



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA HORMONA HIPERGLUCEMIANTE
DE CRUSTÁCEOS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE
GLUCOSA Y LA AMPLITUD DEL
ELECTRORETINOGRAMA EN LA RETINA DEL
ACOCIL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

REYNA FABIOLA CHÁVEZ MATÍAS



DIRECTOR DE TESIS: JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

Cd. Universitaria, D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	Página
1 Resumen	
2 Introducción	
2.1 Los ritmos biológicos	1
2.2 Hormona Hiperglucemiante de Crustáceos (CHH)	2
2.2.1 Actividades biológicas de la CHH	3
2.2.2 Síntesis de CHH	4
2.2.3 Modulación de CHH	4
2.2.4 Ritmo de la CHH	5
2.3 Metabolismo de glucosa	6
2.4 Modelo de estudio	
2.4.1 Procambarus Clarkii	6
2.4.2 Sistema neuroendocrino	6
2.4.3 Ritmos en acocil	7
2.4.3.1 Ritmos en retina	8
2.4.3.2 Amplitud del ERG	8
2.4.3.3 Movimientos de pigmentos	9
3 Planteamiento y Justificación del problema	11
4 Hipótesis	12
5 Objetivos	13
6 Material y Método	14
6.1 Registro del ERG	15
6.2 Cuantificación de glucosa	17
6.3 Análisis estadístico	18

7 Resultados	
7.1 Efecto de la CHH sobre la concentración de glucosa y la amplitud del ERG durante ZT3	20
7.2 Efecto de la CHH sobre la concentración de glucosa y la amplitud del ERG durante ZT15	24
7.3 Glucosa usada para la respuesta de los fotorreceptores	26
8 Discusión	
8.1 Efecto de la CHH durante ZT3	28
8.2 Efecto de la CHH durante ZT15	32
9 Conclusiones	34
10 Bibliografía	35

Resumen

El propósito en la presente tesis fue analizar el efecto de la Hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) sobre la amplitud del electroretinograma y sobre la concentración de la glucosa en la retina del acocil *Procambarus clarkii*, en dos puntos diferentes del día, uno en la escotofase y otro en la fotofase del ciclo luz oscuridad. Para esto se escogieron las horas ZT 3 y ZT 15. Para el registro electroretinográfico se tuvieron dos grupos experimentales para cada hora: retinas incubadas en CHH y sin la hormona. En el caso de la determinación de glucosa se tuvieron tres grupos, de igual manera para cada hora: incubadas en CHH con pulsos de luz, incubadas en CHH sin pulsos de luz y la condición control, retinas incubadas sin hormona. Se encontró que el efecto de la hormona depende de la hora del día, pues se observó que la CHH llevo a una disminución en la amplitud del ERG en ZT15, y a un aumento en ZT3. El efecto de la hormona en la concentración de glucosa fue aumentar los niveles de ésta en ZT3, mientras que en ZT15 solo hubo un aumento de glucosa en las retinas incubadas con CHH y que fueron expuestas a pulsos de luz. De manera que los resultados del presente me llevan a concluir que la CHH está actuando en las células de la retina al provocar la liberación de glucosa a partir de fuentes de glucógeno que existen en el interior de estas y que éste metabolito puede ser usado por los fotorreceptores para responder a pulsos de luz. A su vez la hormona posiblemente está modulando la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz, pues aumenta durante ZT 3 y disminuye durante ZT 15.

Introducción

Los ritmos biológicos

Los organismos a través del tiempo se han ido adaptando a los cambios del medio ambiente que habitan. Dentro de estos cambios se encuentran los ciclos geofísicos como el paso de día a noche, las estaciones del año, las mareas, incluso las fases de la luna. De las adaptaciones más notorias a los ciclos geofísicos son los cambios conductuales, fisiológicos y sensoriales que se repiten dentro de un intervalo de aproximadamente 24 horas. A estos cambios se les denomina ritmos circadianos (*circa= cercano*), estos tienen la característica de ser endógenos y de sincronizarse a un ciclo de 24 h. Existen también otros ritmos que son capaces de ajustarse a otros cambios cíclicos geofísicos, como los ritmos: circalunares, circamareales y los circaanuales (Sullivan *et al.*, 2009). Sin embargo en esta tesis solo me enfocaré en los ritmos circadianos.

Para poder seguir hablando de los ritmos circadianos, hay que definir lo que es un ritmo biológico, éste se define como todo aquel proceso fisiológico o conductual que se repite dentro de un determinado intervalo de tiempo. Ejemplo de esto es la actividad locomotora, la muda, la ingesta de comida, la reproducción, la migración y la hibernación.

Una de las características de los ritmos circadianos es que persisten bajo condiciones constantes, es decir sin la influencia de señales cíclicas del ambiente (luz-oscuridad, temperatura). Si algún cambio del tipo conductual, fisiológico, bioquímico o molecular persiste en condiciones constantes se dice que el ritmo es endógeno, esto quiere decir que son generados por osciladores endógenos. Estos osciladores pueden ser células, por ejemplo las del tipo nervioso, capaces de medir el tiempo y a su vez generar señales de tiempo; por lo que se dice que tienen una actividad rítmica auto-controlada. Estos ritmos endógenos son capaces de sincronizarse a señales ambientales externas, de dichas señales ambientales se conoce que la más importante es el ciclo día-noche o el ciclo luz-oscuridad, pues es capaz de sincronizar muchas de las funciones de los organismos (Aréchiga, 1993; Sullivan *et al.*, 2009).

Al estudiar un ritmo biológico, al igual que en cualquier oscilación, se deben definir y determinar algunos parámetros: amplitud, frecuencia y periodo. Donde el periodo es el intervalo de tiempo que transcurre para que una oscilación sea completada y frecuencia es el número de veces que se

repite dicha oscilación dentro de un intervalo de tiempo determinado, es decir el inverso del valor de la oscilación, siendo la amplitud la distancia existente entre la acrofase (el punto más alto) y la batifase (el punto más bajo) (Figura 1).

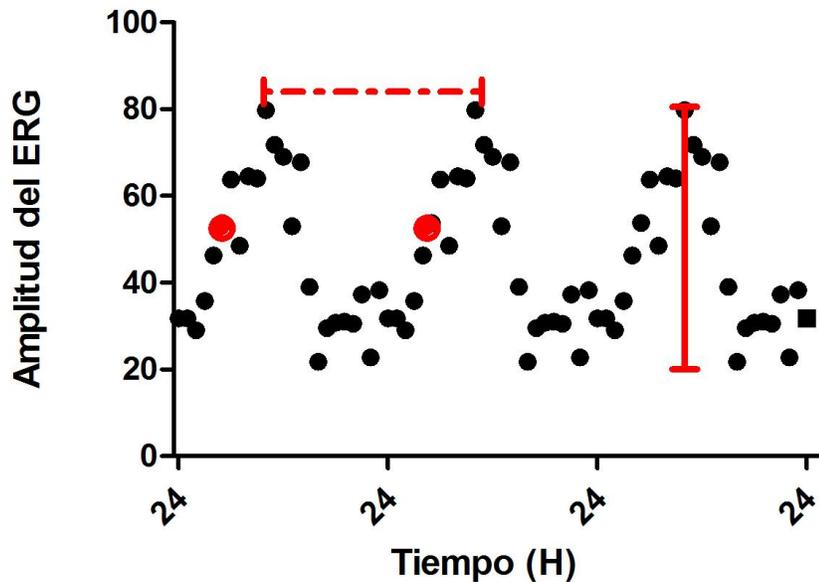


Figura 1. En ésta figura se muestran los parámetros a considerar en un ritmo biológico. Periodo (- - - -), Amplitud (—) y Frecuencia (●), donde los círculos señalan una fase particular del ritmo que se repite una vez, en un periodo de 24 horas; por lo que la frecuencia de dicha fase es de una vez por día. La figura se realizó a partir de un registro obtenido en el laboratorio.

Hormona hiperglucemiante de crustáceos

El control hormonal del metabolismo de glucosa en crustáceos comenzó a ser estudiado a partir de los descubrimientos de Abramowitz y colaboradores (1944); ellos encontraron que la inyección de extracto de tallo de ojo del cangrejo azul *Callinectes sapidu* provocó una rápida hiperglucemia. Al inicio fue nombrado como factor diabetogénico, posteriores caracterizaciones de este factor como conocer su solubilidad en agua, en etanol, en acetona y éter etílico, siendo en estos dos últimos insoluble; así como presentar termoestabilidad y recuperar su función después de haber sido expuesta a 100°C llevaron a concluir que la naturaleza de este factor u hormona era peptídica, recibiendo el nombre más tarde de: la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) (Kleinholz, 1966, 1967).

Posteriormente la CHH fue aislada de la glándula sinusal del cangrejo *Carcinus maenas* y caracterizada su secuencia por primera vez por Kegel en 1989 (citado por Webster, 2012).

Este péptido tiene un peso de 8 000 a 9 000 Da que está formado por 72 residuos de aminoácidos con 6 residuos Cys conservados. Ambos extremos se encuentran modificados, el extremo amino por un residuo de piroglutamato y el extremo carboxilo por una amida (Soyez, 1994).

Posteriormente se fueron identificando diversos péptidos en diferentes especies de crustáceos encontrando que en los componentes de esta familia la secuencia de aminoácidos es muy parecida por lo que se designó la superfamilia CHH con dos subfamilias: CHH tipo I en donde se clasifica la CHH con actividad hiperglucémica en sentido estricto, así como péptidos con actividad de transportadores de iones y CHH tipo II donde se incluyen péptidos como MIH y VIHs. Dichas subfamilias se dividen en base a las diferencias en sus genes y precursores respectivos. La secuencia de aminoácidos de estos presenta una homología del 60% (Webster, 2012; y Fanjul, 2006).

Dentro de la subfamilia CHH tipo I existen diferentes isoformas que se clasifican en CHH-A y CHH-B. Estas tienen una homología del 92% difiriendo solo en la configuración de un solo residuo de aminoácido en la posición 3 (L- o D-Phe). Algunos autores mencionan que ambas mantienen una actividad similar hiperglucemiante pero con diferentes respuestas en el curso del tiempo (Wei-Jun et al., 1997; Soyez, 1994); aunque otro autor menciona que la isoforma D-Phe es más potente en su efecto hiperglucemiante, donde esta misma en *Procambarus clarkii* es más potente en reprimir la síntesis de ecdysteroides (Webster, 2012).

Actividades biológicas de la CHH

La hormona hiperglucemiante de crustáceos es un péptido importante durante el desarrollo y la vida de los crustáceos pues tiene muchas actividades biológicas, algunas de estas coinciden con la función de otras hormonas. Entre sus funciones se encuentran el inhibir la muda, la reproducción, además de intervenir en funciones osmoregulatorias. Sin embargo su función principal parece ser la regulación del metabolismo de carbohidratos, pues cuando se aplica una inyección de CHH en un crustáceo se produce de inmediato una hiperglucemia en el organismo. Esta respuesta es iniciada rápidamente dentro de 15 a 20 minutos, y es sostenida por largos periodos entre 1 a 3

horas (Santos y Keller, 1993). Esta movilización de glucosa, de fuentes de glucógeno en el músculo y hepatopáncreas, provee de los requerimientos energéticos a los tejidos de los crustáceos.

