



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
IZTACALA - U. N. A. M.

INFLUENCIA DE LAS ENCEFALINAS SOBRE LA
FUNCION VISUAL DEL ACOCIL
Procambarus Clarkii

T E S I S

ELABORADA PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G A

MARIA DEL PILAR FREIJO NIEBLA



Los Reyes Iztacala, Estado de México 1986.



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.

Este trabajo fue realizado parcialmente con recursos aportados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dentro del Programa de Fortalecimiento al Posgrado Nacional.

Agradezco a todos mis amigos que colaboraron en la realización de este trabajo, ya que sin su apoyo, colaboración y cariño quizá aún sería un proyecto.

Especialmente a Neto, Javier, Ivonne, Norma, Blanca, Pilar, Eduardo, Bolita y Jaine.

A mi mamá:

La mujer más maravillosa del mundo.

A la memoria de mi padre, que con su amor me dió todo.

A mis hermanos y sobrinos.

A Javier por su dirección, consejos y cariño.

La dicha de crear se manifiesta en las obras, que de una u otra forma son réplicas de la maravilla que nos rodea. La naturaleza con sus encantos y misterios nos invita a penetrar en un mundo donde cabe toda ciencia y todo arte, un mundo del cual formamos parte y no debemos olvidar. Día a día aprendemos algo de ella y cada vez nos maravilla más su grandeza.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 El sistema visual de los crustáceos	1
1.2 El tallo ocular de los crustáceos	3
1.3 Pigmentos accesorios	5
1.4 Electroretinograma	6
1.5 Encefalinas	8
1.5.1 Encefalinas en vertebrados	10
1.5.2 Encefalinas en la retina de los vertebrados	11
1.5.3 Encefalinas en invertebrados	13
1.5.3.1 Encefalinas en crustáceos	16
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL Y METODOS	20
3.1 Animales experimentales	20
3.2 Retina aislada	20
3.3 Sistema de estimulación	21
3.4 Sistema de registro	22
3.5 Animal íntegro	23
3.6 Evaluación de los índices de migración de los pigmentos accesorios	23
3.7 Tratamiento de resultados	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Análisis del efecto de algunos opiáceos sobre la actividad eléctrica de la retina aislada	26
4.1.1 Morfina	26
4.1.2 Leucina encefalina	28

4.1.3 Metionina encefalina	29
4.1.4 D-serina ² leucina encefalina treonina	29
4.2 Análisis del efecto de algunos opiáceos sobre la migración de los pigmentos visuales	31
4.2.1 Curso temporal de los pigmentos accesorios	31
4.2.2 Pigmento proximal	31
4.2.2.1 Morfina	31
4.2.2.2 Naloxona	32
4.2.2.3 Dser ² leucina encefalina treonina	33
4.2.3 Pigmento distal	34
4.2.3.1 Morfina	34
4.2.3.2 Naloxona	34
4.2.3.3 D-serina ² leucina encefalina treonina ..	35
5. DISCUSION	36
6. BIBLIOGRAFIA	44

1. INTRODUCCION

Las estructuras relacionadas con la entrada de información en los organismos, y los mecanismos involucrados con su regulación, juegan un papel determinante en diversas funciones, así como en la determinación de patrones conductuales (1,2). Dentro de una amplia gama de variaciones energéticas, los cambios lumínicos, cuya integración inicial se lleva probablemente a cabo en las células fotorreceptoras, tienen un papel preponderante. En los crustáceos, el sistema visual no se restringe al área retiniana, sino que involucra a diversas regiones del sistema nervioso (2). La función de los fotorreceptores retinianos se encuentra regulada por diversos mecanismos, entre los que destacan algunas sustancias que pueden desempeñar un papel de importancia en la transmisión de información o en la modulación de la función del sistema visual.

1.1 EL SISTEMA VISUAL DE LOS CRUSTACEOS.

El sistema visual localizado en la retina, está formado por células sensoriales especializadas, cuya organización y funcionamiento difiere según el grupo zoológico de que se trate. En los artrópodos se encuentran principalmente dos tipos de ojos: los simples y los compuestos. Los últimos son generalmente bien desarrollados y usualmente pedunculados (3). En los crustáceos decápodos, la unidad visual del ojo compuesto es el omatidio (fig.1), que contiene siete células sensoriales o retinulares (3). El número de omatidios varía según la especie (4). Las células retinianas emiten prolongaciones membranales en

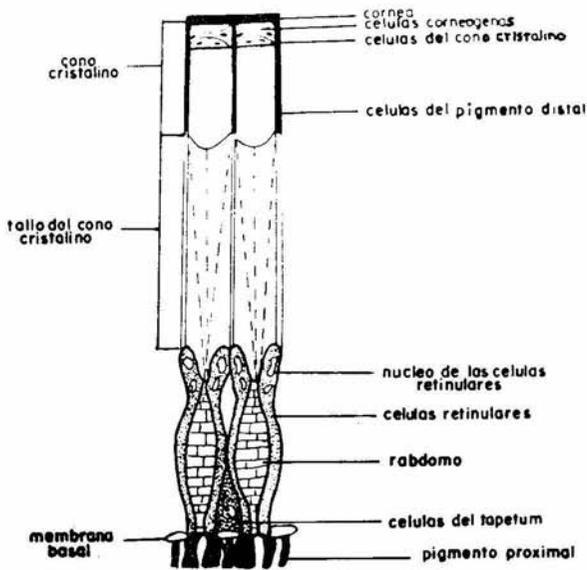


Figura 1: Representación esquemática del omatidio en los crustáceos decápodos.

la región medial, que se fusionan con las del lado opuesto para formar en conjunto el rabadomo que se encuentra en la región central y contiene a la rodopsina (5), pigmento fotolábil indispensable en la visión, el cual se blanquea dependiendo de la intensidad de iluminación (6). Por encima de las células retinulares, se encuentra el cono cristalino, formado por cuatro células cubiertas por dos células corneógenas en forma de lente (3).

Como estructuras parareceptoras, se encuentran los pigmentos proximal, distal y de reflexión (3,4,5,7,8). El pigmento proximal está contenido en las células retinulares, el distal se encuentra en dos células situadas alrededor del cono cristalino de cada omatidio (3,4,5), y el pigmento de reflexión (pteridinas) (2,4), se sitúa a lo largo del ojo desde la córnea hasta la membrana basal, observándose además en dos largas células en la parte externa de la membrana basal con procesos entre la retina y la lámina ganglionar así como en la córnea (3). Por su parte, los axones de las células retinulares, terminan en la lámina ganglionar (9). La membrana basal está formada por células y fibras de tejido conectivo, que corren por debajo de las células retinulares y que es atravesada en patrones regulares por axones acompañados por una red vascular (3).

1.2 EL TALLO OCULAR DE LOS CRUSTACEOS

En el lóbulo óptico de los decápodos existen cinco neuropilos: la lámina ganglionar, la médula externa, la médula interna, la médula terminal y el cuerpo hemielipsoide (fig. 2).

Tipicamente hay dos tipos de conexiones axónicas entre los neuropilos; neuronas cortas que corren entre un neuropilo y el próximo formando un quiasma entre cada neuropilo sucesivo; y neuronas con largas arborizaciones que corren tangencialmente en forma de capas en los neuropilos internos, mandando sus axones al cerebro (3).

La lámina ganglionar esta situada cerca de la base de los omatidios, los axones de las células retinulares no la atraviesan. Se encuentran en ella axones de primer y segundo orden, los de primer orden salen de la parte posterior de la lámina hacia la parte anterior de la médula externa, formando el primer quiasma óptico. En su superficie externa hay una capa de células ganglionares (3). La médula externa al igual que la médula interna son neuropilos dispuestos en densas capas. Entre ellos se encuentra situado el segundo quiasma óptico, asimismo, emerge un tracto que se dirige al protocerebro. El tercer quiasma óptico se forma entre la médula interna y la médula terminal y generalmente es irregular (3). La médula terminal se encuentra en la parte dorsal y anterior del tallo ocular, lateral al cuerpo hemielipsoide, contiene tractos provenientes de la médula interna. Dos paquetes de axones salen de ella hacia el cerebro, a lo largo del tracto que forma el nervio óptico en

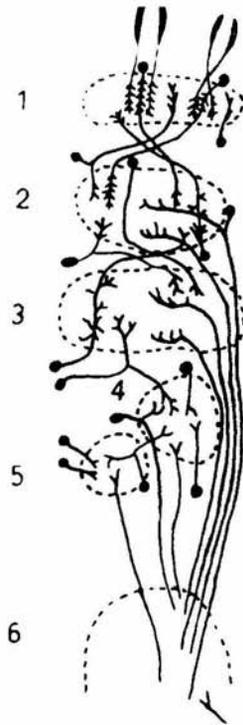


Figura 2: Representación esquemática de los neuropilos en el tallo ocular de los crustáceos y algunas de sus interrelaciones. 1) Lámina ganglionar. 2) Médula externa. 3) Médula interna. 4) Médula terminal. 5) Cuerpo hemielipsoide. 6) Protocerebro. Modificado de Hanstrom, 1926 (3).

la mayoría de los decápodos. El número de axones en el nervio óptico es aproximadamente seis veces mayor que el número de omatidios. Es importante destacar que en la médula terminal se localizan los cuerpos de las neuronas secretoras cuyas terminales forman la glándula sinusal (10). El cuerpo hemielipsoide situado en la parte anterior del tallo, en la mayoría de los decápodos, se encuentra asociado con grupos de células globulares (3).

Los ganglios ópticos del tallo se comunican con el ganglio supraesofágico por medio del nervio óptico, en el cual, es posible distinguir un gran número de clases neuronales (11). El nervio contiene axones de interneuronas visuales aferentes, que se originan en la periferia del ganglio óptico, así como fibras eferentes provenientes del cerebro o de regiones nerviosas más caudales (12,13,14). El nervio óptico del acocil Orconectes genus contiene aproximadamente 17,000 axones (15) la mayoría con un diámetro medio de 2 micras, encontrándose algunos de 20 micras de diámetro. Además de las fibras visuales, el nervio óptico contiene neuronas mecanorreceptivas, con campos receptores extensos, axones eferentes de órganos cefálicos sensoriales, particularmente de los estatocistos (13) e interneuronas visuales (12,16). Dichas fibras al parecer cruzan la línea media del cerebro por medio de los tractos de las comisuras protocerebrales, que conectan los dos nervios ópticos (17).

1.3 PIGMENTOS ACCESORIOS.

Al recibir estímulos luminosos, en el ojo ocurren cambios, tanto en las estructuras parareceptoras como en las fotorreceptoras (18). En condiciones de adaptación a la obscuridad, los pigmentos proximal y distal se retraen, permitiendo que los fotorreceptores reciban una mayor proporción de la luz incidente en el ojo. En el caso de la adaptación a la luz, dichos pigmentos tienden a aproximarse, quedando los fotorreceptores "blindados" a la luz tangencial (19,20). El pigmento de reflexión actúa reflejando la luz que pasa a través del rabadomo, aumentando la estimulación de las células retinulares (21). Durante el día, este pigmento se encuentra cubierto por los pigmentos distal y proximal (21). Este pigmento es móvil en algunos crustáceos, lo que no ocurre en el acocil (5).

Los desplazamientos fotomecánicos de los pigmentos están regulados por sistemas diferentes. El pigmento distal responde a señales neurohormonales, ya que al parecer a estas células no llegan fibras nerviosas. En algunas especies de crustáceos, se ha documentado que el sistema neuroendócrino produce una hormona de naturaleza peptídica que promueve la migración de este pigmento hacia la posición de adaptación a la luz (HPDL) (22,23,24). Existen datos que sugieren la existencia de otra hormona capaz de inducir la migración del pigmento distal a la posición de adaptación a la obscuridad (25), aunque otros autores reportan que en el caso del acocil Procambarus bouvieri

este fenómeno es pasivo (26). El pigmento retiniano proximal al parecer se comporta como un efector independiente, respondiendo directamente a la luz incidente en los fotorreceptores (26).

La estimulación luminosa, esta asociada con un incremento en la concentración intracelular de iones Ca^{++} en el fotorreceptor, relacionado con los desplazamientos del pigmento proximal (27). Asimismo, existe una marcada diferencia en el curso temporal de los movimientos inducidos por la iluminación en cada uno de los pigmentos accesorios del ojo compuesto del crustáceo, que ha sido descrita por De Bruin y Crisp (28), en tres especies marinas: Praunus flexuosus, Pandalus montaquí y Leander serratus. Durante la adaptación a la luz migra más rápidamente el pigmento proximal que el pigmento distal, lo que también se ha observado en el acocil de agua dulce Procambarus bouvieri (29). Otra diferencia importante es la intensidad necesaria para inducir los movimientos de estos pigmentos. El distal requiere de intensidades más elevadas que el proximal, por lo que el primero al parecer participa en ajustes lentos (8,22,24,29).

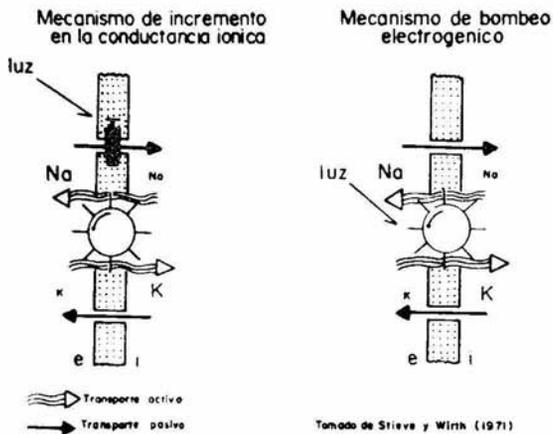
1.4 ELECTORRETINOGRAMA (ERG).

