

30362  
Zes



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
IZTACALA**

**"CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LA GLANDULA SINUSAL  
Y SU RECUPERACION FUNCIONAL  
POR EFECTO DE LA DESTALLIZACION UNILATERAL EN EL ACOCIL  
Procambarus clarki".**

**T E S I S**

**Elaborada para obtener el Grado de  
MAESTRA EN NEUROCIENCIAS**

**Que presenta**

**BLANCA ELISA PEREZ RODRIGUEZ**



**Los Reyes Iztacala, Estado de México**





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

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

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## RESUMEN

No existen antecedentes formales sobre las características morfológicas generales de la glándula sinusal (GS) y su significado funcional, y menos aún sobre el estudio de su capacidad plástica consecutiva a lesiones experimentales. La forma, el color y los diámetros (ML-AP), son parámetros utilizados como un modelo experimental útil para la evaluación de la capacidad plástica del sistema neurosecretor de los crustáceos. Los propósitos del estudio fueron: la descripción de las características estructurales de la GS, y sus posibles modificaciones en acociles en diversos estados fisiológicos; la evaluación de la capacidad plástica de la estructura y función de la GS como respuesta a lesiones e implantes; el análisis del probable acoplamiento estructural de la GS de ambos tallos oculares. Se utilizaron acociles de la especie *Procambarus glarki* (de entre 5 y 9 cm de longitud cefalo-tórax) en distintas etapas del ciclo de muda, los que fueron clasificados en diversos lotes experimentales. Por métodos micrométricos se evaluaron las características estructurales, y por medio de un bioensayo, los cambios funcionales.

En las GS de los animales testigo se presentaron características variables como las formas y el color, y otras más constantes como los diámetros AP y ML. Se observó que la talla, el ciclo de muda y la muerte, son variables que se relacionan de manera importante con las características de la GS y por lo tanto con la función secretora.

La ablación de uno de los tallos oculares produce modificaciones significativas en función del tiempo, en las características estructurales de la GS del pedúnculo contralateral. Asimismo el contenido de material neurodepressor muestra un decremento inicial y un incremento que se potencia en el tiempo.

Los cambios mencionados en los animales con desatellización unilateral (DU), muestran en los animales con DU y trasplante autólogo un bloqueo temprano y/o una potenciación tardía.

La GS es una estructura que manifiesta cambios morfológicos y funcionales que compensan la pérdida del sistema contralateral, lo que probablemente se relaciona con la capacidad plástica de la GS.

Dado que las características de la GS de ambos pedúnculos oculares son similares en animales en distintos estados fisiológicos, surge la idea de un probable acoplamiento de los sistemas neurosecretores. Los experimentos de ligadura y sección del nervio óptico sugieren la participación de una vía neural y una humoral en el mantenimiento de dicho acoplamiento.

# I N D I C E

	PAGINA
1.- Introducción.....	1
1.1.Neurosecreción .....	1
1.1.1.Neurosecreción en invertebrados.....	2
1.1.2.Neurosecreción en crustáceos.....	3
1.1.3.Morfología del Sistema OXMT-GS.....	4
1.1.3.1. El Organó X.....	4
1.1.3.2. El tracto OXMT-GS.....	5
1.1.3.3. La Glándula sinusal.....	5
1.1.4.Morfología de la GS del acocíl <u>Procambarus</u> <u>clarki</u> .....	7
1.1.5.Evidencias Morfológicas de la liberación.....	8
1.1.6.Actividad eléctrica del Sistema OXMT-GS.....	9
1.1.7.Hormonas liberadas por el sistema OX-GS.....	10
1.2.Plasticidad .....	15
1.2.1.Plasticidad en los vertebrados.....	17
1.2.2.Plasticidad en los invertebrados.....	19
1.2.3.Plasticidad en los crustáceos.....	20
1.2.4.Plasticidad de los sistemas neurosecretorios .....	21