Síntesis de CHH

En los crustáceos malacostracos la CHH, así como otros péptidos, son sintetizados en los somas de neuronas que se encuentran en el órgano X (OX) para posteriormente ser transportados vía axónica hacia el sistema neurohemal denominado glándula sinusal (GS) donde son almacenados por un tiempo y posteriormente secretados (Fanjul, 2006). Se conoce por medio de estudios inmunohistoquímicos que el mayor sitio de síntesis y liberación de péptidos de la superfamilia CHH en los crustáceos malacostracos es el sistema glándula sinus órgano X (OX-GS); estos estudios han mostrado que la CHH tiene diferentes localizaciones dentro de los somas neuronales del OX, en los axones del tracto OX-GS y en las terminales neurohemales de la GS. Sin embargo la CHH, además se expresa en una gran variedad de tejidos neurales y no neurales en los crustáceos (Webster, 2012). Por estudios neuroquímicos se han encontrado isoformas de CHH en el sistema nervioso y el intestino de diversos crustáceos; además de haber sido localizada en la retina, particularmente en las células tapetales de la retina, en estadios juveniles de *Procambarus clarkii*. Estas células tapetales presentan un ritmo diario de inmunoreactividad positiva a CHH. Los autores sugieren que la secreción dinámica de estas células puede ser modulada por la liberación de serotonina de células retinulares adyacentes (Escamilla *et al.*, 2001, 2002).

Modulación de CHH

La síntesis y secreción de la CHH es regulada homeostáticamente y circadianamente (Fanjul-Moles, 2006). Al decir homeostáticamente nos referimos a que los niveles de hormona siempre se deben mantener dentro de un nivel basal. Este nivel basal es interrumpido en ciertos momentos del día, es decir que existen aumentos o disminuciones en la concentración de la hormona llevada a cabo por un control circadiano.

En estudios realizados en diferentes laboratorios dirigidos por Glowik y Keller (1997), describen una regulación de la secreción de CHH por medio de un mecanismo de retroalimentación negativa y positiva. El mecanismo de retroalimentación negativa esta dado por los niveles de concentración de la D-glucosa, cuando estos aumentan provocan la hiperpolarización de células secretoras de

CHH, ubicadas en el complejo OX-GS, generándose una corriente de potasio. Esta hiperpolarización provoca que la célula deje de secretar CHH. El mecanismo de retroalimentación positiva se regula mediante los niveles de lactato circulantes en la hemolinfa, donde el lactato provoca la secreción de CHH (Santos y Keller, 1993). Pero los niveles de CHH no solo obedecen a una retroalimentación negativa o positiva, también se conoce que diversas aminas modulan la actividad secretora de las células del complejo OX-GS, como los son: serotonina, dopamina y octopamina. Se ha reportado que la serotonina provoca la secreción de CHH de una manera dosis-dependiente, esto al provocar una despolarización en las células secretoras (para revisión Fanjul-Moles, 2006).

Ritmo de la CHH

Gorgels y Voorter (1985) propusieron un modelo de regulación diaria para la liberación de CHH: la actividad sintética de las células de CHH recibe un estímulo dos horas antes de comenzar el periodo de oscuridad, resultando en una pronunciada transferencia de gránulos de CHH dentro de los axones. Los gránulos de CHH llegan a las terminales axónicas después del inicio del periodo de oscuridad. Entonces ocurre la máxima actividad excitotóxica que causa una fuerte liberación de CHH hacia la hemolinfa. Cuatro horas después esta CHH liberada produce una hiperglucemia. Siendo el mismo proceso el que causa un segundo pico, pero menor, de glucosa al inicio del periodo de luz.

Lo anterior corresponde a la CHH secretada por el complejo OX-GS, recientes estudios han mostrado que también existe un ritmo diario en la secreción de CHH en las células retinianas y que éste es diferente de la secreción del complejo OX-GS. Los autores sugieren que la CHH secretada por la retina puede estar cumpliendo un papel solo a nivel local donde suple las demandas energéticas en dicho tejido, pues en la retina existen los sustratos necesarios para obtener glucosa en condiciones de emergencia (Fanjul-Moles *et al.*, 2010).

En crustáceos nocturnos como el acocil *Astacus leptodactylus* la hiperglicemia es resultado de la liberación de CHH hacia la hemolinfa al inicio de la escotofase. Las concentraciones de CHH así como de glucosa en la hemolinfa muestran variaciones a lo largo del día en diferentes especies de acocil.

Metabolismo de glucosa

Los niveles de glucosa en la hemolinfa de crustáceos decápodos revela un ritmo circadiano, caracterizado por menores niveles basales durante el periodo de luz y un pico en el contenido de glucosa que aparece varias horas después del inicio de la oscuridad. Investigaciones fisiológicas en acociles indica un ritmo circadiano de los niveles de glucosa sincronizado por luz oscuridad (Kallen *et al.*, 1990).

Modelo de estudio

Procambarus clarkii

El acocil es un invertebrado de agua dulce que pertenece al orden Decápoda de la clase Crustacea, y se piensa que tiene un origen monofilético. Se reconocen dos súper familias: Astacoidea y Parastacoidea. La primera se divide en dos familias la Astacidae y la Cambaridae. Mientras que en la segunda hay una sola familia la Parastacidae.

La familia Cambaridae es el grupo de decápodos más diverso de los cuales el 99% se encuentran distribuidos en Norte América, por lo que en esta zona se reconocen dos subfamilias: Cambarellinae y Cambarinae, esta última conformada por 10 géneros: *Barbicambarus*, *Bouchardina*, *Cambarus*, *Distocambarus*, *Fallicambarus*, *Faxonella*, *Hobbseus*, *Orconectes*, *Procambarus* y *Troglocambarus* (Holdich, 2002).

Por lo que los organismos usados en el presente trabajo son crustáceos decápoda que pertenecen al género *Procambarus* de la especie *clarkii*. Hoy en día esta especie se encuentra ampliamente distribuida en México, en estados como Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Sonora, Tamaulipas (Hernández *et al.*, 2007). Su distribución mundial es muy amplia pues se encuentra en 4 de los 6 continentes. Esta especie es de importancia económica, sin embargo también es de suma importancia en las investigaciones fisiológicas y neurobiológicas (Campos, 2005).

Sistema neuroendócrino

El principal sistema neuroendócrino en crustáceos decápodos se encuentra en los lóbulos ópticos, en ellos se contienen neuropilos que forman parte del protocerebro lateral del cerebro como: la

lámina ganglionar, médula externa, médula interna y médula terminal. Esta estructura es muy importante ya que es una fuente de neuropéptidos que tienen un rol vital en la modulación de los ritmos circadianos como el de la locomoción, distribución de pigmentos y la sensibilidad de la retina. Entre estos neuropéptidos tenemos a la hormona concentradora de pigmentos rojos (RPCH), CHH, hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de la vitologénesis (VIH/GIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) (Strauss y Dirksen, 2010). Dentro de esta misma estructura se encuentra el complejo órgano X-glándula sinusal; este consiste de un cúmulo de somas localizado en la superficie proximal de la médula terminalis donde los axones proyectan al órgano neurohemal, glándula sinusal, que arborizan dentro de numerosas terminales. El órgano X contiene una población heterogénea de células neurosecretoras que producen varios neuropéptidos envueltos en la regulación y homeostasis de una gran variedad de procesos fisiológicos (Glowik et al., 1997).

Los gránulos neurosecretores que contienen CHH son transportados por un tracto que los dirige a través del neuropilo de la médula terminal a la región neurohemal. Cerca del 40% de las terminales axónicas de las GS contienen gránulos neurosecretores de CHH que son liberados hacia la hemolinfa vía exocitosis. Esta actividad sintética de las neuronas junto con el transporte de los gránulos de CHH hacia GS y la liberación de la hormona dentro de la hemolinfa muestran una ritmicidad circadiana (Kallen et al., 1990).

Ritmos en acocil

Los ciclos día-noche o luz/oscuridad ejercen una poderosa influencia en crustáceos. La ritmicidad fotoperiódica sincroniza distintos ritmos endógenos como son los ritmos de actividad locomotora, la amplitud de la respuesta eléctrica de los ojos compuestos a un estímulo de luz, conocido como ritmo de amplitud del electrorretinograma, cambios en los potenciales eléctricos de los fotorreceptores, así como cambios cíclicos en el movimiento de los pigmentos en los ojos y en el exoesqueleto.

Los ritmos fotoperiódicos requieren de detectores fotosensitivos para sincronizarse a ciclos ambientales de luz-oscuridad. Dos sistemas fotorreceptivos, aparte de los ojos compuestos, han sido identificados en el acocil: los fotorreceptores caudales en el sexto ganglio de la cadena

ganglionar ventral y los fotorreceptores cerebrales del cerebro, también denominado ganglio supraesofágico (Sullivan et al., 2009)

En condiciones 12:12 de luz-oscuridad un acocil, del género *Astacidea*, exhibe un ritmo circadiano de locomoción en el que la actividad ocurre en la fase de oscuridad. En *Procambarus clarkii* se ha observado que existe un ritmo locomotor bimodal, es decir, con dos picos de actividad uno en el inicio de la fase de oscuridad y el otro en el inicio de la fase de luz. El oscilador que genera esta ritmicidad se encuentra en el cerebro.

Ritmos en retina

Amplitud del ERG

Un electroretinograma (ERG) es un registro eléctrico de campo, esto quiere decir que el ERG representa el conjunto de potenciales de varias células de la retina, siendo estos potenciales provocados por un estímulo luminoso. Este registro tiene la ventaja de poder realizarse en lapsos de tiempo bastante amplios, como son los experimentos crónicos. Se conoce que la amplitud del ERG puede variar a lo largo de un día, por lo que se ha documentado un ritmo de amplitud del electroretinograma (ERG), el cual se define como las variaciones en la amplitud de la respuesta de los fotorreceptores a un estímulo de luz de una intensidad determinada. La amplitud es mayor durante la fase de oscuridad con respecto a la fase de luz. Este comportamiento se mantiene en condiciones constantes de oscuridad por lo que se dice que es un ritmo endógeno (Fanjul, 2003; Strauss y Dirksen, 2010; Aréchiga et al., 1993).

Esta diferencia en la respuesta de los fotorreceptores es debido a tres factores: 1) cambios en la sensibilidad de los fotorreceptores, 2) La posición de los gránulos de pigmento proximal y distal y 3) la secreción periódica de la glándula sinusal de neurohormonas reguladoras. Dichas neurosecreciones influyen en la sincronización de la actividad rítmica de ambos ojos, así como en la sincronización de grupos osciladores contenidos en la misma retina, como son: los fotorreceptores y las células pigmentarias de protección que se encuentran tanto entre las omatidias (células del pigmento distal), como dentro de las células retinulares (pigmento proximal) (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003; Strauss y Dirksen, 2010).

Poco se conoce la manera en la que los fotorreceptores tienen cambios en su sensibilidad, aunque se propone que esta regulación es autónoma de la retina. Se han hecho numerosos experimentos para conocer qué estructuras regulan la ritmicidad del ERG, como lesiones en algunas zonas del cerebro, ablaciones de estructuras. A partir de esto se conoce que la lámina ganglionar así como otros ganglios ópticos, no contribuyen en la ritmicidad del ERG y que las lesiones en hemiganglios del cerebro, del protocerebro o del deutocerebro no alteran las oscilaciones del ERG. Sin embargo la separación de hemiganglios del protocerebro si lleva a una desincronización en la fase del ERG, lo cual indica una conectividad nerviosa entre esta estructura y la retina (Strauss y Dirksen, 2010).

La estructura sugerida como responsable de generar el ritmo del electrorretinograma es el ganglio supraesofágico (ganglio cerebroide), sin embargo se ha mostrado que tanto el lóbulo óptico como la retina aislada, en condiciones de oscuridad constante, muestran un ritmo en la amplitud del ERG (Sánchez y Fuentes Pardo, 1977; citado por Arèchiga y Rodríguez-Sosa, 1998) por lo que los autores sugieren: un origen local para dicho ritmo y que las células de la retina son capaces de generar dicha ritmicidad. En los fotorreceptores de la retina y células de la lámina ganglionar se encontró inmunopositividad para el gen *per*, lo que refuerza el hecho de que esta estructura forme parte del reloj circadiano como un oscilador (Arèchiga y Rodríguez-Sosa, 1998).