Las células retinulares al ser excitadas por la luz se despolarizan apareciendo el llamado Potencial de Receptor (PR) (30,31,32,33,34,35), el cual persiste mientras se mantenga el estímulo, y cuya magnitud es proporcional al logaritmo del mismo. La actividad masiva de toda la población de

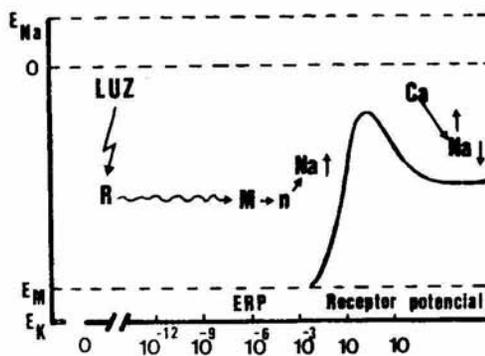
fotorreceptores, es susceptible de ser detectada mediante el registro extracelular conocido como electroretinograma (18,35). Para explicar la generación de este potencial en la célula del fotorreceptor, se han postulado dos mecanismos. El primero, involucra una modificación en el bombeo electrogénico, que es controlado por la luz (fig. 3a) (36,37,38), a favor de este mecanismo Koike (39), Stieve (38) y Smith (36) muestran que la ouabaina, bloqueador de la bomba de sodio-potasio, no afecta la despolarización del fotorreceptor del langostino, pero afecta en su fase inicial tanto el bombeo, como el potencial de reposo de los fotorreceptores, respondiendo éstos, sólo a intensidades lumínicas mayores (38). El segundo propone un incremento en la conductancia iónica, causado por la luz, generando así el potencial del fotorreceptor (35,40). A favor de este mecanismo se tienen registros del cambio de conductancia de la membrana, en respuesta a la luz (35). Este mecanismo ha sido probado en la totalidad de los fotorreceptores de invertebrados hasta ahora estudiados y en particular en el acocil *Procambarus clarkii*, donde se han mostrado cambios de conductancia membranal durante el PR (35). Asimismo se ha visto en el percebe (41) y en el acocil (42), que en ausencia de Na^+ externo el potencial despolarizante del fotorreceptor es drásticamente reducido, pero no desaparece completamente.

La absorción de fotones, por sí misma no modifica la permeabilidad de la membrana, pero al ser captados por la rodopsina, se desencadenan una serie de transformaciones

a



b



R: Rodopsina
M: Metarodopsina
n: molecula transmisora

Figura 3: a) Algunos mecanismos propuestos para la generación del potencial del receptor (38,82). b) Mecanismo propuesto para los cambios de conductancia en fotorreceptores de invertebrados. Ver texto (citado en 82).

químicas, que producen un proceso de amplificación, y ocasionan la apertura de canales iónicos, muy probablemente de Na^+ y Ca^{++} . Adicionalmente, el potencial de membrana decrece y se eleva la afinidad a los iones Ca^{++} en los canales de Na^+ , provocando el cierre de éstos y un rápido decremento de la entrada de Na^+ . Cuando el estímulo cesa, el exeso de Ca^{++} cierra todos los canales de Na^+ y el potencial regresa a su nivel de reposo (fig.3b). El transmisor involucrado en el proceso de amplificación para el incremento a la conductancia al Na^+ es aún desconocido, pero este no parece ser el calcio, puesto que un incremento en la conductancia interna de este ión reduce la conductancia para el Na^+ . Esta respuesta eléctrica, a su vez es acompañada por desplazamientos del pigmento proximal, deduciéndose que ambas respuestas están funcionalmente acopladas (43).

1.5 ENCEFALINAS

En 1973, tres laboratorios independientes reportan la presencia de receptores específicos a opiáceos en el sistema nervioso central de los vertebrados, capaces de combinarse con todos los opiáceos activos conocidos, al igual que con sus antagonistas (44,45,46). La hipótesis de una sustancia endógena que se asociaba con estos receptores cobró fuerza. Esta se basaba en la observación de que al estimular la sustancia gris periacueductal de la rata, se producía una analgesia similar a la obtenida con morfina (47). Posteriormente se observó que esta

analgesia se atenuaba con un antagonista específico de opiáceos: la naloxona. La explicación dada era que la estimulación eléctrica liberaba una sustancia endógena parecida a la morfina cuyo efecto se bloqueaba con naloxona (48). La búsqueda deliberada de opiáceos endógenos, termina en 1975 cuando Huges y cols. identifican dos péptidos en el cerebro de la vaca y del cerdo, que producen los mismos efectos que la morfina en el ilium aislado de cobayo, y en los vasos deferentes del ratón. Estos dos pentapéptidos, leucina encefalina y metionina encefalina, sólo difieren en su aminoácido terminal (tir-gli-gli-phe-leu y tir-gli-gli-phe-met) (49). Un año después, el grupo de Roger Guillemin descubre las endorfinas (50).

En un principio se creyó que las encefalinas y endorfinas provenían del mismo precursor, la pro-opiomelanocortina. Noda y cols. en 1982, reportan la presencia del precursor de las encefalinas, siendo éste la proencefalina, que posee 6 veces la secuencia de metionina-encefalina y una vez la de leucina-encefalina, con capacidad de liberar el péptido E, un heptapéptido y un octapéptido, que tienen la secuencia de metionina-encefalina alargada por dos y tres aminoácidos. La proencefalina se ha encontrado en la médula de la glándula suprarrenal, intestino y cerebro. Se cree que se liberan moléculas en proporciones variables según la región del cuerpo y sus necesidades (51,52,53).

1.5.1 ENCEFALINAS EN VERTEBRADOS.

Las encefalinas en los vertebrados, se encuentran en casi todas las regiones del cerebro, excepto en el cerebelo. Principalmente se localizan en el sistema límbico donde se ha encontrado una mayor proporción de leucina encefalina (54), en el cuerpo estriado, núcleo solitario, cuerno dorsal de la médula espinal y parte posterior de la hipófisis, así mismo, se han encontrado en la médula suprarrenal y en el intestino (54). Las posibles funciones atribuidas a estas sustancias, se relacionan con el comportamiento emocional, el control automático de la motricidad (movimiento involuntario), la acción sobre los reflejos viscerales (respiración), la transmisión del dolor, la liberación de adrenalina y noradrenalina en la médula suprarrenal y la liberación de vasopresina y oxitocina en la hipófisis, entre otras (54).

Las encefalinas pueden ser consideradas como neuromoduladores o posibles neurotransmisores inhibidores de circuitos neuronales específicos, como sería el caso de la transmisión de información de dolor por la sustancia P en la médula espinal, para lo cual se ha propuesto una acción inhibidora sináptica de las encefalinas (55). Su acción es tanto presináptica como postsináptica (56). Las encefalinas, ocasionan que la corriente de calcio entrante disminuya en uniones sinápticas en cultivo de células del ganglio espinal dorsal y médula espinal de pollo y de rata, evitando la liberación de

sustancia P; también se ha observado que inhiben la liberación de serotonina, noradrenalina y GABA (56). Asimismo estimulan la liberación de dopamina y adicionalmente modulan la liberación *in vitro* de acetilcolina en el plexo mesentérico. La distribución de neuronas con neurotensina y sustancia P es sorprendentemente próxima a regiones que contienen encefalinas (57). En el cerebro medio se yuxtaponen a neuronas que contienen GABA o serotonina (57). Esta proximidad es también notoria en la distribución de encefalinas y sustancia P en el tallo ocular de algunos crustáceos (ver adelante). Las encefalinas se unen a los receptores μ y δ , teniendo en común al primero de ellos con la morfina. La naloxona antagonista de opiáceos, compite con estos receptores (58,59).

1.5.2 ENCEFALINAS EN LA RETINA DE LOS VERTEBRADOS.

A través de métodos radioinmunológicos, cromatográficos e inmunohistoquímicos, se ha localizado en la retina de algunos vertebrados, la presencia de varios péptidos, entre los cuales figuran las encefalinas. Estas se localizaban principalmente en las células amácrinas (60). En aves como la paloma y la gallina, las encefalinas se encuentran en células amacrinas multiestratificadas, distribuyéndose en toda la retina, aumentando su densidad en regiones centrales. Las células amacrinas que contienen encefalina, constituyen una población de células separadas que pueden actuar sobre otras células amacrinas que contengan dopamina, GABA, indolamina o encefalina

(61). En la tortuga *Pseudemys scripta elegans* las células amacrinas que contienen encefalinas se encuentran biestratificadas, con arborizaciones en la lámina 1,3 y 5 de la lámina plexiforme interna, encontrándose concentradas en la franja visual, decrecientando su densidad gradualmente hacia la retina periférica (62). En esta especie de reptil, se han encontrado encefalinas por inmunoreactividad en vesículas de 1250 angstroms de diámetro, asimismo se han visto, junto a ellas, vesículas no marcadas de 600 a 1300 angstroms de diámetro, produciéndose además una reacción difusa en el citoplasma celular. A su vez reciben sinapsis de células bipolares y amacrinas. Estas células hacen sinapsis químicas, que involucran las pequeñas vesículas no marcadas en varios tipos celulares postsinápticos (63).

En la retina de teleosteos se ha demostrado la acumulación de GABA en las células amacrinas periformes selectas. La liberación de GABA es causada por la despolarización a través de canales de K^+ dependientes de Ca^{++} . Esta liberación se puede bloquear con metionina-encefalina, leucina-encefalina o morfina, siendo el efecto dependiente de la dosis. La naloxona a su vez puede suprimir la acción bloqueante de la metionina-encefalina, esto sugiere que las encefalinas pueden tener una acción específica en la acumulación de GABA en el sistema de células amacrinas en la retina del teleosteo (64).

Registros electrofisiológicos en preparaciones de copa de la retina del teleosteo, han demostrado que al aplicar

D-alanina² metionina encefalinamida (DALA), por medio de un atomizador, se aumenta la actividad espontánea, así como la respuesta evocada por la luz en el centro "on" de la célula ganglionar, inhibiéndose a su vez la actividad espontánea y la respuesta evocada por la luz en el centro "off" de la célula ganglionar. Este efecto es reversible con naloxona. Efectos similares pero no reversibles se observan al aplicar morfina (65).

1.5.3 ENCEFALINAS EN INVERTEBRADOS

Un año previo al descubrimiento de los opiáceos endógenos, Tremblay y colaboradores (66) probaron el efecto de la morfina sobre una monosinapsis colinérgica excitatoria en el ganglio abdominal de *Aplysia californica* encontrando que la morfina reduce hasta en un 50 % la amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSPs), de un tren evocado por estimulación eléctrica. Al parecer el efecto observado es independiente de la frecuencia de estimulación, siendo la dosis mínima efectiva de 1×10^{-5} M. Su acción inhibitoria se ha relacionado con un efecto presináptico, ya que la aplicación iontoforética de Acetilcolina (ACh) en presencia de morfina no produce el bloqueo, por lo que el mecanismo se relaciona con una disminución en la liberación del transmisor en la terminal presináptica, que afecta todo el proceso de remplazo del transmisor en el pozo de almacenamiento para su liberación. La naloxona no antagoniza el efecto de la morfina, en cambio

decrece la amplitud de los EPSPs del tren. El levorphanol y el dextrophanol producen los mismos efectos que la morfina, por lo que se sugiere la presencia de receptores no estereoespecíficos en esta preparación (66).

Por métodos de inmunocitoquímica, se ha logrado detectar la presencia de algunos opiáceos endógenos en invertebrados (67,68,69,70,77). En la lombriz de tierra, se ha encontrado inmunoreactividad positiva a encefalinas y β -endorfina. Las encefalinas se encuentran en el ganglio cerebral, en los cuerpos neuronales de diferentes tipos, localizados en la periferia y en fibras nerviosas situadas en la parte central. Las fibras son muy numerosas extendiéndose a las conexiones circunfaríngeas. La β -endorfina tiene un patrón similar, excepto que las fibras nerviosas no se extienden hacia las conexiones y su número es menor (67). En el ganglio medio posterior de la sanguijuela, se encuentra una célula entre las 400 existentes, que presenta reactividad positiva a leucina encefalina. Esta célula se encuentra aproximadamente en la misma posición en cada ganglio, presentándose también unas pequeñas varicosidades, que se presume son terminales sinápticas con gran contenido peptídico (68).

Experimentos realizados en el ganglio pedal de la almeja *Mytilus edulis* para evaluar la relación de péptidos opioides a sitios receptores, muestran sitios de unión estereoespecífica con alta afinidad, que presentan reversibilidad. Encontrando también unión no cooperativa de sitios de alta afinidad y unión

cooperativa alta a sitios de baja afinidad, lo cual prueba la existencia de receptores a opiáceos en esta preparación (71).

En diferentes tipos celulares, en ganglios supraesofágicos aislados de *Helix pomatia*, que responden por medio de una despolarización o hiperpolarización a la ACh, se han reportado dos tipos de efectos a la leucina encefalina. Una despolarización moderada que acelera el patrón de descarga y una respuesta hiperpolarizante. En el primer caso, la naloxona produce un efecto agonista, aumentando la frecuencia de disparo neuronal y en la hiperpolarización un bloqueo total. La leucina encefalina en las hiperpolarizaciones evocadas por ACh dependientes de la presencia de K^+ , provoca un decremento en la amplitud, fenómeno que se antagoniza con naloxona. Las dosis efectivas son mayores que en los vertebrados (72). En neuronas secretoras (NS) del ganglio visceral y en la célula RPa2 del ganglio parietal derecho de *Helix pomatia*, la metionina encefalina acelera la frecuencia de disparo. En el caso de las NS el efecto se presenta después de un periodo de latencia, con una duración mayor. En ambos casos, el fenómeno observado se antagoniza con grandes dosis de naloxona. La morfina produce el mismo efecto, pero con una magnitud mayor (73). En la misma especie, la metionina encefalina modula selectivamente la transmisión dopaminérgica, decrementando la constante de tiempo en la movilización del transmisor. Se sugiere la presencia de receptores a opiáceos en la célula presináptica, que modulan la

eficacia de la transmisión dopaminérgica. La naloxona antagoniza el efecto causado por la metionina encefalina (74).

Con respecto al efecto de las encefalinas sobre la regulación de dopamina, en preparaciones de *Mytilus edulis*, se han observado variaciones estacionales en la sensibilidad de estos péptidos, tanto en la unión a receptores como en los efectos farmacológicos. En el verano, los niveles de ligandos endógenos a opiáceos y la ocupación de receptores es mayor, que la observada en primavera y otoño, pudiendo existir alteraciones cíclicas en la afinidad del receptor o variación en el número de éstos, lo que sugiere un posible papel modulador (75).

