luz. El PD, localizado dentro de las células de pigmento distal se retrae en la oscuridad hacia la córnea y se dispersa bajo iluminación. Como consecuencia, el flujo de fotones que llega al rabdomo, se incrementa en la oscuridad y se reduce bajo iluminación. De esta manera, la posición de estos pigmentos determina el tamaño del área de reflexión de la luz en la córnea, conocida como pseudopupila, esto es, el área de la pseudopupila depende de cuanta luz pasa por el sistema dióptrico e incide sobre el pigmento reflejante, el cual queda cubierto por el pigmento proximal durante la adaptación a la luz y expuesto directamente a la luz cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad. Cada grupo de pigmentos, proximal y distal, contribuye a modular la sensibilidad a la luz del ojo compuesto, cerca de

una unidad logarítmica, en el acocil *Procambarus clarkii* (Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982).

En animales intactos mantenidos bajo condiciones de oscuridad o iluminación continua, ambos grupos de pigmentos manifiestan un ritmo circadiano de posición, retrayéndose en la noche subjetiva y dispersándose en el día subjetivo. La ritmicidad endógena es más conspicua en el pigmento proximal en oscuridad constante y en el pigmento distal bajo iluminación continua (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002). Los movimientos rítmicos de estos pigmentos producen una variación circadiana de la sensibilidad de la retina medida como cambios en la amplitud del ERG (Aréchiga y Fuentes, 1970). En este ritmo, la amplitud del ERG es más grande cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad, es decir retraídos, y es más pequeña durante la adaptación a la luz, cuando los pigmentos están dispersos (Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982). En este ritmo circadiano de la migración de los gránulos de pigmento, el pigmento proximal empieza a migrar antes de que los gránulos de pigmento distal lo hagan, es decir, el curso temporal de la migración es considerablemente más rápida para el pigmento proximal que para el distal (Aréchiga, 1977; Aréchiga et al., 1993).

### **2.5.3.2.1. Control fisiológico del movimiento de los pigmentos de blindaje.**

#### **2.5.3.2.1.1. Pigmento proximal (PP).**

El pigmento proximal migra como una respuesta directa de los fotorreceptores retinales a la luz y a la oscuridad (Olivo y Larsen, 1978; Frixione et al., 1979). Existen experimentos que demuestran que las migraciones de los gránulos de PP dependientes de la luz en el acocil *Procambarus bouvieri* a lo largo de los fotorreceptores, persisten en las retinas y tallos ópticos aislados (Aréchiga et al., 1993); la magnitud y la cinética del movimiento en cada dirección son cuantitativamente equivalentes a las observadas en el órgano *in situ* (Frixione et al., 1979).

La migración del PP en la retina del acocil *Procambarus bouvieri* durante la adaptación a la luz y a la oscuridad, en tallos ópticos aislados, ocurre en dos pasos distintos. En cada paso los gránulos se desplazan la mitad de la distancia total. En la primera fase los gránulos se retraen o dispersan rápidamente, mientras que la segunda fase es una continuación más

lenta del movimiento (Frixione y Pérez-Olvera, 1991). Cuando la primera etapa de la dispersión se completa el pigmento se expande 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 probablemente proporciona un factor de seguridad contra la sobre-exposición del fotorreceptor y coopera para evitar la saturación del pigmento visual en el tiempo cuando el pigmento distal apenas ha comenzado a moverse a la posición de adaptación a la luz (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1977). La magnitud del desarrollo de la segunda etapa de dispersión del pigmento puede cambiar la sensibilidad de entre 0.5 a 0.7 unidades logarítmicas (Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982), esto puede representar la adaptación real a una intensidad de iluminación particular, una vez que el umbral de la respuesta todo o nada ha sido excedido (Frixione y Pérez-Olvera, 1991).

Mediante microscopía electrónica pueden observarse dos patrones separados de organización citoplásmica correspondientes a las áreas celulares donde ocurren las dos fases tanto de la adaptación a la luz como a la oscuridad. 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 condiciones de oscuridad, se puede inhibir la retracción de los gránulos de pigmento o inducir la dispersión a la posición de adaptación a la luz, bajo condiciones que incrementan los niveles intracelulares de  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, la dispersión de los gránulos de pigmento proximal está muy relacionada con los incrementos en los niveles intracelulares tanto de  $\text{Ca}^{2+}$  como de  $\text{Na}^+$ , que ocurren como respuesta a la fotoestimulación (Frixione y Aréchiga, 1981). Como ya se mencionó, durante la fototransducción, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares tiene como consecuencia la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula fotorreceptora, la entrada de este ión también puede inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico liso (Frixione y Ruiz, 1988). Se ha propuesto que el incremento resultante en la cantidad  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma permite la dispersión de los gránulos de pigmento asociados a los microtúbulos dentro de las células retinulares (Frixione y Aréchiga, 1981; Frixione y Tsutsumi, 1982; Frixione y Pérez-Olvera, 1991).

Una propuesta similar se ha presentado para las células retinulares de *Drosophila* (Lo y Pak 1981).

Dos principales características diferencian la dinámica de la respuesta a la luz del movimiento opuesto en la oscuridad: 1) mientras la agregación de pigmento requiere permanencia continua en la oscuridad gran parte de la dispersión o la dispersión total puede alcanzarse por iluminación breve (Olivo y Larsen, 1978; Frixione y Pérez-Olvera, 1991)

Como ya se mencionó, se han identificado cerca de los axones de los fotorreceptores, en la lámina ganglionaris, axones inmunopositivos a 5-HT. La 5-HT además de incrementar la conductancia de los fotorreceptores, promueve la retracción del PP. Su efecto es más pronunciado sobre el movimiento a lo largo de la parte distal de las células.(Frixione y Hernández, 1989; Aréchiga et al., 1990).

#### **2.5.3.2.1.2. Pigmento distal (PD).**

Las células del pigmento distal son sensibles a neurohormonas liberadas como respuesta a la luz y a la oscuridad, es decir, son las efectoras de un reflejo neuroendocrino. Bajo iluminación se libera la hormona dispersora del pigmento (PDH) (Aréchiga, 1977; Aréchiga et al., 1985) y en la oscuridad se libera la hormona concentradora de pigmento rojo (RPCH) (Garfías et al., 1995). Ambas hormonas son liberadas desde la glándula sinusal y actúan principalmente sobre cromatóforos integumentarios, pero también sobre las células del pigmento distal, mediando el movimiento antagónico de los gránulos de pigmento distal en la retina de los crustáceos decápodos.

La dispersión del pigmento distal se lleva a cabo cuando la luz actúa sobre fotorreceptores extrarretinales (Aréchiga et al., 1985) localizados en el cerebro anterior (Sandeman et al., 1990), conduciendo a la liberación de un octadecapéptido, la PDH, desde la glándula sinusal hacia la hemolinfa. Esta hormona promueve la migración longitudinal de los gránulos de pigmento que se encuentran dentro de las células del pigmento distal (Garfías et al., 1995). La RPCH, un octapéptido que promueve la retracción radial de los gránulos de pigmento dentro de los eritróforos tegumentarios (Rao, 1985), también actúa sobre las células del pigmento distal, promoviendo la retracción del PD (Garfías et al., 1995). La cantidad de la PDH así como de la RPCH en el tallo óptico del acocil sigue un

patrón rítmico circadiano. Los niveles de PDH son mayores durante el día que en la noche (Aréchiga y Mena, 1975); mientras que la cantidad de RPCH es mayor en la noche que durante el día. Los niveles altos de RPCH persisten durante casi toda la noche, incrementándose después del encendido de la luz (Rodríguez-Sosa et al., 1994). Tanto la PDH como la RPCH, además de encontrarse y ser liberadas desde la glándula sinusal, se han localizado en axones en la lámina ganglionaris. Estos axones inmunopositivos a RPCH se encuentran en una región cercana a los axones de los fotorreceptores y en el extremo proximal de las células de pigmento distal (Mangerich et al., 1986; Preciado et al., 1994). Los axones inmunopositivos a péptidos parecidos a PDH se localizan en la región donde las neuronas inmunopositivas a RPCH se ramifican (Mangerich et al., 1986; Mangerich et al., 1987).

La actividad de la RPCH ha sido la más estudiada. Al investigar el papel de la RPCH sobre el control de sensibilidad retinal del acocil, se encontró que la inyección de esta hormona en la hemolinfa de acociles intactos *Procambarus clarkii* fue capaz de aumentar la amplitud del ERG en animales adaptados a la oscuridad y a la luz (Garfias et al., 1995), lo mismo se encontró para el acocil *Orconectes limosus* (Gaus y Stieve, 1992). Después de la adaptación a la luz, la respuesta de la retina (amplitud del ERG) de *P. clarkii* a la RPCH fue mayor que después de la adaptación a la oscuridad. Debido a que la RPCH aumenta la amplitud del ERG aún cuando ambos pigmentos retinales están totalmente retraídos, la RPCH probablemente tenga una doble acción. Un efecto directo sobre los fotorreceptores, en algún paso de la cascada de fototransducción y un efecto indirecto sobre el pigmento retinal distal (Garfias et al., 1995).

Las rutas de transducción de las señales, así como las cascadas enzimáticas intracelulares activadas por la PDH y la RPCH son poco conocidas en los crustáceos. Se sabe que la RPCH promueve la agregación del pigmento retinal distal incrementando la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, actuando a través de un doble mecanismo: (1) promoviendo la entrada de  $Ca^{2+}$  y (2) la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular (Porrás et al., 2001). Se propone una posible interacción de la ruta mediada por calcio para la acción de la RPCH con otros mensajeros intracelulares, en particular, los nucleótidos cíclicos, los cuales se han visto que están involucrados en los movimientos de los eritróforos (Kotz y McNiven, 1994;

Nery y Castrucci, 1997; Porras et al., 2001). Estudios de la acción de hormona concentradora de pigmento sobre los eritróforos del camarón *Macrobrachium potiana*, sugieren que esta hormona induce la agregación de los gránulos de pigmento a través de una ruta que depende de  $Ca^{2+}$  y con la posterior activación de una fosfatasa, posiblemente la fosfatasa serina/treonina I. Posiblemente, la activación de la fosfatasa conduzca a la fosforilación de las moléculas (cinesinas) responsables del movimiento de gránulos de pigmento (Nery et al., 1997). También se ha observado que la agregación de los gránulos de pigmento regulados por  $Ca^{2+}$ , dependen de ATP ( McNiven y Ward, 1988). 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).

#### **2.5.4. Origen de la señal de tiempo circadiano para la génesis del ritmo de amplitud ERG.**

El origen de la señal de tiempo circadiano para la generación del ritmo de amplitud ERG se ha debatido por mucho tiempo. Se ha sugerido que el ritmo de amplitud ERG está controlado por mecanismos neuroendocrinos y neuronales que dependen del cerebro y de las estructuras neurosecretoras del lóbulo óptico, en particular el órgano X – glándula sinusal (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). Page y Larimer (1975) propusieron un oscilador circadiano central localizado en el ganglio supraesofágico, el cual manda axones eferentes hacia la retina. Recientemente se ha sugerido que el oscilador circadiano puede estar localizado en un grupo de células neurosecretoras del ganglio supraesofágico (Hernández y Fuentes-Pardo, 2001). Sin embargo, en trabajos anteriores Sánchez y Fuentes-Pardo (1977), reportan que el ritmo de amplitud del ERG persiste en el tallo óptico aislado mantenido en oscuridad constante, sugiriendo un origen local de la ritmicidad, aunque ellos no detectaron variaciones circadianas en la migración del PP y PD. Barrera-Mera y colaboradores (1980), propusieron que el protocerebro modula la ritmicidad circadiana de la amplitud del ERG y el movimiento de los pigmentos proximal y distal, a través del control de la liberación de neurohormonas desde la glándula sinusal.

Como se señaló anteriormente, una modulación humoral de la sensibilidad retinal ha sido demostrada en el acocil. Se ha propuesto al tallo óptico como un oscilador circadiano,



en él se encuentra el órgano X - glándula sinusal el cual realiza la síntesis y liberación de varias neurohormonas que pueden generar la señal de tiempo circadiano para la expresión del ritmo de amplitud del ERG, participando en el sistema multioscilar que genera este ritmo (Aréchiga et al., 1993). La retina se ha propuesto como un posible generador de la ritmicidad circadiana, ya que su actividad eléctrica (reflejada en su sensibilidad a la luz) en condiciones *in vitro* varía a lo largo del ciclo de 24 hrs, incluyendo la posición del PP (Noguerón y Aréchiga, 1986), recientemente se ha demostrado también la persistencia de dicha ritmicidad en la retina aislada mantenida en cultivo (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998). En las preparaciones de retina aislada solo los ritmos inherentes a los fotorreceptores (células retinulares): la ganancia y la posición del pigmento proximal, se mantienen. Sin embargo, existen trabajos donde no se observa la migración del pigmento proximal en las retinas y tallos ópticos aislados (Sanchez y Fuentes-Pardo, 1977; Moreno-Saénz et al., 1987). La falta de ritmicidad en el pigmento distal, en la retina aislada, se debe al hecho de que la migración de estos gránulos de pigmento está bajo el control de dos neurohormonas (RPCH y PDH) liberadas por la glándula sinusal (Aréchiga et al., 1993).

## **2.6. Homeostasis de glucosa en crustáceos.**

Usualmente en las células de los diferentes crustáceos existe relativamente poca glucosa libre, ya que la mayoría se encuentra fosforilada. Conforme la glucosa entra al citoplasma se convierte en glucosa-6-fosfato (G-6-P) por la hexocinasa. La G-6-P puede seguir tres rutas: 1) glucogenogénesis, 2) glucólisis o 3) la ruta de las pentosas. La activación de cada una de estas rutas, depende de los requerimientos energéticos de los animales (o tejidos). Cuando se requiere ATP, la glucólisis se activa; cuando G-6-P y ATP son abundantes, se forma glucógeno, mientras que en la ruta de las pentosas se generan NADPH y ribosa-5-fosfato, esta última involucrada en la síntesis de nucleótidos. Tanto la síntesis, como la degradación de glucógeno se han observado en los músculos abdominales, integumentos, hepatopáncreas, gónadas y branquias de varias especies de crustáceos. En el músculo de los crustáceos se ha determinado que la glucólisis es la principal ruta catabólica de la glucosa. La ruta de las pentosas opera en algunos tejidos de los crustáceos, particularmente en el hepatopáncreas y en las branquias, en ambos tejidos, esta ruta y la

glucólisis operan al mismo tiempo en los animales en estado de intermuda; en tanto que durante el estado de premuda, la glucólisis prevalece por encima de la ruta de las pentosas (Santos y Keller, 1993). El metabolismo de la glucosa está finamente ajustado a cambios fisiológicos como la reproducción o el crecimiento (García et al., 1993).

Para los crustáceos, no existen ejemplos de receptores de glucosa, únicamente se conocen transportadores que también se encuentran en los vertebrados. Dos son los sistemas de transporte de glucosa en invertebrados: 1) el sistema de transporte acoplado al gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ , que ha sido estudiado en el hepatopáncreas de los acociles (Verri et al., 2001) y 2) acoplado al gradiente electroquímico del  $\text{K}^+$ , propuesto para las células del órgano X encargadas de sintetizar la hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH) (Glowik et al., 1997).

### **2.6.1. Hormona hiperglucemiante de los crustáceos (CHH).**

La CHH está involucrada en la homeostasis animal y las respuestas a estrés, a través de la regulación del metabolismo de la glucosa, regulando así los niveles de este carbohidrato en la hemolinfa de acuerdo con las necesidades metabólicas (Soyez et al., 1994). Por ejemplo, durante la premuda la secreción de CHH en *Astacus leptodactylus* se reduce (Kallen, 1985, citado en Santos y Keller, 1993a), en tanto que en condiciones de estrés, tales como, cambios en la temperatura y anoxia se incrementa (Santos y Keller, 1993b) y como consecuencia se produce hiperglucemia.

Como se señaló anteriormente, la CHH es sintetizada y secretada por el complejo órgano X – glándula sinusal. Cerca del 40% de las terminales axónicas de glándula sinusal poseen gránulos neurosecretores que contienen CHH, la cual es liberada a la hemolinfa por exocitosis (Gorgells-Kallen y Van Herp, 1981). La CHH muestra una alta afinidad a proteínas de alto peso molecular en la hemolinfa, posiblemente a subunidades de hemocianina, las cuales podrían funcionar como transportadores (Kallen et al., 1990). En *Procambarus clarkii*, así como en otras especies de crustáceos (*Procambarus bouvieri*, *Homarus americanus*, *Orconectes limosus* y *Astacus leptodactylus*) existen dos isoformas de la CHH, CHH-I y CHH-II. Estas isoformas difieren por la configuración de un aminoácido, la fenilalanina, situada en la tercera posición de la cadena peptídica. La CHH-I

posee una L-fenilalanina, en tanto que la CHH-II posee una D-fenilalanina; ambas isoformas se encuentran en una proporción 3:1. La isomerización de la L-fenilalanina a D-fenilalanina, es un evento post-traduccion, antes de que los gránulos dejen los somas del órgano X para migrar hacia la glándula sinusal (Soyez et al., 2000). En el acocil *O. limosus*, se ha logrado determinar que esta hormona es sintetizada por dos diferentes tipos celulares, como dos isómeros (CHH-I y CHH-II) (Ollivaux y Soyez, 2000). Tanto la CHH-I como la CHH-II presentan actividad hiperglucémica, sin embargo, existen diferencias en cuanto a su actividad biológica cuando se considera la cinética de su efecto hiperglucémico. La CHH-II posee un mayor efecto hiperglucémico junto con un retraso y extensión del mismo al compararse con la CHH-I (Soyez, et al., 1994; Yasuda et al., 1994).

La CHH aparentemente actúa sobre varios tejidos pero el hepatopáncreas y la musculatura, los cuales poseen depósitos de glucógeno, parecen ser los principales tejidos blanco (Vogt, 2002). Esta hormona promueve la obtención de glucosa desde depósitos de glucógeno, para su posterior liberación a la hemolinfa y utilización por otros tejidos. Actúa sobre la actividad de las enzimas encargadas de la síntesis y degradación de glucógeno. Primero, la CHH al unirse a receptores de membrana, activa a la adenilato ciclasa y a la guanilato ciclasa en el músculo abdominal y en el hepatopáncreas, resultando en un aumento de la concentración intracelular de cAMP y cGMP (Sedlmeier, 1982; Sedlmeier, 1985; Kummer y Keller, 1993). Como consecuencia se activan proteínas cinasas que dependen de éstos nucleótidos cíclicos, lo que conduce a la fosforilación de la glucógeno sintetasa (inactivándola) y de la cinasa fosforilasa que a su vez fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa (Sedlmeier, 1985), liberándose así, glucosa hacia la hemolinfa (Sedlmeier, 1982, Sedlmeier, 1985). Cuando los niveles de glucosa se incrementan, por ejemplo, como resultado de la alimentación, los niveles de CHH en la hemolinfa de *O. limosus* disminuyen (Santos y Keller, 1993b); este descenso de CHH puede conducir a la activación de glucógeno sintasa, resultando en un incremento del contenido de glucógeno en diferentes tejidos (Santos y Keller, 1993a).