Movimientos de pigmentos

Los ojos de los crustáceos se caracterizan por tener la migración de gránulos de pigmento, estos movimientos tienen una influencia en la sensibilidad de los fotorreceptores (Frixione et al., 1989), pues al concentrarse o expandirse cambian la cantidad de luz que puede entrar a los fotorreceptores, blindándolos como cuando se cierra la pupila o exponiéndolos a una mayor cantidad de fotones. Es por lo anterior que estos pigmentos constituyen una verdadera pseudopupila. De esta manera los pigmentos regulan la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz, ya que por medio del movimiento de estos en las omatidias son capaces de detectar los cambios en la intensidad de luz que se les presenta.

Dentro de los pigmentos que forman la pseudopupila del ojo del acocil se reconocen dos tipos: los pigmentos proximales (PP), que se encuentran dentro de los fotorreceptores (células retinulares) y los pigmentos distales (DP) que se encuentran dentro de las células accesorias. Como señañe anteriormente la función de ambos es la de limitar la cantidad de luz que reciben las membranas

rabdoméricas de los fotorreceptores retinulares durante la fase de luz, mientras que en la fase de oscuridad permiten que la captura de fotones sea mayor. La diferencia en su función durante la fase de luz y la de oscuridad es debida al movimiento que hacen dentro de las células que los contienen. Pues durante la fotofase ambos pigmentos se encuentran bien distribuidos dentro de la célula, mientras que en la escotofase los PP se concentran proximalmente y los DP se concentran distalmente, cada uno dentro de las células que los contienen.

Este movimiento presenta un ritmo circádico siendo que para los DP este movimiento es regulado por neurosecreciones dispersadoras de pigmentos que son liberadas por la glándula sinusal durante el día. Entre estas neurosecreciones tenemos: hormona concentradora de pigmentos rojos y a la hormona dispersadora de pigmentos (Strauss y Dirksen, 2010). En cambio el movimiento de los PP, aunque endógeno, parece ser regulado circadianamente por la luz mediante la acción de neurotransmisores como la serotonina (Aréchiga et al., 1993) pues estos migran cubriendo a los fotorreceptores en respuesta a la luz, mientras que en respuesta a la oscuridad migran aglutinándose en la zona proximal de los fotorreceptores.

Planteamiento y justificación del problema

La hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) ha sido estudiada desde inicios de los 90 (Webster, 2012), desde entonces se conoce su efecto hiperglucemiante. Esta hormona provoca incrementos rápidos en la concentración de glucosa en la hemolinfa mediante la movilización de glucosa a partir de fuentes de glucógeno que se encuentran en el músculo y el hepatopáncreas que son los principales tejidos blanco de la CHH (Sedlmeier, 1987). Santos y Keller propusieron en 1993 que la CHH no solo modula la glucogenolisis, sino también podría estar modulando la glicólisis de una manera directa. El primer locus de secreción de la CHH identificado fue el complejo órgano X-glándula sinus (OX-GS) que se encuentra en el lóbulo óptico de los crustáceos decápodos. Sin embargo en 2002 Escamilla y colaboradores encontraron que cerca del 25% de las células tapetales de la retina y del lóbulo óptico de acociles adultos y juveniles secretan CHH en respuesta a la despolarización mediada por serotonina. Este descubrimiento, junto con la comprobación de que existe glucógeno en células de la retina (Fanjul-Moles et al., 2010), llevo a pensar que la glucosa podría ser un sustrato metabólico para los fotorreceptores. Lo anterior fue probado por Sánchez Ortiz (2004) en su tesis de licenciatura donde encontró que los fotorreceptores usan la glucosa para responder eléctricamente a un estímulo de luz. De igual manera que la secreción de CHH del lóbulo óptico es controlada circadianamente, la secreción de CHH de las células retinianas esta bajo un control circádico (Fanjul-Moles, 2010).

Con lo anterior quedaba claro que la glucosa podría ser un metabolito energético para los fotorreceptores, pero se generaban las siguientes preguntas: ¿la CHH provoca un aumento en la concentración extracelular de glucosa en la retina?, de ser así ¿Pueden los fotorreceptores usar esta glucosa para responder eléctricamente a un estímulo de luz? Siendo estas las preguntas que se abordan en la presente tesis.

Hipótesis

La aplicación exógena de CHH en retina *in vitro* provocará que este tejido libere glucosa la cual será usada como sustrato para la respuesta de los fotorreceptores a un estímulo luminoso; dado que en la retina existe un ritmo circadiano de secreción de la hormona el efecto de ésta en la concentración de glucosa y amplitud del ERG dependerá del momento del día.

Objetivo General

Cuantificar la liberación de glucosa en la retina *in vitro* del acocil como efecto de la Hormona Hiperglucemiante de crustáceos en dos puntos diferentes del día, así como su efecto sobre la amplitud del Electrorretinograma (ERG).

Objetivos particulares

Determinar la cantidad de glucosa en retina *in vitro*, en dos tiempos diferentes del día: punto en fotofase y escotofase del ciclo luz-oscuridad, bajo diferentes tratamientos.

Observar las diferencias en la amplitud del ERG con diferentes tratamientos, en dos puntos diferentes del día: en fotofase y escotofase del ciclo luz-oscuridad.

Correlacionar los cambios en la concentración de glucosa con respecto a los cambios en la amplitud del ERG en diferentes puntos del día.

MATERIAL Y MÉTODO

Animales

Se usaron 50 animales adultos de la especie *Procambarus clarkii*. Los organismos fueron colectados en Delicias, Chihuahua. Todos los animales se aclimataron al laboratorio en acuarios de acrílico suplidos con lámparas conectadas a un timer para el control del fotoperiodo. Estuvieron en estos por lo menos dos semanas antes de los experimentos.

Condiciones experimentales

Una vez aclimatados los animales fueron separados en dos grupos experimentales sometidos a diferentes fotoperiodos, un grupo con un fotoperiodo L:O 12:12 encendido de la luz a las 7 AM, apagado de la luz a las 7PM. El segundo grupo con un fotoperiodo O:L 12:12 apagado de la luz 7 AM, encendido de la luz 7PM. Por convención se denomina ZT0 la hora a la que se enciende la luz y ZT12 la hora a la que se apaga, que en el caso del primer fotoperiodo ZT0 corresponde a las 7 am y en el segundo fotoperiodo corresponde a las 7 pm. Para todos los animales, después de haber sido anestesiados mediante refrigeración, las retinas se disectaron después de 3 horas del encendido o apagado de la luz, es decir a ZT 3 o ZT 15. Esto con el propósito de observar los efectos de la CHH sobre la concentración de glucosa y la amplitud del electroretinograma en retina durante dos horas distintas del día, a las 10 am (ZT3) y 10 pm (ZT15). Para todos los tratamientos experimentales se usó una versión sintética de CHH que fue sintetizada por los laboratorios BIOPEPTIDE Co;Inc. Esta versión tiene un peso molecular de 3 474 Da., dado que sólo fue sintetizada una parte de la hormona. La siguiente secuencia corresponde a la secuencia completa de aminoácidos del péptido, siendo la zona sombreada la secuencia correspondiente a la sintetizada por los laboratorios:

```
1  mwsllvvvvvv vvaslgssgv hgrsvegssr leqllssgss sseplsflsq dhsvnkrqvf  
61  dqackgiydr aifrklelvc ddcynlyrpk kvattcrenc yansvfrqcl ddlllinvvd  
121 eyisgvqivg k
```

Para todos los experimentos se uso una dilución de la hormona a una concentración de 178nM.

Registro del Electroretinograma (ERG)

Para el registro del ERG se tuvieron dos grupos experimentales: En el primer tratamiento, grupo control, las retinas una vez disectadas eran incubadas con 500 μ l de solución fisiológica Van-Harreeverld+Hepes (VH+Hepes, 197.77 mM NaCl, 5.37mM KCl, 13.53 mM CaCl₂, 2.60 mM MgCl₂*6H₂O, 2.38 Hepes, el pH fue ajustado a 7.55); el segundo tratamiento, grupo experimental, consistía de incubar la retina con 450 μ l de VH+Hepes más 50 μ l, a una concentración de 178nM, de CHH por lo que la concentración de CHH a la que fueron expuestas las retinas fue de 16nM. Esto se hizo durante el día y noche del fotoperiodo luz/oscuridad, es decir a las 10 (ZT 3) y 22 (ZT 15) horas (Figura 2). Cuando los animales provenían del escotoperiodo (ZT15) se cuidaba que no incidiera luz sobre los ojos de estos por lo que la disección se hacía con luz roja. Para la disección de retina se colocó al acocil durante 5 minutos en hielo para inmovilizarlo y poder aislar uno de los pedúnculos oculares, posteriormente se disectó la retina del tallo ocular. Antes de la disección se perforó la cornea con un electrodo para poder facilitar la inserción del electrodo de registro. Después de disectar la retina se colocó en una caja de Petri en el interior de una cámara de registro protegida por una jaula de Faraday, la cual cuenta con un sistema de perfusión que mantenía un flujo constante de solución fisiológica VH+Hepes. Después de poner la retina en alguno de los tratamientos se proseguía al registro del ERG, para esto se colocaba un micro-electrodo de tungsteno conectado, por medio de una sonda de alta impedancia HIP511GA, a un amplificador Grass P511; se obtenía una respuesta de prueba para comprobar que el sistema estuviera captando la señal eléctrica de la retina, dando un solo pulso de luz siempre de la misma intensidad y duración procedente de un fotoestimulador Grass S48. La señal fue filtrada usando un filtro pasa bajas a 1 Hz y a un filtro pasa alta a 1 KHz, la señal fue amplificada a un 1 mili volt por centímetro. Una vez obtenida la respuesta de prueba, se dejaba durante media hora para la adaptación de la retina a la oscuridad; posteriormente se iniciaba el registro del ERG usando el software Axoscope versión 1.1, durante dos horas que consistía de tres pulsos con un intervalo de 10 segundos entre estos, dados cada 10 minutos por medio del fotoestimulador. Después de la primer hora de registro se realizaba un lavado el cual consistía en cambiar la solución fisiológica VH+Hepes.

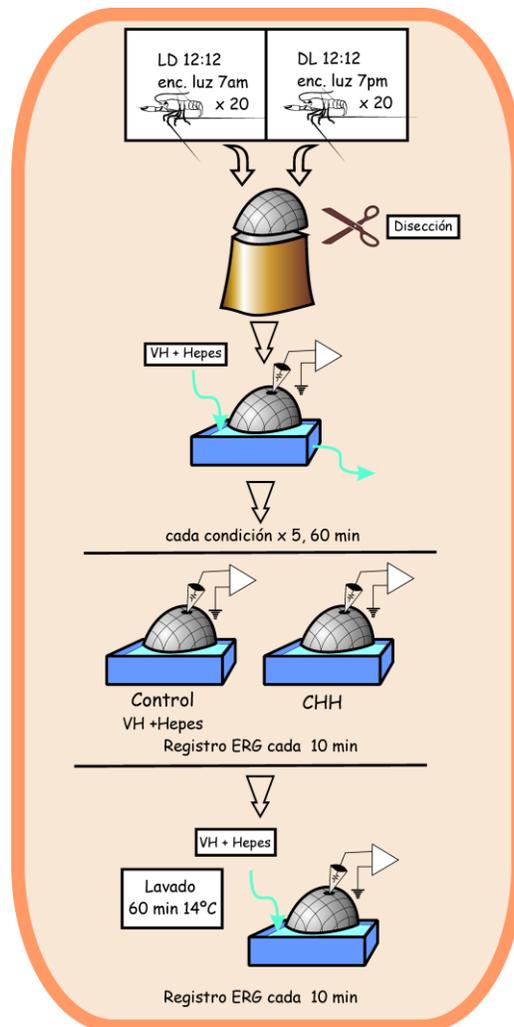


Figura 2. Protocolo experimental para el registro electroretinográfico (ERG). Se usaron organismos provenientes de dos fotoperíodos L:D y D:L. La retina fue disecada a las 10 am (ZT 3) y 10 pm (ZT 15), respectivamente. Las retinas de ambos fotoperíodos eran puestas en uno de los dos tratamientos: VH + Hepes o CHH con pulsos de luz cada 10 minutos, durante una hora de registro.