1.5.3.1 ENCEFALINAS EN CRUSTACEOS.

En 1984, Quackerbush y Fingerman observan que en los cromatóforos intertegumentarios del cangrejo *Uca pugilator*, la metionina encefalina produce la concentración de los pigmentos rojo y negro en el animal íntegro, siendo el efecto dependiente de la dosis, el mayor efecto se logra con una concentración de 10^{-5} M, bloqueándose con naloxona. En las patas aisladas no se observa la translocación de los pigmentos. En los tallos oculares aislados, induce la liberación de la hormona concentradora de eritróforos (RPCH) y melanóforos (BCPH), siendo este sitio susceptible de ser bloqueado con naloxona. En una concentración de 10^{-5} M la metionina encefalina aumenta la liberación de BPC y RPCH inducida por pulsos de voltaje aplicados a los tallos aislados. La naloxona bloquea

completamente la liberación de BPCH y dos formas largas de RPCH. La β -endorfina tanto en el cangrejo intacto como en las patas aisladas, produce la dispersión del pigmento oscuro (76).

Por medio de microscopía de luz e inmunocitoquímica, Fingerman y cols., detectaron reactividad positiva a leucina encefalina y metionina encefalina en estructuras del tallo ocular del cangrejo Uca pugilator. Ambas sustancias se encontraron en la lámina ganglionar, médula terminal, glándula sinusal y nervio óptico, presentándose además metionina encefalina en el órgano X y en axones de la médula externa (77) (fig.4). A través de métodos inmunohistoquímicos, se ha documentado la presencia de leucina encefalina y de sustancia P en elementos neuronales específicos del sistema visual de la langosta Panulirus interruptus y del acocil Procambarus clarkii (69). En la langosta, la encefalina se observó en toda el pericarion de las células retinulares con excepción del núcleo, en las fibras que pasan en dirección centrifuga a través de la médula terminal terminando en un plexo de fibras finas varicosas en la médula interna, que se cree terminan en la lámina ganglionar, encontrándose también en el tercer quiasma óptico. En el acocil Procambarus clarkii se encontró un patrón extremadamente similar. En esta especie, además se detectaron encefalinas en las fibras que van de los fotorreceptores primarios a la lámina ganglionar, así como en terminales que la atraviesan (fig.4) (69). Jaros y cols. en 1985 en el cangrejo Carcinus maenas por medio de inmunofluorecencia y tinción con

peroxidasa, localizaron reactividad positiva para encefalina en perfiles axónicos en la glándula sinusal, presentando una mayor densidad cerca del área del seno sanguíneo. En algunos de los axones se presentan gránulos electrodensos. Adicionalmente, esta inmunoreactividad a encefalinas se presenta en otras regiones del tallo ocular, asociada con fibras nerviosas y pequeños cuerpos celulares situados en la lámina ganglionar, médula externa, médula interna y médula terminal, así como en fibras del primer quiasma óptico (fig.4). Por medio de cromatografía líquida de alta presión, comparando el tiempo de retención de patrones conocidos con el de los extractos radioinmunoactivos de la glándula sinusal, encontraron una mayor cantidad de leucina encefalina, algo del heptapeptido metionina encefalina arginina⁶ alanina⁷ y trazas de metionina encefalina (70).

Existen evidencias en diversos sistemas que apuntan hacia la posible modulación por encefalinas, como sucede para la sustancia P, en la sustancia gelatinosa de la médula espinal de algunos vertebrados (55). La detección de encefalinas en el tallo ocular y principalmente en las estructuras visuales, sugiere la posibilidad de que posean alguna función neurotransmisora o neuromoduladora dentro de dicho sistema.

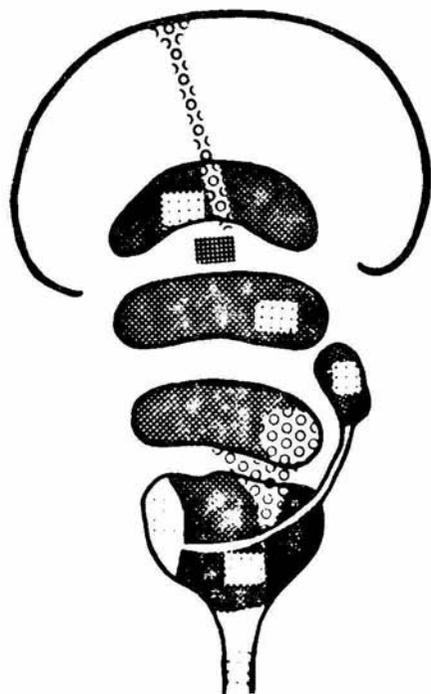


Figura 4: Distribución esquemática de las encefalinas en el tallo ocular de los crustaceos, según los trabajos de Mancillas y cols. (O), Jaros y cols. (■) y Fingerman y cols. (:) (69, 70, 77).

2. OBJETIVOS

Se han identificado diversos opiáceos en el tallo ocular del acocil Procambarus clarkii, sin embargo se desconoce su función en esta especie. Su localización podría sugerir relaciones con la función de estructuras o sistemas contenidos dentro del pedúnculo ocular, particularmente con el sistema visual.

Por lo que el propósito de la presente tesis es estudiar el efecto de algunos opiáceos sobre el sistema visual, evaluando su efecto sobre el proceso de adaptación a la obscuridad en la retina aislada del acocil Procambarus clarkii y sobre el curso temporal de la migración de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal durante el proceso de adaptación a la obscuridad en el animal íntegro.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

Los experimentos se realizaron en acociles de la especie Procambarus clarkii recolectados en el Río Conchos en el Estado de Chihuahua. Se emplearon especímenes adultos, sin distinción de sexo y en la etapa C o D del ciclo de intermuda (78). Los animales fueron aclimatados por lo menos una semana previa a los experimentos en estanques de plástico de 46 cm. por 56 cm. a temperatura ambiente con ciclos naturales de luz-obscuridad.

En los experimentos se utilizaron dos tipos de preparaciones: la retina aislada y el animal íntegro.

3.2 RETINA AISLADA

Las retinas se obtuvieron mediante disección, para ello se extirparon el rostrum y los tallos oculares, colocando a éstos en cajas de petri con solución salina para crustáceos Van Harreveld (79). Por medio de una hoja de afeitar se realizó un corte diagonal en el sitio de unión del pedúnculo ocular y la retina, procurando dejar en ésta una porción pequeña de la lámina ganglionar.

Las retinas se colocaban en una cámara de lucita con un volumen de 2 ml, con solución salina para los animales testigo y con Leucina encefalina 10^{-4} M, Metionina encefalina 10^{-4} M, Morfina 10^{-6} M a 10^{-4} M, D-serina² leucina encefalina treonina 10^{-4} M, Naloxona 10^{-4} M, así como Leucina encefalina 10^{-4} M,

Metionina encefalina 10^{-4} M y Morfina 10^{-4} M en combinación con Maloxona 10^{-5} M para los grupos experimentales.

3.3 SISTEMA DE ESTIMULACION

Se utilizaron dos métodos de fotoestimulación, en ambos casos, se aplicaron tres pulsos luminosos cada tres minutos, de 100 a .001 mseg de duración, con una intensidad de 8 a 60 bujias/pie².

Durante los primeros experimentos, la estimulación luminosa se aplicó mediante la adaptación de un foco de linterna a un estimulador del fisiógrafo Narco Bio-Systems Mod. SI-10. Se captó la señal a través de una fotocelda de miógrafo (colocada en el lugar de la preparación), que se encontraba conectada al amplificador del fisiógrafo (Narco Bio-System mod. 7070), registrándose así la señal en papel en unidades de voltaje. Se construyó adicionalmente una curva donde la frecuencia de estímulos permitía medir las intensidades en unidades lumínicas (bujias/pie²), esta lectura se efectuó con un fotómetro Weston Instrument INC mod. 756. colocado en el sitio de la preparación. Con estos datos se relacionó el voltaje registrado por la fotocelda y la lectura del fotómetro, por último se estableció la relación entre el voltaje emitido por el estimulador que activaba la fuente de luz con las unidades lumínicas emitidas por ésta (fig. 5), encontrando que los estímulos emitidos por la fuente luminosa fueron de 8 bujias/ pie² y 100 mseg de duración.

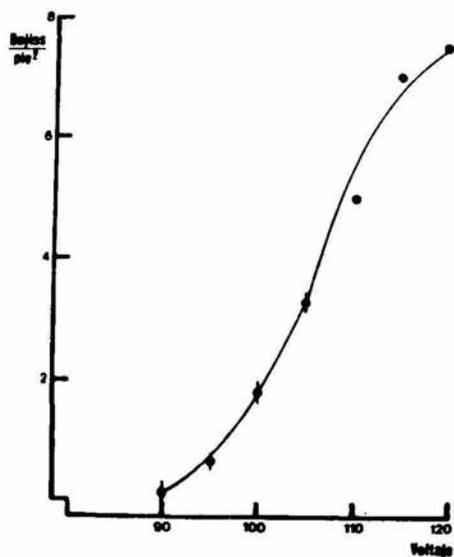


Figura 5: Relación entre el voltaje emitido por el estimulador y las intensidades lumínicas captadas por el fotómetro. En la ordenada se expresan estas intensidades en bujías/pie² y en la abcisa el voltaje del estimulador.

Los experimentos efectuados con este diseño, fueron realizados incubando las retinas en solución Van Harrevelde para los animales testigo y con Leucina encefalina, Metionina encefalina y la combinación de éstas con naloxona para los grupos experimentales. La segunda serie de experimentos fue realizada por medio de un fotoestimulador Grass mod. PS33 que emite pulsos de .001 mseg. de duración, con una intensidad de 60 bujias/pie², evaluada a través del fotómetro, cuya fotocelda fue colocada en el lugar de la preparación.

3.4 SISTEMA DE REGISTRO

Como se muestra en la figura 6, para el registro de la respuesta eléctrica de la retina (ERG), se empleó un electrodo de succión colocado en la lámina ganglionar. El electrodo fue fabricado a partir de un capilar de vidrio estirado por calentamiento, el cual se llenó con solución salina como medio conductor. La señal eléctrica fue comparada con un electrodo a tierra y transmitida a un amplificador de fisiógrafo Narco Bio-Systems mod. 7070, registrándose las señales obtenidas en papel, a través de un sistema de plumillas de un fisiógrafo Narco Bio-Systems mod. CPM.

Los experimentos se llevaron a cabo durante los meses de abril, mayo, agosto y septiembre a temperatura ambiente, y en obscuridad constante, solo interrumpida por pulsos luminosos de prueba.

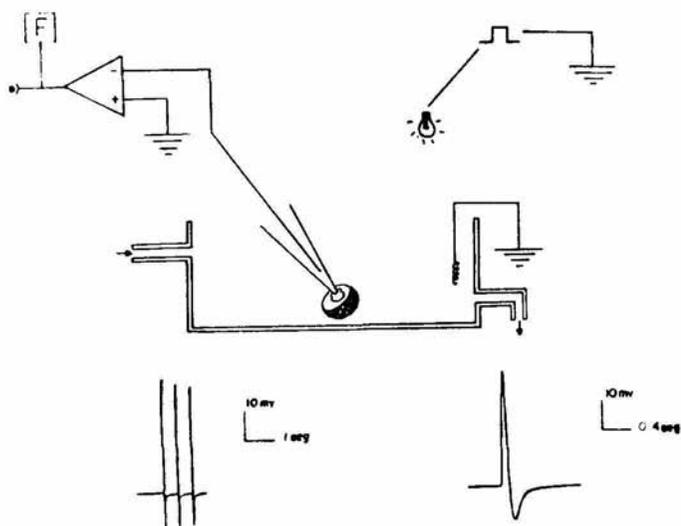


Figura 6: Sistema de estimulación y registro de la actividad eléctrica de la retina. En la parte inferior se muestran registros del ECG tomados a diferentes velocidades. (F: fisiógrafo).

3.5 ANIMAL INTEGRO

En el animal integro, se evaluó la migración de los pigmentos accesorios proximal y distal durante el proceso de adaptación a la obscuridad. Los experimentos se realizaron en abril y mayo, a partir de las 16:00 hrs. Dos horas previas a los experimentos, los lotes de animales fueron mantenidos en luz constante con una intensidad de 80 bujías/pie².

Al grupo testigo, se le inyectó 0.2 ml de solución Van Harreveld, y a los experimentales 0.2 ml de morfina 10^{-4} M, D-serina² leucina encefalina treonina 10^{-4} M y naloxona 10^{-4} M, así como la combinación de naloxona con morfina y de naloxona con D-serina² leucina encefalina treonina, previa extracción del mismo volumen de hemolinfa. La inyección se realizó en la coxa del segundo par de apéndices locomotores. Inmediatamente después de la administración de estas sustancias, los animales fueron mantenidos en obscuridad constante, por periodos entre 10 y 120 minutos (fig. 7).

3.6 EVALUACION DE LOS INDICES DE MIGRACION DE LOS PIGMENTOS ACCESORIOS

Transcurrido el tiempo de obscuridad (de 10 a 120 min), se procedió a determinar los índices de migración de los pigmentos, realizando la fijación instantánea de éstos, para ello, los animales se introdujeron durante un minuto en agua a una temperatura de 80° C, inmediatamente después se realizó la ablación de los pedúnculos oculares, introduciéndolos

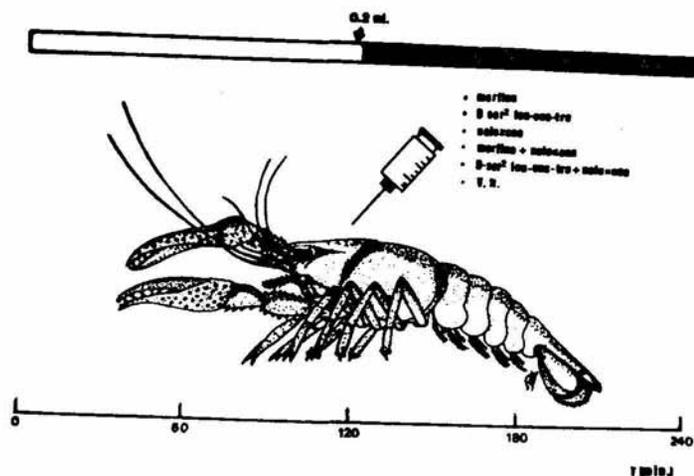


Figura 7: Esquema del método utilizado en los experimentos realizados en el animal íntegro. En la parte superior se ilustra, con barra clara, el período de exposición a la luz y con barra oscura, el período de oscuridad, en el eje inferior se representa el tiempo en minutos. Dos horas después de exponerlos a la luz, se inyectaron 0.2 ml. de las soluciones que se indican, previa extracción del mismo volumen de hemolinfa.

posteriormente en formol al 4 % durante 48 horas. Después de lo cual, los tallos oculares fueron seccionados sagitalmente, evaluándose el corrimiento de los pigmentos por medio de una reglilla micrométrica colocada en el ocular de un microscopio estereoscópico Zeiss, modelo 475200-9901.