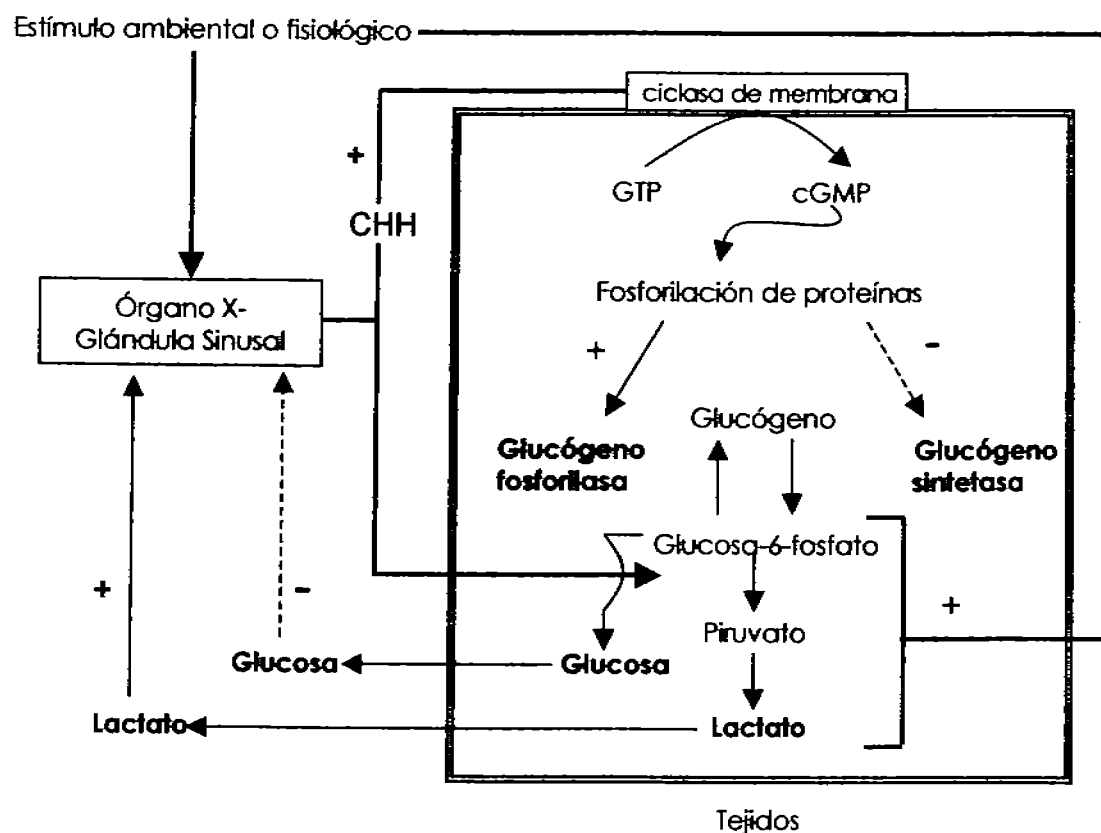
Existen interacciones de retroalimentación entre la glucosa, el lactato y la CHH. La producción de lactato como resultado del catabolismo de la glucosa promueve la liberación de la CHH por un mecanismo de retroalimentación positiva, la hormona puede entonces

estimular la glucogenólisis, incrementándose la disponibilidad de glucosa. Si más glucosa es liberada de la que es metabolizada, el exceso de glucosa puede entonces inhibir la liberación de la CHH desde la glándula sinusal por un proceso de retroalimentación negativa (Santos y Keller, 1993b) (Fig. 5). En el cangrejo *Cancer borealis*, la D-glucosa activa una corriente de  $K^+$  en las células que se encargan de sintetizar y liberar CHH en el complejo órgano X – glándula sinusal, resultando en una hiperpolarización de las células que conduce a la inhibición de la liberación de CHH, inhibiendo así la movilización de glucosa desde depósitos de glucógeno. Cuando los niveles de glucosa en la hemolinfa son bajos las células que poseen CHH se despolarizan, induciendo la liberación de la hormona. La D-glucosa actúa exclusivamente sobre las células que contienen CHH, de manera que regula la liberación de CHH y por lo tanto las concentraciones de glucosa en la hemolinfa a través de un mecanismo de retroalimentación negativo (Glowik et al., 1997). En vertebrados, la glucosa provoca respuestas hiperpolarizantes en varias regiones del cerebro, la mayoría de estas respuestas están mediadas por canales de  $K^+$  sensibles a ATP (Ashcroft y Ashcroft, 1990).

Las fluctuaciones en la liberación de CHH debido a factores ambientales y endógenos esta mediada por neurotransmisores o neuromodulares liberados desde neuronas reguladoras. La Leucina- y la Metionina-encefalina inhiben la liberación de CHH desde la glándula sinusal en *Orconectes limosus*, por un proceso mediado por receptor. Ambas encefalinas inhiben la liberación de ambas isoformas de CHH vía contactos sinápticos, localizados dentro del neuropilo de la médula terminal y no en la glándula sinusal (Ollivaux et al., 2002). En el acocil *P. clarkii*, tanto la dopamina (DA) y la leucina-encefalina (L-Enk) producen hipoglicemia; en este organismo una neurona dopaminérgica precede una neurona encefalinérgica, la cual inhibe la secreción de CHH desde las células neuroendocrinas (Sarojini et al., 1995). En el acocil *P. clarkii*, se encontró que la 5-HT ejerce un efecto hiperglucémico aumentando la liberación de CHH desde los tallos ópticos (Escamilla-Chimal, 2002), este efecto está mediado por los receptores parecidos a 5-HT<sub>1</sub>- y 5-HT<sub>2</sub> (Lee et al., 2000, Lee et al., 2001)

La CHH además de localizarse en el complejo órgano X - glándula sinusal, también se encuentra en otros lugares del sistema nervioso de los crustáceos. Chang y colaboradores

(1999) identificaron otras fuentes de péptidos parecidos a CHH en el sistema nervioso de las langostas: las células de las segundas raíces del ganglio torácico, así como, un par de células en el ganglio subesofágico. La despolarización del ganglio subesofágico, con soluciones que contienen grandes cantidades de  $K^+$  provoca la liberación de péptidos parecidos a CHH, esta liberación depende de calcio (Chang et al., 1999). Escamilla-Chimal y colaboradores (2001), encontraron inmunorreactividad a CHH en la retina de *Procambarus clarkii*, específicamente en las células tapetales o células del pigmento reflejante, además la secreción de CHH en la retina *in vitro* es inducida por 5-HT (Escamilla-Chimal, 2002).



**Figura 5.** Regulación de los niveles de CHH por glucosa y lactato y sus efectos fisiológicos. (+) estimulación, (-) inhibición. Las rutas metabólicas han sido simplificadas (Tomado de Santos y Keller, 1993).

### 2.6.2. Ritmicidad circadiana del contenido de CHH y glucosa en hemolinfa.

Los niveles de CHH y glucosa en hemolinfa fluctúan siguiendo un patrón rítmico circadiano, siendo menores durante el periodo luminoso y mayores durante el periodo de oscuridad cuando los acociles son activos. Los niveles basales de la hormona y el carbohidrato durante el día, así como la amplitud y duración del pico nocturno, es específico para cada una de las especies de crustáceos (Kallen et al., 1990). Por ejemplo, en el acocil *Orconectes limosus* los niveles de CHH en hemolinfa permanecen constantes durante el periodo luminoso y en las tres primeras horas del periodo de oscuridad se incrementan el triple. En cuanto a la glucosa, sus niveles son bajos durante el día y se incrementan de dos a cuatro veces durante las 3 o 4 hrs después del inicio del periodo de oscuridad, mostrando dos picos sucesivos durante este periodo y declinando hasta alcanzar los niveles observados durante el periodo de luz (Kallen et al., 1990). En el acocil *Astacus leptodactylus*, se logró determinar que tanto la síntesis, como el transporte y la liberación de CHH a la hemolinfa presentan una ritmicidad diaria lo que resulta en un ritmo de 24 hrs del contenido de glucosa en la hemolinfa. La actividad sintética de las células productoras de CHH comienza a incrementar 2 hrs antes del inicio del periodo de oscuridad, resultando en una transferencia pronunciada de gránulos de CHH desde los somas del órgano X hacia la glándula sinusal. Después del inicio del periodo de oscuridad, la glándula sinusal presenta gran actividad exocítica de gránulos que contienen CHH hacia la hemolinfa, lo que resulta en hiperglucemia (Gorgells-Kallen y Voorter, 1985). En cuanto a los niveles de glucosa en la hemolinfa del *A. leptodactylus*, estos se duplican 4 horas después del inicio del periodo de oscuridad y permanecen elevados durante la mayor parte de este periodo (Kallen et al., 1988). Algunos gránulos de CHH permanecen almacenados en la glándula sinusal y probablemente se mantienen disponibles para utilizarlos en situaciones de emergencia o estrés (Vogt, 2002).

El ritmo circadiano de glucosa en la hemolinfa así como de CHH es endógeno y puede ser sincronizado por ciclos luz/oscuridad, como se ha demostrado en el acocil *A. leptodactylus*. El estímulo luminoso que sincroniza el ritmo no es detectado por los ojos compuestos o por el receptor caudal localizado en el sexto ganglio abdominal, sino probablemente por un fotorreceptor localizado en alguna parte del sistema nervioso del

animal (Kallen et al., 1988). Sandeman y colaboradores (1990) reportaron fotorreceptores extrarretinianos en el cerebro del acocil *Cherax destructor*, recientemente en nuestro grupo de investigación se reportó la presencia de pigmentos fotorreceptores, criptocromos, en el protocerebro del acocil (Fanjul et al., 2004). Después de cortar la conexión neural entre los lóbulos ópticos y el ganglio cerebral, la ritmicidad de la glucosa en la hemolinfa persiste, lo cual indica que el reloj biológico de este ritmo está localizado dentro de los lóbulos ópticos.

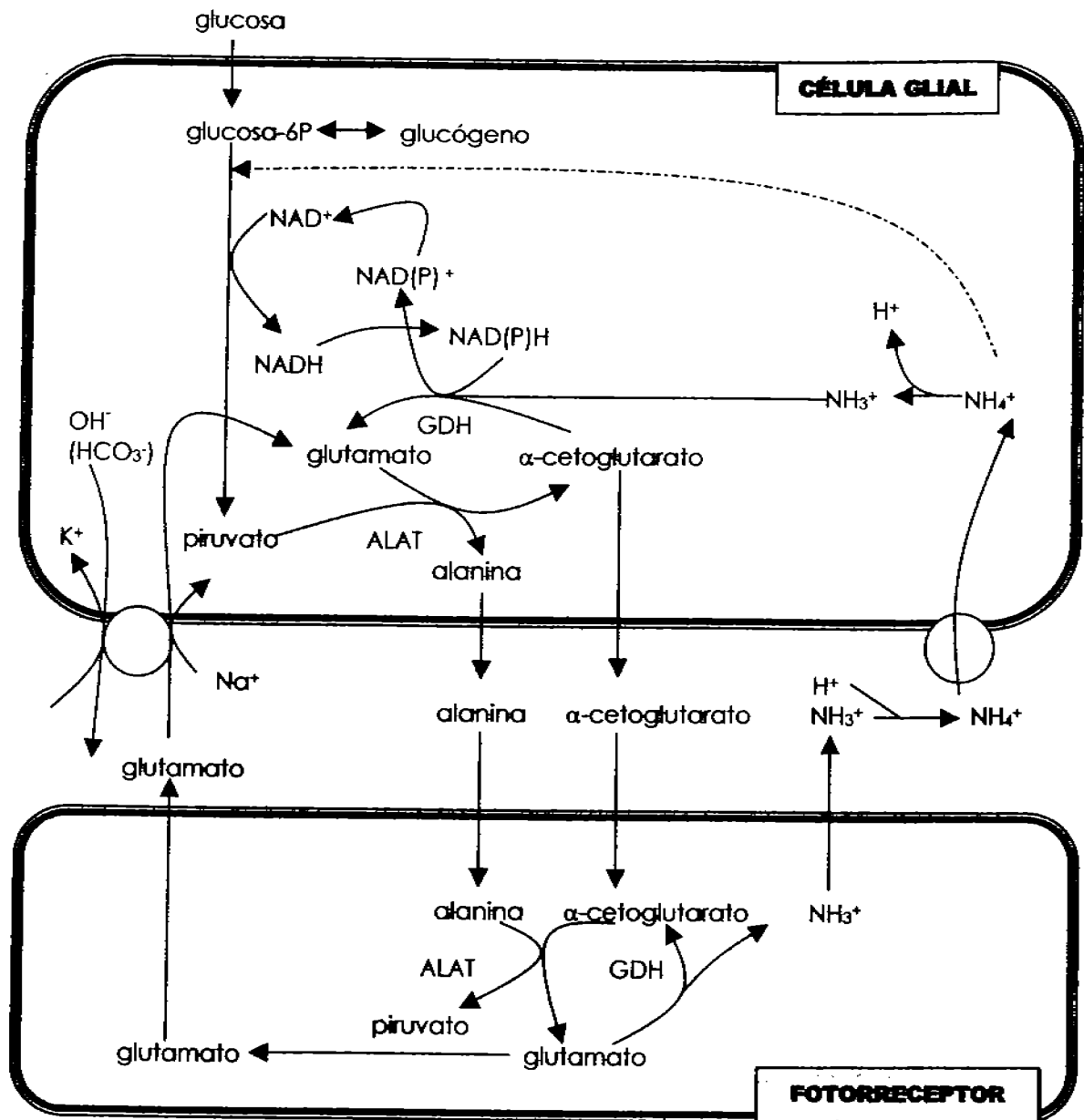
## **2.7. Metabolismo de glucosa en la retina de invertebrados.**

Para el estudio del metabolismo de glucosa en la retina de invertebrados e incluso de vertebrados se ha usado como modelo la retina de la abeja *Apis mellifera*, en donde las células gliales y las células fotorreceptoras constituyen dos compartimentos metabólicamente distintos. La toma y metabolismo de glucosa se realiza preferentemente en las células gliales, donde puede ser almacenada en forma de glucógeno o catabolizada mediante la ruta glucolítica (Tsacopoulos et al., 1988; Brazitikos y Tsacopoulos, 1991; Evêquoz-Mercier y Tsacopoulos, 1991). En las células fotorreceptoras, el metabolismo de la energía es aeróbico, por lo que la anoxia y la inhibición de la función mitocondrial, suprimen la respuesta eléctrica generada por la fotoestimulación. Histológicamente, los fotorreceptores se caracterizan por poseer una gran cantidad de mitocondrias y poco glucógeno; por el contrario, las células gliales poseen una menor cantidad de mitocondrias y grandes cantidades de glucógeno (Dimitracos y Tsacopoulos, 1985; Tsacopoulos et al., 1987; Tsacopoulos et al., 1988).

Entre las células fotorreceptoras y las células gliales existe un acoplamiento metabólico, en donde las células gliales sintetizan y liberan metabolitos que son utilizados por los fotorreceptores durante la fotoestimulación, proporcionando así la energía necesaria para la generación de la respuesta eléctrica (Fig. 6). Durante la fotoestimulación, por un lado se incrementa el metabolismo oxidativo (fosforilación oxidativa) en los fotorreceptores, mientras que en las células gliales se activa la glucólisis. Al incrementarse el metabolismo en las células fotorreceptoras, éstas liberan al espacio extracelular señales químicas (glutamato y amonio) que entran en las células gliales por sistemas de transporte de membrana, haciendo que se active la glucólisis en éstas células (Tsacopoulos et al.,

1988; Brazitikos y Tsacopoulos, 1991). La glucosa catabolizada por las células gliales puede ser tomada desde el espacio extracelular o bien desde sus propios depósitos de glucógeno; en la ausencia de glucosa extracelular se emplea el glucógeno (Tsacopoulos et al., 1994). Dentro de las células gliales, el glutamato y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), promueven la actividad de tres enzimas: la fosfofructocinasa (PFK), enzima que participa en la glucólisis; la alanina aminotransferasa (ALAT), enzima que convierte el piruvato en alanina por una reacción de transaminación y la glutamato deshidrogenasa (GDH), la cual convierte el glutamato en  $\alpha$ -cetoglutarato (Tsacopoulos, 2002). Al promoverse la actividad de la PFK, se activa la glucólisis para producir piruvato (producto final de esta ruta metabólica), el cual es transformado en alanina, por la enzima ALAT. Por otro lado, el glutamato que entra a las células gliales es transformado en  $\alpha$ -cetoglutarato por la GDH, esta reacción permite donar nitrógeno para la conversión de piruvato a alanina por transaminación (Tsacopoulos et al., 1994; Tsacopoulos et al., 1997). La alanina sintetizada en la glia es liberada y tomada por los fotorreceptores mediante un mecanismo de transporte de membrana dependiente de  $\text{Na}^+$ , es transaminada a piruvato, el cual entra al ciclo de Krebs en la mitocondria como acetil coenzima-A (acetil-CoA). Así mismo, el  $\alpha$ -cetoglutarato sintetizado por las células gliales también es liberado al espacio extracelular, tomado por las células fotorreceptoras y empleado en el ciclo de Krebs. La incorporación de acetil-CoA en el ciclo de Krebs desde el piruvato parece no ser suficiente, por lo que parece probable que los intermediarios en el ciclo de Krebs (como el  $\alpha$ -cetoglutarato) incrementan en una reacción anaplerótica catalizada por la GDH. Tsacopoulos y colaboradores (1994), proponen que la prolina es un segundo substrato para el ciclo de Krebs, ya que la prolina se transforma en glutamato, el cual entra al ciclo de Krebs como  $\alpha$ -cetoglutarato. El uso de prolina en el ciclo de Krebs parece necesario, ya que, al incrementarse el consumo de  $\text{O}_2$  en los fotorreceptores, aumenta la demanda de ATP, el cual es usado para bombear  $\text{Na}^+$  fuera de la célula. Finalmente, la oxidación de alanina en los fotorreceptores implica la producción de  $\text{NH}_4^+$ , el cual regresa a las células gliales como una señal de información (Tsacopoulos, 2002); además, el  $\alpha$ -cetoglutarato obtenido de la prolina y que es consumido en las mitocondrias de los fotorreceptores es convertido a  $\text{NH}_4^+$  y glutamato (Tsacopoulos et al., 1997) (Fig. 6).