1.2.4.1.Sistemas neurosecretores de vertebrados.....	21
1.2.4.2.Sistemas neurosecretores de invertebrados.....	23
1.1.4.3.Experimentos de destallización unilateral.....	25
2.- Objetivos.....	29
3.- Material y métodos.....	31
3.1.Sujetos experimentales.....	31
3.2.Parámetros estudiados.....	32
3.2.1.Dímetros.....	32
3.2.2.Formas.....	32
3.2.3.Aspecto o coloración .....	33
3.2.4.Liberación espontánea.....	34
3.2.5.Extractos crudos.....	34
3.3.Bicensayo.....	35
3.4.Grupos.....	37
3.4.1. Grupo testigo.....	37
3.4.2. Grupo con destallización unilateral (DU).....	38
3.4.3. Grupo con destallización unilateral y transplante autólogo.....	38
3.4.4. Grupo con ligadura del nervio óptico.....	39

3.4.5. Grupo con sección del nervio óptico.....	40
4.- Resultados.....	41
4.1. Algunas características de la Glándula Sinusal (GS) y sus probables implicaciones funcionales.....	41
4.1.1. Características de la GS.....	41
4.1.2. La GS durante el desarrollo.....	43
4.1.3. La GS durante el ciclo de muda.....	46
4.1.4. La GS en animales muertos.....	49
4.2. Efecto de la destallización unilateral (DU) sobre las características de la glándula sinusal.....	53
4.2.1. Modificaciones en la GS por efecto de la DU.....	53
4.2.2. Curso temporal de los cambios morfológicos de la GS.....	55
4.2.3. Curso temporal de los cambios funcionales de la GS...	59
4.2.4. Cambios en la GS por efecto de la DU y trasplante autólogo.....	61
4.3. Acoplamiento de los sistemas neurosecretores del tallo ocular.....	65
4.3.1. Relaciones de la GS de ambos tallos oculares.....	65
4.3.2. Relaciones de la GS en distintas etapas de muda.....	66
4.3.3. Relaciones de la GS en animales vivos y muertos.....	69

4.3.4. Posibles vías de acoplamiento.....	71
4.3.4.1. Efecto de la ligadura del nervio óptico.....	71
4.3.4.2. Experimentos con sección del nervio óptico.....	74
4.3.4.3. Experimentos de destallización unilateral (DU).....	78
5.- Discusión .....	85
6.- Conclusiones.....	102
7.- Bibliografía.....	104

## 1. Introducción.

### 1.1. Neurosecreción.

El término **neurocrinia** se refiere a la acumulación de material secretado por un tejido nervioso (Collin, 1924). Este no es sinónimo de la palabra neurosecreción, aunque la escuela francesa lo utiliza en tal sentido. El concepto de "neurosecreción" se basa en que las células son definidas como verdaderas neuronas, debido a la presencia de algunos atributos morfológicos como: la presencia del axón, el cuerpo con dendritas, la sustancia de Nissl, las neurofibrillas y las vesículas sinápticas (Ortmann, 1960); Knowles (1954) define a las fibras neurosecretoras como aquellas que terminan libremente, tienen sinapsis especiales y no excitan a otras neuronas o inervan órganos en el sentido común del término; además de éstos, se han observado algunos atributos electrofisiológicos como la capacidad de conducir potenciales de acción, tanto en vertebrados como en invertebrados (Bliss, 1956; Palay y Weissig, 1953).

El fenómeno de la neurosecreción se presenta en los metazoarios casi sin excepción. Por lo general si se observa la presencia de un sistema nervioso con algún grado de cefalización, se encuentran neuronas con actividad secretora (Bullock y Horridge, 1965). Un sistema neurosecretor se forma de un conjunto de células que se especializan en la síntesis de neurohormonas, un tracto que se encarga del transporte del

materias neurosecretoras y de terminales axónicas que presentan una relación muy estrecha con un sistema vascular, y forman un "órgano neurohemal" que almacena y libera el producto secretado (Bliss y Welsh, 1952).