Para determinar la posición de los pigmentos, se utilizaron los índices descritos por Frixione (fig. 8) (18).

El índice de migración del pigmento distal (IPD), se obtuvo por medio de la siguiente relación:

$$IPD=(D1+D2)/2D3$$

Donde D1=la distancia de la córnea al extremo distal del pigmento distal;

D2=la distancia de la córnea al extremo proximal del pigmento distal y

D3=la distancia de la córnea a la membrana basal.

El índice de migración del pigmento proximal (IPP) se evaluó mediante la siguiente relación:

$$IPP=a/b$$

donde a=la distancia de la membrana basal al extremo distal del pigmento proximal, y

b=la distancia la membrana basal al extremo distal de los fotorreceptores.

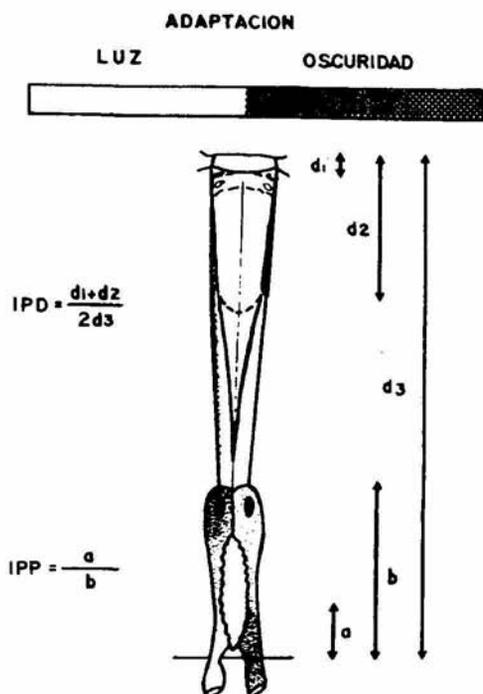


Figura 8: Esquema de la unidad funcional del ojo compuesto del acocil, el omatidio. En la parte izquierda se representa el estado de adaptación a la luz, y en la parte derecha el de adaptación a la oscuridad. El índice de migración de los pigmentos se obtuvo mediante mediciones micrométricas aplicando la relación algebraica que se muestra y se describe en el texto.

3.7 TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Las señales eléctricas obtenidas de la retina aislada, se expresaron en mV, de acuerdo con la amplificación utilizada y el sistema de registro previamente descrito. Se calculó la media de la amplitud de los electroretinogramas obtenidos cada tres minutos, y se determinó el porcentaje en relación a la máxima amplitud obtenida en cada experimento.

Se calculó el valor de la media con su desviación estandar para cada tiempo en los grupos testigo y experimentales, construyendose así las curvas de adaptación a la obscuridad que relacionan el porcentaje de incremento en la amplitud del ERG, con respecto al tiempo. Los puntos experimentales se sometieron a la prueba t de student, obteniendo su significancia estadística a $p < 0.1$.

Por medio de un análisis de mínimos cuadrados de tipo exponencial, se obtuvo la pendiente de cada curva, que representa la constante de adaptación a la obscuridad. Agrupando experimentos similares, se calculó la media y su desviación standard, después de lo cual, se compararon los grupos experimentales con su testigo, utilizando la prueba t de student.

Con respecto a la migración de los pigmentos, se graficaron las medias con su desviación standard de las lecturas obtenidas, comparándose punto por punto cada grupo experimental con su testigo, para ello se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

4. RESULTADOS

4.1 ANALISIS DEL EFECTO DE ALGUNOS OPIACEOS SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DE LA RETINA AISLADA.

A partir del registro eléctrico de la retina, se obtuvieron las gráficas de adaptación a la obscuridad, en las cuales en el eje de las ordenadas se representa la amplitud del ERG en porciento y en el eje de las abcisas el tiempo. La constante de ascenso de las curvas (K) se obtuvo mediante el ajuste de una ecuación exponencial, en la cual la pendiente denota la diferencia en la constante de subida de la curva, expresada en min^{-1} , graficandose en forma de histogramas, en los cuales las abcisas indican en cada caso la sustancia probada, y en las ordenadas la constante de ascenso.

4.1.1 MORFINA

En el caso de la morfina, se probaron diferentes concentraciones (de 1×10^{-6} a 1×10^{-4} M) para evaluar su efecto sobre el proceso de adaptación a la obscuridad, encontrándose que comparadas con el testigo, en todos los casos, las curvas sufrieron un desplazamiento hacia la derecha (fig. 9a). El tiempo en el cual alcanzan el 100 % de adaptación, aumenta en comparación con el testigo, la cual se logra completamente en 36 ± 4.06 minutos. En el caso de la morfina 10^{-6} M este tiempo es de 57.8 ± 8.9 min, con morfina 10^{-5} M de 55 ± 8.7 min y con 10^{-4} M es de 75 ± 3 min (fig. 9b). La pendiente de las curvas, varió

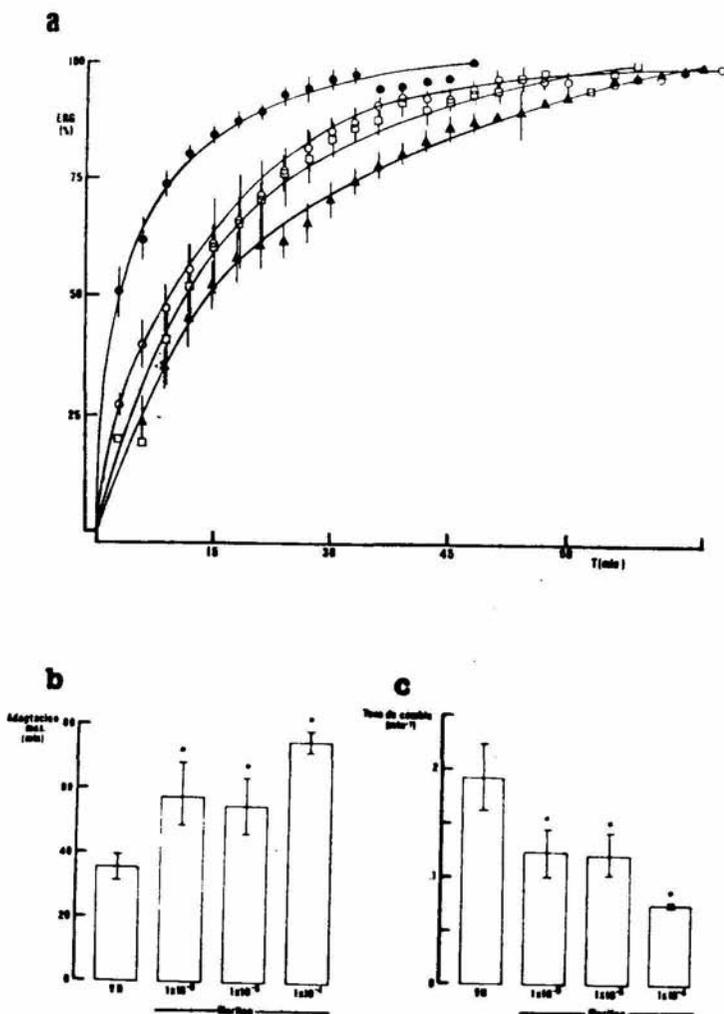


Figura 9: Efecto de distintas concentraciones de morfina sobre la adaptación a la obscuridad. a) Efectos de la incubación de las retinas aisladas en morfina 10^{-6} M (\circ), morfina 10^{-5} M (\square), morfina 10^{-4} M (\blacktriangle) y solución V.H. (\bullet). b) Efectos sobre el tiempo de adaptación máxima. c) Efectos sobre la constante de ascenso. La morfina induce cambios estadísticamente significativo (\ast) en todos los parámetros estudiados. (n= 3,3,2 y 4 respectivamente).

considerablemente, encontrándose que la constante de ascenso en la curva testigo fue de $0.192 \pm 0.034 \text{ min}^{-1}$ mientras que la de morfina 10^{-6} M fue de $0.123 \pm 0.023 \text{ min}^{-1}$, la de morfina 10^{-5} M de $0.121 \pm 0.020 \text{ min}^{-1}$ y la de morfina 10^{-4} M de $0.075 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$, la diferencia es estadísticamente significativa mediante la prueba t de student con una $p < 0.1$ en las concentraciones de 10^{-6} y 10^{-5} M y con una $p < 0.05$ para la morfina 10^{-4} M , con respecto al testigo. Así tenemos que la morfina 10^{-6} M reduce la constante en un 35.9 %, la morfina 10^{-5} M la reduce un 36.98 % y la morfina 10^{-4} M un 60.93 % (fig. 9c)

Adicionalmente, se incubaron las retinas en presencia de morfina 10^{-4} M y naloxona 10^{-5} M . El efecto observado previamente para esta concentración de morfina, se bloqueó en forma parcial. El tiempo de adaptación total se redujo a $54 \pm 3 \text{ min}$ (figs. 10a,b), al evaluar la constante de ascenso, ésta fue de $0.127 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$ comparada con el testigo $0.192 \pm 0.034 \text{ min}^{-1}$ y la de morfina de $0.075 \pm 0.0003 \text{ min}^{-1}$, siendo la reducción en esta constante de un 33.85 % en comparación al testigo (fig. 10c).

Debido a la posibilidad de que la naloxona pudiera presentar un efecto por sí misma sobre el ERG, se procedió a probar su efecto bajo las mismas condiciones experimentales en una concentración de 10^{-4} M , encontrando que no se produce efecto alguno sobre las curvas de adaptación a la obscuridad, ya que estas se comportan en forma semejante al testigo, sin presentar diferencias entre ellas por criterio estadístico (figs. 11a,b),

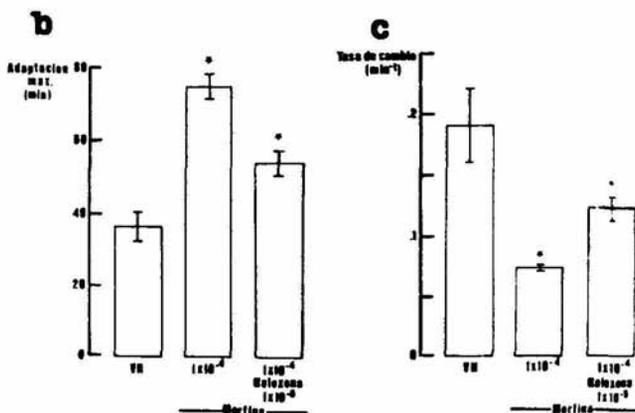
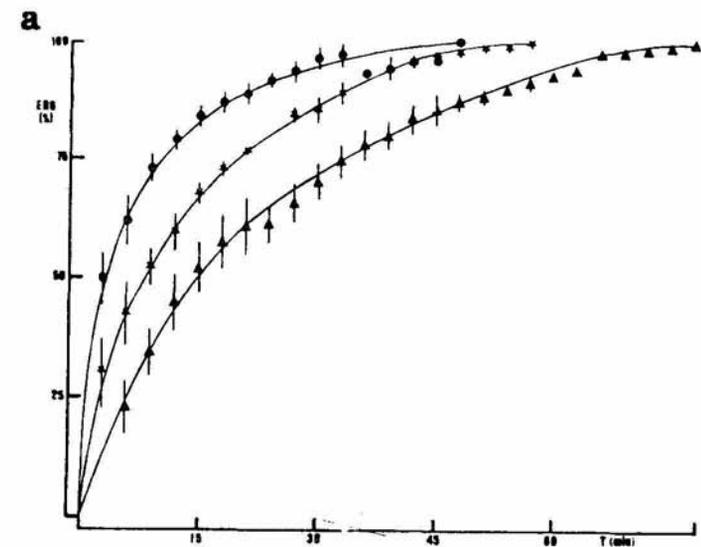


Figura 10: Efecto de la morfina (Δ) y de su combinación con naloxona (\times) sobre la adaptación a la oscuridad. Se observa un bloqueo parcial sobre el efecto de la morfina en presencia de naloxona, en comparación con la incubación en V.H. (\bullet). b) El tiempo de adaptación disminuye y c) la tasa de cambio aumenta. (n= 2,2 y 4 respectivamente)

un resultado semejante se obtuvo en la evaluación de la constante de ascenso de estas curvas (fig. 11c).

4.1.2 LEUCINA ENCEFALINA

Al incubar las retinas en leucina encefalina 10^{-5} M, con el patrón de estimulación mencionado anteriormente, se encontró que esta sustancia produce un cambio en las curvas de adaptación a la obscuridad, ya que sufre un desplazamiento significativo hacia la izquierda a partir del noveno minuto (fig. 12a). El tiempo en que alcanza el 100 % en la amplitud del ERG es de 35 ± 9.07 min el cual, comparado con el testigo 43.7 ± 2.7 min, no resulta estadísticamente diferente (fig. 12b). Al agregar naloxona en el medio de incubación, la curva se desplaza hacia los valores testigo, sobrepasando incluso a estos, aumentando a 58.5 ± 10.5 min el tiempo para alcanzar la máxima adaptación (fig. 12). Al medir la pendiente de estas curvas, se observó que la leucina encefalina aumenta un 30.9 % la constante de ascenso, siendo este cambio estadísticamente significativo ($p < 0.025$), ya que el valor de la curva testigo fue de $0.177 \pm 0.022 \text{ min}^{-1}$ y en presencia de leucina encefalina aumenta a $0.268 \pm 0.024 \text{ min}^{-1}$. La naloxona, que bloquea e invierte el efecto observado para leucina encefalina, presentó una constante de ascenso de $0.104 \pm 0.021 \text{ min}^{-1}$ la que comparada con la observada para la leucina encefalina 10^{-4} M, disminuye un 118.04 %, y con respecto a la solución Van Harrevelde en 41.72 %, siendo este cambio en ambos casos estadísticamente significativo ($p < 0.1$) (fig. 12c).