**Figura 6.** Modelo de la interacción metabólica entre una célula glial y un fotorreceptor, en la retina de la abeja *Apis mellifera*. El glutamato y  $\text{NH}_3$  liberados por la célula fotorreceptora, entran a la célula glial y controlan el metabolismo de la glucosa y la liberación de sustratos metabólicos (alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato) desde esta célula. ALAT= alanina aminotransferasa; GDH=glutamato deshidrogenasa (Tomado de Tsacopoulos et al., 1997).

## 2.8. Depósitos de glucógeno en la retina de crustáceos.

Son pocos los trabajos que han tenido como uno de sus objetivos localizar depósitos de glucógeno en la retina de crustáceos. En general, se han logrado observar partículas de glucógeno como principales inclusiones intracelulares visibles en los conos cristalinos. A continuación mencionaré algunos de los trabajos.

En el ojo compuesto de *Porcellio scaber* (crustáceo isópodo), las propiedades de tinción histoquímica del cono cristalino sugieren que está compuesto de un complejo proteína-carbohidrato (Nemaniac, 1975). Por microscopía de luz y electrónica se han localizado partículas de glucógeno en los conos de la especie *Artemia* (Eloffson y Odselius, 1975). En cuanto a la retina de 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. Roach (1976) intentó teñir estas partículas en los conos cristalinos de *Procambarus clarkii*, pero sus resultados no fueron satisfactorios debido al bajo contraste y a la formación de precipitado. Schraermeyer (1992) intentó localizar depósitos de glucógeno por microscopía electrónica en las retinas de *Orconectes limosus* y *Procambarus clarkii*, encontró partículas densas a los electrones dentro de lagunas hemolinfáticas y células gliales y propone que se tratan de depósitos de glucógeno. Se sabe que las células gliales de vertebrados e invertebrados presentan algunas características morfológicas comunes, como la presencia de depósitos de glucógeno. Al analizar las relaciones entre las células gliales y la matriz extracelular en el sistema visual del cangrejo *Ucides cordatus* por métodos histoquímicos (reacción de ácido periódico de Schiff, PAS), se pudo observar material positivo a la reacción PAS en la membrana basal debajo de la retina, entre los axones de la retina, en los límites externos de la lámina, en la médula externa e interna, entre los quiasmas de externos e internos y entre las fibras del tracto protocerebral (da Silva et al., 2001).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente no existen trabajos enfocados a estudiar el papel de la glucosa en los mecanismos que determinan la sensibilidad de la retina de los crustáceos a la luz, como son, la ganancia de las células retinulares o fotorreceptoras y la posición de los pigmentos de blindaje (pigmento distal y pigmento proximal). En varios grupos de animales, se ha logrado determinar que la glucosa es usada indirectamente como substrato metabólico por los fotorreceptores. En la abeja *Apis mellifera*, la energía metabólica requerida por los fotorreceptores para el mantenimiento del metabolismo oxidativo, durante la fotoestimulación es administrada por las células gliales adyacentes a los fotorreceptores, principalmente en la forma de alanina (Tsacopoulos, 2002). Sería plausible suponer que la glucosa también sea empleada como un substrato metabólico para el funcionamiento de los fotorreceptores de crustáceos durante la fotoestimulación. Es importante destacar que tanto los cambios rítmicos circadianos de sensibilidad visual (reflejada en la amplitud del ERG) (Aréchiga et al., 1993) como los niveles de glucosa en el acocil (Kallen et al., 1990), tienen acrofases o picos nocturnos, es decir que tanto la amplitud del ERG como la concentración de glucosa en hemolinfa son mayores durante la noche (tiempo en el cual, estos animales son activos) que durante el día. Con respecto a la posición de los gránulos de pigmento de blindaje, estudios realizados en células pigmentadas de varias especies de crustáceos y peces han logrado determinar que la migración de los gránulos de pigmento está determinada por cambios en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  así como de AMPc, y que estos movimientos dependen de ATP (Nery et al., 1997; McNiven y Ward, 1988; Kotz y McNiven, 1994). Además, las proteínas motoras encargadas del transporte de gránulos de pigmento a lo largo de los microtúbulos, convierten la energía de la hidrólisis del ATP en movimiento vectorial (Alberts et al, 2002), posiblemente este ATP sea obtenido principalmente del catabolismo de la glucosa durante la glucólisis. Se sabe que en los crustáceos esta ruta opera cuando hay un requerimiento energético (Santos y Keller, 1993).

#### **4. HIPÓTESIS.**

Si la D-glucosa es un substrato metabólico para el mantenimiento de la actividad funcional de la retina, entonces tendrá un efecto sobre la sensibilidad de ésta estructura a la luz, determinada mediante la amplitud del ERG y el movimiento de los pigmentos de blindaje. El efecto de este carbohidrato variará dependiendo de la hora circadiana.

## 5. OBJETIVOS.

### **General:**

Determinar el 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*.

### **Particulares:**

- Cuantificar los cambios en la actividad eléctrica de la retina aislada, manifestados en la amplitud de los dos componentes del ERG (H-I y H-II), ante diferentes concentraciones de glucosa, durante el día y la noche.
- Determinar el efecto de la glucosa sobre la posición del pigmento distal (PD) y proximal (PP), a las mismas horas en que se registre el ERG, durante el día y la noche.
- Determinar la posible existencia de depósitos de glucógeno en retina, a las mismas horas en que se registre el ERG y la posición de los pigmentos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **6.1. Animales.**

Se emplearon en total 67 acociles adultos de ambos sexos de la especie *Procambarus clarkii* en estado de intermuda; 50 para el registro del ERG, 15 para la determinación de la posición de los pigmentos y 2 para los métodos histoquímicos. Los acociles fueron colectados en el Río Conchos en Saucillo, Chihuahua. Se mantuvieron en ciclos luz-oscuridad (LO) 12:12 en cajas de aproximadamente 60 litros, en grupos de 15 acociles por caja, a una temperatura de 20° C, el agua fue constantemente aireada por una bomba. Se alimentaron con verduras (zanahoria, calabaza y chayote) tres veces por semana.

### **6.2. Fotoperiodo.**

El efecto de la D-glucosa sobre la amplitud del ERG y la posición de los pigmentos se determinó en el día o fotofase (10:00-12:00 hrs.) y en la noche o escotofase (24:00-02:00 hrs.), por lo cual los animales se dividieron en dos grupos experimentales: 1) *día* y 2) *noche*. Ambos grupos se sincronizaron a ciclos LO 12:12 por lo menos una semana antes de la realización de los experimentos. Para el primer grupo experimental (*día*) el encendido de la luz se realizó a las 07:00 horas; para el segundo grupo (*noche*) se invirtió el fotoperiodo, es decir, el encendido se realizó a las 19:00 horas, para poder realizar los experimentos durante el día.

### **6.3. Disección de la retina.**

Los acociles fueron inmovilizados colocándolos en frío por 30 minutos para poder cortar el tallo óptico, después de lo cual, se realizó la disección de la retina en la presencia de Van Harreveld (VH), solución fisiológica de crustáceos. La retina y la lámina ganglionaris fueron separadas del resto del tallo óptico con la ayuda de una navaja de rasurar, cortando en el lugar donde se unen la córnea y el exoesqueleto quitinoso del tallo óptico. Las retinas que se usaron para el registro del ERG, antes de separarlas del tallo se les realizó un pequeño agujero en la superficie de la córnea, para la posterior inserción del electrodo de registro. Para los experimentos del grupo 1 (*día*) la disección de la retina se

realizó a las 08:00 hrs. y para el grupo 2 (*noche*) la disección se realizó a las 22:00 hrs.

#### 6.4. D-glucosa.

Se probó el efecto de cuatro diferentes concentraciones de glucosa sobre la amplitud de los dos componentes del ERG (H-I y H-II); dos por debajo de los niveles fisiológicos basales que se han reportado en otras especies de acociles, *Orconectes limosus* (Kallen et al., 1990; Santos et al., 2001) y *Astacus leptodactylus* (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985; Lorenzon et al., 2004) y dos que se encuentran dentro de los niveles fisiológicos basales de estas mismas especies:

D-glucosa	
mg/dl	mM
1	0.054
2	0.110
4	0.222
8	0.444

Para determinar el efecto de la glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje, distal y proximal, se usó la dosis más alta de glucosa empleada para el registro del ERG (8 mg/dl = 0.444 mM).

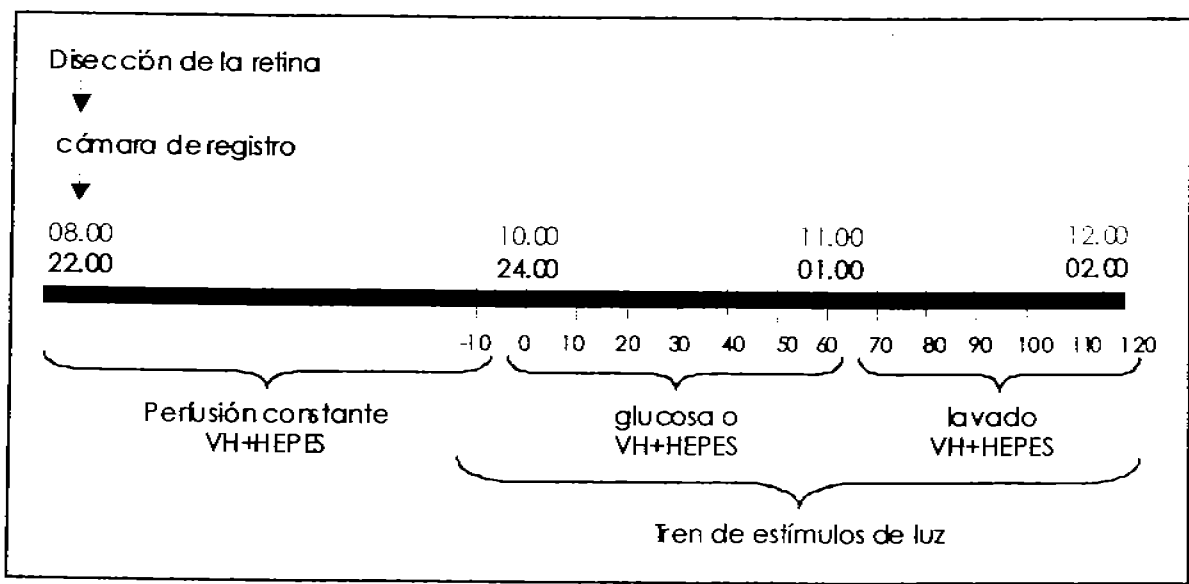
#### 6.5. Registro del ERG.

Después de la disección, la retina aislada fue colocada en una cámara de registro, situada dentro de una jaula de Faraday y previamente llenada con una solución de Van Harreveld+HEPES (VH+HEPES) (ver ANEXO). Con la ayuda de un micromanipulador, se insertó el electrodo de registro (de tungsteno) por el agujero previamente realizado en la córnea. La cámara de registro equipada con un sistema de perfusión permitió bañar a la retina constantemente con solución fisiológica (VH+HEPES), la cual se mantuvo a temperatura constante (14° C) con un sistema de refrigeración.

La retina permaneció en condiciones de oscuridad y perfusión constante por dos horas antes de estimular a la retina con pulsos de luz. Después de transcurridas estas primeras dos

horas en condiciones de perfusión y oscuridad constante, la retina fue fotoestimulada con un tren de pulsos de luz blanca (4 pulsos de luz cada 7 seg) de la misma intensidad de 10  $\mu$ s de duración cada uno. La perfusión fue suspendida y se aplicó glucosa o VH+HEPES para los experimentos control. Después la retina fue fotoestimulada cada diez minutos con el mismo tren de pulsos de luz durante dos horas, en la primera hora la retina estuvo incubada con glucosa o VH+HEPES y en la segunda se reinició la perfusión para el lavado de la solución aplicada. Para cada experimento se capturaron registros de calibración.

Para el grupo experimental 1 (*día*) los ERGs se registraron de 10:00 a 12:00 hrs. y para el grupo 2 (*noche*) de 24:00 a 02:00 hrs., con sus respectivos experimentos control, es decir, los experimentos donde no se incubó con glucosa sino con VH+HEPES. Para cada condición experimental (control y las cuatro diferentes soluciones de glucosa) se registraron los ERGs de cinco retinas (Fig. 7).



**Figura 7.** Registro del ERG. Después de realizar la disección de la retina, esta fue colocada en una cámara de registro, en condiciones de oscuridad (barra negra) y perfusión constantes con VH+HEPES por dos horas. Después la retina fue estimulada con un tren de pulsos de luz de la misma intensidad cada diez minutos en tres condiciones para un mismo experimento: 1) antes de la incubación con D-glucosa (min. -10), 2) incubación con D-glucosa o VH+HEPES (del min. 0 al 60) y 3) lavado de la solución aplicada (del min. 60 al 120). Para cada condición experimental, es decir, control (VH+HEPES) y las cuatro diferentes concentraciones de glucosa, se registraron los ERGs de cinco retinas tanto para el día (gris) como para la noche (negro).



### **6.5.1. Equipo de registro electrofisiológico.**

El electrodo de registro (de tungsteno) colocado en la retina, cerca de la córnea; y el electrodo indiferente (de plata) colocado en el baño de perfusión, se conectaron a una sonda de alta impedancia Grass HIP511GA, la cual fue conectada a un preamplificador Grass P511. La respuesta eléctrica recibida por el preamplificador se envió a un digitalizador Instrutech VR-10A, lo que permitió digitalizar los registros. El digitalizador conectado a una computadora PC-XT permitió capturar los ERGs en el programa VR111 versión 1.0, a su vez envió la señal digitalizada a un osciloscopio HAMEG (HM 205-3) para la visualización de los registros. Un estimulador S48 Grass conectado a la computadora y a un fotoestimulador Grass PS33 PLUS, permitió que el programa VR111 empezará a capturar segundos antes de fotoestimar a la retina, y permitió fijar la frecuencia de estímulos luminosos (4 pulsos de luz cada 7 segundos). Los registros fueron respaldados grabándolos en una videocasettera conectada al digitalizador.

### **6.5.2. Análisis de los datos.**

Los 4 ERGs registrados cada diez minutos, es decir, en cada uno de los puntos temporales (del minuto -10 al 120) y las calibraciones, se capturaron en archivos diferentes en el programa VR111 versión 1.0. Para su análisis se transfirieron al programa Fetchan versión 1.0, donde se midió la amplitud de ambos componentes del ERG (H-I y H-II) en voltios, así como la calibración. Los datos en voltios fueron procesados en una hoja del cálculo del programa Corel Quatro Pro 4.0 y para cada uno de los puntos temporales se calculó la media de la amplitud de H-I y H-II de los 4 ERGs registrados y su error estándar, posteriormente los datos fueron porcentualizados. El porcentaje de cambio en la amplitud se determinó con respecto al valor control (minuto -10, antes de la aplicación de glucosa, o VH+HEPES). Se realizaron gráficas con los datos porcentualizados de los dos componentes del ERG en el programa Sigma Plot 5.0, para visualizar las tendencias de los datos. El análisis estadístico se realizó en el programa Statistica 6.0. Se aplicó una prueba de Bartlett, para determinar si las varianzas de los datos eran homogéneas o heterogéneas. Posteriormente, se aplicó una prueba estadística no paramétrica, Kolmogorov-Smirnov. Se realizaron regresiones múltiples para obtener las pendientes y el coeficiente de correlación

en el programa Statistica 6.0 únicamente para los datos del minuto -10 al minuto 60. Las gráficas de la regresión múltiple se construyeron en el programa Sigma Plot 5.0.

#### **6.6. Determinación de la posición de los pigmentos de blindaje.**

Se determinó el efecto de la glucosa 0.44 mM sobre la posición de los pigmentos distal y proximal. Se realizaron 5 experimentos para el grupo del *día* y 5 para el grupo de la *noche*. Para cada experimento se utilizaron 3 retinas. Las retinas de ambos grupos experimentales, después de haber sido disectadas (08:00 y 22:00 hrs.), fueron colocadas en grupos de tres, en cámaras de cultivo llenadas con una solución de VH+HEPES cada una, en condiciones de oscuridad y temperatura constante (23° C) durante todo el experimento. Durante las primeras dos horas, cada 20 minutos, se reemplazaron 300 µl de VH+HEPES por otros 300 µl de la misma solución. A las 10:00 y 24:00 hrs. (dos horas después de haber realizado la disección), se tomaron cinco retinas del grupo del día y cinco del grupo de la noche, fueron sumergidas en agua hirviendo por 3 a 5 min. para la fijación instantánea de la posición de los pigmentos, después fueron colocadas en formaldehído al 10% por al menos 24 hrs. Después de haber tomado y fijado las primeras cinco retinas, en cada cámara se reemplazó la solución de VH+HEPES por una de glucosa para obtener una concentración final de glucosa 0.44 mM. A las 11:00 y 01:00 hrs., una hora después de haber aplicado la glucosa, se fijaron otras cinco retinas, después de lo cual, se retiraron 500 µl de líquido, para aplicar la misma cantidad de VH+HEPES, durante esta última hora, se realizó el lavado gradual de la solución aplicada. A las 12:00 y 02:00 hrs., se fijaron las últimas 5 retinas, para cada grupo experimental. Después de que las retinas estuvieron por al menos 24 horas en formol, cada una fue cortada longitudinalmente por la mitad, cada mitad se fotografió mediante una cámara digital a través de un microscopio estereoscópico. Las fotos se observaron en el programa Sigma Scan Pro 4, en el cual se midió el grado de dispersión o retracción de los pigmentos expresado como el índice del pigmento distal (IPD) y del proximal (IPP).