Cuantificación de Glucosa

En este protocolo se manejaron 3 grupos experimentales en cada una de las horas, ZT 3 y ZT 15 (Figura 3).

Se colocó al acocil durante 5 minutos en hielo para inmovilizarlo, posteriormente se disectó la retina del tallo ocular y ésta se colocó en uno de los tres tratamientos: 1) C0, la retina fue puesta en un tubo para centrifugar, de aproximadamente 1.5 ml, con solución fisiológica VH+Hepes para inmediatamente ser homogenizada. 2) CHH s/luz la retina fue incubada durante una hora en 180µl

de solución fisiológica VH+Hepes que además tenía 20 μ l de CHH, por lo que fueron expuestas a una concentración de 17.8nM de CHH. 3) CHH c/luz la retina fue incubada de igual manera que el tratamiento previo con la diferencia que en esta durante la hora de incubación fue estimulada con tres pulsos de luz con un intervalo de 10 segundos cada 10 minutos. Todos los tratamientos fueron realizados a una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C.

Después de cada tratamiento las retinas fueron homogenizadas en 160 μ l de solución fisiológica, una vez homogenizadas se les agregó 40 μ l de ácido tricloroacético (TCA) al 70% para desnaturalizar las proteínas y con esto romper la membrana de las células. El homogenizado obtenido se centrifugó durante diez minutos a dos mil revoluciones por minuto, en una centrifuga Prism R, a una temperatura de 4°C. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se usó 25 μ l de cada muestra para la determinación de glucosa. El kit usado para la cuantificación fue Genzyme Diagnostics. El ensayo enzimático se basa en la oxidación de la glucosa lo cual produce un producto colorido que puede ser cuantificado mediante la absorbancia de cada muestra, las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 a 505 nm.

Análisis estadístico

Electroretinograma

Los datos fueron manejados en una hoja del programa Microsoft Excel donde los valores de la amplitud obtenidos en cada tratamiento fueron porcentualizados y después analizados por ANOVA de una vía con la prueba *pos hoc* Diferencia mínima significativa (DMS) por medio del programa SPSS statistics. Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism que son el resultado del promedio de la amplitud obtenido del registro de 5 retinas para cada tratamiento.

Concentración de glucosa

Los datos fueron analizados con el programa SPSS statistics. Se hizo un análisis de ANOVA de una vía junto con la prueba *pos hoc* DMS, la N de cada tratamiento fue de cinco. Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism que representan el promedio de los valores de cada tratamiento.

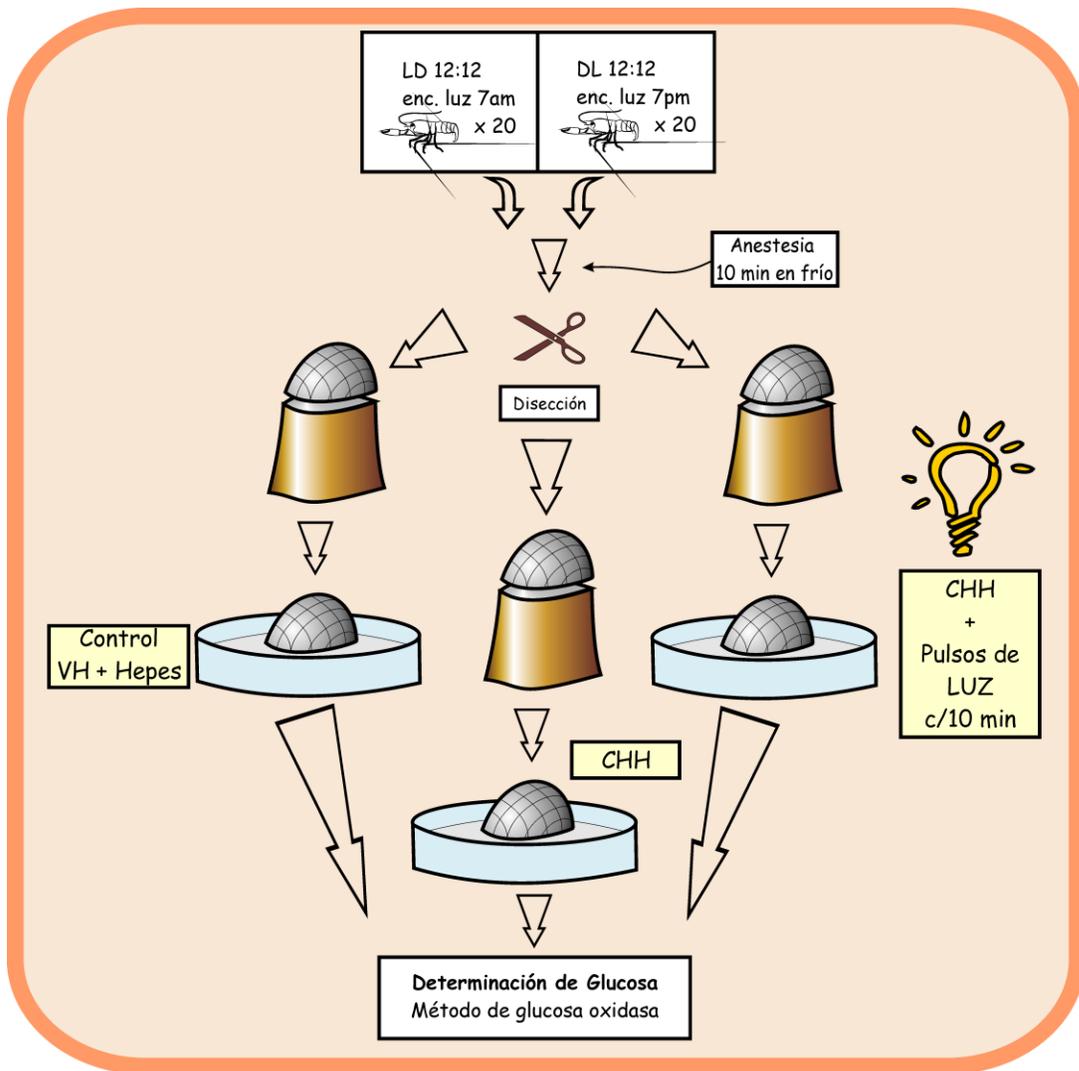


Figura 3. Protocolo experimental para la determinación de glucosa. Se usaron organismos provenientes de dos fotoperiodos L:D y D:L. La retina fue disectada a las 10 am (ZT 3) y 10 pm (ZT 15), respectivamente. Las retinas de ambos fotoperiodos eran puestas en uno de los tres tratamientos: VH + Hepes, CHH con pulsos de luz cada 10 minutos, CHH en oscuridad, estos dos últimos incubados durante una hora.

Resultados

Para observar el efecto de la CHH en la amplitud del ERG, se hicieron registros durante una hora con pulsos de luz cada 10 minutos en retinas incubadas con VH+Hepes o con CHH, provenientes estas de cualquiera de las dos horas evaluadas ZT 3 o ZT 15. Con el fin de observar si la amplitud aumentó o disminuyó según el tratamiento se comparó la amplitud del ERG al tiempo cero contra la amplitud en el tiempo sesenta. Para la concentración de glucosa se incubaron retinas en CHH con o sin estímulos de luz, así como retinas incubadas en VH+Hepes y después se determinó la concentración de glucosa para retinas provenientes de la hora ZT 3 y ZT 15.

Efecto de la CHH sobre la concentración de glucosa y la amplitud del ERG durante ZT3

El efecto de la CHH sobre la concentración de glucosa fue el provocar un aumento de esta, pues las retinas incubadas en CHH mantenidas en oscuridad durante una hora mostraron una mayor concentración de glucosa comparado a las retinas incubadas en VH+Hepes (Figura 4). A la par el efecto de la CHH sobre la amplitud del ERG durante la hora ZT 3 de la fotofase fue el de ir aumentando la amplitud a través de la hora de registro. Como se puede observar en la figura 5, las retinas del grupo control presentaron un aumento en la amplitud en el tiempo 10 al 60, donde esto podría deberse quizás al proceso de adaptación a la oscuridad por parte de los fotorreceptores, sin embargo después de una hora de haberse realizado el lavado la amplitud registrada en el tiempo 60 ($\bar{\phi}=86.79\pm 7.57\%$) no muestra diferencia significativa (*post hoc* DMS) con la registrada en el tiempo control ($\bar{\phi}=99.99\pm 2.9\%$). El efecto de la CHH sobre la amplitud se puede observar en la figura 6, ésta muestra el registro de retinas del grupo experimental, donde se observa la tendencia a aumentar la amplitud durante el registro siendo éste aumento permanente hasta el minuto 60 después del lavado (60<). De manera que al comparar la amplitud al tiempo cero respecto al tiempo sesenta en retinas control no se observa ningún cambio en ésta, al contrario de las retinas incubadas con CHH las cuales presentan un aumento en la amplitud a los 60 minutos de registro (Figura 7).

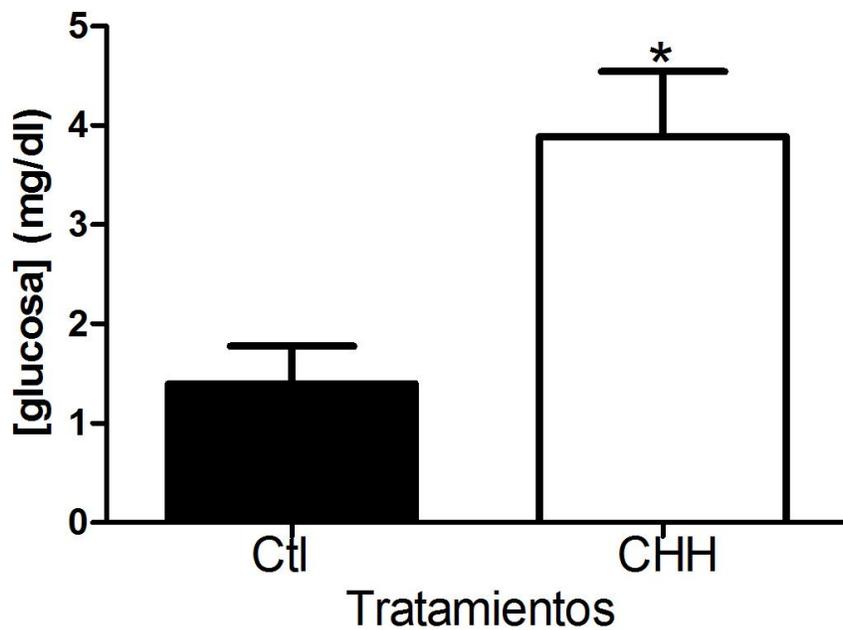


Figura 4. CHH aumenta la concentración de glucosa en retina *in vitro*. La concentración de glucosa aumentó en retinas incubadas por una hora con CHH (CHH, \bar{x} =3.89±0.65 mg/dl, n=5) respecto a las retinas control (Ctl, \bar{x} =1.4±0.37 mg/dl, n=5) de organismos que provenían de ZT3. En ninguno de los dos casos fueron estimuladas con luz. * (p<0.05) DMS *post hoc*.