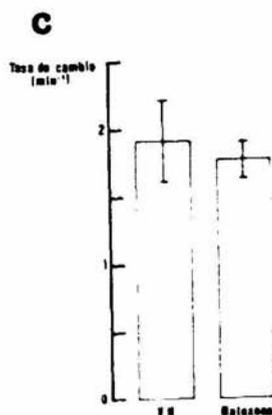
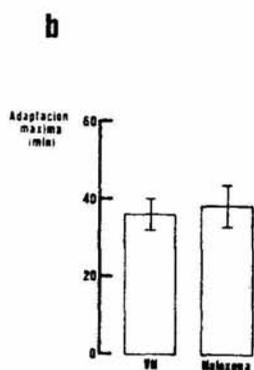
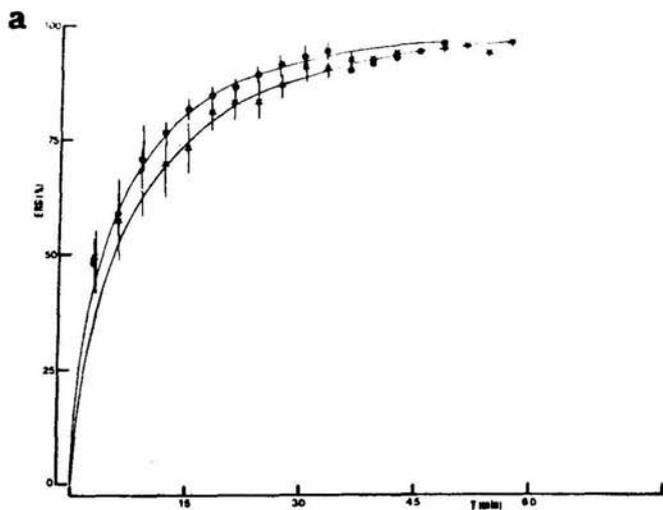


Figura 11: En presencia de naloxona ($n=3$) no se observa ningún efecto sobre la adaptación a la obscuridad en la retina aislada en comparación con su testigo ($n=4$). Como se observa en a) las curvas de adaptación a la obscuridad V.H. (●) y naloxona (*), b) el tiempo de adaptación y c) la tasa de cambio.

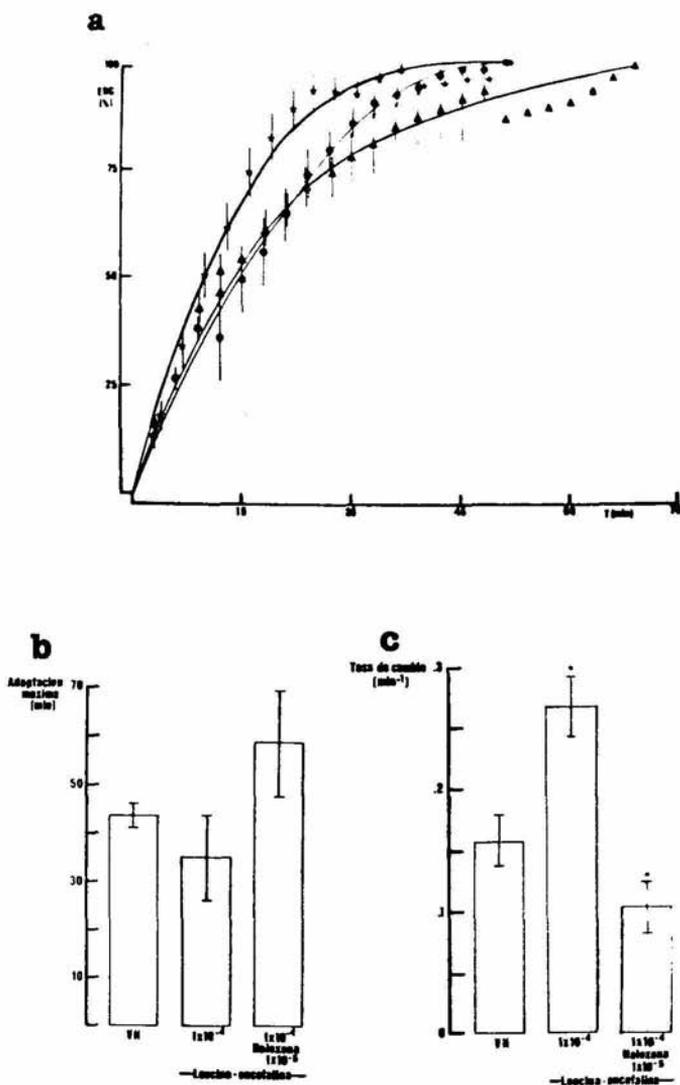


Figura 12: a) Curvas de adaptación a la obscuridad en presencia de leucina encefalina (*) (n=4), leucina encefalina más naloxona (Δ) (n=2) y V.H. (\bullet) (n=7). b) No se aprecian cambios significativos sobre el tiempo para alcanzar la adaptación máxima. c) La leucina encefalina produce un aumento significativo (*) en la constante de ascenso de las curvas de adaptación a la obscuridad, que se bloquea e invierte en presencia de naloxona.

4.1.3 METIONINA ENCEFALINA

Con metionina encefalina 10^{-4} M, se observó un efecto semejante al obtenido con leucina encefalina, produciéndose en las curvas de adaptación a la obscuridad, a partir del noveno minuto, un desplazamiento hacia la izquierda, alcanzando el 100 por ciento de adaptación a los 39 ± 2.12 min, tiempo que no resulta estadísticamente significativo con respecto al control (43.7 ± 2.7 min). Sólo se realizó un experimento con naloxona 10^{-5} M combinada con metionina encefalina 10^{-4} M, en éste la curva se asemeja a la testigo, desplazándose hacia la derecha y alcanzando la adaptación máxima a los 57 min (figs. 13a,b).

Al determinar la constante de ascenso de la curva de adaptación a la obscuridad, de las retinas incubadas en metionina encefalina, se observó que ésta es mayor que en el testigo, siendo de $0.220 \pm 0.012 \text{ min}^{-1}$ y $0.178 \pm 0.022 \text{ min}^{-1}$ respectivamente, el aumento fue de un 23.60 % siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$), la pendiente de la curva de metionina encefalina en combinación con naloxona es de 0.101 min^{-1} (fig. 13c).

4.1.4 D-SERINA² LEUCINA ENCEFALINA TREONINA

La D-serina² leucina encefalina treonina es un agonista de encefalinas que se ha relacionado con una alta especificidad para receptores δ (74). Al incubar las retinas en esta sustancia en una concentración de 10^{-4} M, se observó que el tiempo para alcanzar el 100 % en la amplitud del EPG fue de 75 ± 1.7 min, que

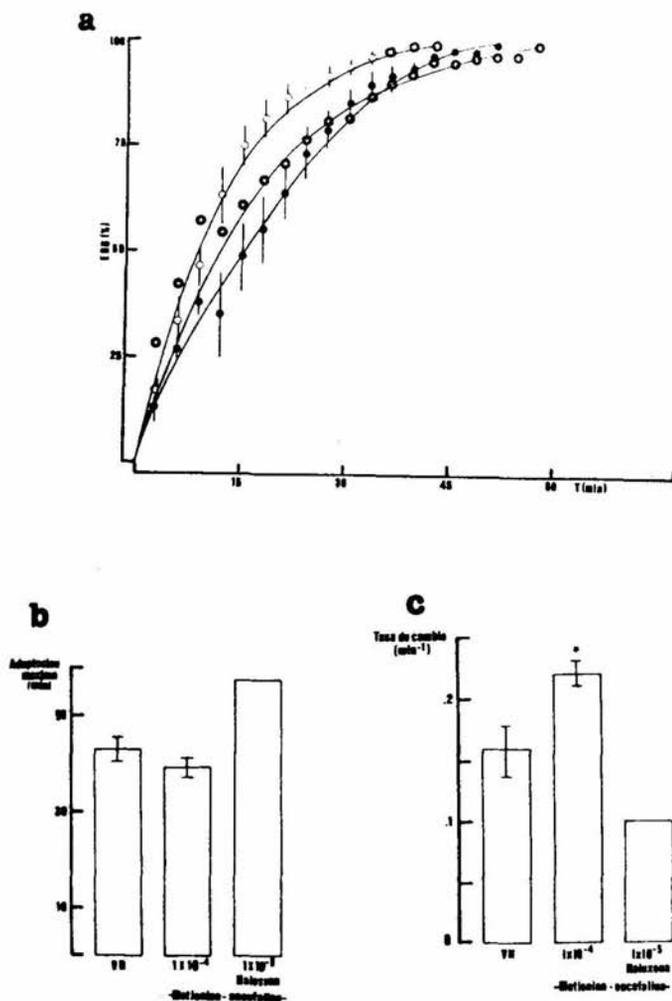


Figura 13: a) La metionina encefalina (O) produce el desplazamiento de la curva de adaptación a la obscuridad, que es antagonizado por la naloxona (●). b) El tiempo de adaptación total se reduce significativamente con metionina encefalina (*). c) La metionina encefalina, al igual que la leucina encefalina, produce un aumento en la constante de ascenso. El efecto se invierte con naloxona. $n=4$ para metionina encefalina, 2 para metionina encefalina más naloxona y 7 para la solución Van Harreveld.

resulta mucho mayor en comparación al testigo (36 ± 4.06 min), este cambio está relacionado con el corrimiento de la curva de adaptación a la obscuridad hacia la derecha (figs. 14a,b).

Al determinar la pendiente de la curva de adaptación a la obscuridad con D-serina² leucina encefalina treonina, se encontró un valor de $0.073 \pm 0.0002 \text{ min}^{-1}$ el cual es mucho menor que el control ($0.192 \pm 0.034 \text{ min}^{-1}$), siendo la diferencia de un 61.98 % que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (fig. 14c).

En la tabla I se resumen los efectos, observados para los diferentes opiáceos sobre la constante de ascenso de las curvas de adaptación a la obscuridad. En ella se muestran las sustancias empleadas en los experimentos; la constante de ascenso (K) expresada en min^{-1} ; el error standard y el valor de significancia estadística.

En la parte superior del cuadro se ven las sustancias que, con excepción de la naloxona, producen una disminución en la constante de ascenso con respecto al testigo, siendo estas la morfina en sus distintas concentraciones y la D-serina² leucina encefalina treonina. En la parte inferior, se ilustran las sustancias que producen el efecto contrario, es decir, un incremento en la constante de ascenso, encontrando aquí a la leucina encefalina y a la metionina encefalina.

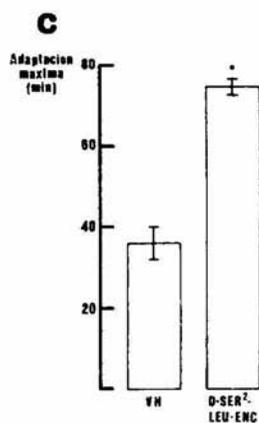
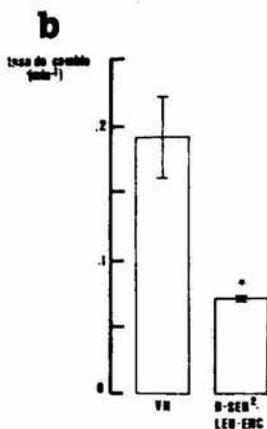
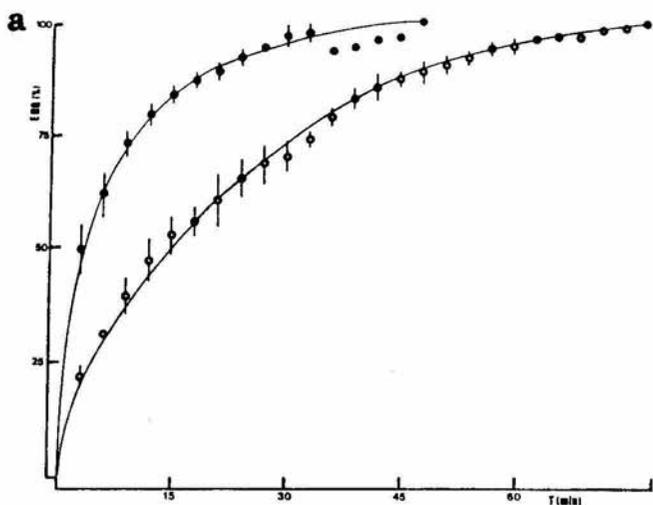


Figura 14: a) Efecto de la D-serina² leucina encefalina treonina (⊕) sobre las curvas de adaptación a la oscuridad en comparación a su testigo (●). Se observa un desplazamiento de la curva. b) Presentado un mayor tiempo, estadísticamente significativo (*), para alcanzar la máxima adaptación. c) La D-serina leucina encefalina treonina modifica la constante de ascenso. (n= 2 para la sustancia experimental y 4 para la solución Van Harreveld).

TABLA I

SUSTANCIA (M)	K (MIN ⁻¹)	E.S.	SIGNIFICANCIA
VH	.192	.0340	--
MORFINA (10 ⁻⁶ M)	.123	.0230	P<0.1
MORFINA (10 ⁻⁵ M)	.121	.0200	P<0.1
MORFINA (10 ⁻⁴ M)	.075	.0003	P<0.05
D SER ² -LEU-ENC-TREQ (10 ⁻⁴ M)	.073	.0002	P<0.05
NALOXONA (10 ⁻⁴ M)*	.179	.0250	N.S.
MORFINA (10 ⁻⁴ M) + NALOXONA (10 ⁻⁵ M)	.127	.0092	N.S.
VH	.178	.0223	---
LEU-ENC (10 ⁻⁴ M)	.268	.0240	P<0.025
MET-ENC (10 ⁻⁴ M)	.220	.0117	P<0.05
LEU-ENC (10 ⁻⁴ M) + NALOXONA (10 ⁻⁵ M)	.103	.0210	P<0.1

Tabla I. Resumen de los efectos causados por distintos opiáceos sobre la constante de ascenso (K) de las curvas de adaptación a la obscuridad. En la parte superior se encuentran algunas de las sustancias que disminuyen k. En la parte inferior se muestran las sustancias que causan el aumento en el valor de K.