De acuerdo con el método descrito por Frixione et al. (1979), el IPD se obtuvo del cociente de dos distancias: 1) la distancia existente entre la córnea y el extremo proximal del pigmento distal (*d1*) dividida entre 2) la distancia entre las células de la córnea y la

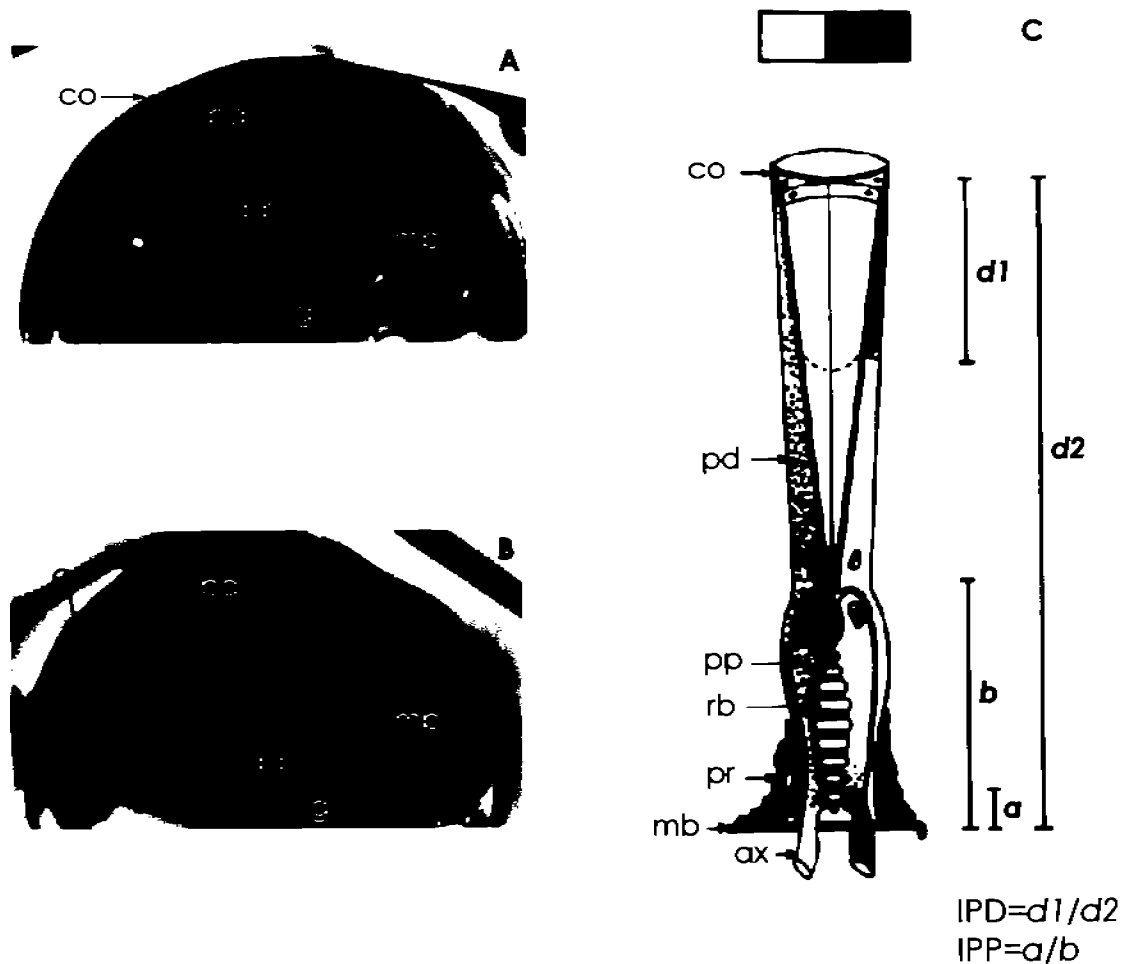


Figura 6. **A** y **B**) Secciones longitudinales de retinas aisladas, donde se muestra la posición del pigmento distal (pd) y proximal (pp). **A**) Adaptación a la luz, tanto el pd como el pp se encuentran dispersos. **B**) Adaptación a la oscuridad, el pd se encuentra retraído hacia la córnea y el pp hacia los axones, por debajo de la membrana basal. **C**) Representación esquemática de los elementos celulares en una ommatidia y las distancias usadas para determinar la posición de los pigmentos. ax, axones de las células retinulares; co, córnea; lg, lámina ganglionaris; mb; membrana basal; pd, pigmento distal; pp pigmento proximal; pr, pigmento reflejante; rb, rabdomo;  $d1$ , distancia desde la córnea al extremo proximal del pigmento distal;  $d2$ , distancia desde la córnea a la membrana basal;  $a$ , distancia desde el extremo distal del pigmento proximal a la membrana basal;  $b$ , distancia desde el extremo distal de los fotorreceptores a la membrana basal. IPD, índice del pigmento distal, IPP, índice del pigmento proximal. La barra blanca y negra indican la adaptación a la luz y a la oscuridad, respectivamente (C, Tomado de Garfias et al., 1995).

membrana basal ( $d_2$ ) ( $IPD=d_1/d_2$ ). El IPP se obtuvo del cociente de 1) la distancia que hay desde el extremo distal del pigmento proximal a la membrana basal ( $a$ ), dividida entre, 2) la distancia entre el extremo distal de los fotorreceptores a la membrana basal ( $b$ ) ( $IPP=a/b$ ) (Fig. 8). Los índices pueden tomar valores desde 1.0, cuando el pigmento está 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. Usualmente, una fracción de pigmento proximal permanece sobre la membrana basal después de la retracción normal, por lo que es muy 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). Además, varios trabajos demuestran que rara vez se obtiene la dispersión total del pigmento distal, en condiciones de iluminación el IPD alcanza valores de entre 0.65 a 0.75 (Garfias et al., 1995; Porras et al., 2001).

Las gráficas del efecto de la glucosa sobre el movimiento de los pigmentos se construyeron en el programa Sigma Plot 5.0. Se aplicó un ANOVA para determinar el efecto estadísticamente significativo o no, de la glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje.

### 6.7. Histoquímica.

Para cada grupo experimental (*día y noche*), se realizó una prueba histoquímica para la localización de glucógeno en la retina: Reacción de Ácido Periódico de Schiff (PAS).

Los tallos oculares de ambos grupos experimentales, *día y noche*, se disectaron a las 10:00 y 24:00 hrs., respectivamente. Los tallos oculares se fijaron en formol al 10 % en PBS (buffer de fosfatos) a temperatura ambiente, transcurridas las primeras dos horas, la quitina de los tallos ópticos se removió con la ayuda de instrumentos de disección y se dejó dos horas más en formol. Posteriormente, el tejido se deshidrató de la siguiente forma: alcohol al 50% por 24 hrs, alcohol al 70% por 24 hrs, alcohol al 96% por 12 hrs, alcohol al 100% por 12 hrs y xilol al 30%.

Una vez deshidratado el tejido, se colocó en paraplast (derretido) al 100%, de 12 a 24 horas dentro de una estufa de incubación a una temperatura de 59° C y se llevó a cabo la inclusión en paraplast. Una vez incluido se realizaron los cortes histológicos longitudinales

de un grosor de 4  $\mu\text{m}$  con un microtomo Leica. Se obtuvieron tiras de 7 cortes sucesivos y se colocaron en portaobjetos. Los tejidos fueron rehidratados de la siguiente manera: alcohol al 100% por 10 min., alcohol al 96% por 10 min, alcohol al 70% por 5 min, alcohol al 50% por 5 min y finalmente agua destilada. Una vez hidratado se realizó la reacción de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (ver Anexo). Con esta técnica pueden visualizarse glucógeno, mucina y algunas membranas basales de color rojo a púrpura; también pueden marcarse los núcleos de color azul.

Se tomaron fotografías de los cortes histológicos con una cámara adaptada al microscopio óptico, las fotografías fueron capturadas en el programa RSImage versión 1.9.1.

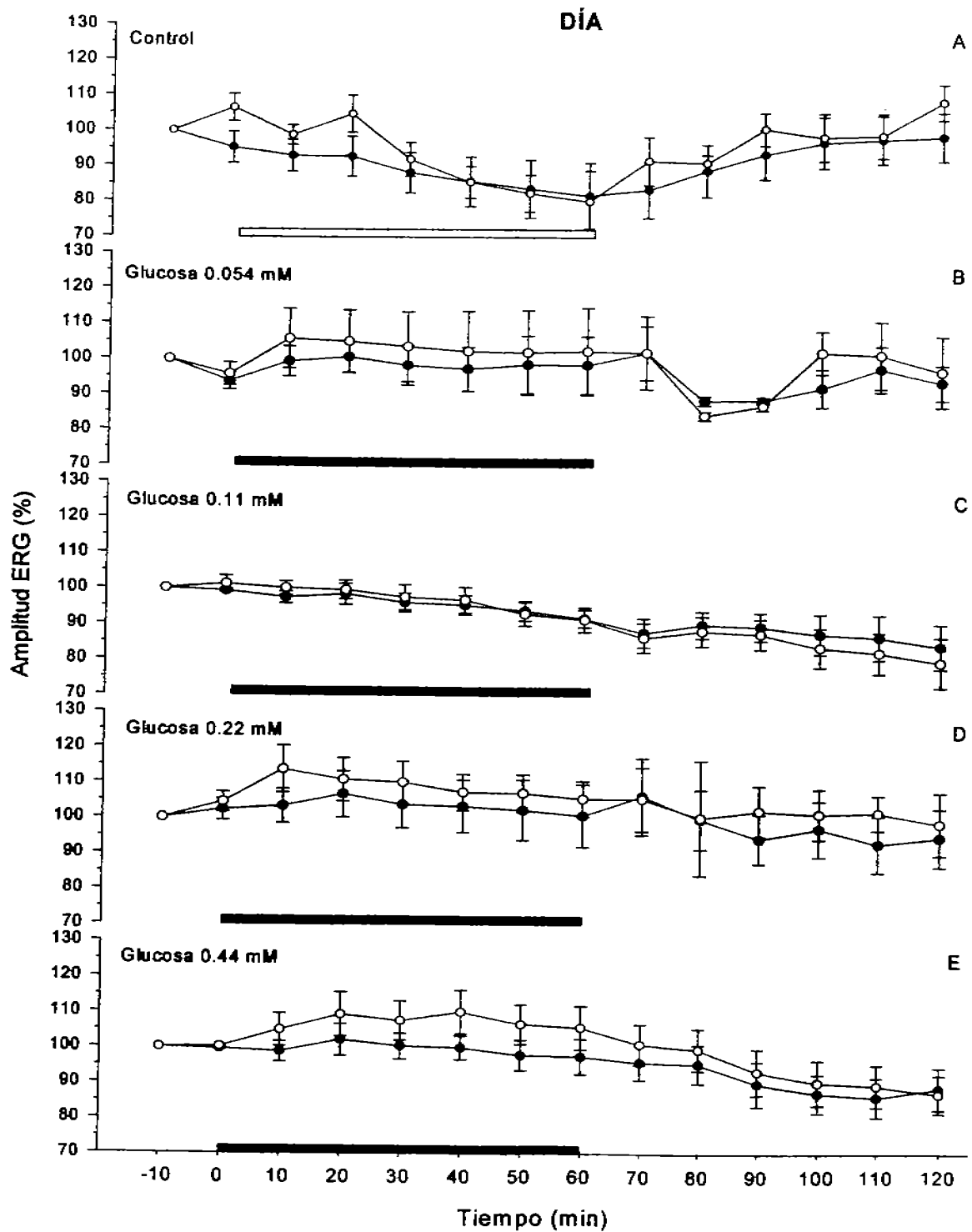
## 7. RESULTADOS:

### 7.1. Efecto de la glucosa sobre la amplitud de los componentes del ERG: H-I y H-II.

#### 7.1.1. Curso temporal del efecto de la glucosa sobre la amplitud de H-I y H-II.

El curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG, H-I y H-II, durante el día (de 10:00 a 12:00 hrs) y la noche (de 24:00 a 02:00 hrs) en las condiciones control (VH+HEPES) y experimentales (diferentes concentraciones de glucosa), se muestran en la figura 9 y 10 respectivamente; cada punto temporal corresponde al promedio porcentualizado de los valores de la amplitud de H-I y H-II obtenidos en cinco retinas. El comportamiento de ambos componentes sigue un curso temporal similar.

Durante el día, en las condiciones control (Fig. 9A), la amplitud de ambos componentes del ERG, en los primeros 60 minutos disminuye hasta casi un 20%; al iniciar el lavado, la amplitud de H-I y H-II aumenta gradualmente hasta alcanzar valores cercanos al 100% (minuto 120). Al aplicar glucosa 0.054 mM (1 mg/dl) (Fig. 9B), puede observarse que 10 minutos después de la aplicación del carbohidrato, la amplitud decrece un 5%, después de lo cual aumenta un 10%, manteniéndose en valores cercanos al 105% hasta el minuto 70, después de este tiempo el ERG (H-I y H-II) decrece y vuelve a aumentar. Con glucosa 0.11 mM (2 mg/dl) (Fig. 9C) la amplitud de H-I y H-II decrece gradualmente durante la exposición al carbohidrato y durante el lavado, hasta alcanzar valores de amplitud del 84% en H-I y 80% en H-II al final del experimento. Con glucosa 0.22 mM (4 mg/dl) (Fig. 9D) y glucosa 0.44 mM (8 mg/dl) (Fig. 9E), la amplitud de H-I y H-II aumenta. Al aplicar glucosa 0.22 mM, H-II aumenta un 13% al minuto 10, mientras que H-I aumenta hasta un 7% al minuto 20; después de estos tiempos en los cuales se alcanza la amplitud máxima, la amplitud de ambos componentes decrece hasta valores cercanos al 100% (H-I, 100.8% y H-II, 105.5%) al minuto 60. Con glucosa 0.44 mM, H-I aumenta un 2% al minuto 20, mientras que H-II aumenta un 9.29% al minuto 40; durante el lavado la amplitud del ERG (H-I y H-II) decrece casi un 10% con respecto al valor de amplitud del minuto -10. Como puede observarse en los gráficos de la figura 9, los valores de amplitud de H-II en todas las condiciones experimentales son mayores que H-I. En general puede observarse un



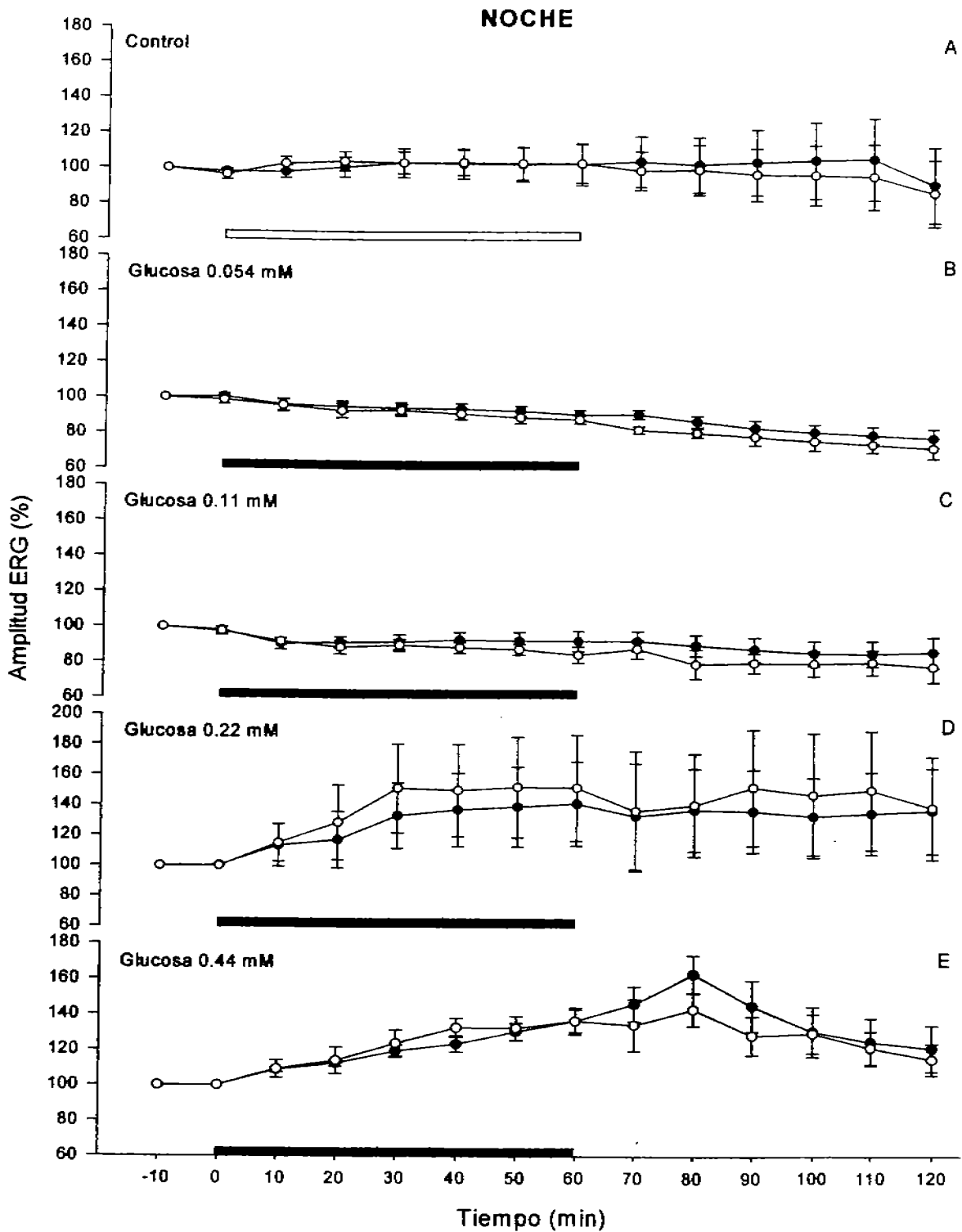
**Figura 9.** Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG: H-I (●) y H-II (○), en el experimento control (A) y ante diferentes concentraciones de glucosa (B, C, D, E) durante el día, de 10:00 a 12:00 hrs. La barra negra indica el tiempo de exposición a la glucosa y la barra blanca el tiempo de exposición a VH+HEPES. Cada punto representa el promedio de 5 registros  $\pm$  error estándar.

incremento del ERG (H-I y H-II) al aplicar glucosa 0.054, 0.22 mM y 0.44 mM, sobre todo en el componente H-II, los valores del ERG en las tres condiciones experimentales decrecen con el lavado.