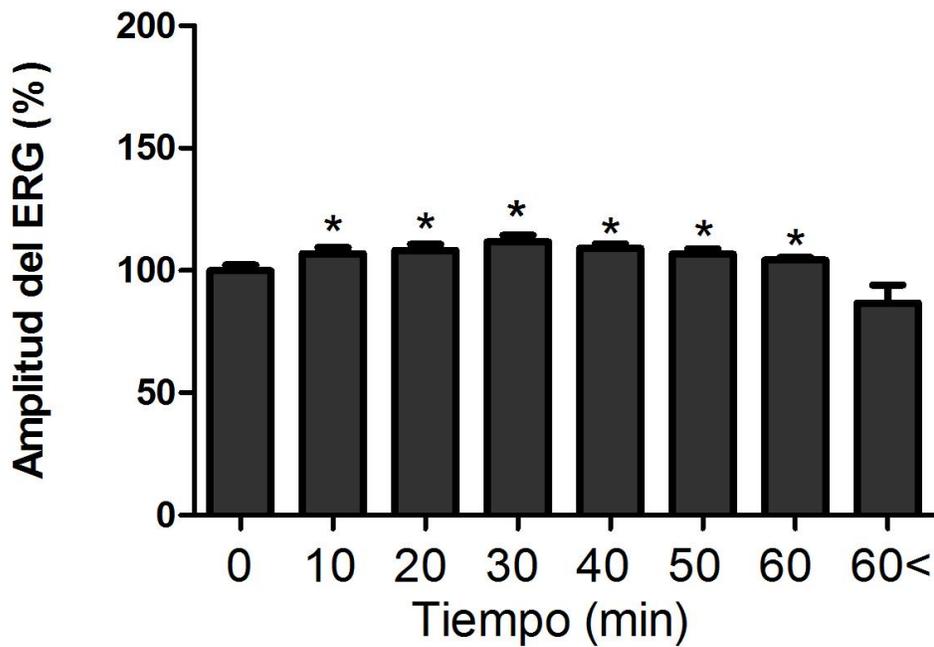


Figura 5. Registro del ERG de retinas control provenientes de ZT3, fotofase. En esta gráfica se puede observar que la amplitud aumentó significativamente, sin embargo la amplitud en el minuto 60< (después del lavado) no muestra diferencia respecto al tiempo 0. * ($p < 0.05$) DMS *post hoc*.

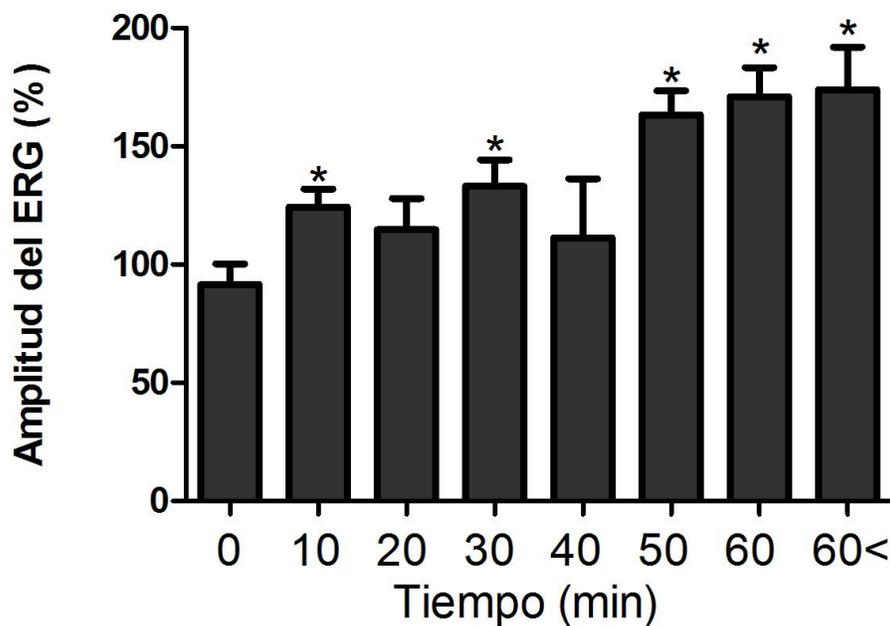


Figura 6. Aumento de la amplitud del ERG en ZT3. Se puede observar el aumento de la amplitud a través del tiempo, una hora de registro, como efecto de la CHH. 60< hace referencia a los datos tomados en el tiempo 60 después del lavado. * ($p < 0.05$) DMS *post hoc* (n=4).

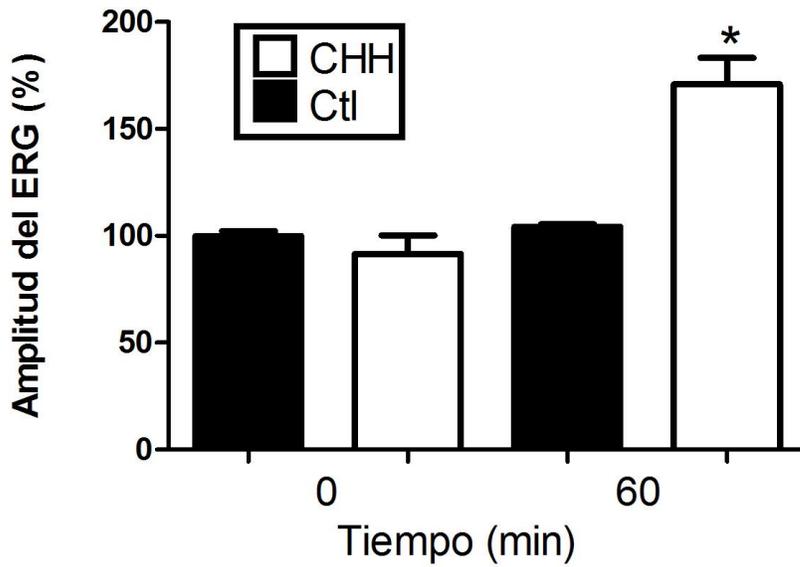


Figura 7. Aumento en la amplitud del ERG como efecto de la CHH en ZT3. En esta gráfica se puede observar que en el tratamiento control (ctl) no se encontró diferencia en la amplitud entre el tiempo 0 y 60. Por el contrario en el tratamiento experimental (CHH) si hubo diferencias, siendo éste un aumento en la amplitud en el tiempo 60 (\bar{x} =171 ±12.27 %, n=3) respecto al tiempo 0 (\bar{x} =91.66±8.57 %, n=3). * (p<0.05) DMS *post hoc*.

Efecto de la CHH sobre la concentración de glucosa y la amplitud del ERG durante ZT15

En la hora ZT15 de la fase de oscuridad o escotofase para las retinas incubadas en CHH durante una hora no se observó ninguna diferencia en la concentración de glucosa al comparar éstas con las retinas control, es decir, las retinas que estuvieron incubadas en VH+Hepes (Figura 8). En lo referente al efecto de la hormona sobre la amplitud del ERG se observó que hubo una disminución en las retinas incubadas con CHH. En la figura 10 se observa el registro a lo largo del tiempo de retinas incubadas en VH+Hepes donde se muestra que la amplitud se mantuvo con pequeños variaciones en el tiempo 20, 40 y 50 que fueron aumentos en la amplitud, sin embargo la amplitud del tiempo 60 y del tiempo 60 después del lavado (60<) no muestran disminución o aumento respecto al control. Por el contrario en las retinas incubadas en CHH se observa una disminución de la amplitud a partir del minuto 30 donde este efecto perduro hasta el tiempo 60< (Figura 9). De manera que al comparar la amplitud del tiempo sesenta contra el tiempo cero de las retinas en CHH se observa una disminución de la amplitud, mientras que como ya se menciona en las retinas control no hay diferencia de amplitud entre el tiempo cero y el sesenta (Figura 11).

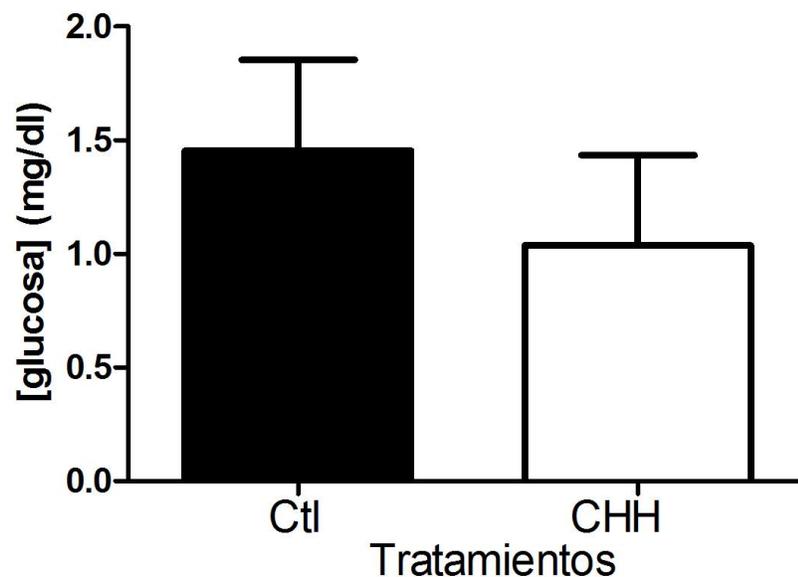


Figura 8. Concentración de glucosa liberada en respuesta a la CHH en retinas de ZT 15. La concentración de glucosa en las retinas incubadas con CHH ($\bar{x} = 1.03 \pm 0.39$ mg/dl, n=5) durante una hora no muestra diferencia alguna con la concentración de las retinas control ($\bar{x} = 1.45 \pm 0.39$ mg/dl, n=5) durante la escotofase.

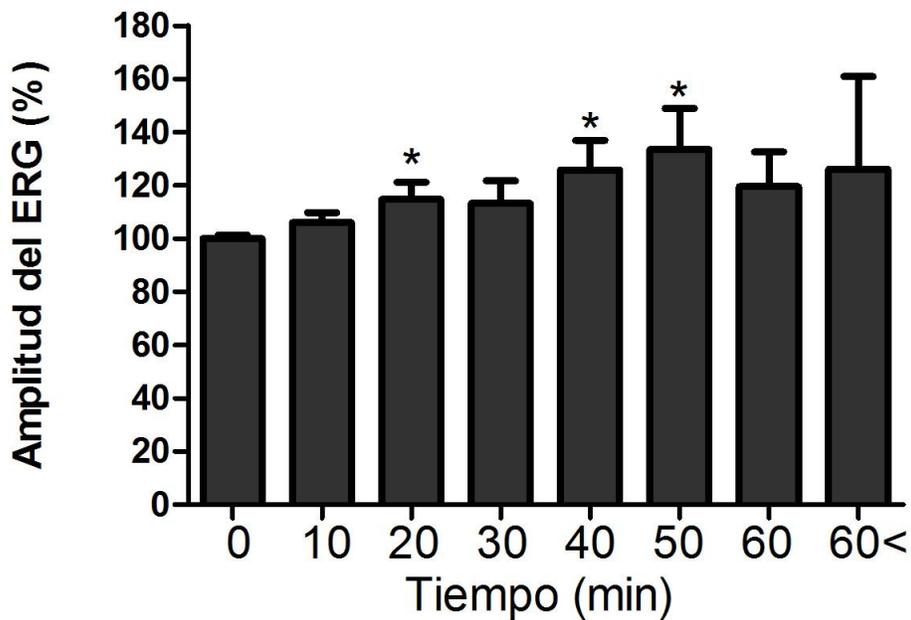


Figura 9. Amplitud del ERG en retinas control de ZT15. Se muestra el registro hecho durante una hora de retinas del grupo control provenientes de la escotofase, en el cual se observan aumentos en la amplitud solo a ciertos tiempos, siendo que después de una hora y de 60 minutos después del lavado (60<) la amplitud no muestra cambios respecto al tiempo 0. * ($p < 0.05$) DMS *post hoc*.