* La naloxona no modifica K.

4.2 ANALISIS DEL EFECTO DE ALGUNOS OPIACEOS SOBRE LA MIGRACION DE LOS PIGMENTOS VISUALES ACCESORIOS

4.2.1 CURSO TEMPORAL DE LOS PIGMENTOS ACCESORIOS

En la figura 15, se muestra el curso temporal de la migración de los pigmentos accesorios en condiciones de obscuridad constante. Estas curvas obtenidas de lotes de animales a los cuales se les inyectó únicamente solución Van Harreveld, se utilizaron como testigo, en los siguientes experimentos.

Con respecto al IPP, se observa que este parte de un valor de 0.925 unidades, el cual va disminuyendo progresivamente hasta alcanzar un valor de cero, equivalente a la adaptación completa, que permite una mayor entrada de luz sobre los fotorreceptores, algo semejante se observa con el pigmento distal, el cual, de un valor a los 10 min de 0.24 unidades, alcanza a los 120 min a un valor de 0.118 unidades, lo cual igual que en pigmento proximal, denota una adaptación máxima a la obscuridad para el caso de este pigmento.

4.2.2 PIGMENTO PROXIMAL

4.2.2.1 MORFINA

La morfina (10^{-4} M) produce un aumento inicial en la velocidad de migración del PP, siendo éste cambio de 7.89 %, 28.18 % y 43.53 % en los 10, 15 y 20 minutos respectivamente

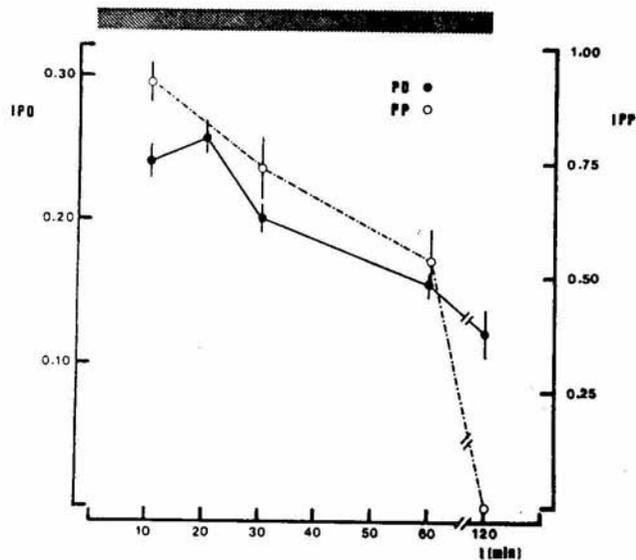


Figura 15: Curso temporal del desplazamiento de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal en condiciones de adaptación a la obscuridad. Cada punto representa el promedio de 6 mediciones con el error standard. Los experimentos se realizaron con solución salina.

comparado con el testigo. Este efecto se revierte a los 30 min, regresando a los valores control. A los 60 min el desplazamiento del pigmento inducido con morfina aumenta un 18.52 % con respecto al control. Sin embargo, a los 120 min este efecto se invierte, representando una disminución que no alcanza el valor de la adaptación total (0), alcanzando un valor mínimo en el índice de migración de 0.445 unidades a los 120 min (fig. 16a).

Al administrar a los animales morfina 10^{-4} M en combinación con naloxona 10^{-4} M, se observó un bloqueo parcial del efecto descrito anteriormente, a los 15 y 20 min, siendo el valor con respecto al testigo de 13.28 % y 14.71 % respectivamente, estos valores traducen una adaptación más rápida a pesar de que resultan menores a los observados para la morfina. A los 30 y 60 min, se observa un aumento en la velocidad de adaptación, de 25.85% y de 81.48 % mayor a la adaptación observada en el testigo. La naloxona bloquea totalmente el efecto observado a los 10 y 120 min, lograndose una adaptación total (fig. 16b).

4.2.2.2 NALOXONA

En este caso, al probar la naloxona 10^{-4} M se observó que por sí misma, muestra un efecto sobre el curso temporal de la migración del PP. Este efecto sólo se observa a los 10, 60 y 120 min, mientras que a los 15, 20 y 30 min se comporta como el testigo. Al igual que en los casos anteriores, se presentan dos tipos de efectos, ya que a los 10 min el corrimiento aumenta un 13.16 % , es decir, el pigmento se encuentra más adaptado, sin

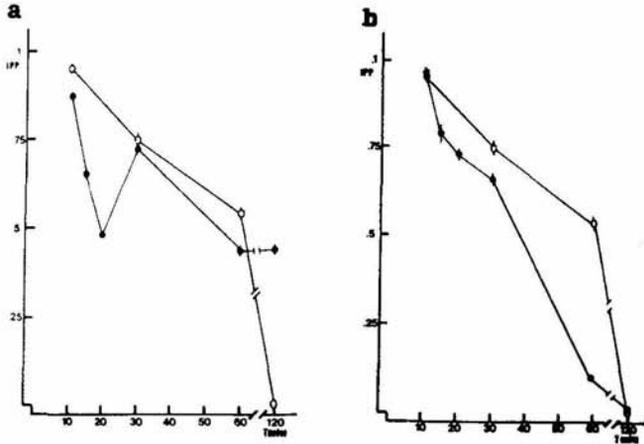


Figura 16: a) Curso temporal de la migración del PP en animales tratados con morfina 10^{-4} M (●). En las ordenadas se representa el IPP y en las abscisas el tiempo. V.H. (○). b) Bloqueo parcial de la naloxona (●) en el efecto producido por la morfina sobre el desplazamiento del PP. (n=6).

embargo, a los 60 min esta situación se invierte pues el pigmento se encontró más disperso que el testigo, siendo la reducción del 21.3 %. Por último, a los 120 min no se alcanza la adaptación total, sino que se adapta hasta un valor de 0.31 unidades en la escala del IPP (fig. 17).

4.2.2.3 D-SERINA² LEUCINA ENCEFALINA TREONINA

La inyección de D-serina² leucina encefalina treonina 10^{-4} M, produce un aumento en el desplazamiento del pigmento a la posición de adaptación a la oscuridad, de 26.84 % en el minuto 10, de 15.29 % en el minuto 20 y de 37.58 % en el minuto 30. Este efecto se cancela a los 60 minutos y, finalmente, a los 120 minutos se invierte, encontrándose el pigmento adaptado parcialmente en un valor de 0.4 unidades en relación a la adaptación total observada en el testigo (fig. 18a).

Al administrar a los animales D-serina² leucina encefalina treonina en combinación con la naloxona, se observó que el efecto se bloquea a los 10 y 20 minutos (con un cambio de 5.26 % y 2.35 % respectivamente) y en forma parcial, a los 30 minutos, tiempo en que el efecto de la D-serina² leucina encefalina treonina fue de un 37.58 %, reduciéndose en este caso a un 13.42 %. El efecto observado a los 120 minutos, no se bloquea, sino que muestra un incremento, pues de un valor de 0.4 unidades, con naloxona no migró más allá de 0.515 unidades (en el IPP). Se observó también un efecto adicional a los 60 minutos, ya que

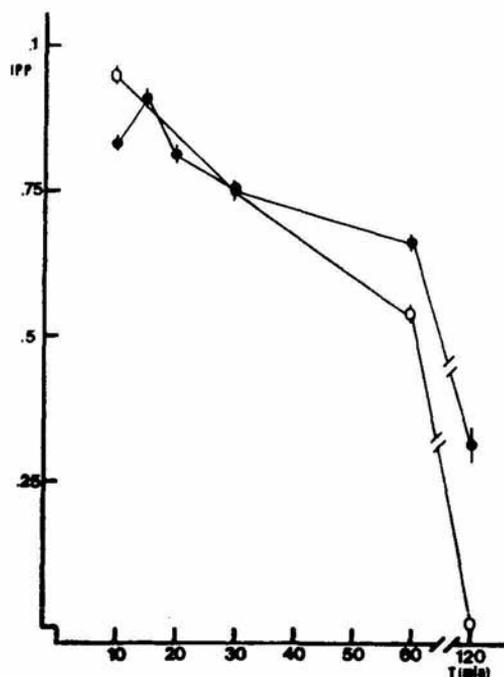


Figura 17: Efecto de la naloxona (●) sobre el desplazamiento del PP, durante el proceso de adaptación a la oscuridad, en comparación con el testigo (○). (n=6).

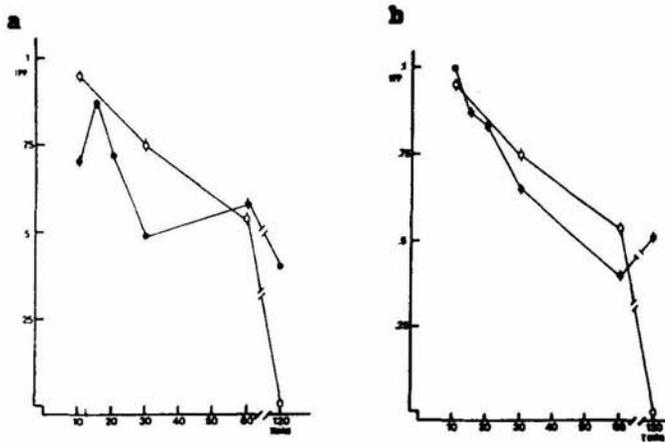


Figura 18: a) Efecto de la D-serina² leucina encefalina treonina (●). Se observa la modificación en la migración del PP con relación al testigo (O). b) Efecto de la inyección de D-serina² leucina encefalina treonina en combinación con naloxona (●). (n=6)

aquí la migración es más rápida que en el testigo en un 25.93 %, este efecto no se observó en ausencia de naloxona (fig. 18b).

4.2.3 PIGMENTO DISTAL

4.2.3.1 MORFINA

Al determinar el efecto de la morfina en una concentración de 10^{-4} M sobre el IPD, se observó que induce un mayor desplazamiento del pigmento en los primeros 30 minutos, siendo de un 19.42 % a los 10 min, de 30.2 % a los 15 min, de 37.21 % a los 20 min y de 20.79 % a los 30 min. A los 60 y 120 minutos no se observan diferencias respecto al testigo (fig. 19a).

El efecto encontrado para la morfina, solamente se bloquea en presencia de naloxona a los 10 minutos, persistiendo a los 15 minutos con un 33.6 %, a los 20 con un 27.13 % y a los 30 con un 25.74 %, como se puede observar en la figura 31. A los 20 minutos ocurre un bloqueo parcial del 10 % (fig. 19b).

4.2.3.2 NALOXONA

La naloxona 10^{-4} M ejerce un efecto por si misma sobre el desplazamiento del PD, este antagonista de opiáceos, aumenta la velocidad de adaptación a la obscuridad del pigmento durante los primeros 30 minutos, efecto que desaparece a los 60 y 120 minutos. El aumento fue de 13.22 %, 20.0 %, 29.45 % y de un 14.85 % a los 10, 15, 20 y 30 primeros minutos respectivamente (fig. 20).

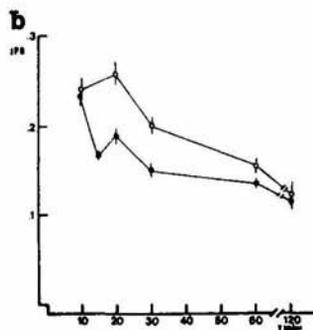
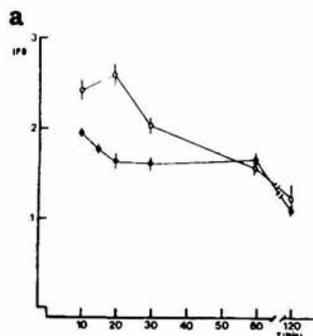


Figura 19: a) Efecto de la morfina (●) sobre el PD en el proceso de adaptación a la obscuridad en el animal Integro. En las ordenadas se representa el IPD y en las abscisas el tiempo. b) La gráfica muestra el desplazamiento del PD, producido por morfina en combinación con naloxona (●) en comparación con el testigo (○). (n=6)

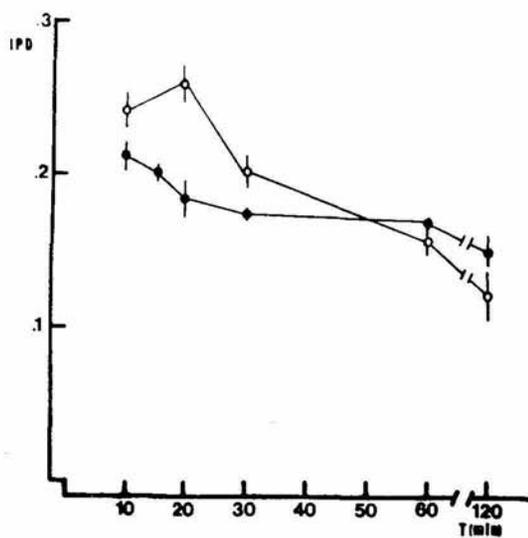


Figura 20: La gráfica muestra el efecto de la naloxona (●) modificando la migración del PD, en relación al testigo (○).

4.2.3.3 D-SERINA² LEUCINA ENCEFALINA TREONINA

La D-serina² leucina encefalina treonina 10^{-4} M provoca la modificación del curso temporal del desplazamiento del pigmento distal en los primeros 20 minutos, ya que se presenta un aumento a los 10 minutos de 23.14 %, a los 15 minutos de un 29.6 % y a los 20 minutos de un 31.01 % con respecto al control, este efecto se pierde a partir de los 30 minutos (fig. 21a).

Al mezclar la solución administrada a los animales con naloxona, solo se logró bloquear parcialmente el efecto observado a los 10 minutos, persistiendo a los 15 y 20 minutos, aunque el valor de éstos con respecto al control fue de 21.6 % y de 26.36 % respectivamente, siendo ligeramente menores que con la aplicación exclusiva de D-serina² leucina encefalina treonina (fig. 21b).