Durante la noche, la amplitud de H-I y H-II en el experimento control (Fig. 10A), permanecen constantes a lo largo del experimento, es decir se mantienen en valores cercanos al 100% hasta el minuto 110, después de lo cual hay un ligero decremento en la amplitud. Al aplicar glucosa 0.054 mM (Fig. 10B) y glucosa 0.11 mM (Fig. 10C), la amplitud de H-I y H-II decrece, este comportamiento persiste aún después de iniciar el lavado, hasta alcanzar valores cercanos al 80% al minuto 120, en ambas condiciones experimentales. En los experimentos a los cuales se les aplicó glucosa 0.22 mM (Fig. 10D) y glucosa 0.44 mM (Fig. 10E) se observa un aumento de la amplitud de ambos componentes del ERG a partir del minuto 0. Con glucosa 0.22 mM la amplitud de H-I aumenta un 41% al minuto 60, mientras que H-II, aumenta un 52% al minuto 50; al finalizar el experimento, H-I y H-II se mantienen alrededor de los valores obtenidos durante la exposición a la glucosa. Con glucosa 0.44 mM, H-I aumenta un 63% y H-II un 43% al minuto 80, después de lo cual la amplitud decrece un 43% y 29% respectivamente. La amplitud de H-I y H-II durante el curso temporal de las condiciones experimentales control, glucosa 0.054 mM, 0.11 mM, son similares, siendo la amplitud de H-I ligeramente mayor a H-II. Con glucosa 0.44 mM, H-I y H-II son similares excepto en los minutos 70, 80 y 90, tiempo en el cual se observan los valores máximos alcanzados por ambos componentes, siendo H-I mayor a H-II. Con glucosa 0.22 mM, la amplitud de H-II es mayor que H-I durante todo el experimento. En general, la amplitud del ERG incrementa al aplicar glucosa 0.22 mM y 0.44 mM. Con glucosa 0.44 mM, los valores del ERG decrecen después de alcanzar valores máximos.

Se aplicó la prueba estadística no paramétrica Kolmogorov-Smirnov, para determinar si la glucosa produce un cambio significativo sobre la amplitud de los dos componentes del ERG con respecto a los experimentos control, es decir, a los que se les aplicó únicamente VH+HEPES y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en el día ni en la noche.





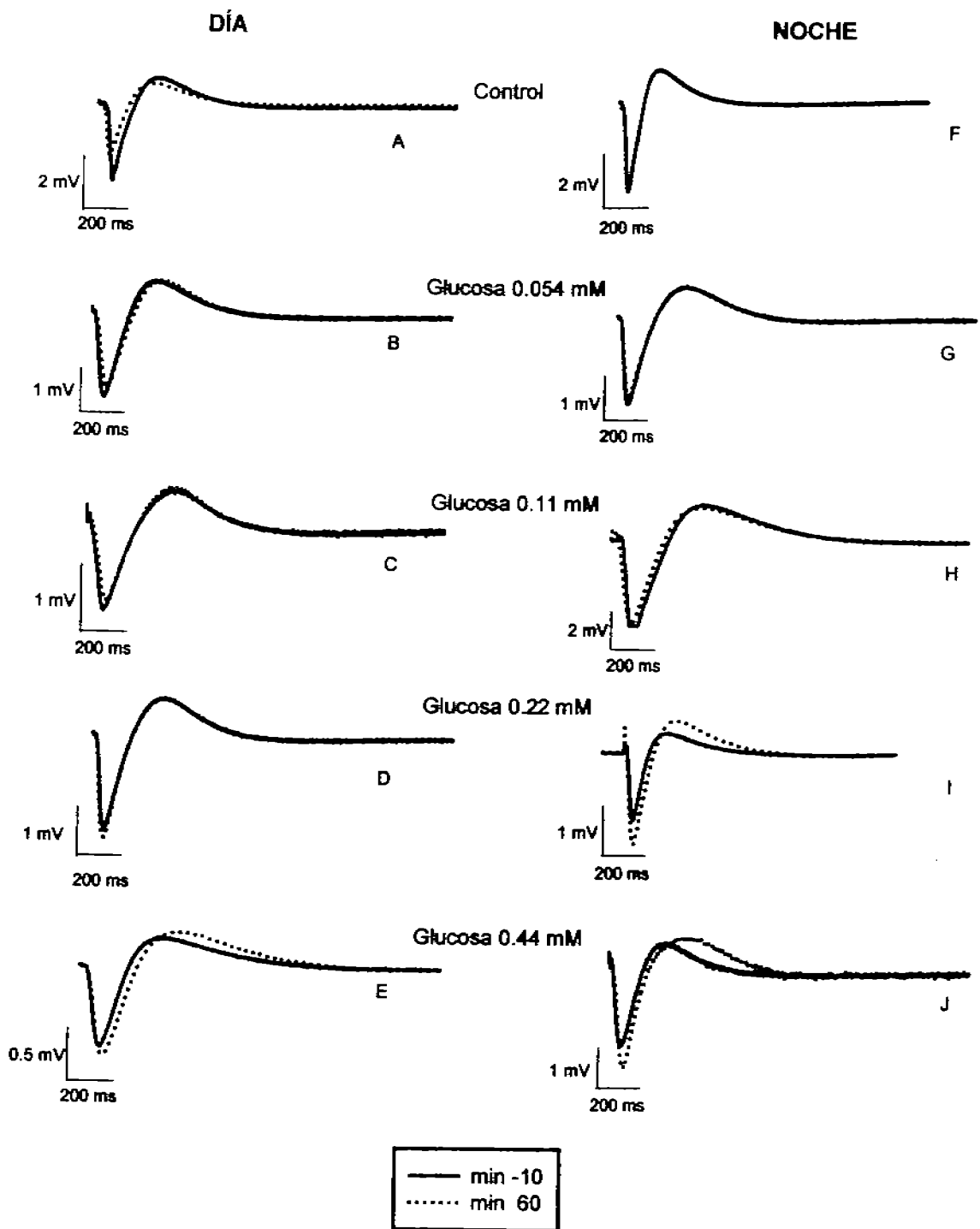
**Figura 10.** Curso temporal de los cambios en la amplitud de los componentes del ERG: H-I (●) y H-II (○), en el experimento control (A) y ante diferentes concentraciones de glucosa (B, C, D, E) durante la noche, de 24:00 a 02:00 hrs. La barra negra indica el tiempo de exposición a la glucosa y la barra blanca el tiempo de exposición a VH+HEPES. Cada punto representa el promedio de 5 registros  $\pm$  error estándar.

### **7.1.2. Comparación de los cambios de amplitud del ERG entre el minuto -10 y 60.**

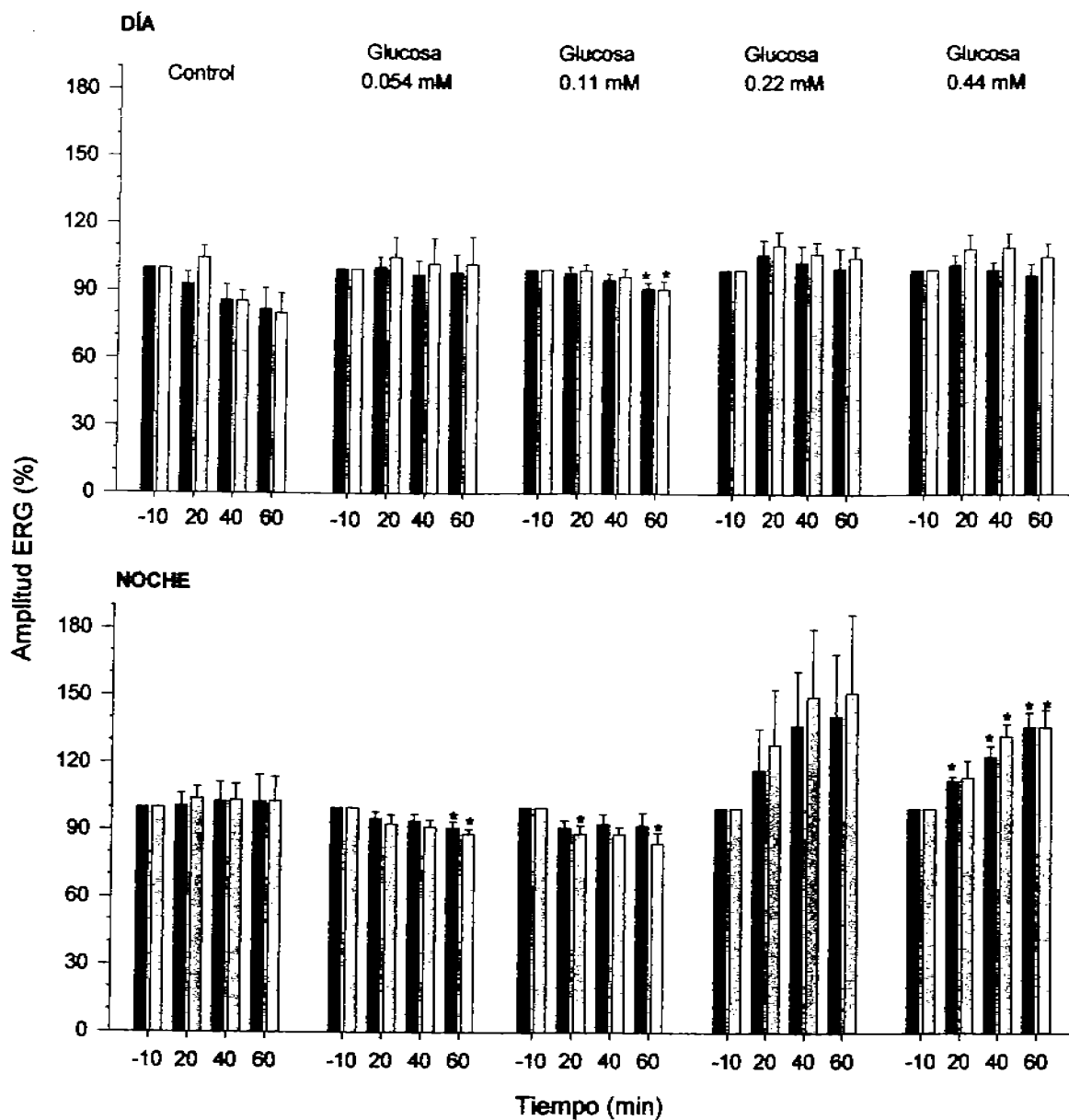
En la figura 11 se observan ERGs representativos de cada condición experimental, es decir un registro por cada solución aplicada, registrados en el día y la noche. Se comparan los cambios de voltaje en la retina a la estimulación luminosa antes (minuto -10) y 60 minutos después de aplicar glucosa o VH+HEPES, en las condiciones experimentales y control, respectivamente. Al aplicar VH+HEPES durante la noche (Fig. 11F) el voltaje del ERG (H-I y H-II) al minuto -10 y 60 son similares, por el contrario, durante el día (Fig. 11A) el voltaje disminuye. En los experimentos con glucosa 0.054 mM y 0.11 mM durante el día (Fig. 11B y C) y la noche (Fig 11G y H) el voltaje del ERG al minuto -10 es similar al registrado al minuto 60. Se observa que al aplicar glucosa 0.22 mM y 0.44 mM tanto durante el día (Fig. 11D y E) y como durante la noche (Fig. 11I e J), el voltaje al minuto -10 es menor que el registrado al minuto 60.

### **7.1.3. Relación dosis-respuesta.**

La figura 12, es una curva dosis-respuesta que muestra los cambios de la amplitud antes (minuto -10) y durante la exposición a la glucosa o VH+HEPES (minutos: 20, 40 y 60) en cada condición experimental y control, durante el día y la noche. Cada barra corresponde al promedio porcentualizado de la amplitud de H-I y H-II de cinco retinas. Se aplicó la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov para comparar los valores del minuto -10 que corresponde al 100% de la amplitud de cada uno de los dos componentes del ERG con los valores de los diferentes puntos temporales, para cada una de las condiciones experimentales. Para los experimentos realizados durante el día se encontró una diferencia significativa en la amplitud de H-I y H-II al minuto 60 ( $p < 0.025$ ) al aplicar glucosa 0.11 mM. En la noche con glucosa 0.054 mM se encontraron diferencias significativas en H-I y H-II al minuto 60 ( $p < 0.025$ ); con glucosa 0.11 mM en H-II a los minutos 20 y 60 ( $p < 0.025$ ). Finalmente, durante la noche, con glucosa 0.44 mM hay un incremento estadísticamente significativo en la amplitud de H-I al minuto 20 y en la amplitud de H-I y H-II a los minutos 40 y 60 ( $p < 0.025$ ).



**Figura 11.** Trazos de ERGs, 10 minutos antes (min -10) y 60 minutos después (min 60) de la incubación con las diferentes concentraciones de glucosa o VH +HEPES, durante el día (A, B, C, D, E) y la noche (F, G, H, I, J).



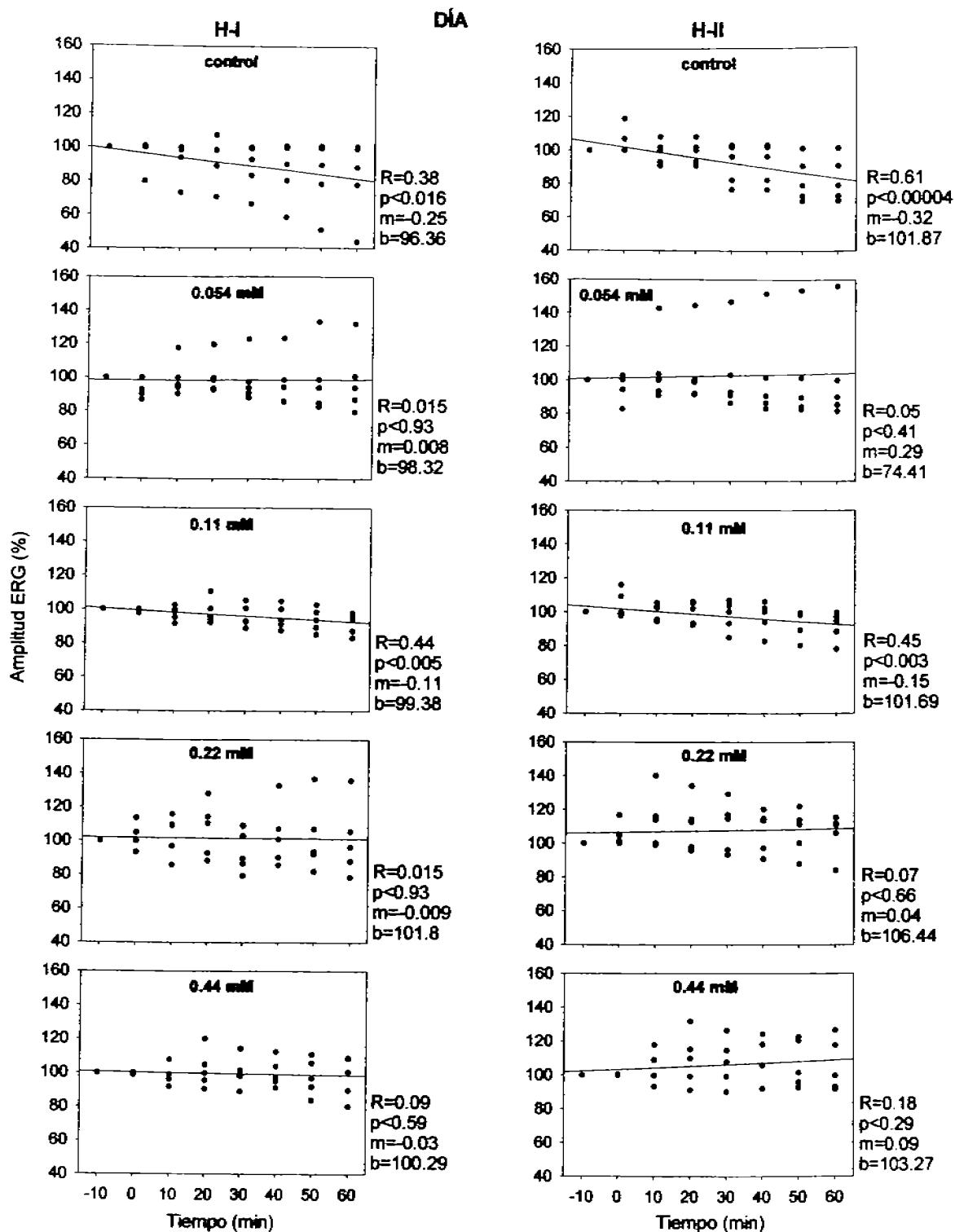
**Figura 12.** Relación dosis-respuesta entre las diferentes concentraciones de glucosa y la amplitud de los componentes del ERG: H-I (■) y H-II (□), durante el día y la noche. Diferencias estadísticamente significativas (\*) con respecto a la amplitud del minuto -10 ( $p < 0.025$ ). Cada barra representa el promedio de 5 registros  $\pm$  error estándar.