En la década de los treinta, Scharrer aportó las primeras evidencias sobre la actividad secretora de neuronas hipotalámicas; también las observó de manera constante en el hipotálamo de los vertebrados. Por ese mismo tiempo, la actividad neurosecretora fue reportada en crustáceos por Hanstrom (1933), en insectos por Meyer (1935) y en otros invertebrados por el mismo Scharrer.

La actividad secretora de las neuronas representa una especialización de esas células. Como otras neuronas, las células neurosecretoras presentan evidencias morfológicas comunes de una síntesis intensiva de proteínas como el agrandamiento del nucléolo y del núcleo (Ortman, 1940).

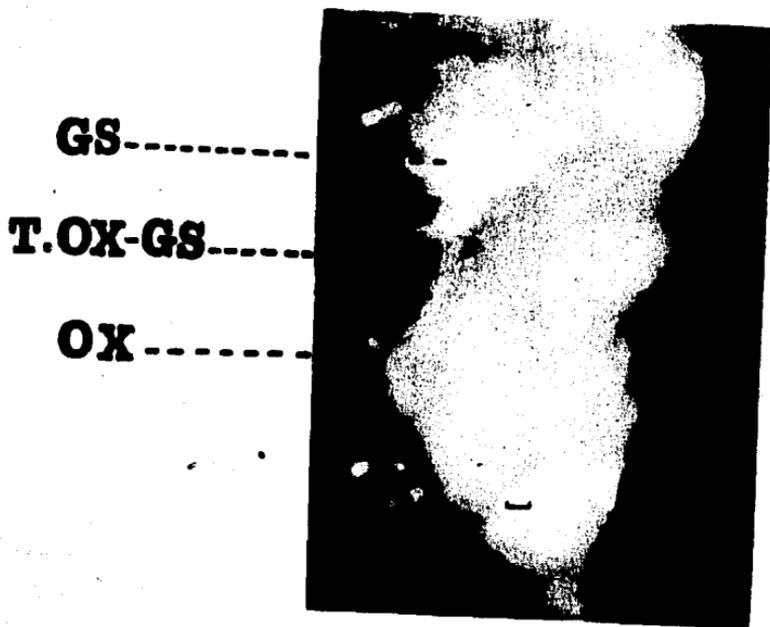
### 1.1.1. Neurosecreción en los invertebrados

Aunque las estructuras neurosecretoras han sido demostradas fácilmente en los invertebrados con las técnicas de tinción actuales (Azan), la utilización de hematoxilina de cromo y de paraldehído de fuschina han permitido avances sustanciales en este campo, aun cuando no se pueda afirmar que estas técnicas sean específicas para estas neuronas. Es característica de un gran número de invertebrados que sus axones neurosecretorios

formen "glándulas" de naturaleza secretora. De hecho dos principios fundamentales sobre las relaciones del sistema hipotálamo-hipofisiario se han podido establecer para los invertebrados: a) el material neurosecretor es llevado a través de vías neuronales a un depósito del cual se libera a un seno sanguíneo o a tejidos periféricos de acuerdo con las necesidades de los organismos; b) el material neurosecretor liberado de las glándulas de secreción interna, influye y regula la actividad secretora de estos organismos (Ortman, 1960).

#### 1.1.2. Neurosecreción en Crustáceos.

En los crustáceos, el sistema neuroendócrino localizado en el tallo ocular, ha sido estudiado en cuanto a sus características morfológicas a partir de los años treinta. Está constituido por el órgano X que se localiza en la médula terminal (OXMT), el tracto órgano X-glándula sinusal (OXMT-OS) y la glándula sinusal (OS) (Bliss, Durand y Welsh, 1934; Andrew, Orchard y Saleudin, 1978) (Figura 1).