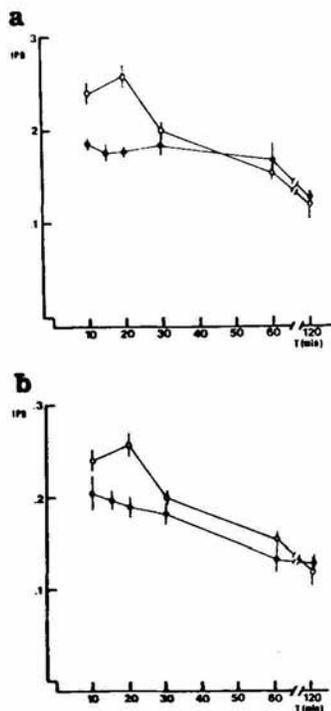


Figura 21: a) Curso temporal de la adaptación a la oscuridad en el PD, causado por la administración de D-serina² leucina encefalina treonina (●) en el animal íntegro. b) Efecto producido por dicha sustancia en combinación con naloxona (●). V.H. (○).

5. DISCUSION

La respuesta eléctrica masiva de los fotorreceptores, en particular durante el proceso de adaptación a la obscuridad, es susceptible a la acción farmacológica de diferentes opiáceos, tales como la morfina, leucina encefalina, metionina encefalina y D-serina² leucina encefalina treonina.

Como se ha visto hasta ahora, se observaron dos tipos de efectos, un aumento en la velocidad de adaptación, obtenido al incubar las retinas aisladas en leucina encefalina y metionina encefalina y el efecto contrario, una disminución en la velocidad causado por la morfina, D-serina² leucina encefalina treonina, leucina encefalina + naloxona y metionina encefalina + naloxona.

La D-serina² leucina encefalina treonina y la morfina, afectan el curso temporal de los pigmentos visuales accesorios proximal y distal en el animal integro en condiciones de adaptación a la obscuridad, cuando se inyectan dichas sustancias en la hemolinfa. Durante los primeros minutos, dichas sustancias producen un aumento en la velocidad de migración de ambos pigmentos. En el caso del pigmento proximal, no se alcanza la adaptación total a los 120 min.

La naloxona, afecta la migración de ambos pigmentos. Tanto en el pigmento proximal como en el distal, aumenta inicialmente la migración. En el pigmento proximal causa durante los últimos minutos, una disminución de la migración con respecto al testigo, no afectando durante este lapso al pigmento distal. La

naloxona produce, adicionalmente dos tipos de bloqueo sobre el efecto de la morfina en el pigmento proximal siendo total a los 10 y 120 min y parcial a los 15 y 20 min. En relación con los efectos de la D-serina² leucina encefalina treonina, la naloxona produce un bloqueo parcial a los 30 minutos y total a los 10 y 20 minutos. En el pigmento distal la naloxona bloquea totalmente el efecto de la morfina a tiempos cortos, y parcialmente a tiempos mayores. Con D-serina² leucina encefalina treonina se bloquea totalmente a los 10 min y parcialmente a los 10 y 15 min.

Se ha documentado una mayor potencia en los efectos producidos por la leucina encefalina en relación a los observados para la morfina (80), en nuestros experimentos encontramos que entre las sustancias probadas que incrementan la constante de ascenso de la curva a la adaptación a la obscuridad en la retina aislada, es más potente la leucina encefalina, ya que esta produce un aumento de un 50.9 %, en relación al testigo, mientras que la metionina encefalina solo la aumenta un 23.6 %. Entre la morfina y D-serina² leucina encefalina treonina, no se observa una diferencia notable en la potencia del efecto que producen, siendo en ambos casos de la misma magnitud, la morfina 10^{-4} M disminuye la constante de subida un 60.93 % y la D-serina² leucina encefalina treonina un 61.98 %. La relación de potencia entre la leucina encefalina con la morfina y la D-serina² leucina encefalina treonina en las mismas concentraciones resulta similar a pesar de ser de sentido

contrario, ya que la leucina encefalina aumenta la constante de subida en un 50.9 % y la morfina y D-serina² leucina encefalina treonina la disminuyen en un 60.93 % y 61.98 % respectivamente.

La metionina encefalina, es menos potente que la morfina y la D-serina² leucina encefalina treonina a concentraciones semejantes, produciendo un efecto contrario y de diferente magnitud, ya que la metionina encefalina aumenta la constante de subida un 23.6 %, mientras que la morfina y la D-serina² leucina encefalina treonina la disminuyen un 60.93 % y 61.98 % respectivamente.

En los primeros 10 min es más potente en ambos pigmentos la D-serina² leucina encefalina treonina que la morfina. A los 15 min en el pigmento distal, la morfina y la D-serina² leucina encefalina treonina presentan una potencia similar. Con respecto a los cambios observados en el pigmento proximal es más potente la morfina, aumentando en mayor medida su desplazamiento con respecto al testigo. A los 20 min en el PD la morfina y la D-serina² leucina encefalina treonina presentan una potencia similar. En el PP es más potente la morfina, pues induce un corrimiento de 43.53 %, mayor que el testigo, mientras que la D-serina² leucina encefalina treonina origina un desplazamiento de apenas un 15.29 %.

A los 30 min la morfina solo produce su efecto sobre el PD, (no se observan efectos sobre el PP) y la D-serina² leucina encefalina treonina aumenta el corrimiento del PP, sin afectar

al PD. A los 60 min en el PP, es más potente la morfina que la D-serina² leucina encefalina treonina.

En el PP a los 120 min, son muy potentes tanto la morfina como la D-serina² leucina encefalina treonina, pues observamos un efecto muy importante, ya que el control llega a un valor de cero en el IPP, denotando una adaptación total, mientras que con la morfina y D-serina² leucina encefalina treonina la adaptación solo llega a un valor parcial.

Los opiáceos, actúan al parecer sobre distintas partes del sistema visual, ya que producen cambios tanto en los fotorreceptores en la preparación de retina aislada, como sobre la migración de los pigmentos accesorios proximal y distal en el animal íntegro.

La adaptación a la obscuridad en la retina aislada se logra en mayor tiempo en presencia de morfina y D-serina² leucina encefalina treonina, este efecto puede ser compatible con los cambios observados a los 120 min en el índice de migración del PP ya que, en este caso, no se logró la adaptación total.

La naloxona, que no produce cambio alguno sobre la retina, tiene sin embargo efectos sobre la migración de los pigmentos. Al combinar naloxona con morfina en el medio de incubación de la retina aislada, ésta bloquea parcialmente el efecto observado para la morfina, mientras que en el animal íntegro, el bloqueo es de dos tipos, total y parcial dependiendo del tiempo. Contrario a esto, se observó un mayor efecto con la morfina en

combinación con la naloxona, a los 30 y 60 min en el PP donde el corrimiento fue de mayor magnitud.

Al comparar la potencia de las sustancias utilizadas en las preparaciones estudiadas, tomando en cuenta el porcentaje del efecto registrado, se observa que la morfina produce una disminución de un 60.93 % en la constante de subida de las curvas de adaptación del ERG, mientras que el máximo efecto observado en el PP no sobrepasa el 44 % y en el PD el 38 %, por lo que la morfina al parecer es más potente en la retina aislada, aunque esto puede deberse a que en el animal íntegro, la concentración disminuye aproximadamente una unidad al entrar en contacto con la hemolinfa circulante, cuyo volumen es variable en los distintos animales.

Asimismo, la D-serina² leucina encefalina treonina es más potente en la retina aislada disminuyendo la constante de subida en un 61.98 %, en el animal íntegro, el máximo efecto visto fue para el PP con un cambio de 37.58 %, y en el distal de 31 %. Sin embargo, en el PP no se alcanza la adaptación total ni con morfina ni con D-serina² leucina encefalina treonina en el tiempo requerido.

El hecho de que la leucina encefalina se encuentre presente en el tallo ocular del acocil Procambarus clarkii, así como que los opiáceos probados en este trabajo actúen sobre la función visual, modificando las curvas de adaptación a la obscuridad y la migración de los pigmentos accesorios proximal y distal,

permite plantear la existencia de receptores a opiáceos en la retina y posiblemente en otras regiones del sistema visual de la especie estudiada.

De los receptores a opiáceos encontrados, los más estudiados son los receptores μ y δ . La especificidad de los opiáceos a ellos varía, siendo mayor la afinidad de la morfina a los receptores μ (80), y de las encefalinas a los δ (81). A la D-serina² leucina encefalina treonina, análogo artificial de las encefalinas, se le ha atribuido una alta especificidad para los receptores δ (81). La naloxona, bloquea todos los tipos de receptores, sin embargo, tiene una mayor afinidad por los receptores δ (81). El hecho de que los opiáceos probados produzcan efecto sobre la retina aislada así como el bloqueo parcial de ellos con naloxona, nos señala la presencia de receptores a opiáceos, dentro de los cuales además de los μ y δ , se podrían encontrar algunas subclases o de otro tipo como los κ . Los dos efectos encontrados, podría deberse a varios factores, entre ellos, la especificidad de los ligandos sobre los receptores. Por otra parte a los patrones de estimulación utilizados, así como en la época del año en los cuales se llevaron a cabo los experimentos, como ocurre en algunos moluscos marinos (75), ya que los experimentos realizados con leucina encefalina y metionina encefalina fueron en abril y mayo, y los de morfina y D-serina² leucina encefalina treonina en agosto y septiembre. Un hecho interesante, es que la naloxona

no produce por sí misma efecto sobre la retina aislada, lo cual puede deberse a que bajo esta condición experimental no existe liberación endógena de opiáceos.

El efecto observado en los pigmentos, también nos habla de la presencia de receptores principalmente μ y δ . Ya que en el animal íntegro migran más rápidamente ambos pigmentos durante los primeros minutos con todos los opiáceos probados. El efecto contrario, se observa en el PP donde a los 120 min no alcanza la adaptación total, esto resulta interesante, ya que este pigmento cambia su posición mecánicamente con los estímulos externos (29), aunque se ha documentado que la serotonina también produce modificaciones en su movilidad (82). El PD, cuyo movimiento a la posición de adaptación a la luz es controlado por la HPDL, y para el cual se ha postulado otra hormona para su adaptación a la obscuridad (25), también sufre modificaciones, dichas hormonas se liberan en la glándula sinusal, en la que se ha descrito también la presencia de inmunoreactividad a encefalinas (70,77), pudiendo ser una evidencia indirecta de la presencia de receptores a opiáceos en ella, aunque existe la posibilidad de que la acción sea directa sobre las células que contienen al pigmento. El efecto de la naloxona en el desplazamiento de los pigmentos accesorios en el animal íntegro puede deberse a que actúe bloqueando la acción de opiáceos endógenos.

Los resultados presentados muestran que los opiáceos inducen cambios en el sistema visual lo que permite plantear su papel como posibles intermediarios entre el estímulo luminoso y

la respuesta visual. Sin embargo, los cambios observados en la migración de los pigmentos, en particular el pigmento distal, cuyo desplazamiento obedece a señales neuroendócrinas, abre la posibilidad de que los opiáceos actúen sobre el sistema neurosecretor afectando la liberación de neuropéptidos que produzcan cambios en la función visual. Pudiendo existir la posibilidad adicional de que actúen sobre el sistema visual, desencadenando una respuesta en el sistema neurosecretor, o que actúen sobre los dos sistemas simultáneamente (fig. 22), lo que deberá ser dilucidado en experimentos posteriores.

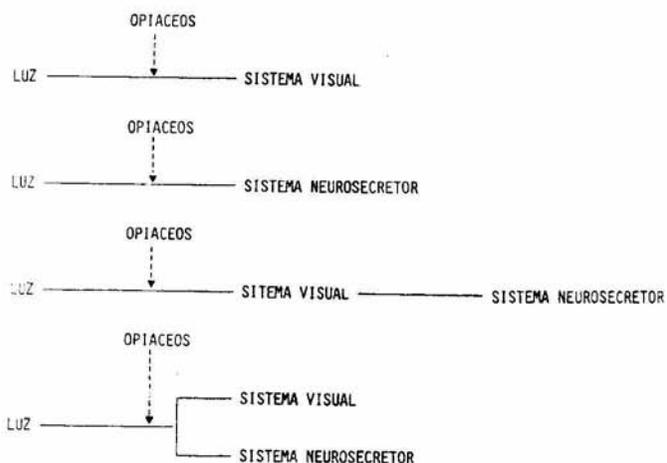


Figura 22: Algunos posibles modelos para explicar la acción de los opiáceos en el tallo ocular del acocil.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adrian, E.D. (1959) Sensory mechanisms. Introduction Handbook of Physiological Society. Sec I, 1 365-367.
- 2.- Page, L.T. (1982) Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. *Experientia*, **38**:1007-1013.
- 3.- Horridge, G.A. (1965) Arthropoda. En: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. T.H. Bullock and G. A. Horridge (Eds.). W.H.Freeman and Co. San Francisco and London. Vol II: 1064-1132.
- 4.- Kleinholz, L.H. (1961) Pigmentary effectors. En: The physiology of crustacea. T, Watermann Eds. Academic Press. New York. Vol. II, Cap 4: 133-169.
- 5.- Kong, K.L. and Goldsmith, T.H. (1977) Photosensitivity of reticular cells in white-eyed crayfish (*Procambarus clarkii*) *J. Comp. Physiol.* **122**: 273-288.
- 6.- Weale, R.A. (1968) Photochemistry and vision. En: Photophysiology. A. C. Giese. (Ed.). Academic Press. New York. Vol. IV: 1-45.
- 7.- Cortés Peñaloza, J. L. (1982) Sensibilidad espectral del fotorreceptor extraretiniano que participa en la migración del pigmento distal del ojo compuesto del acocil. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- 8.- Yinon, U. (1972) Adaptation in the compound eye and interactions with screening pigment. *J. Exp. Biol.* **54**:119-128.
- 9.- Hanstrom, B. (1924). Citado por Horridge, A. En: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. T.H. Bullock and G. A. Horridge (Eds.). W.H.Freeman and Co. San Francisco and London. Vol II: 1064-1132.
- 10.- Andrew, R.A. Orchard, I. and Saleuddin A. S. M. (1978) Estructural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell. Tis. Res.*, **190**:235-246.
- 11.- Wiersma, C.A.G. and Yanagisawa, K. (1971) On types of interneurons responding to visual stimulation present in the optic nerve of the rock lobster *Palinurus interruptus*. *J. Neurobiol.* **2**:291-309.