#### 7.1.4. Regresión múltiple y correlación.

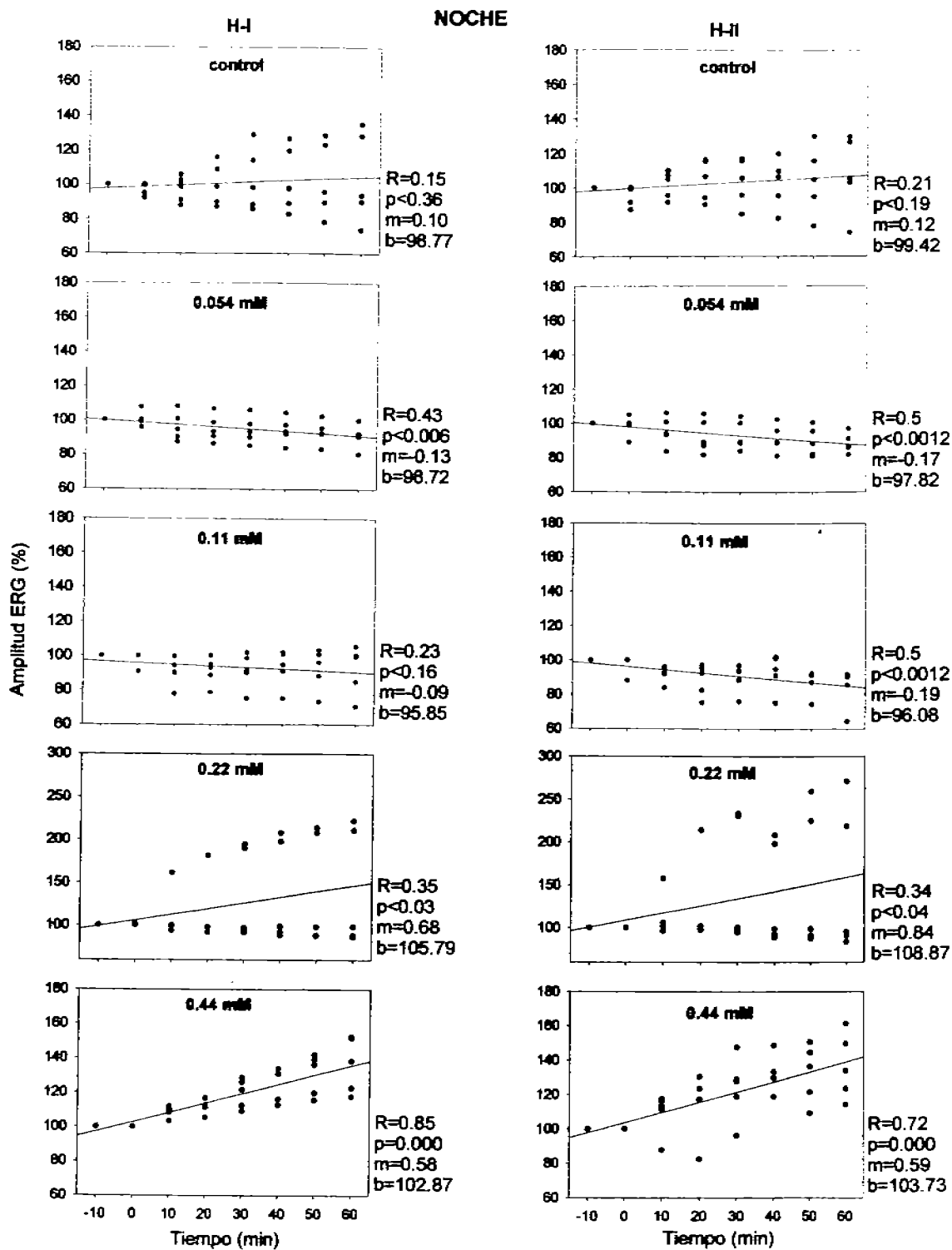
Se realizó un análisis de regresión y correlación de la amplitud de ambos componentes del ERG, para obtener una línea de regresión de los cambios en amplitud con respecto al tiempo, antes de la aplicación de glucosa y durante la exposición a la misma y determinar la intensidad de la relación entre ambas variables. Las figuras 13 y 14, muestran las líneas de regresión de los valores de la amplitud de H-I y H-II en los experimentos realizados, durante el día y la noche, para las condiciones control y experimentales.

*Día* (Fig. 13). En los experimentos control se observa que la línea de regresión tiene una pendiente negativa mayor para H-II, así mismo el coeficiente de correlación es mayor para este componente del ERG y es estadísticamente significativo. Para los experimentos en los cuales se usó glucosa, no se observa esta relación, ya que las pendientes de las líneas de regresión tienen valores cercanos a cero y la correlación entre los cambios en la amplitud de ambos componentes del ERG con respecto al tiempo no existe, es decir, la amplitud del ERG no incrementa o decrece significativamente con respecto al tiempo, al aplicar glucosa.

*Noche* (Fig. 14). Tanto para los experimentos control como a los que se les aplicó glucosa 0.054 y 0.11 mM, las pendientes de H-I y H-II tienen valores cercanos a cero, mientras que con glucosa 0.22 y 0.44 mM las pendientes tienen valores positivos de entre 0.55 y 0.84, es decir, que la glucosa incrementa la amplitud de ambos componentes del ERG a las concentraciones que están dentro de los valores fisiológicos basales reportados para otras especies de acociles. Los valores de correlación sólo son significativos con glucosa 0.44 mM.



**Figura 13.** Análisis de regresión múltiple y correlación, de los cambios de la amplitud de H-I (gráficos de la izquierda) y H-II (gráficos de la derecha) durante el día en las diferentes condiciones experimentales. R, coeficiente de correlación; m, pendiente; b, ordenada al origen.



**Figura 14.** Análisis de regresión múltiple y correlación, de los cambios de la amplitud de H-I (gráficos de la izquierda) y H-II (gráficos de la derecha) durante la noche en las diferentes condiciones experimentales. R, coeficiente de correlación; m, pendiente; b, ordenada al origen.

## 7.2. Efecto de la glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje.

La figura 15 muestra el curso temporal del efecto de la glucosa 0.44 mM sobre la posición de los pigmentos distal y proximal, reflejada en el valor del índice del pigmento distal (IPD) y proximal (IPP), respectivamente.

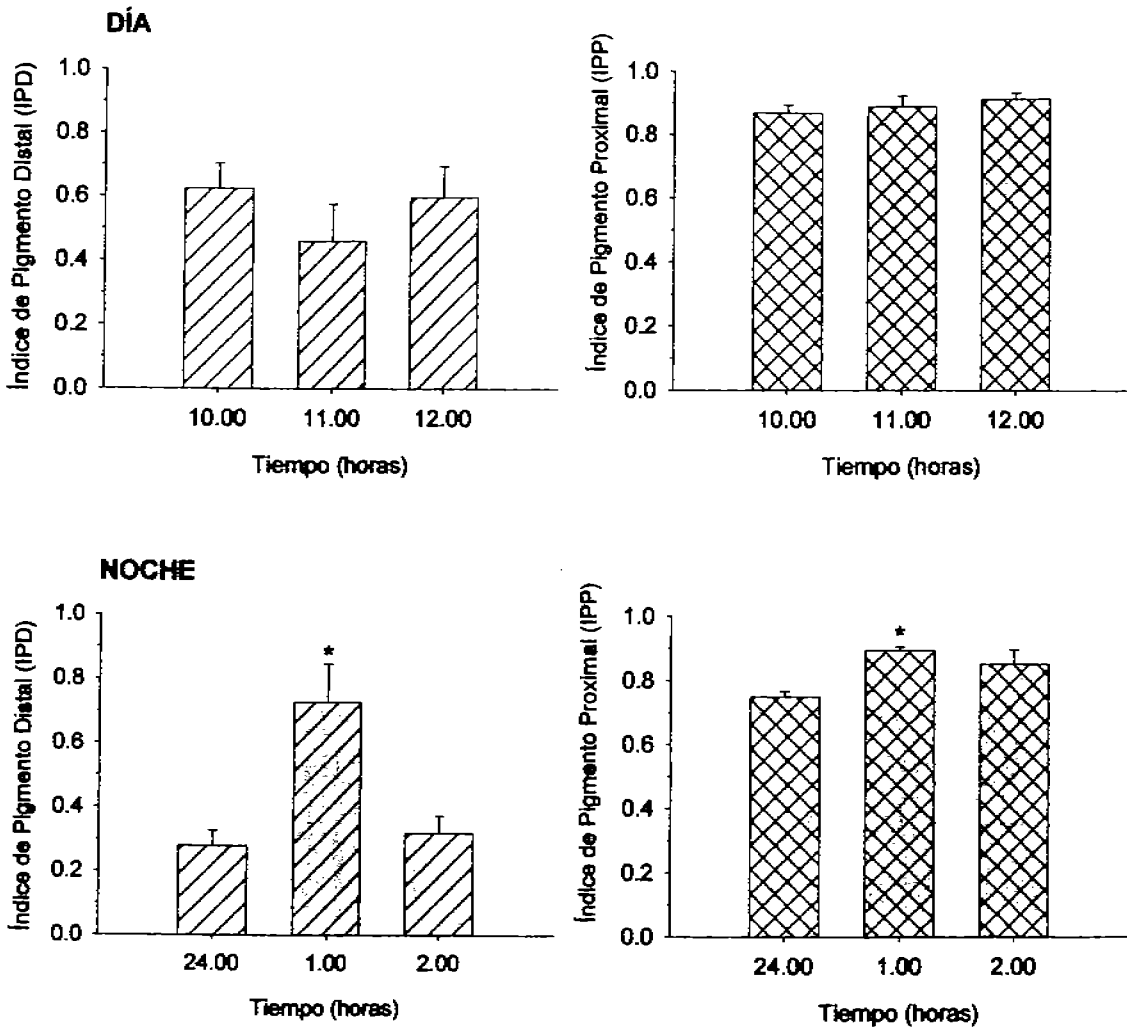
Durante el día el pigmento distal y proximal se encuentran dispersos (IPD=0.62 y IPP=0.87) (10:00 hrs), una hora después de la incubación con glucosa (11:00 hrs) el pigmento distal se retrae (IPD=0.46), y después de eliminar la glucosa (12:00 hrs) se dispersa (IPD=0.59). El pigmento proximal se comporta de diferente manera, ya que, continua dispersándose a lo largo del experimento (IPP=0.89 a las 11:00 hrs; IPP=0.91 a las 12:00 hrs).

En los experimentos realizados durante la noche; puede observarse que antes de la aplicación de glucosa (24:00 hrs), el pigmento distal se encuentra en una posición retraída (IPD=0.28), mientras que el proximal se encuentra disperso (IPP=0.75), después de una hora de incubación con glucosa (01:00 hrs), el pigmento distal se dispersa (IPD=0.73), al igual que el proximal (IPP=0.89), una hora después de haber sido substituida poco a poco la solución de glucosa (02:00 hrs) por VH+HEPES (lavado de la solución aplicada), tanto el pigmento distal como el proximal se retraen (IPD= 0.32 y IPP=0.85) colocándose en la posición que se encontraban antes de la aplicación de la glucosa.

Se aplicó un ANOVA para determinar la existencia de diferencias significativas en la posición de los pigmentos antes y después de la aplicación de glucosa 0.44 mM; solo se encontraron diferencias significativas durante la noche en la posición del pigmento distal ( $p=0.010$ ) y proximal ( $p=0.028$ ).

En la figura 16 se muestran secciones longitudinales de retinas, donde puede apreciarse la posición de los pigmentos, antes de aplicar glucosa 0.44 mM, una hora después de incubar la retina en la solución de glucosa y una hora después del lavado, tanto para el grupo experimental del día como para el de la noche.





**Figura 15.** Curso temporal del efecto de la glucosa 0.44 mM sobre el índice del pigmento distal (IPD) y el índice del pigmento proximal (IPP), durante el día (arriba) y la noche (abajo). Cada barra representa el promedio de 5 experimentos con sus errores estándar. La primera barra de cada una de las gráficas representa el valor del índice antes de la incubación con glucosa; la segunda barra, una hora después de la incubación con glucosa y la tercera barra, una hora después del lavado.

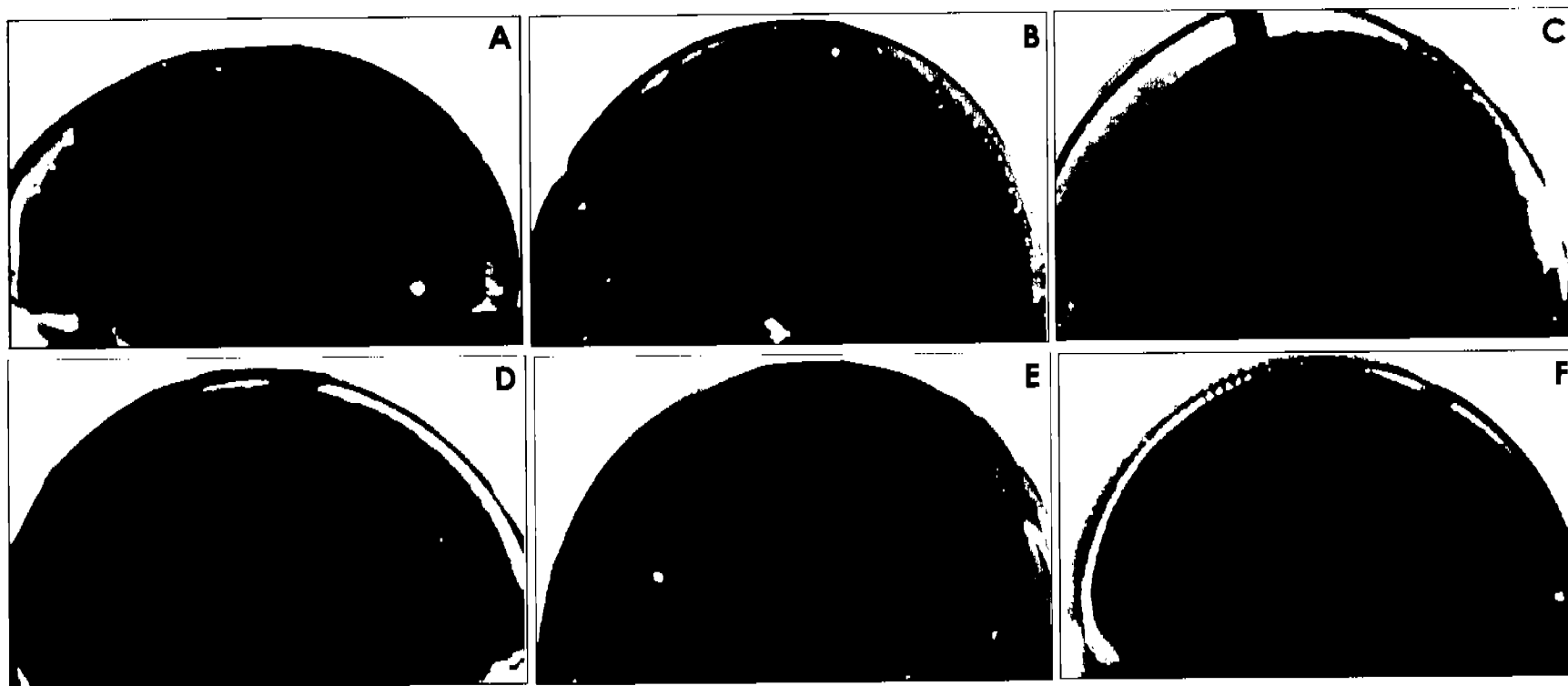


Figura 14. Secciones longitudinales de retinas aisladas del día (**A**, **B** y **C**) y la noche subjetiva (**D**, **E** y **F**), colocadas bajo oscuridad constante. **A** y **D**, retinas antes de la aplicación de glucosa; **B** y **E** una hora después de la incubación con glucosa (2.22 mM); **C** y **F** una hora después del lavado. Durante el día subjetivo, tanto el pigmento distal como el proximal se encuentran dispersos (**A**), después de la aplicación de glucosa el pigmento distal se retrae y el proximal permanece disperso (**B**), el efecto de la glucosa desaparece después del lavado (**C**). El efecto de la glucosa sobre la retracción del pigmento distal no es estadísticamente significativo. Durante la noche subjetiva, el pigmento distal se encuentra retraído, mientras que el proximal se encuentra disperso (**D**); después de la aplicación de glucosa, tanto el pigmento distal como el proximal se dispersan; este efecto es estadísticamente significativo (**E**) y desaparece después del lavado (**F**).

### **7.3. Localización de depósitos de glucógeno en la retina.**

Se realizó una prueba histoquímica para la localización de depósitos de glucógeno en la retina: Reacción de ácido periódico de Schiff (PAS), en el día y la noche. La figura 17 muestra cortes histológicos a diferentes aumentos. En los cortes de las retinas del día y la noche, se observa que tanto los rabinos, como los conos cristalinos y la membrana basal, se encuentran teñidos de color púrpura, es decir, presentan una reacción positiva a PAS, lo que indica que éstas células poseen depósitos de glucógeno. Los conos cristalinos se encuentran desprendidos del resto del tejido. Puede observarse el pigmento proximal dentro de las células retinulares, este se encuentra disperso en las retinas adaptadas a la luz y retraído hacia los axones en las células adaptadas a la oscuridad, en estas retinas, se observa que queda un poco de pigmento por encima de la membrana basal. Los núcleos de las células retinulares están teñidos de color azul. Cerca de la membrana basal destacan zonas más oscuras, posiblemente sean células tapetales, sin embargo debido a la posición del pigmento proximal no se logran apreciar en su totalidad.

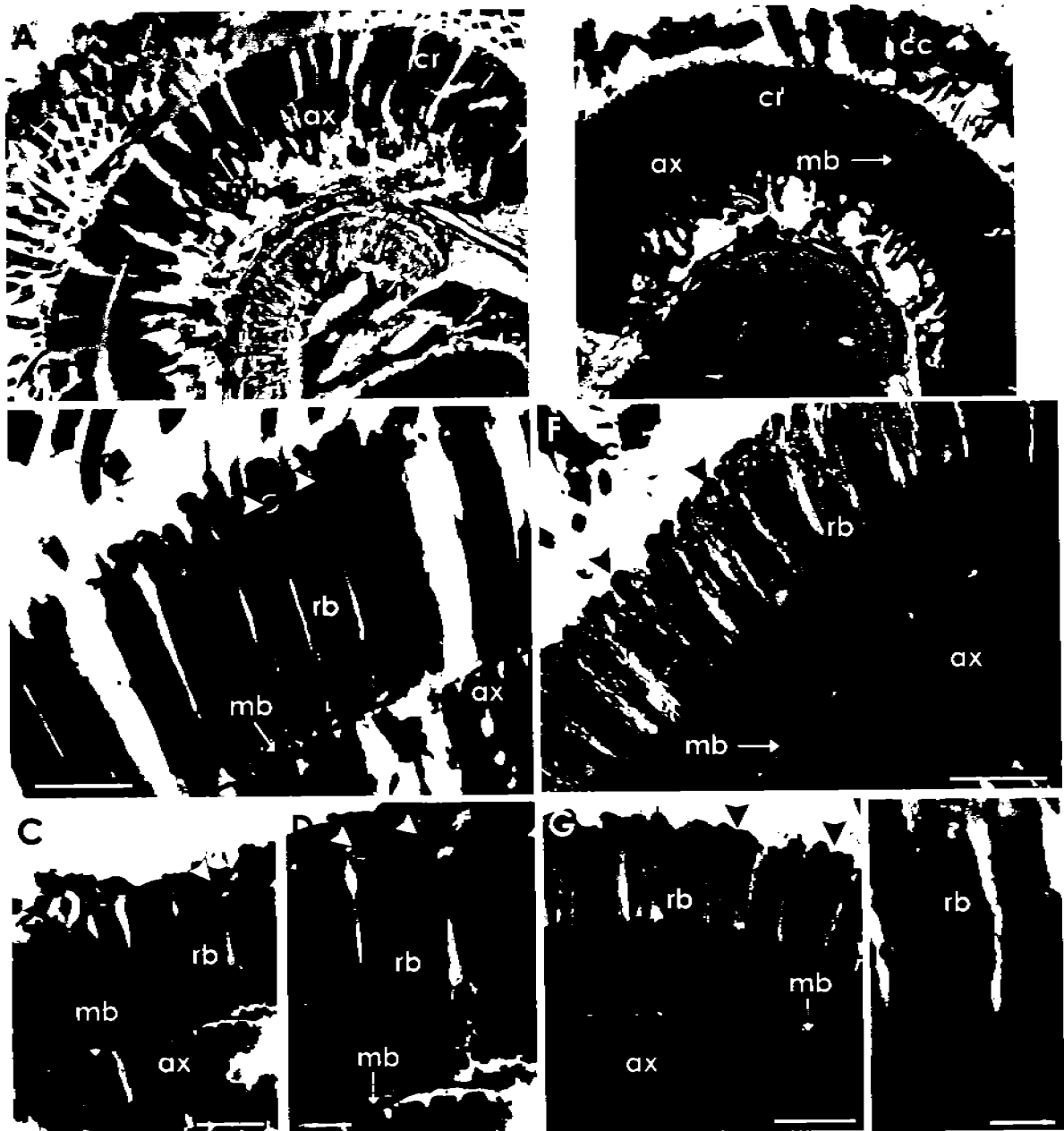


Figura 15. Microfotografías de cortes longitudinales de tallos ópticos del acicil *Procambarus clarkii*. **A, B, C** y **D** corresponden a tallos ópticos de aciciles adaptados a la luz, se aprecia la dispersión del pigmento proximal a lo largo de las células retinulares. **E, F, G** y **H**, corresponden a tallos ópticos de aciciles adaptados a la oscuridad, se aprecia la retracción del pigmento proximal hacia los axones de las células retinulares (ax), un poco de pigmento proximal queda por encima de la membrana basal (mb). Tanto en los tallos ópticos adaptados a la luz como en los adaptados a la oscuridad se observa una reacción positiva PAS en los conos cristalinos (cc), rabdomo (rb), membrana basal (mb) y lámina ganglionar (lg). **A**, Barra: 200  $\mu$ m. **B**, Barra: 50  $\mu$ m. **C**, Barra: 50  $\mu$ m. **D**, Barra: 20  $\mu$ m. **E**, Barra: 200  $\mu$ m. **F**, Barra: 50  $\mu$ m. **G**, Barra: 50  $\mu$ m. **H**, Barra: 20  $\mu$ m. Las puntas de flecha señalan los núcleos teñidos de color azul de las células retinulares (cr). Las puntas de flecha señalan algunos núcleos de las cr teñidos de color azul.