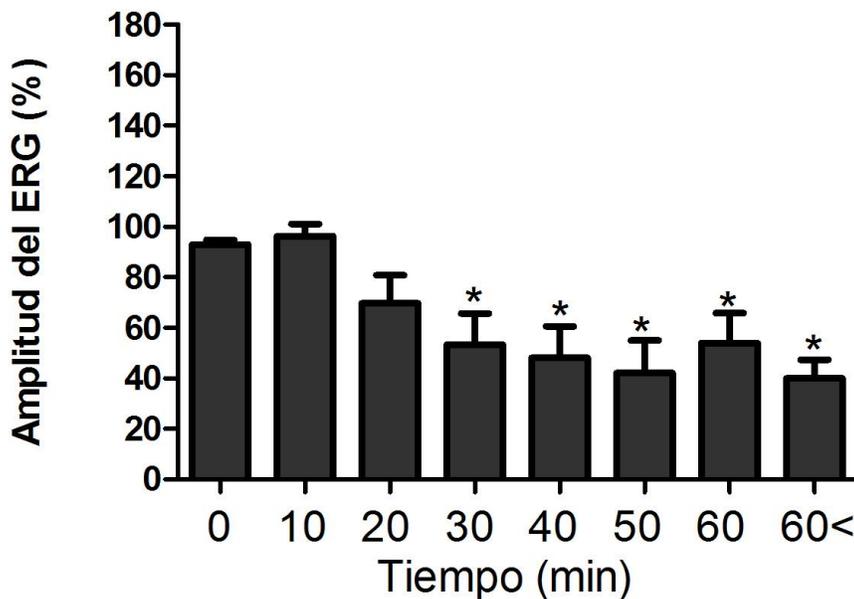


Figura 10. Disminución de la amplitud del ERG en ZT15. En esta gráfica se puede observar que el porcentaje de amplitud fue disminuyendo a partir del minuto 30 durante la hora de registro cuando la retina estuvo incubada en CHH. *diferencias significativas respecto al control prueba *pos hoc* DMS ($p < 0.05$, $n=4$).

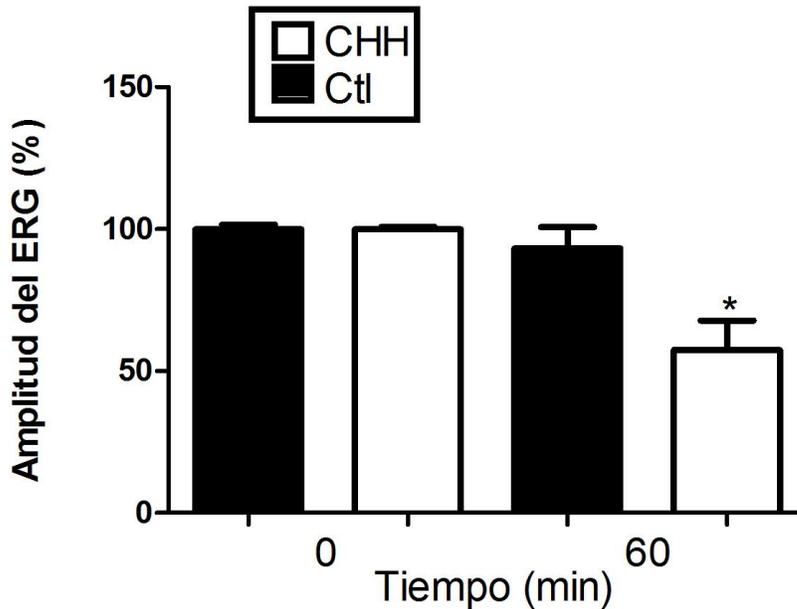


Figura 11. Disminución en la amplitud como respuesta a la CHH en retinas provenientes de ZT 15. Se observa la disminución en la amplitud al tiempo 60 (\bar{x} =57.43±10.34%, n=3) respecto al tiempo 0 (\bar{x} =99.99±0.81%, n=3) de retinas incubadas en CHH (CHH), mientras que en las retinas control (Ctl), incubadas en VH+Hepes, no hubo ningún cambio en la amplitud del tiempo 0 (\bar{x} =99.9±0.81%, n=3) contra el 60 (\bar{x} =93.19±7.44%, n=3). * (p <0.05) DMS *post hoc*.

Glucosa usada para la respuesta de los fotorreceptores

Para conocer si la glucosa que está siendo liberada en respuesta a la CHH en la retina es usada por los fotorreceptores para la respuesta a un estímulo luminoso, se incubaron retinas en CHH por una hora, durante la cual fueron estimuladas con un tren de tres impulsos cada diez minutos. Con este protocolo se observó que en las retinas provenientes de ZT3 la concentración de glucosa fue menor en las retinas estimuladas contra las que no lo fueron (Figura 12). Mientras que en las retinas provenientes de ZT15 aparentemente sucedió lo contrario, pues aunque la concentración de glucosa fue de 1.18 mg/dl mayor en las retinas estimuladas que en las retinas que no lo fueron, la prueba estadística no muestra que esta diferencia sea significativa; aunque cabe destacar que el valor de 0.065 es cercano a 0.05 por lo que quizás sería necesario tener un número mayor de muestras para así poder estar seguros en descartar o afirmar la existencia de una diferencia significativa entre tratamientos (Figura 13).

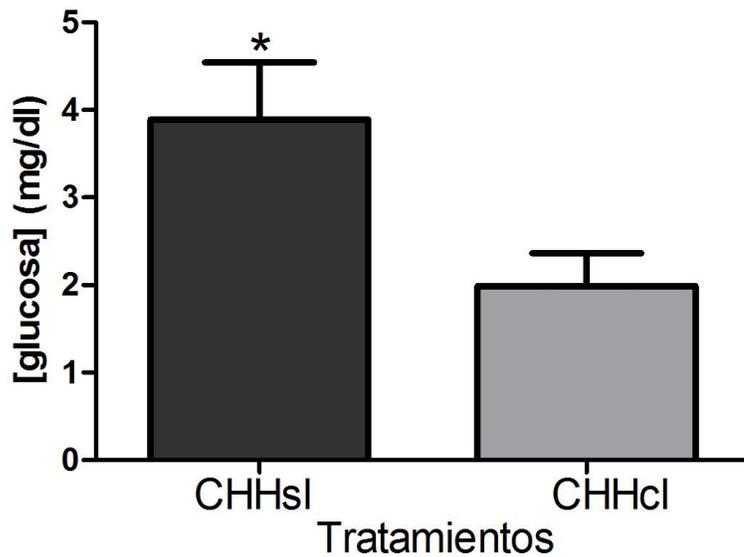


Figura 12. Disminución de la concentración de glucosa en retinas estimuladas con pulsos de luz. Se observa que la concentración de glucosa en las retinas, provenientes de ZT3, disminuyó al ser estimuladas con pulsos de luz (CHHcl) (\bar{x} =1.99±0.37 mg/dl) respecto a las que no fueron estimuladas (CHHsl (\bar{x} =3.89±0.65 mg/dl). * indica diferencias significativas entre tratamientos, prueba *post hoc* DMS ($p < 0.05$, $n = 5$).

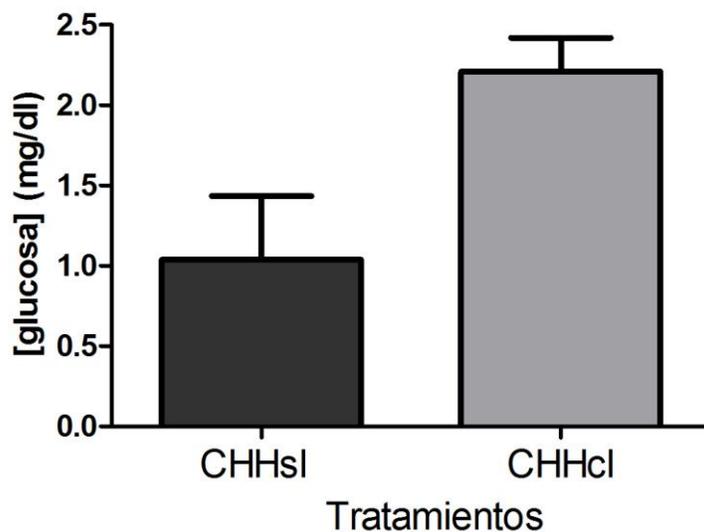


Figura 13. Concentración de glucosa en retinas estimuladas con pulsos de luz. Según esta gráfica podemos observar que la concentración de glucosa en las retinas, provenientes de ZT 15, parece haber aumentado al ser estimuladas con pulsos de luz (CHHcl) (\bar{x} =2.21±0.21 mg/dl, $n = 5$) respecto a las que no fueron estimuladas (CHHsl) (\bar{x} =1.03±0.88 mg/dl, $n = 5$). Sin embargo el valor p ($0.065 > 0.005$) no es estadísticamente significativo, DMS.

Discusión

Efecto de la CHH durante ZT3

Los datos obtenidos en ésta tesis muestran que durante la fotofase la CHH tiene un efecto similar sobre la concentración de glucosa en la retina del acocil al efecto que tiene dicha hormona en otros tejidos de éste crustáceo. Tanto en el hepatopáncreas y el músculo abdominal la CHH provoca la liberación de glucosa en el medio intracelular, así como un aumento de éste carbohidrato en la hemolinfa (Santos y Keller, 1993; Sedlmeier, 1987). Lo anterior indica que la CHH regula el metabolismo de carbohidratos en los tejidos antes mencionados. Se ha propuesto que el mecanismo de acción de dicha hormona se realiza mediante la regulación de la actividad enzimática de la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa (Sedlmeier, 1981 y 1982). Son los trabajos de este investigador los que revelaron que en los crustáceos la CHH disminuye la actividad de la glucógeno sintasa, encontrando una correlación entre la disminución de la actividad de la enzima antes mencionada y un aumento en los niveles de AMPc y GMPc; por lo que se sugiere que estos actúan como segundos mensajeros en la vía de señalización de la CHH. En los mismos trabajos se propone que quizás la CHH también activa a la glucógeno fosforilasa, sin poder concluir este hecho en su modelo. Sin embargo trabajos recientes comprobaron que la inyección de CHH aislada del cangrejo *Oziotelphusa senex senex* produce un aumento en niveles de actividad de la enzima glucógeno fosforilasa (Sreenivasula et al., 2007).