**Figura 1.- Fotografía del Tallo ocular del acoril *Paracaudina clarki*. GS, Glandula Sinusali; T. OX-GS, Tracto Organ X- Glandula sinusali; OX, Glandula Sinusali. Escala, 0.12 mm.**

1.1.3. Morfología del Sistema OXNT-OS.

1.1.3.1. El Órgano X.

El Órgano X de la médula terminal presenta cuerpos celulares neurosecretores (Carlisle y Passano, 1953; Smith y Naylor, 1972; Hisano, 1974) que envían sus axones al neuropilo de la médula terminal, para emerger posteriormente formando un grupo de axones que recibe el nombre de tracto OXNT-OS. Numerosos exámenes histológicos de estas células neurosecretoras revelan de 2 a 6 diferentes tipos celulares, clasificados por algunos autores con base en su forma, su contenido de gránulos y las características de su retículo sarcoplásmico (Durand, 1956; 1959; Smith y Naylor, 1972; Andrew y Saleudin, 1978; Hisano, 1974; 1976a; Bliss y Welsh, 1952; Smith, 1975). Sin embargo, aún no existe un acuerdo unánime con respecto al número total de tipos celulares. Los cuerpos celulares se encuentran rodeados por capas de glioplasma (Strolenberg y cols, 1977b). Se han observado otras células cuyos somas tienen un diámetro de 20  $\mu$ , y cuyas vesículas presentan un halo y un núcleo o corazón denso de 90 nm. de diámetro (Andrew y Saleudin, 1978). Este tipo de vesículas no ha sido observado en la OS y por tanto las células que contienen estas vesículas no parecen ser neurosecretoras.

### 1.1.3.2 El tracto OXMT-OS.

El tracto OX-OS está compuesto de axones amielínicos que contienen numerosos microtúbulos con un diámetro de 20 nm, que se sitúan en la parte central del axón y se rodean de gránulos de neurosecreción con un diámetro de 100 y 160 nm, aunque los hay mayores. Además se observa la presencia de algunas mitocondrias, (Andrew y cols, 1978) que probablemente se relacionan con el transporte de gránulos. Se ha descrito en el acocíl *Orconectes virilis* mediante el empleo de microscopía de luz y electrónica, (Andrew y cols, 1978) que la entrada del tracto OXMT-OS a la OS propiamente dicha, se forma de aproximadamente 115 axones constantes a lo largo de todo su recorrido, lo que sugiere la presencia de alrededor de 115 cuerpos neurosecretorios.

### 1.1.3.3. La Glándula Sinusal.

La descripción morfológica de la OS con microscopía de luz, fue realizada por primera vez en 1933 por Hanstrom. Está situada dorso-lateralmente en la transición de la médula externa y la médula interna (Smith y Naylor, 1972) en estrecho contacto con un seno sanguíneo. Debido a ese hecho, se le ha dado la denominación de órgano neurohemal. La OS está formada por las terminales provenientes de las células neurosecretoras (Andrew y cols, 1978), y es al parecer, el sitio principal de almacenamiento y liberación de los productos de neurosecreción

(Kleinholz, 1974; Berlind, 1977); se ha especulado sobre su contenido de vesículas sinápticas (Scharrer, 1969; Strolenberg y cols, 1977a,b). Dentro del seno sanguíneo, las terminales se rodean de diferentes membranas y elementos mitocondriales, además se observa una fina estructura granular llamada glicocálix (Strolenberg y cols, 1977a,b).

Existe un gran interés con respecto a la identificación de los tipos de terminales y los mecanismos de liberación de las hormonas. Abundantes investigaciones han sido realizadas en los últimos treinta años sobre la estructura y la ultraestructura de la glándula sinusal. En 1958 Hodge y Chapman describieron, por primera vez, a nivel ultraestructural la GS del cangrejo de tierra Gecarcinus lateralis. Estos autores propusieron la existencia dos tipos de gránulos situados dentro de las terminales que forman la GS. Al igual que sucede con los tipos de células que forman el Órgano X, no existe un acuerdo general sobre el número de gránulos presentes en esta estructura secretora. En la tabla 1, se describen diferentes especies de crustáceos que han sido estudiadas por algunos autores, en relación con el número de gránulos. La clasificación de los gránulos se basa generalmente en las variaciones de la forma, el tamaño y la electrodensidad. Como se puede observar, los tipos de terminales no han sido consistentes de un estudio a otro, debido probablemente a las diferencias entre las especies (Brodie y Halcrow, 1977), el sexo (Sunt y Ashby, 1967) y los métodos empleados para la preservación del tejido, que varía en