## 8. DISCUSIÓN.

Los resultados de este trabajo demuestran un efecto de la D-glucosa sobre la amplitud del ERG, en sus dos componentes, H-I y H-II; así como sobre la posición del pigmento distal. Este efecto depende de la hora del día y está determinado por el umbral de sensibilidad a la luz reportado por otros autores para esta misma especie, por lo que parece ser de naturaleza circadiana (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002).

En esta tesis se emplearon cuatro diferentes concentraciones de glucosa, dos por debajo de los niveles fisiológicos basales que se han reportado en otras especies de acociles, *Orconectes limosus* (Kallen et al., 1990; Santos et al., 2001) y *Astacus leptodactylus* (Gorgels-Kallen y Voortter, 1985; Lorenzon et al., 2004) y dos que se encuentran dentro de los niveles fisiológicos basales de éstas mismas especies. Por otra parte, trabajos de nuestro laboratorio han reportado cambios nictemerales en la concentración de glucosa en la hemolinfa de la especie *Procambarus clarkii*, estos valores oscilan a lo largo del día de 2 a 8 mg/dl (Fanjul-Moles y Escamilla-Chimal, 2005).

Como ya se mencionó, en los acociles los cambios en la sensibilidad visual que se manifiestan en la amplitud del ERG, así como los niveles de concentración de glucosa en hemolinfa, siguen un patrón rítmico circadiano con acrofase o pico nocturno (Aréchiga et al., 1993; Kallen et al., 1988). El ritmo de sensibilidad visual (amplitud del ERG) depende esencialmente de la actividad eléctrica de los fotorreceptores en respuesta a estímulos luminosos; no obstante, la posición de los pigmentos de blindaje, al permitir o impedir la entrada de fotones influye sobre la respuesta de los mismos.

### 8.1. Efecto de la D-glucosa sobre la amplitud del ERG:

En condiciones control durante la noche, los valores de la amplitud de los dos componentes del ERG, H-I y H-II, se mantienen constantes a lo largo del experimento (Fig. 10A). Por el contrario, durante el día hay una disminución en la amplitud durante el tiempo en el cual se suspende la perfusión, este decremento no es estadísticamente significativo; al reiniciar la perfusión los valores de la amplitud comienzan a incrementar manteniéndose en valores de bajo voltaje (Fig. 9A). Este ligero decremento observado en la amplitud del ERG

durante el día en los primeros 60 minutos de registro (estadísticamente no significativo), podría ser debido a un efecto circadiano sobre la amplitud del ERG. Este decremento no se observa al aplicar glucosa 0.22 y 0.44 mM, por el contrario, la amplitud aumenta (Fig. 9D y E), sin embargo, este incremento no es estadísticamente significativo cuando se compara con los experimentos control (Fig. 9A). Durante la noche, la glucosa incrementa la amplitud del ERG a las concentraciones 0.22 y 0.44 mM (Fig. 10D y E). A pesar de que el análisis estadístico no reveló diferencias significativas al comparar los valores de amplitud obtenidos con glucosa 0.22 y 0.44 con los experimentos control (Fig. 10A), quizá debido a la varianza de los datos, sí encontramos diferencias intraexperimentales estadísticamente significativas al comparar los valores de amplitud del minuto -10 (antes de la aplicación de glucosa) con los minutos 20, 40 y 60 (durante la incubación con glucosa) de los experimentos donde se aplicó glucosa 0.44 mM (Fig. 10E). Esto sugiere que la glucosa a concentraciones que están dentro del rango fisiológico basal (0.22 y 0.44 mM) funcionan como un sustrato metabólico para el mantenimiento de la actividad funcional de la retina. Este carbohidrato podría actuar, sobre la conductancia de las células fotorreceptoras durante la noche subjetiva, como se ha demostrado en otros trabajos realizados en mamíferos (López y Sannita, 1997; Macaluso et al., 1992; Niemeyer, 1997). El efecto de la glucosa observado únicamente en la noche y no en el día puede explicarse como un efecto circadiano, determinado por los cambios en la sensibilidad de la retina a la luz. Existen varios factores intrínsecos a los fotorreceptores, mencionados en la introducción, que determinan una menor fotosensibilidad durante el día. Estos factores incluyen los cambios en el potencial de membrana (Miller y Glantz, 2000); así como los mecanismos de translocación de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$  de las proteínas G del tipo  $G_q$ , desde las membranas rabadómicas hacia el citosol en la luz y desde el citosol a las membranas en la oscuridad, observados por Terakita y colaboradores (1996 y 1998); cambios en el tamaño y forma del rabadomo debido a la destrucción y resíntesis de la membrana, (Shaw y Stowe, 1982, Eguchi, 1965), incluso se ha encontrado en el cangrejo *Hemigrapsus sanguineus* un incremento en el número de vesículas que contienen opsina en las células retinulares al anochecer (Matsushita et al., 1999). Esto explicaría la falta de efecto de la glucosa sobre la sensibilidad de la retina (reflejada en la amplitud del ERG) durante el día. El aumento en la amplitud del ERG

debido a la aplicación de glucosa durante la noche, posiblemente se deba a una contribución de la energía obtenida del metabolismo oxidativo de la glucosa en forma de ATP y GTP. Posiblemente los productos del catabolismo de la glucosa sean utilizados en el proceso de fototransducción como se ha demostrado en otros trabajos experimentales en donde la energía que se requiere este proceso es usada para el transporte activo del sodio (por la  $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$  ATPasa) que entra a las células fotorreceptoras como respuesta a la fotoestimulación, manteniendo a las células en estado excitable; además, la síntesis de enlaces fosfato de alta energía involucrada en la síntesis de GMPc también requiere una cantidad apreciable de energía. El GTP está involucrado en la activación de las proteínas G involucradas en el proceso de fototransducción, así como en la producción de GMPc por la guanilato ciclasa lo que permite que canales de GMPc se abran durante el proceso de fototransducción (Ames III et al., 1992; Winkler, 1981).

## **8.2. Efecto de la D-glucosa sobre la posición de los pigmentos de blindaje:**

Como ya se mencionó en el método, las retinas aisladas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad constante durante todo el experimento. Como puede observarse en la figura 15, dos horas después de mantener la retina aislada en condiciones de oscuridad constante, antes de la aplicación de la solución de glucosa, el PD queda paralizado en la posición de adaptación a la oscuridad o a la luz, dependiendo de la hora del día en la cual se haya realizado la disección. En las retinas del día permanece en una posición de adaptación a la luz (disperso), en tanto que en las retinas de la noche subjetiva, el PD permanece en una posición de adaptación a la oscuridad (retraído). Probablemente lo anterior se deba a la secreción circadiana de las dos hormonas responsables de la migración del PD, la PDH en el día y la RPCH en la noche, ambas liberadas del complejo órgano X – glándula sinusal. Aunque en las retinas aisladas no se encuentra este complejo responsable de la síntesis y liberación de ambas hormonas, estas podrían haber quedado en la retina aislada después de la disección y por lo tanto actuar sobre la dispersión y/o retracción del PD retiniano, durante el día y la noche. Por su parte el PP, permanece en una posición de adaptación a la luz en las retinas disectadas tanto en la noche como en el día. Se ha propuesto que el PP migra como una respuesta directa de los fotorreceptores a la luz y a la oscuridad (Frixione, 1979)

y varios trabajos de los mismos autores demuestran que el PP no pierde la capacidad de migrar dependiendo de las condiciones lumínicas en las retinas aisladas (Frixione et al., 1979; Frixione y Pérez-Olvera, 1991; Noguerón y Aréchiga, 1986). Los resultados de esta tesis parecen contradecir esta propuesta, ya que el PP de las retinas de la noche subjetiva permanece en estado de adaptación a la luz a pesar de que las retinas aisladas permanecieron dos horas en oscuridad constante. Otros autores (Frixione et al., 1979), ya habían observado la paralización del PP en el estado de adaptación a la luz (disperso) al dañar los axones de las células retinulares proponiendo métodos de disección similares a los utilizados en esta tesis, lo cual nos podría hacer descartar esta hipótesis. Otra explicación para la paralización del PP en estado de adaptación a la luz es quizá la falta de algún substrato neural responsable de la migración, es decir, la falta de una vía eferente de un reflejo responsable de la posición de los gránulos de pigmento proximal. Las únicas fibras eferentes que interactúan con los axones de las células retinulares en la lámina ganglionaris se originan en la médula externa (Nässel, 1977), la cual es eliminada en las preparaciones de retina aislada. Se han localizado axones inmunopositivos a 5-HT cerca de los axones de las células retinulares (Aréchiga et al., 1990; Escamilla-Chimal et al., 2001). La 5-HT induce la retracción del pigmento proximal, así mismo, aumenta la sensibilidad de los fotorreceptores a la fotoestimulación, actuando sobre la conductancia de los mismos (Aréchiga et al., 1990).

Después de la aplicación de glucosa 0.44 mM a las retinas aisladas durante la noche, tanto el PP como el PD se dispersan; el IPP=0.89 y el IPD=0.73, lo que significa que el 89% de la distancia que hay desde el extremo de las células retinulares hasta la membrana basal se encuentra cubierto con pigmento, mientras que el 73% de la distancia que existe entre la córnea y la membrana basal está cubierta con pigmento distal, lo que implica que el rabdomo se encuentra blindado. Se ha reportado que el IPP puede tomar valores de 0.10-0.15 en estado de adaptación a la oscuridad, es decir, que una fracción de pigmento usualmente permanece sobre la membrana basal después de la agregación normal, mientras que en estado de adaptación a la luz toma valores de 1.0. Por su parte el IPD usualmente toma valores de 0.65 a 0.75 durante la adaptación a la luz en tanto que en la adaptación a la oscuridad puede tomar valores de 0.1 (Frixione y Aréchiga 1981; Garfias et al., 1985; Olivo



y Chrismer, 1980; Porras et al., 2001; Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982). 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). El efecto de la glucosa solo es reversible para el pigmento distal, ya que el pigmento proximal continúa en la misma posición dispersa aún después del lavado.

Estos resultados indican que la glucosa 0.44 mM tiene un efecto sobre la posición del pigmento distal, promoviendo su dispersión durante la noche. Lo anterior contradice lo encontrado en los registros del ERG, ya que la dispersión del PD y PP conlleva a una menor entrada de fotones (Fig. 15) y sin embargo, el ERG aumenta, H-I aumenta un 63% y H-II un 43% (Fig. 10E). Esto solo lo podemos explicar como un efecto circadiano de la glucosa sobre el umbral de las células retinulares, que son capaces de aumentar su sensibilidad a la luz (aumento en la amplitud del ERG) a pesar de la menor entrada fotónica.

Los efectos contradictorios sobre la posición del PD, sugieren una acción de la glucosa sobre intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , estos intercambiadores se han descrito en células pancreáticas de ratas (Ximenes et al., 2003), en fotorreceptores de *Drosophila* (Wang et al., 2005) y el fotorreceptor ventral de *Limulus* (O'Day et al., 1991), en células cardiacas (Hilgemann y Ball, 1996) y fotorreceptoras de mamíferos, en neuronas de calamar (He et al., 1998) y en el músculo axial, cardiaco y glándula antenal del acocil *Procambarus clarkii* (Stiner et al., 2002). Dichos intercambiadores acoplan una expulsión citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  a la entrada de  $\text{Na}^+$  al interior de la célula, favoreciendo la despolarización de la misma. En las células  $\beta$  pancreáticas, la glucosa que entra es catabolizada incrementándose los niveles de ATP, canales de  $\text{K}^+$  sensibles a ATP se cierran y la membrana plasmática se despolariza, como consecuencia se abren canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje y entra  $\text{Ca}^{2+}$ , al incrementarse los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  el proceso de exocitosis de insulina se activa. Se ha demostrado en éstas células que la glucosa estimula la transcripción, expresión y actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Ximenes et al., 2003). Por otra parte la función del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cardiaco, puede invertirse a diferentes potenciales de membrana (despolarización) y dependiendo del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ , es decir, puede meter  $\text{Ca}^{2+}$  y sacar  $\text{Na}^+$  (Kang y Hilgemann, 1998). Se ha observado que tanto el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de las células cardiacas como el de las neuronas de calamar,

dependen de ATP (He et al., 1998). En las células mesangiales del riñón, la exposición a una concentración alta de glucosa induce un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y disminuye la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , lo cual parece ocurrir a nivel de expresión de proteínas (Song et al., 2003). Los resultados de esta tesis parecen sugerir la existencia de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  sensibles a glucosa tanto en las células del pigmento distal como en los fotorreceptores de la retina de *P. clarkii* como los que se han propuesto para el fotorreceptor ventral de *Limulus* (O'Day y Gray-Keller, 1989; O'Day et al., 1991). La inversión de estos intercambiadores a diferentes potenciales de membrana permitiría acoplar los mecanismos de fototransducción y conductancia iónica al movimiento de los efectores pigmentarios responsables del reflejo pseudopupilar. Este reflejo requieren entrada o salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y podría estar asociado a la acción de la RPCH (Porras et al., 2001) o de la PDH. Así, durante la noche, bajo el efecto de la RPCH, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la retracción pigmentaria y durante el día, la carencia de RPCH invierte el fenómeno con la consecuente dispersión pigmentaria. Los resultados de este trabajo indican que la glucosa podría invertir el efecto que posiblemente tiene la presencia o ausencia de la RPCH sobre el intercambiador. Varios trabajos sobre el movimiento de pigmentos en eritróforos han logrado determinar que la dispersión de pigmento no sólo es obtenida por la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sino que además, un incremento en los niveles de AMPc intracelular induce la dispersión de los gránulos de pigmento, posiblemente las proteínas cinasas que dependen de AMPc fosforilan a la cinesina, molécula motor responsable del transporte de vesículas y organelos, permitiendo así el transporte de los gránulos de pigmento (Kotz y McNiven, 1994; Nery et al., 1997).

### **8.3. Depósitos de glucógeno en retina.**

La utilización de glucosa como un substrato metabólico retiniano debe de llevar implícito no solo la utilización procedente de la circulación sistémica, sino quizá la capacidad de utilizar vías anabólicas para acumular depósitos de carbohidratos, por lo anterior en esta tesis se investigó a nivel histológico la presencia de depósitos de glucógeno en la misma retina. En los cortes histológicos de las retinas adaptadas a la luz y a la oscuridad del acocil *Procambarus clarkii*, muestran que el rabdomo presenta una tinción

positiva a la reacción PAS (Fig. 17), por lo que se podría decir que estas estructuras tienen sus propios depósitos de glucógeno; lo que podrían hacer a la retina metabólicamente autosuficiente en ciertos límites. En estos cortes, no se pudieron observar a las células tapetales, consideradas células gliales y en las que se ha reportado la presencia de la CHH (Escamilla-Chimal et al., 2001), debido a la posición del pigmento proximal dentro de las células retinulares en el día y la noche, sin embargo, tanto el rabadomo como las células del cono cristalino, así como la membrana basal, presentan una reacción positiva, indicando la existencia de depósitos de glucógeno en la retina. En los insectos, las células gliales son las que catabolizan la glucosa, a partir de depósitos intracelulares de glucógeno transformándola en alanina, la cual es utilizada por los fotorreceptores durante la fotoestimulación (Tsacopoulos, 2002). La positividad a la reacción PAS en los rabadomos de *P. clarkii*, podría indicar una utilización directa de la glucosa por los fotorreceptores.

## 9. CONCLUSIONES.

- La D-glucosa incrementa la sensibilidad de las células retinulares o fotorreceptoras, reflejada en la amplitud del ERG, en sus dos componentes, H-I y H-II.
- La D-glucosa tiene un efecto sobre las células del pigmento distal, promoviendo la dispersión de sus gránulos de pigmento, durante la noche.
- El efecto de la D-glucosa depende de la hora del día y está determinado por el umbral de sensibilidad a la luz, por lo que el efecto parece ser de naturaleza circadiana.
- Los resultados indican que la sensibilidad de las células fotorreceptoras depende en gran parte de los cambios en la conductancia de la membrana y no tanto de la posición de los pigmentos de blindaje.