Trabajos anteriores del laboratorio han demostrado la existencia de depósitos de glucógeno en la retina del acocil (Valdés-Fuentes, 2006; Fanjul-Moles, 2010) lo que aunado a los datos obtenidos en éste trabajo, respecto al aumento de los niveles de glucosa en la retina *in vitro* como efecto de la CHH durante el día (ZT3) (Figura 4), lleva a pensar que dicha hormona esta regulando el metabolismo de carbohidratos en retina posiblemente al inhibir la glucógeno sintasa y quizás activar la glucógeno fosforilasa. Lo anterior tiene como consecuencia la liberación de glucosa, sustrato que puede ser usado por los fotorreceptores para sostener la respuesta eléctrica a la luz. Esto último se confirmó con los experimentos en donde se incubo a retinas con CHH junto con la aplicación de estímulos luminosos, las cuales presentaron una menor concentración de glucosa comparado a las retinas que no recibieron estímulos (Figura

12). Lo que sugiere que la glucosa está siendo usada para la respuesta de los fotorreceptores a la luz, lo que nos da un indicio de un rol de separación de actividades metabólicas entre la glía y las células sensoriales semejante a lo que sucede en insectos. Tsacopoulos (1988) trabajando con la abeja *Apis mellifera* demostró que al aumentar el metabolismo oxidativo de los fotorreceptores como consecuencia de la fotoestimulación también aumentaba la actividad metabólica en la vía de degradación de carbohidratos, glucólisis, por parte de la glía. Lo que deja claro que es la glía la que provee de la glucosa necesaria para la actividad de las neuronas, lo que podría estar sucediendo en la retina de los acociles.

Si bien la CHH podría estar ejerciendo una regulación en el metabolismo de glucosa en la retina llevando a que aumente durante el día, no deja claro la relación de este fenómeno con el efecto que ésta ejerce en la amplitud del ERG. Pues la amplitud del ERG aumenta en las retinas provenientes de ZT3, que fueron incubadas con CHH respecto a las que fueron incubadas en VH+Hepes durante la fotofase (Figura 7).

Se ha demostrado que la sensibilidad de los fotorreceptores a los pulsos de luz es regulado de una manera circadiana (Fanjul-Moles, 2014), lo que se refleja en los cambios circadianos en la amplitud del ERG. Como se mencionó en la introducción de este trabajo el aumento de la amplitud del ERG durante la noche es debido en parte al movimiento de los pigmentos distales y proximales los cuales son retraídos, dejando así los fotorreceptores expuestos para que una mayor cantidad de fotones incida en ellos. Por el contrario durante el día estos pigmentos protegen la retina, esto lleva a que haya una menor sensibilidad por parte de la retina a la luz durante el día, y como resultado la amplitud del ERG es menor. Otro de los fenómenos que lleva a que el ERG sea menor durante el día es el hecho inherente a las propias células sensoriales de presentar una menor sensibilidad (Aréchiga et al., 1993).

Esta propiedad de los fotorreceptores de presentar menor sensibilidad durante el día puede ser explicado por el trabajo de Miller y Glantz (2000). Ellos observaron que existe una conductancia de potasio dependiente de voltaje que permite a la célula, después de un evento de despolarización, volver a los valores de la membrana en reposo para así poder responder nuevamente a un pulso de luz. Durante la adaptación a la luz existe una pequeña despolarización lo que repercute en la corriente de potasio llevando a que ésta disminuya y así

no sea restaurado el potencial de membrana en reposo lo que tiene como consecuencia que la sensibilidad de los fotorreceptores sea menor durante la adaptación a la luz. El rol del Calcio en este fenómeno es importante pues se ha visto que hay una relación entre el aumento de éste en el interior celular y la inhibición de la corriente de potasio.

Lo antes descrito nos permite entender que durante la fotofase, fisiológicamente la retina es incapaz de responder con una alta sensibilidad a un pulso de luz, pero según los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó que hubo un aumento en la amplitud del ERG durante el día. Esto sugiere que la CHH podría estar ejerciendo un efecto a nivel de los fotorreceptores que lleva a un aumento en la sensibilidad a la luz. La posible manera de acción de la CHH en los fotorreceptores sugerida en el presente es relacionado con la vía de señalización de dicha hormona.

El proceso de fototransducción en invertebrados es producido por una cascada de señalización que inicia con la isomerización de la rodopsina, en respuesta a un fotón, que da lugar a metarodopsina; ésta molécula activa una proteína G (Gq) una vez dicha proteína G es fosforilada, en cuyo proceso se forma GTP a partir de GDP, queda activa para inducir la activación de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la conversión de fosfoinositol bifosfato a inositol trifosfato, este último abre canales en el retículo endoplasmático que permiten la salida de Ca^{2+} . Sin embargo el efector final encargado de la apertura de los canales para la despolarización de la célula no se conoce, siendo propuestos el Ca^{2+} (Shin *et al.*, 1993, Dorlochter *et al.*, 1997) y/o el GMPc (O'Day *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1995; Bacigalupo *et al.*, 1991). Los principales modelos para la foto-transducción en invertebrados son la mosca de la fruta *Drosophila*, el artrópodo *Limulus* y algunos moluscos. Siendo que se han encontrado diferencias en las vías de señalización de estos organismos. En *Limulus* y *Drosophila* han encontrado que la inyección de GMPc o bien, en el caso de la mosca, la inyección de un análogo de GMPc induce una corriente parecida a la producida por la luz en los fotorreceptores, es decir, la relación corriente/voltaje en respuesta a la luz y al GMPc es muy similar (Johnson *et al.*, 1986; Bacigalupo *et al.*, 1995). Aunado a esto está el hecho de que en el calamar se ha observado un aumento en los niveles de GMPc en respuesta a la foto-estimulación de los fotorreceptores (Johnson *et al.*, 1986).

Por otro lado está el trabajo de Shin y colaboradores (1993) en el que muestran la importancia del aumento del Ca^{2+} para la despolarización de los fotorreceptores como respuesta a la luz, en este trabajo aclaran el rol del Ca^{2+} ya que se consideraban dos modelos para explicar la función del calcio en la fototransducción: el modelo sinérgico y el modelo de dos vías. El primero postulaba que el rol del Ca^{2+} consistía en aumentar la velocidad de los pasos en la cascada primaria donde el calcio no es del todo esencial, mientras que en el segundo modelo postula que el Ca^{2+} es el encargado de modular una de las vías involucradas en la fototransducción, es decir, que el calcio es importante solo para uno de las fases del potencial de receptor. En donde los autores en base a sus resultados concluyen que ninguno de los modelos anteriores explican el rol del calcio, donde el papel de éste se ajusta mejor a un modelo de mediación en donde el aumento del calcio es un paso previo a la apertura de canales, donde ellos proponen que quizás el aumento del calcio está ligado al aumento de los niveles de GMPc que es el que lleva a la apertura de canales. Para aclarar este último punto entre la relación del aumento de los niveles de GMPc y el Ca^{2+} se ha propuesto a la enzima guanylato ciclasa (GC) como el enlace entre estos dos fenómenos, en donde el aumento del Ca^{2+} de alguna manera lleva a la activación de dicha enzima que cataliza la síntesis de GMPc, esto fue probado de manera indirecta al observar el efecto de inhibidores de la GC donde se observó que al inhibirla la amplitud de la despolarización es menor comparada al control (Garger *et al.*, 2004).

Todo lo anterior ha sido principalmente estudiado en los fotorreceptores ventrales de *Limulus*, donde este es, aparte de la mosca, el principal modelo de fototransducción en invertebrados por lo que quizás este modelo nos ayude a entender lo que sucede en los fotorreceptores del acocil. Así pues se conoce que la CHH lleva al aumento en los niveles de GMPc de una manera dependiente de tiempo y dosis en el músculo y hepatopáncreas (Sedlmeier, 1981), de manera que si la CHH está actuando sobre los fotorreceptores puede provocar en estos un aumento de GMPc donde éste último es importante para la apertura de canales iónicos sensibles a GMPc, por lo que quizás la amplitud del ERG aumentaría.

Lo antes propuesto ha sido demostrado en la mosca *Drosophila*, en este trabajo usaron un análogo del GMPc el 8-bromo-cíclico-GMP (8-Br-cGMP) donde observaron que la aplicación exógena de dicha molécula en los fotorreceptores lleva a un aumento en la respuesta de éstos a la luz, así como la inducción de una corriente de membrana (Bacigalupo *et al.*, 1995).

Sería interesante investigar más sobre la hipótesis antes mencionada y constatar el efecto del GMPc o de un análogo en preparaciones de retina *in vitro*, con el fin de observar el efecto de éste en la corriente de membrana, así como realizar una curva corriente-voltaje (I-V) y analizar el efecto del GMPc en la conductancia de membrana de los fotorreceptores.

Efecto de la CHH durante ZT15

El efecto de la CHH en la concentración de la glucosa durante la noche, fue nulo, es decir no se encontró ningún cambio en la concentración de glucosa (ver figura 8). Esto puede deberse a que al inicio de la noche es secretada CHH de la Glándula Sinusal y ésta ejerce su efecto en sus órganos blanco, incluyendo quizás a las células tapetales pues se sugiere que son blanco de la hormona (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985; Fanjul-Moles, 2006). De manera que durante la escotofase la CHH se encuentra ejerciendo un efecto endógeno en la retina por lo que los receptores de la hormona están ocupados por la CHH endógena por lo que la CHH exógena se ve imposibilitada de ejercer su efecto pues el sistema se encuentra saturado. Sin embargo existe un efecto de la CHH que no queda del todo claro; ya que pareciera que en las retinas incubadas con la hormona y que fueron estimuladas con luz la concentración de glucosa fue mayor que en las incubadas en CHH y que no fueron estimuladas, pero esto no está del todo definido ya que la diferencia significativa es muy cercana a $p < 0.05$, pues fue de $p(0.065) > 0.05$, de manera que sería importante ampliar la n de los experimentos o bien usar una mayor concentración de la hormona y así definir bien el rol de la hormona respecto a su efecto sobre la concentración de glucosa en retinas estimuladas y no estimuladas con pulsos de luz.

Respecto al efecto de la CHH en la amplitud del ERG durante ZT15 se observó que este es paradójico pues la amplitud disminuye en las retinas incubadas con CHH respecto a las retinas incubadas con VH+Hepes (Figura 11). Esto quizá sea porque la CHH al ejercer su efecto en los fotorreceptores provocaría un aumento en los niveles de GMPc que junto al aumento de este nucleótido en respuesta a la luz (como se ha visto en el calamar; Johnson *et al.*, 1986) llevaría a que los niveles fueran tan altos que por un efecto alostérico podrían activar a la fosfodiesterasa, ésta enzima degrada GMPc, por lo que los niveles disminuirían de tal forma que los canales sensibles a GMPc no podrían ser abiertos en respuesta a un fotón por lo que la respuesta a la luz decae (O' Day, 1997).

Por lo que el efecto de la CHH sobre la amplitud de los fotorreceptores y la concentración de la glucosa, nos indica que las células retinulares tienen una respuesta muy diferente a un mismo estímulo, misma concentración de CHH, de una forma diferente según el momento del día. Lo anterior podría estar indicándonos un efecto dual de la hormona, es decir, que las células que tienen receptores a la CHH y están siendo estimuladas por ésta, desencadenan diferentes respuestas celulares que dependen del estado fisiológico de la célula en un momento particular del día. Lo encontrado en el presente trabajo sobre un aumento en alguna actividad metabólica y una disminución de la misma actividad por una sola hormona donde el efecto, aumento o disminución, depende solo del momento del día en el que la hormona estimula a la célula no ha sido descrito en invertebrados. Existen reportes en donde prueban el efecto de un péptido en la amplitud del ERG pero solo durante el día subjetivo (Mancillas *et al.*, 1984; Kass *et al.*, 1984).

Por otro lado en vertebrados Yannielli y Harrington (2001) reportaron que el neuropeptido Y tiene efectos diferentes sobre el sistema circadiano según la hora del día; pues durante el día subjetivo el péptido produce un cambio de fase, sin embargo durante la noche subjetiva tardía este mismo péptido inhibe el cambio de fase del reloj producido por la luz. En dicho trabajo los autores concluyen que esto podría deberse a la interacción de la hormona con diferentes subtipos de receptores, donde un subtipo de receptor regula el efecto durante el día y el otro subtipo durante la noche. Aunque lo anterior sucede en vertebrados nos ayuda a tener una idea de lo que puede estar pasando en los invertebrados y plantearnos nuevas dudas, como por ejemplo: ¿existen subtipos de receptores a la CHH?, de ser así ¿la expresión de estos es diferente durante el día, de manera que un subtipo predomina en el día subjetivo y otro en la noche?, ¿es la regulación de diferentes vías metabólicas por estos subtipos de receptores los que permiten el efecto dual de la hormona? Y también será muy importante conocer si existen implicaciones de la diferente respuesta de las células a la CHH sobre la sincronización del ritmo del ERG.