T A B L A I

ESPECIE	TIPOS DE GRANULOS	AUTOR
1. <i>Callinectes sapidus</i>	7	Andrew y cols 1971.
2. <i>Callinectes sapidus</i>	6	Potter, 1956.
3. <i>Carcinus maenas</i>	6	Rehn, 1959.
4. <i>Carcinoma caryifex</i>	6	Weatherby, 1981.
5. <i>Antaxia leptodactylus</i>	5	Strolenberg y cols 1977b.
6. <i>Carcinus maenas</i>	5	Smith, 1974.
7. <i>Comarcus oceanicus</i>	5	Brodie y Halcrow, 1977.
8. <i>Palaeomon serratus</i>	5	Strolenberg y cols 1977a.
9. <i>Procambarus clarkii</i>	5	Bunt y Ashby, 1967.
10. <i>Ika nudax</i>	5	Silverthorn, 1975.
11. <i>Pachygrapsus marmoratus</i>	4	Bressac, 1976.
12. <i>Palaeomon caudicens</i>	4	Hisano, 1976b.
13. <i>Pandalus borealis</i>	4	Carlisle, 1959.
14. <i>Carcinus maenas</i>	3	Neusy, 1968.
15. <i>Orconectes virilis</i> y <i>Homarus americanus</i>	3	Pyle, 1943.
16. <i>Porcellio dilatatus</i>	3	Martin, 1972.
17. <i>Cambarillus Shufeldti</i>	2	Fingerman y Aoto, 1959.
18. <i>Oecarcinus lateralis</i>	2	Hodge y Chapman, 1958.
19. <i>Orconectes naia</i>	2	Shivers, 1967.
20. <i>Scylla mentis</i>	2	Knowles, 1959.

la composición y concentración del aldehído utilizado para la fijación, en el pH y en la composición del amortiguador. Esto es muy importante ya que se ha observado que la naturaleza del preservador tiene una relación química y específica para cada hormona individual (Weatherby, 1981).

Se ha observado otro tipo de gránulos con forma de "dedos" en *Scuilla mantis* (Knowles, 1959), *Pachyrhynchus marmoratus* (Bressac, 1976) y *Collinectes sapidus* (Andrew y cols, 1971). Estos gránulos cuando se observan abundantemente en algunas terminales, no se presentan en terminales vecinas. Es probable que estos gránulos puedan ser un artefacto de fijación, o parte del proceso de liberación (Strolenberg y cols, 1977b). Andrews y cols (1971) sugieren que estos gránulos pueden representar un estado específico en el proceso secretor.

#### 1.1.4. Morfología de la GS del acocil *Procambarus clarki*.

En las terminales que forman la GS del acocil *Procambarus clarki* se han descrito 5 tipos de gránulos, los que se diferencian en su forma, sus dimensiones y su electrodensidad (Bunt y Ashby, 1967). Se ha sugerido que estos gránulos representan diferentes hormonas contenidas en las terminales, sin embargo, se ha planteado la posibilidad de que una hormona desempeñe más de una función, por lo que no se requeriría la existencia de gránulos adicionales (Bunt y Ashby, 1967).

Las vesículas sinápticas descritas por Scharrer (1969) están presentes en la GS del P. clarki y parecen estar asociadas con el proceso de liberación. Se encuentran con frecuencia agrupadas en alguno de los polos de la terminal adyacente a la membrana basal, lo que sugiere que pueden ser derivadas de la membrana misma (Brodie y Halcrow, 1977).