Se requieren más experimentos que nos permitan corroborar la existencia del mecanismo enzimático responsable de las vías anabólicas como catabólicas para la utilización de la glucosa, a través de la determinación de la existencia en retina de las enzimas glucógeno fosforilasa y glucógeno sintasa. De igual forma se requieren experimentos que permitan determinar de qué forma la glucosa incrementa la respuesta eléctrica de las células fotorreceptoras.

## 10. ANEXO.

### Van Harreveld+HEPES:

Sustancia	mM
NaCl .....	197.77
KCl .....	5.37
CaCl <sub>2</sub> .....	13.51
MgCl <sub>2</sub>	2.63
.....	
HEPES .....	10

La solución se ajusta a un pH de 7.55

### Ácido periódico de Schiff:

Las soluciones que se emplearon para preparar el reactivo de Ácido periódico de Schiff (PAS), fueron las siguientes:

- Solución ácido periódico al 5%
    - Ácido periódico ..... 0.5 g
    - Agua destilada ..... 100.0 ml
  - Solución de ácido clorhídrico 1N
    - Ácido clorhídrico, g. esp. 1.19 ..... 83.5 ml
    - Agua destilada ..... 916.5 ml
  - Reactivo Schiff 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 24 hrs y adicionar carbón activado (0.5 g). Agitar durante 1 min, luego filtrar a través de papel de filtro grueso, hasta que la solución aparezca incolora.

- Solución de hematoxilina de Mayer ó solución de Hematoxilina de Harris.

Procedimiento para la obtención de la reacción:

1. Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
2. Oxidar en la solución de ácido periódico durante 5 minutos.
3. Enjuagar en agua destilada.
4. Colocar en el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos.
5. Lavar con agua corriente tibia durante 10 minutos.
6. Contrastar con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, o la solución d hematoxilina de Harris duante 6 minutos.
7. Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
8. Deshidratar y aclarar a través de alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios, 2 minutos cada uno.
9. Montar con un medio resinoso.

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD (2002) El citoesqueleto. En: *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 844-920.
- Ames III A, Li Y-Y, Heher EC y Kimble CR (1992) Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport. *J. Neurosci.* 12(3): 840-853.
- 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, Fernández-Quiroz F, Fernández de Miguel F y Rodríguez-Sosa L (1993) The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* 10(1): 1-19.
- Aréchiga H y Fuentes B (1970) Correlative changes between retinal pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist.* 13: 137.
- Aréchiga H y Mena F (1975) Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 52: 581-584.
- Aréchiga H, Cortes JL, García U y Rodríguez-Sosa L (1985) Neuroendocrine correlates of circadian rhythmicity in crustaceans. *Am. Zool.* 25: 265-274.
- Aréchiga H, Bafuelos E, Frixione E, Picones A y Rodríguez-Sosa L (1990) Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150: 123-143.
- Aréchiga H y Rodríguez-Sosa L (1997) Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J. mar. Biol. Ass. U.K.* 77: 17-29.
- Aréchiga H y Rodríguez-Sosa L (1998) Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265: 1819-1823.
- Aréchiga H y Rodríguez-Sosa L (2002) Distributed circadian rhythmicity in the crustacean nervous system. En: *The circadian nervous system*. (ed. Wiese). C. Springer. pp. 113-122.
- Aréchiga H y Wiersma AG (1969) Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71-85.
- Aschoff J (1984) A survey in biological rhythm. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4. Biological rhythms (Ed. Aschoff). Plenum Press. Nueva York.
- Ashcroft SJ y Ashcroft FM (1990) Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* 2: 197-214.

- Barrera-Mera B, Cibrian-Tovar J y García-Díaz DE (1980) The role of protocerebrum in the modulation of circadian rhythmicity in the crayfish visual system. *Brain Res. Bull.* 5: 667-672.
- Bauman O y Walz B (1989) Calcium- and inositol polyphosphate-sensitivity of the calcium-sequestering endoplasmic reticulum in the photoreceptor cells of the honey bee drone. *J. Comp. Physiol. A.* 165: 627-636.
- Brazitikos PD y Tsacopoulos M (1991) Metabolic signaling between photoreceptors and glial cells in the retina of the drone (*Apis mellifera*). *Brain Res.* 567: 33-41.
- Castañón-Cervantes O, Battelle BA y Fanjul-Moles ML (1999) Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.* 202: 2823-2830.
- Chang ES, 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. *J. Comp. Neurol.* 414: 50-56.
- Coffe V, Carbajal RC y Salceda R (2004) Glycogen metabolism in the rat retina. *J. Neurochem.* 88: 885-890.
- da Silva SF, Taffarel M y Allodi S (2001) Crustacean visual system: an investigation on glial cells and their relation to extracellular matrix. *Biol. Cell.* 93: 293-299.
- Dimitracos SA y Tsacopoulos M (1985) The recovery from a transient inhibition of the oxidative metabolism of the photoreceptors of the drone (*Apis mellifera*) *J. Exp. Biol.* 119: 165-181.
- Eguchi E (1965) Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 66: 441-430.
- Elofsson R y Odseius R (1975) The anostracan rhabdom and the basement membrane. An ultrastructural study of the *Artemia* compound eye (Crustacea). *Acta zool. (Stockh).* 56: 141-153.
- 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. *J. Exp. Biol.* 204: 1073-1081.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 283-290.



- 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. *J. Gen. Physiol.* 98: 497-515.
- Fanjul-Moles ML y Prieto-Sagredo JA (2003) The circadian system of crayfish: a developmental approach. *Micr. Res. Tech.* 60: 291-301.
- Fanjul-Moles ML y Escamilla-Chimal EG (2004) The retina of crayfish *Procambarus clarkii* shows crustacean hyperglycemic hormone circadian variations. En: *37th Annual General Meeting of the European Brain and Behavior Society*.
- Fanjul-Moles ML, Escamilla-Chimal EG, Gloria-Soria A y Hernández-Herrera G (2004) The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. *J. Exp. Biol.* 207: 1453-1460.
- Fingerman M (1992) Glándulas y secreción. En: *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea (eds. Barnes RD y Harrison FW) Wiley-Liss Inc., Nueva York. pp. 345-394.
- 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 pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* 56C: 5-8.
- Frixione E (1983) Firm structural associations between migratory pigment granules and microtubules in crayfish retinula cells. *J. Cell Biol.* 96: 1258-1265.
- Frixione E, Aréchiga H y Tsutsumi V (1979) Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish. *J. Neurobiol.* 10(6): 573-590.
- Frixione E y Aréchiga H (1981) Ionic dependence of screening pigment migrations in crayfish retinal photoreceptors. *J. Comp. Physiol.* 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. *J. Exp. Biol.* 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. *J. Neurobiol.* 22(3): 238-248.
- Frixione E y Ruiz L (1988) Calcium uptake by smooth endoplasmic reticulum of peeled retinal photoreceptors of the crayfish. *J. Comp. Physiol. A.* 162: 91-100.
- Frixione E y Tsutsumi V (1982) Photomechanical responses in crustacean retinula cells: the role of microtubules. *Vision Res.* 22: 1507-1514.

- 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. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 82(2): 385-389.
- García E, Benítez A y Onetti CG (1993) Responsiveness to D-glucose in neurosecretory cells of crustaceans. *J. Neurophysiol.* 70(2): 758-764.
- Garfias A, Rodríguez-Sosa L y Aréchiga H (1995) Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone. *J. Exp. Biol.* 198: 1447-1454.
- Garger AV, Richard EA y Lisman JE (2004) The excitation cascade of *Limulus* ventral photoreceptors: guanylate cyclase as the link between  $\text{InsP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release and the opening of cGMP-gated channels. *Neurosci.* 5: 1-11.
- 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) Behavior. En: *Biology of 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. *J. Exp. Biol.* 200: 1421-1431.
- Goodwin TW (1960) Biochemistry of pigments. En: *The physiology of Crustacea*. Vol. 1: Metabolism and growth (eds. Waterman TH) Academic Press. Nueva York.
- 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). *J. Morph.* 170: 347-355.
- Gorgels-Kallen JL y Voorter CEM (1985) The secretory dynamics of the CHH-producing cell group in the eyestalk of the crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the course of the day/night cycle. *Cell. Tiss. Res.* 241: 361-366.
- Govin CK (1992) Nervous system. En: *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea (eds. Barnes RD y Harrison FW) Wiley-Liss Inc., Nueva York. pp. 395-438.
- Hardin PE (2000) From biological clock to biological rhythms. *Genome Biol.* 1(4): 1-5.
- He Z, Tong Q, Quednau BD, Philipson KD y Hilgemann DW (1998) Cloning, expression, and characterization of the Squid  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX-SQ1). *J. Gen. Physiol.* 111: 857-873.
- Hernández-Falcón J y Fuentes-Pardo B (1991) Crayfish reticular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 100(4): 823-832.

- Hernández OH y Fuentes-Pardo B (2001). Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of electrical response to light in the crayfish. *Biological Rhythm Research*. 32(2): 125-144.
- Hilgemann DW y Ball R (1996) Regulation of cardiac  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  exchange and KATP potassium channels by PIP2. *Science*. 273(5277): 956-959.
- Huner JV (2002) *Procambarus*. En: *Biology of freshwater crayfish*. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp. 541-574.
- Kallen JL, Abrahamse L y Van Herp F (1990) Circadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *Biol. Bull.* 179: 351-357.
- Kallen JL, Rigiani NR y Trompenaars HJAJ (1988) Aspects of entrainment of CHH cell activity and hemolymph glucose levels in crayfish. *Biol. Bull.* 175: 137-143.
- Kang TM y Hilgemann DW (2004) Multiple transport modes of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Nature*. 427: 544-548.
- Kotz KJ y McNiven MA (1994) Intracellular calcium and cAMP regulate directional pigment movements in teleost erythrophores. *J. Cell Biol.* 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.
- Lee CY, Yau SM, Liao CS y Huang WJ (2000) Serotonergic regulation of blood glucose levels in the crayfish, *Procambarus clarkii*: site of action and receptor characterization. *J. Exp. Zool.* 286: 596-605.
- 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.
- Lo MV y Pak WL (1981) Light-induced pigment granule migration in the reticular cells of *Drosophila melanogaster*. Comparison of wild type with ERG-defective mutants. *J. Gen. Physiol.* 77: 155-175.
- López L y Sannita WG (1997) Glucose availability and the electrophysiology of the human visual system. *Clin. Neurosci.* 4(6): 336-340.
- Lorenzon S, Brezovec S y Ferrero EA (2004) Species-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (Crustacea). *J. Exp. Zool. A.* 301(9): 727-736.

- Macaluso C, Onoe S y Niemeyer G (1992) Changes in glucose level affect rod function more than cone function in the isolated, perfused cat eye. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 33 (10): 2798-2808.
- 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.
- Mangerich S, Keller R, Dirksen H, Ranga-Rao K y Riehm JP (1987) Immunocytochemical localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide-immunoreactive material in the eyestalks of decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*. *Cell Tissue Res.* 250: 365-375.
- Matsushita A, Arikawa K y Eguchi E (1999) Appearance of opsin-containing vesicles as rhabdomic precursors and their incorporation into the rhabdom around dusk in the compound eye of the crab *Hemigrapsus sanguineus*. *Zool. Sci.* 16: 25-34.
- McNiven MA y Ward JB (1988) Calcium regulation of pigment transport in vitro. *J. Cell Biol.* 106: 111-125.
- Miller CS y Glantz RM (2000) Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish. *Visual Neurosci.* 17: 353-368.
- Moreno-Sáenz E, Hernández-Falcón J y Fuente-Pardo B (1987) Role of sinus gland in crayfish circadian rhythmicity-II. ERG circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 87(1): 119-125.
- Naka K y Kuwabara M (1959) Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 36: 51-61.
- Nässel DR (1977) The retina and retinal projection on lamina ganglionaris of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Neurol.* 167: 341-360.
- Nässel y Waterman (1979) Massive diurnally modulated photoreceptor membrane turnover in crab light and dark adaptation. *J. Comp. Physiol. A.* 131: 205-216.
- Nemaniac P (1975) Fine structure of the compound eye of *Porcellio scaber* in light and dark adaptation. *Tissue and Cell.* 7: 453-468.
- Nery LEM, Alves da Silva M, Josefsson L y Lauro Castrucci AM (1997) Cellular signalling of PCH-induced pigment aggregation in the crustacean *Macrobrachium potiana* erythrophores. *J. Comp. Physiol. B.* 167: 570-575.
- Nery LEM y Castrucci AML (1997) Pigment cell signalling for physiological colour change. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 118: 1135-1144.

- Niemeyer G (1997) Glucose concentration and retinal function. *Clin. Neurosci.* 4(6): 327-335.
- Noguerón I y Aréchiga H (1986) Ritmo circádico de sensibilidad a la luz en la retina aislada de acocil. En: *XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*.
- Oakley B y Shafer R (1992) Receptor processes. 6.1. Visual reception. En: *Experimental neurobiology. A laboratory manual*. (eds. Oakley B y Shafer R). The University of Michigan Press. pp. 166-173.
- O'Day PM y Gray-Keller MP (1989) Evidence for electrogenic  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchange in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 93: 473-492.
- O'Day PM, Gray-Keller MP y Lonergan M (1991) Physiological roles of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 97: 369-391.
- Olivaux C, Dirksen 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.
- Olivo RF y Chrismer KL (1980) Spectral sensitivity of screening-pigment migration in retinula cells of the crayfish *Procambarus*. *Vision Res.* 20: 385-389.
- Olivo RF y Larsen ME (1978) Brief exposure to light initiates screening pigment migration in retinula cells of the crayfish, *Procambarus*. *J. Comp. Physiol.* 125: 91-96.
- Ollivaux C y Soyez D (2000) Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ - sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5106-5114.
- Page, TL y Larimer J (1975) Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97: 81-86.
- Pérez-León J y Salceda R (1998) El proceso visual en vertebrados e invertebrados. En: *Biología funcional de los animales*. (eds. Fanjul ML, Hiriart M, Fernández de Miguel F) Siglo XXI editores. pp. 313-345.
- Porras MG, López-Colomé AM y Aréchiga H (2001) Red pigment-concentrating hormone induces a calcium-mediated retraction of distal retinal pigments in the crayfish. *J. Comp. Physiol. 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 R (1985) Pigmentary effectors. En: *The Biology of crustacea*. Vol. 9. Integument, pigments and hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, Nueva York. pp. 395-463.

- Roach JLM (1976) Junctional structures in the crystalline cone of the crayfish compound eye. *Cell Tiss. Res.* 173: 309-314.
- Rodríguez-Sosa L, Calderón J, Becerra E y Aréchiga H. (1994) Regional distribution and immunocytochemical localization of red pigment concentrating hormone in the crayfish eyestalk. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 443-456.
- Rodríguez-Sosa L y Aréchiga H (1982) Range of modulation of light sensitivity by accessory pigments in the crayfish compound eye. *Vision Res.* 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. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 109(1): 101-108.
- 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.
- Sandeman DC (1982) Organization of the central nervous system. En: *The biology of crustacea*. Vol. 3 Neurobiology: Structure and function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, Nueva York. pp. 1-62.
- Sandeman DC, Sandeman RE y Couet HG (1990) Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21(4): 619-629.
- Santos EA y Keller R (1993a) Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism current perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. 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. *J. Comp. Physiol. B.* 163: 374-379.
- Santos EA, Keller R, Rodríguez E y López L (2001) Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. *J. Med. Biol. Res.* 34: 75-80.
- Sarojini R, Nagabhushanam R y Fingerman M (1995) Dopaminergic and encephalinergetic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 160-170.
- Sedlmeier D (1982) The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). *Gen. Comp. Endocrinol.* 47: 426-432.
- Sedlmeier D (1985) Mode of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Am. Zool.* 25: 223-232.

- Shaw SR y Stowe S (1982) Photoreception. En: *The Biology of crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC) Academic Press, Nueva York. pp. 292-356.
- Schraermeyer U (1992) Evidence for a pathway of distal screening pigment granules across the basement membrane of the crayfish photoreceptor. *Z. Naturforsch. C*. 47: 453-464.
- Sokal RR y Rohlf FJ (2000) Biometry. *The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and Company. Nueva York.
- 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. *J. Biol. Chem.* 269(28): 18295-18298.
- 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 neurosecretory cells. *J. Biol. Chem.* 275(48): 37870-37875.
- Stieve H y Clanßen-Linke I (1980) The effect of changed extracellular calcium and sodium concentration on the electroretinogram of the crayfish retina. *Z. Naturforsch. C*. 35: 308-318.
- Stiner LM, Zhang Z y Wheatly MG (2002) Localization and molecular characterization of the crayfish NCX. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 976: 77-80. Terakita A, Takahama H, Tamotsu S, Suzuki T, Hariyama T, Tsukahara Y (1996) Light-modulated subcellular localization of the alpha subunit of GTP-binding protein Gq in crayfish photoreceptors. *Visual Neurosci.* 13: 539-547.
- Terakita A, Takahama H, Hariyama T, Suzuki T y Tsukahara Y (1998) Light-regulated localization of beta-subunit of Gq-type G-protein in the crayfish photoreceptors. *J. Comp. Physiol. A*. 183: 411-417.
- Tsacopoulos M, Coles JA y Van de Werbe G (1987) The supply metabolic substrate from glia to photoreceptors in the of the honeybee drone. *J. Physiol. (Paris)*. 82: 279-287.
- Tsacopoulos M y Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8727-8731.
- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL, Poitry S, Perrottet P y Veuthey AL (1997) The nutritive function of glia is regulated by signals released by neurons. *Glia*. 21: 84-91.

- Tsacopoulos M, Poitry-Yamate CL y Poitry S (1997) Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell. *J. Neurosci.* 17(7): 2383-2390.
- 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. *J. Neurosci.* 14(3): 1339-1351.
- Tsacopoulos M (2002) Metabolic signaling between neurons and glial cells: a short review. *J. Physiol.-Paris.* 96: 283-288.
- Van Herp F (1998) Molecular cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. En: *Recent advances in arthropod endocrinology* (eds. Coas GM y 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. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 130: 585-606.
- Vogt G (2002) Functional anatomy. En: *Biology of freshwater crayfish.* (ed. Holdich DM) Blackwell Science. pp. 53-143.
- Wang T, Xu H, Oberwinkler J, Gu Y, Hardie RC y Montell C (2005) Light activation, adaptation, and cell survival functions of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger CaX. *Neuron.* 45: 367-378.
- Winkler BS (1981) Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J. Gen. Physiol.* 77: 667-692.
- Ximenes HM, Kamagate A, Van Eylen F, Carpinelli A y Herchuelz A (2003) Opposite effects of glucose on plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger transcription, expression, and activity in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.* 278(25): 22956-22963.
- 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 387-398.