En términos de ritmos biológicos la última pregunta es muy importante pues la retina es considerada un oscilador del sistema circadiano de los acociles, siendo que la retina aislada muestra un ritmo endógeno (Aréchiga y Rodríguez- Sosa, 1998; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) por lo que la regulación de la actividad eléctrica y metabólica de esta estructura es

importante para la expresión del ritmo del ERG; además de que esta estructura es la vía aferente por la que los ritmos son sincronizados a ciclos de luz/oscuridad ya que se comunica vía proyecciones nerviosas con el cerebroide que se piensa que es el oscilador encargado de sincronizar y regular numerosos ritmos en el acócil (Page y Larimer, 1974; Larimer y Smith, 1980).

Se ha observado que la retina aislada, sin la influencia hormonal del lóbulo óptico, es capaz de mantener un ritmo de ERG por varios días, lo cual deja de manifiesto la capacidad endógena del tejido de generar oscilaciones (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977). Ya que dicha sensibilidad no solo es regulada por el movimiento de los pigmentos sino que también las propias células retinulares generan una oscilación endógena en la sensibilidad a la luz, junto con el hecho de que la CHH es secretada por células del mismo tejido (Escamilla *et al.*, 2002) y que los resultados del presente trabajo dan indicios de que las células tienen todo un mecanismo para responder de diferente forma a la CHH según la hora del día, indica que la CHH podría tener un rol en la sensibilidad de los fotorreceptores y que por tal podría estar involucrada en la regulación del ritmo del ERG..

Así concluyo que el presente trabajo no solo confirma lo encontrado previamente por Sánchez Ortiz (2004) en su tesis de licenciatura sobre el hecho de que la glucosa es el sustrato que los fotorreceptores usan para mantener su actividad en respuesta a estímulos luminosos y que la CHH tiene un rol en la liberación de glucosa dentro de la retina, sino que también da pie a pensar que la CHH podría tener un papel en la regulación del ritmo del ERG. Por lo que lo anterior me lleva a proponer que la CHH podría tener un rol como neuromodulador en la actividad eléctrica de la retina. Este es un hecho interesante ya que en mamíferos también ha sido propuesto al glucagón, el análogo de la CHH en los crustáceos, como neuromodulador de la retina. Pues al igual que la CHH su función es el aumento de los niveles de glucosa en la sangre siendo que se ha encontrado inmunoreactividad en la capa ganglionar de la retina en ratones. Aunado a esto se ha observado que el glucagón aumenta los niveles de AMPc en la retina (Fernández-Durango *et al.*, 1990).

Conclusiones

- 1) La aplicación de CHH exógena en la retina tiene un efecto sobre la regulación del metabolismo de glucosa, semejante al de la CHH endógena sobre otros tejidos.
- 2) La glucosa liberada por la CHH es usada por los fotorreceptores para sostener la respuesta a estímulos luminosos.
- 3) Los efectos paradójicos de la CHH sobre la amplitud del ERG según la hora del día, donde durante la fotofase el efecto fue aumentar la amplitud y por el contrario durante la escotofase la disminución de ésta, muestran que es importante la regulación circadiana de secreción de dicha hormona para un control adecuado de los ritmos, en este caso del ritmo del ERG.

Bibliografía

Aréchiga H. (1993). Circadian Rhythm. *Current Opinion in Neurobiology* 3:1005-1010.

Aréchiga H., Rodríguez-Sosa L. (1998). Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *The Royal Society*. 265: 1819-1823.

Aschoff J. (1984). A survey in Biological Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4. Biological Rhythms. New York. Plenum press. 563 pp.

Bacigalupo J, Johnson E, Vergara C, Lisman J. (1991). Light-dependent channels from excised patches of *Limulus* ventral photoreceptors are opened by cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7938-7942.

Bacigalupo J, Bautista D, Brink D, Hetzer J, O'Day P. (1995). Cyclic-GMP enhances light-induced excitation and induces membrane currents in *Drosophila* retinal photoreceptors. *The journal of neuroscience*. 15 (11): 7196-7200.

Campos M. (2005). *Procambarus clarkii* (Crustacea:Decapoda:Cambaridae). Una langostilla no nativa en Colombia. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29(111): 295-302.

DeVries G, Cohen A, Hall I, Ferrendelli J. (1978). Cyclic nucleotide levels in normal and biologically fractionated mouse retina: effects of light and dark adaptation. *Journal of Neurochemistry*. 31: 1345-1351.

Escamilla-Chimal E.G., Van Herp F., Fanjul-Moles M.L. (2001). Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish. *The Journal of Experimental Biology*. 1073-1081.

Escamilla-Chimal E., Hiriart M., Sánchez-Soto M.C, Fanjul-Moles M.L. (2002). Serotonin Modulation of CHH Secretion by Isolated Cells of the Crayfish Retina and Optic Lobe. *General and Comparative Endocrinology* 125:283–290.

Fanjul-Moles Ma.L., Prieto-Sagredo J. (2003). The circadian system of crayfish: A Developmental Approach. *Microscopy research and technique* 60:291–301.

Fanjul-Moles M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and physiology, Part C* 142:390-400.

Fanjul-Moles ML, Escamilla-Chimal E, Salceda R, Giulianini P, Sánchez-Chávez G. (2010). Circadian Modulation of Crustacean Hyperglycemic Hormone in crayfish eyestalk and retina. *Chronobiology International*, 27(1): 34–51.

Fanjul-Moles M.L. (2014). Biological rhythms and their neural basis in crustaceans en Ch Derby y Thiel M. *Crustaceans Nervous Systems and Their Control on Behavior* Chapter 16 pp 428-456. Oxford University Press.

Fernández-Durango R, Sánchez D, Fernández-Cruz A. (1990). Identification of glucagon receptors in rat retina. *Journal of Neurochemistry*. 54: 1233-1237.

Frank T, Fein A. (1991). The role of the Inositol Phosphate Cascade in Visual Excitation of Invertebrate Microvillar Photoreceptors. *Journal Gen. Physiol.* 97: 697- 716.

Frixione E, Aréchiga H, Tsutsumi V. (1979). Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish. *Journal of neurobiology*. 10(6): 573-590.

Garger A, Richard E, Lisman J. (2004). The excitation cascade of *Limulus* ventral photoreceptors: guanylate cyclase as the link between InsP3-mediated Ca²⁺ release and the opening of cGMP-gated channels. *BMC Neuroscience*: 1-11.

Glowik R, Golowasch J, Keller R, Marder E. (1997). D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *The Journal of Experimental Biology* 200, 1421–1431.

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

Holdich D. (2002). *Biology of freshwater crayfish*. Blackwell Science. University of Nottingham, Nottingham. 702.

Ivanova T, Iuvone M. (2003). Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells. *Brain Research*: 991 (1-2): 96-103.

Johnson E, Robinson P, Lisman J. (1986). Cyclic GMP is involved in the excitation of invertebrate photoreceptors. *Nature* (324): 468-470.

Johnson E, O'Day P. (1995). Inhibitors of cyclic-GMP phosphodiesterase alter excitation of *Limulus* ventral photoreceptors in Ca-dependent fashion. *The journal of neuroscience* 15(10): 6586-6591.

Kallen J, Abrahamse S, Van Herp F. (1990). Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. : *Biol. Bull.* 179: 351-357.

Kass L., Barlow R. (1984). Efferent neurotransmission of circadian rhythms in *Limulus* lateral eye. I. Octopamine-induced increases in retinal sensitivity. *The journal of neuroscience* 4(4): 906-917.

Kaupp B, Seifert R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews.* 82(3): 769-824.

Kleinholz L. (1966). Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. *Am. Zoologist (Integrative and comparative biology)*. 6:161-167.

Kleinholz L. (1967). Initial characterization and separation of hyperglycemic (Diabetogenic) hormone from the crustacean eyestalk. *General and comparative endocrinology*. 8:75-81.

Larimer J., Smith J. (1980). Circadian Rhythm of retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* 136: 313-326.

Mancillas J., Selverston. (1984). Neuropeptide modulation of photosensitivity. II physiological and anatomical effects of substance P on the Lateral eye of *Limulus*. *The journal of neuroscience* 4(3): 847-859.

Miller C.S, Glantz R.M. (2000). Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish. *Visual Neuroscience*. 17: 353-368.

O'Day P, Bacigalupo J, Vergara C, Haab J. (1997). Current issues in invertebrate phototransduction. *Molecular Neurobiology*. 15(1): 41-63.

Page T., Larimer J. (1974). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude Rhythm. *J. comp. Physiology* 97: 81-96.

Sánchez J, Fuentes-Pardo B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A: 601-605.

Sánchez-Ortiz M. (2004). Tesis de Licenciatura: "Efecto de la Hormona Hiperglucemiante de los crustáceos sobre la actividad eléctrica de la retina del acocil *Procambarus clarkii in vitro*". Facultad de Ciencias, UNAM.

Santos E, Keller R. (1993). Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: A role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Camp. Biochem. Physiol*: 106A (2). 343-347.

Sedlmeier D, Keller R. (1981). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocrin*. 45: 82-90.

Sedlmeier D. (1982). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH) II. Involvement of glycogen synthase. *General and comparative endocrinology*. 47: 426-432.

Sedlmeier D. (1987). The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Camp. Biochem. Physiol*: (87) A, No. 2, pp. 423-425.

Review.

Shin J, Richard E, Lisman J. Ca^{2+} is an obligatory intermediate in the excitation cascade of *Limulus* Photoreceptors. *Neuron* (11): 845-855.

Shu-Chan H, Molday R. (1994). Glucose metabolism in photoreceptor outer segments. *The journal of biological chemistry*. 269 (27): 17954-17959.

Soyez D, Van Herp F, Rossier J, Le Caerli J, Tensen C, Lafont R. (1994). Evidence for a conformational polymorphism of Invertebrate Neurohormones. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(28): 18295-18298.

Sreenivasula P, Ramachandra R, Pushpalatha T. (2007). Differential mode of action of hyperglycemic hormones obtained from crab (Crustacea) and Millipede (Myriapoda) in the Crab, *Oziotelphusa senex senex*. *Journal of Biological Sciences*. 7 (1): 145-152.

Strauss J., Dircksen H. (2010). Circadian clocks in crustaceans: identified neuronal and cellular systems. *Frontier in bioscience*. 15:1-35.

Sullivan J., Genco M., Marlow E., Benton J., Beltz B., Sandeman D. (2009). Brain photoreceptor pathways contributing to circadian rhythmicity in crayfish. *Chronobiology International*. 26(6): 1136-1168.

Valdés-Fuentes M. (2006). Tesis de Licenciatura: “Efecto de dos peptidos hiperglicemicos sobre la retina del acocil *Procambarus clarkii* en condiciones in vitro a dos horas del nictemero”. Facultad de Ciencias, UNAM.

Yannielli P., Harrington M. (2001). Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides* 22(3):547-556.

Wei-Jun Y., Katsumi A., Hiromichi N. (1997). Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the Kuruma Prawn, *Penaeus japonicas*. *Peptides*. 18 (4):479-485.

Webster S, Keller R, Dirksen H. (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology* 175: 217–233.