#### 1.1.5. Evidencias Morfológicas de la Liberación.

Se han observado con microscopía electrónica y criofractura, figuras de fusión e imágenes con forma de omega en la membrana de las terminales, así como gránulos en el espacio intracelular, lo que sugiere, que en esta estructura la liberación se da por exocitosis (Shivers, 1976a, b; Aréchiga y cols, 1977). Este proceso de liberación del material neurosecretor ha sido observado en el P. clarki (Bunt y Ashby, 1968), Cardinona carnifex (Weatherby, 1981), Gammarus oceanicus (Brodie y Halcrow, 1977), Porcellio dilatatus (Martin, 1972), Carcinus maenas (Smith, 1974), Pachyrhynchus marmoratus (Bressac, 1976), etc. Sin embargo, las observaciones de Andrews y cols (1971) con microscopía electrónica sugieren que la liberación de las hormonas en Callinectes sapidus se da por difusión a través de la membrana de los gránulos y de la terminal.

### 1.1.6. Actividad eléctrica del sistema OXMT-GS.

En los cuerpos celulares del órgano X del acocil *Procambarus clarkii* se han descrito potenciales de membrana de -50 a -70 mV, así como potenciales de acción con fase de inversión de 10 a 20 mV (Cooke y cols, 1977). La actividad eléctrica de las terminales ha sido evaluada con registros intracelulares que muestran un potencial de membrana de alrededor de -60 mV. Es posible detectar potenciales de acción con fase de inversión de +30 mV. La duración de estas señales varía entre 5 y 20 ms (Cooke y cols, 1977; Cooke, 1977).

La base iónica del potencial de acción en los cuerpos celulares está dada por un componente rápido inicial de  $\text{Na}^+$  y un componente lento de  $\text{Ca}^{++}$  dependiente de voltaje. En las terminales, los cambios de voltaje están sustentados por canales rápidos de  $\text{Na}^+$  aunque también se han detectado potenciales de  $\text{Ca}^{++}$  (Cooke, 1977). Los potenciales de acción en el axón son de corta duración, y pueden ser abolidos en soluciones sin  $\text{Na}^+$ , lo que apoya la noción de que el  $\text{Na}^+$  es el ion activo en la generación de estas señales.

Basados en evidencias electrofisiológicas, Iwasaki y Satow (1971) sugieren la posibilidad de un acoplamiento electrofónico entre las neuronas del órgano X. Recientemente Aréchiga y cols (1985) mediante la inyección intracelular de amarillo lucifer han documentado la existencia de uniones comunicantes tanto en

el OX como en la OS. El acoplamiento es también evidente entre células gliales. Aunque las implicaciones funcionales de este arreglo anatómico no son aún claras, se cree que las neuronas que sintetizan la misma hormona, pueden funcionar como una unidad.

Por otra parte, al evaluar la actividad eléctrica de la OS del isópodo de tierra *Oniscus asellus*, se ha observado que tal actividad es muy similar en ambas OS a diferentes tiempos (Chiang, y Stell, 1985). Los autores sugieren la existencia de un acoplamiento en la actividad de las terminales secretoras, lo que supone la existencia de alguna información neural común para ambas OS que podría provenir de los centros superiores de integración, o de la existencia de una vía directa con el protocerebro que une ambas glándulas.

#### 1.1.7. Hormonas liberadas por el sistema OX-OS.

La aplicación de extractos de tallo ocular de los crustáceos, produce una gran cantidad de efectos biológicos, lo que plantea la posibilidad de la existencia de diversas hormonas, sin embargo, a la fecha sólo han sido purificadas cuatro de ellas: la hormona concentradora de eritróforos (HCE), la hormona promotora de la migración del pigmento distal hacia la posición de adaptación a la luz (HPDL), la hormona hiperglucemiante (HI), la hormona neurodepresora (HND). También se encuentran en

estudio la hormona inhibidora de la muda (HIM) y la hormona ecdisona.