- 12.- Wiersma, C.A.G. and Yamaguchi, T. (1966) The neural components of the optic nerve of the crayfish as studied by single unit analysis. *J. Comp. Neurol.* **128**: 333-358.
- 13.- Wiersma, C.A.G. and Mill, P.J. (1965) Descending neural unites in the comisura of the crayfish central nervous system; and their intergration of visual tactile and proprioceptive stimuli. *J. Comp. Neurol.* **125**: 67-94.
- 14.- Wierma, C.A.G., Ripley, S.H. and Christensen, E. (1955) The central representation of sensory stimulation in the crayfish. *J. Cell. Comp. Physiol.* **46**: 307-326.
- 15.- Numnemacher, R.F., Camougis, G. y McAlear, J.H. (1962) Citado por Wiersma, C.A.G. and Yamaguchi, T. (1966) The neural components of the optic nerve of the crayfish as studied by single unit analysis. *J. Comp. Neurol.* **128**: 333-358.
- 16.- Wiersma, C.A.G., Bush, B.M.H. and Waterman T.M. (1964) Efferent visual responses of contralateral origin in the optic nerve of the crab, *Podophthalmus*. *J. Cell Comp. Physiol.* **64**: 309-326.
- 17.- Hamstrom, B. (1928) Citado por Horridge, G. A. En: Structure and function in the nervous systems of invertebrates. H.T. Bullock and G. A. Horridge (Eds.). W.H. Freeman and Co. San Francisco and London. Vol II:1064-1132.
- 18.- Naka, K. Kuwabara, M (1959) Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* **36**:51-61.
- 19.- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. and Barrera-Mera, B. (1974). Influence of retinal shielding pigments on light sensibility in the crayfish. *Acta Fisiol. Lat.* **24**: 601-611.
- 20.- Frixione G.A. (1977) Mecanismo de migración del pigmento proximal en el ojo del acocil *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- 21.- Rodríguez-Sosa, L. and Aréchiga, H. (1982) Range of modulation of light sensibility by accessory pigments in the crayfish compound eye. *Vision Res.* **22**: 1515-1524.
- 22.- Kleinholz, L.H. (1936) Crustacean eyestalk hormone and retinal pigment migration. *Biol. Bull.* **20**: 159-184.
- 23.- Kleinholz, L.H. (1977) Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Amer. Zool.* **16**: 151-166

- 24.- Aréchiga, H. (1977) Modulation of visual input in the crayfish. En: Identified neurons and behavior of arthropods. G. Hoyle (Ed.). Plenum Publishing Corporation. New York 287-403.
- 25.- Fingerman, M., Krasnov, R.A. and Fingerman, S.W. (1971) Separation assay and properties of the distal retinal pigment light adapting and dark adapting hormones in the eyestalk of the prawn *Palaemonetes vulgaris*. *Physiol Zool.* **44**: 119-128.
- 26.- Frixione, E., Aréchiga, H. and Tsutsumi, V. (1979) Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish, *J. Neurobiol.* Vol.10 N.6 574-590.
- 27.- Olivo, R.F. and Larsen, M.E. (1978) Brief exposure to light initiates screening pigment migration in retinula cells of the crayfish *Procambarus*. *J. Comp. Physiol.* **125**:91-96.
- 28.- De Bruin, G.H.P. and Crisp, D. J. (1957) The influence of pigment migration on vision of higher crustacea. *J. Exp. Biol.* **34**:447-463.
- 29.- Rodríguez-Sosa, L. (1980) La participación de los pigmentos accesorios proximal y distal en la fotosensibilidad retiniana del acocil. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- 30.- Eguchi, E. (1965) Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* **66** 411-429.
- 31.- Glantz, R.M. (1968) Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). *Vision Res.* **8**: 1407-1421.
- 32.- Nosaki, H. (1969) Electrophysiological study of color encoding in the compound eye of crayfish *Procambarus clarkii*. *Z. Vergl. Physiol.* **64**: 318-323.
- 33.- Waterman, T.H. and Fernandez, H.R. (1970) E-Vector and wavelength discrimination by retinular cells in the crayfish *Procambarus*. *Z. Vergl. Physiol.* **68**: 154-174.
- 34.- Stieve, H. Bruns, M. and Gaube, H. (1977) Ability to light-induced conductance change of arthropod visual cell membrane, indirectly depending on membrane potential, during depolarization by external potassium or ouabain. *Z. Naturforsch.* **32c**: 855-869.

- 35.- Picones, A. and Aréchiga, H. (1985) Electrical properties of crayfish photoreceptor cell. *Biophysical Journal* **42**: 474a.
- 36.- Smith, T.G. Stell, W.K. and Brown, J.E. (1968) Conductance changes associated with receptor potentials in *Limulus* Photoreceptors. *Science*. **162**:454-456.
- 37.- Smith, T.G. Stell, W.K. Brown, J.E. and Freeman, J.C. (1968) A Role for the sodium pump in photoreception. *Science*. **162**: 454-458.
- 38.- Stieve, H. Bollman-Fisher, H. and Brown, B. (1971) The Significance of metabolic energy and the ion pump for the receptor potential in the crayfish photoreceptor. *Cell. Z. Natureforsh.* **26b**: 1311-1321.
- 39.- Koike, N. Brown, H.M. and Hagiwara, S. (1971) Hyperpolarization of a barnacle photoreceptor membrane following illumination. *Gen. Physiol.* **52**: 723-737.
- 40.- Stieve, H., Bruns, M. and Gaube, H. (1977) Simultaneous recording by extracellular electrodes of light responses in the crayfish retina. *Vision Research.* **18**: 621-628.
- 41.- Brown, H.M. Hagiwara, S. Koike, H. and Meech, R.M. (1970) Membrane properties of barnacle photoreceptor examined by the voltage Clamp Technique. *J. Physiol.* **208**:385-413.
- 42.- Picones, A. Nogueroń, I. y Aréchiga, H. (1983) Análisis de la transducción de luz en fotorreceptore de acocil. I. Cambios de conductancia y posible origen iónico. XXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 236.
- 43.- Ludolph, D. Pagnanelli, D. and Mote, M.I. (1973) Neural control of migration of proximal screening pigment by reticular cells of the swimming crab *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull.* **145**: 159-170.
- 44.- Pert, C.B. and Snyder, S.H. (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**: 1011.
- 45.- Simon, E.L. Hiller, J.M. and Edelman, I. (1973) Stereospecific binding of the narcotic analgesia (3H) eterophine to rat brain homogenate. *Proc. Nat. Sci.* **20**: 1947-1949.
- 46.- Terenius, I. (1973) Characteristics of the receptors for narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **33**: 377-384.

- 47.- Mayer, D.J. and Liebesking, J.C. (1974) Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an Anatomical and behavioral analysis. *Brain Res.* **68**: 73-93.
- 48.- Pert, C.B. Pasternak, G. and Snyder, H.S. (1973) Opiate antagonist discriminate by receptor binding in brain. *Science.* **82**: 1359-1361.
- 49.- Huges, J. Smith, T.W. Kosterlitz, H.W. Fothergill, L.A. Morgan, B.A. and Morris, H.R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent agonist activity. *Nature* **258**: 577-579.
- 50.- Guillemin, R. (1977) Endorphines, brain peptides that act like opiates. *N. Engl. J. Med.* **296**: 226-228.
- 51.- Noda, M. Eurutani, Y. Takahashi, H. Toyosato, M. Hirose, T. Inayama, S. Nakknishi, S. and Numa, S. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature* **295**: 202-206.
- 52.- Gubler, V. Sieburg, P. H. Jobman, B.J. Gage, L.P. and Udenfriend, S. (1982) Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephaline containing peptides. *Nature* **295**: 206-208.
- 53.- Comb, M. Sieburg, P. H. Adelman, J. Eiden, L. and Herbert, E. (1982) Primary structure of the human met- and leu-enkephaline precursor and its mRNA. *Nature* **295**: 663-666.
- 54.- Miller, J.R. and Pickel, M.V. (1980) The distribution and function of the enkephalins. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* Vol. **28**: (8) 903-917.
- 55.- Szreniawski, A. Czlonkowski, A. Janicki, P. Libich, J. and Gumulka, S.W. (1980) Substance P: Pain transmission and analgesia. En: *Neuropeptides and neural transmission.* A. Marsan and W.Z. Traczyk (Eds.). Raven Press, New York. 121-129
- 56.- Nelson, P.G. Neale, E.A. Matthew, E. and Zimmerman, E.A. (1980) A presynaptic locus of action for the opiates. En: *The role of peptides in neuronal function.* J.L. Barker and T.G. Smith Jr. (Eds.) Mercel Dekker Inc. New York and Bassel. 727-739.
- 57.- Risier, J. Chapoutier, G. (1984) Encefalinas y endorfinas. *Mundo Cientffico.* **3** (21) 68-79.

- 58.- Kosterlitz, W.H. (1980) Enkephalins, endorphins and their Receptor. En: Pain transmission and analgesia. neuropeptides and neural transmission. Raven Press, New York. 191-197.
- 59.- Kosterlitz, W.H. (1980) Opiate receptors and their exogenous and endogenous ligands. En: The role of peptides in neuronal function. Marcel Dekker Inc. New York and Bassel.
- 60.- Brecha, N.C. Eldred, W. Kuljis, R.O. and Karten, H.J. (1984) Identification and localization of biologically active peptides in the vertebrates retina. Vision Res. Cap VII. 185-226.
- 61.- Brecha, C.N. Karten, H.J. and Laverack, C. (1979) Citado por: Brecha, N.C. Eldred, W. Kuljis, R.O. and Karten, H.J. (1984) Identification and localization of biologically active peptides in the vertebrates retina. Vision Res. Cap VII. 185-226.
- 62.- Eldred, W.R. and Karten H.J. (1983) citado por: Brecha, N.C. Eldred, W. Kuljis, R.O. and Karten, H.J. (1984) Identification and localization of biologically active peptides in the vertebrates retina. Vision Res. Cap VII. 185-226.
- 63.- Tornqvist, K. Loren, I. Hakanson, R. and Sudler, F. (1981) Peptide containing neurons in the chicken retina. Expl. Eye Res. 33:55-64.
- 64.- Marc, R.E. Stell, W.K. Bok, D and Lam, M.K. (1978) GABA-ergic pathways in the goldfish retina. J. Comp. Neurol. 182:221-246.
- 65.- Djamgoz, M.B.A. Stell W.K. Chin, Ch-A. and Lam, D.M.K. (1981) And opiate system in the goldfish retina. nature 292:620-623.
- 66.- Tremblay, J.P. Schlapfer, W.T. Woodson, P.B.J. and Barondes, S.H. (1974) Morphine and related compounds: Evidence that they decrease available neurotransmitter in *Aplysia californica*. Brain Res. 81:107-118.
- 67.- Alumets, J. Hakanson, R. Sundler, F. and Thorell, J. (1979) Neuronal localization of immunoreactive enkephalin and -endorphin in the earthworm. Nature 279:805-806.
- 68.- Zipser, B. (1980) Identification of specific leech neurons immunoreactive to enkephalin. Nature 283:857-858.

- 69.- Mancillas, R.J. McGinty, F.J. Selverston, I.A. Karten, H. and Bloom, E.F. (1981) Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature* **293**:576-578.
- 70.- Jaros, P.P. Dirksen, H. and Keller, R. (1985) Occurrence of immunoreactive enkephalins in a neurohemal organ and other nervous structures in the eyestalk of shore crab, *Carcinus maenas* L. (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* **241**:111-117.
- 71.- Stefano, B.G. (1981) Opiates and neuroactive pentapeptides: binding characteristics and interactions with dopamine stimulator cyclase in the pedal ganglia of *Mytilus edulis*. En: *Adv. Physiol. Sci. Vol 22. Neurotransmitters in invertebrates.* K.S. Rózsa (Ed.). 423-451.
- 72.- Erdelyi, L. Joo, F. and Soós, J. (1980) Effects of leu-enkephalin on certain neurons of snail *Helix pomatia*. En: *Neuropeptides and neural transmissions.* Raven Press. New York. 271-280.
- 73.- Stefano, B.G. Rózsa, S.K. and Hiripi, L. (1980) Actions of methionine enkephalin and morphine on single neuronal activity in *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **66C**: 193-198.
- 74.- Jull, C. (1982) Enkephalin increases the efficacy of dopaminergic transmission in *Helix pomatia*. *Neuropharmacology.* **21**:1301-1303.
- 75.- Stefano, B.G. Kream, R.M. and Catapane, E.J. (1981) Seasonal variation of stereospecific enkephalin binding and pharmacological activity in marine molluscs nervous tissue. En: *Adv. Physiol. Sci. Vol 22. Neurotransmitters in invertebrates.* K.S. Rózsa (Ed.). 453-458.
- 76.- Quackerbush, S.L. and Fingerman, M. (1984) Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: Effects of Gamma-aminobutyric acid, octopamine, met-enkephalin, and beta-endorphin. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C** No 1:77-84.
- 77.- Fingerman, M. Hanumante, M.M. and Vacca, L.L. (1983) Enkephalin-like and substance P immunoreactivity in the eyestalk neuroendocrine complex of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Soc. Neurosci. Abstr.* **9**:437.
- 78.- Drach, P. and Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur le méthode de détermination des stades d'intermue son application générale aux crustacés. *Vie et Milieu.* **18 (3a)**: 595-609.

- 79.- Van Harreveld, A. (1936) A Physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. New York. 34:428-432.
- 80.- Lewis, J.W. Cannon, T. Ryan, S.M. and Liebeskind, J.C. (1980) Behavioral pharmacology of opioid peptides. En: The Role of Peptides in Neuronal Function. Mercel Dekker Inc. New York and Bassel. 741-763.
- 81.- Chesselet, M.F. Chéramy, A. Reisine, T.D. and Glowinski, J. (1981) Morphine and μ -opioids agonists locally stimulate in vivo dopamine release in cat caudate nucleus. Nature 291:320-322.
- 82.- Bañuelos, S.E. (1983) Modulación de la actividad eléctrica del fotorreceptor retiniano del acocil. Tesis para obtener el grado de Biólogo. ENEP Iztacala, UNAM. México.