La hormona concentradora de eritróforos fue la primera hormona aislada (Fernelund y Josefson, 1968), caracterizada y sintetizada. La estructura completa de esta hormona fue establecida como: Acido glutámico- leucina- Asparagina- Fenilalanina- Serina- Prolina- Glicina- Triptofano- NH (Fernelund y Josefson, 1972). Esta hormona es un octapéptido de 1000 D de peso molecular. Unas cuantas femtomolias de hormona sintética inyectadas en un camarón de 1 gr son suficientes para causar palidez debido a la concentración de los pigmentos de los cromatóforos blancos y rojos (Fernelund y Josefson, 1968; Josefson, 1975).

La hormona de adaptación a la luz se ha descrito en Macrobrachium y provoca la migración del pigmento distal de la retina en respuesta a la luz y bajo el control de un persistente ritmo diurno (Welsh, 1930). Fernelund y Josefson (1968) y Fernelund (1971) purificaron y aislaron del tallo ocular del Pandalus borealis, una hormona peptídica que causa que el pigmento retiniano distal migre hacia una posición de adaptación a la luz (Kleinholz, 1966). La estructura completa de la hormona fue establecida como: Asparagina- Serina- Glicina- Metionina- Isoleucina- Asparagina- Serina- Isoleucina- Leucina- Glicina- Isoleucina- Prolina- Arginina- Valina- Metionina- Triptofano- Acido Glutámico- NH (Fernelund, 1976).

La hormona hiperglucemiante o factor diabético, en los extractos de tallo ocular de los crustáceos fue discutido por Abramowitz y cols (1944). Más tarde las observaciones fueron confirmadas y extendidas por un gran número de trabajos. La purificación y composición de aminoácidos de la HHG han sido discutidas en Cancer magister (Kleinholz, 1975) Carcinus maenas (Keller y Wunderer, 1978) y Orconectes limosus (Keller y Sedlmeir, 1978). Este péptido tiene 7000 D de peso molecular, y es una molécula termoestable. Del 8 al 10% del total de la proteína de la OS es HHG (Keller, 1977; Keller y Wunderer, 1978).

La hormona neurodepresora y su control sobre la actividad neuronal en los crustáceos, ha sido postulado con base en experimentos de ablación o inyección de extractos crudos de tallo ocular. Se ha documentado que el tallo ocular secreta una sustancia que disminuye la actividad eléctrica unitaria espontánea o evocada en el acocil Procambarus bouvieri, el cangrejo Carcinus maenas (Aréchiga y cols, 1985) y el camarón Nepherops norvegicus (Aréchiga y cols, 1980). La región del tallo con el más elevado contenido de esta sustancia es la OS. La hormona neurodepresora (obtenida de glándulas sometidas a períodos de estimulación con pulsos eléctricos, o a incubación en soluciones conteniendo elevadas concentraciones de K<sup>+</sup>) disminuye la actividad eléctrica espontánea en las motoneuronas de los ganglios abdominales aislados (Aréchiga y cols, 1977), y en las neuronas sensoriales del tensorreceptor abdominal del acocil Procambarus (Aréchiga y cols, 1985). Es un péptido

dializable y termocstable, inactivado por enzimas proteolíticas (Aréchiga y cols, 1977) de bajo peso molecular aproximadamente de entre 1000 y 1300 Daltons. Está compuesto de los siguientes aminoácidos: Acido Aspártico, Serina (2), Acido Glutámico (2), Prolina, Glicina (3), Alanina, Valina, Leucina, Treonina, Isoleucina, Arginina (Aréchiga, 1977). Este péptido ha sido identificado en la hemolinfa del acocil, en niveles suficientes para inducir un decremento de la actividad neuronal (Aréchiga y cols, 1979). La HND ha sido considerada como un modulador de la actividad neuronal en los crustáceos (Aréchiga y cols, 1985).

El estudio de la hormona inhibidora de la muda se remonta a 1905, cuando Zeleny reportó que la ablación de los tallos oculares acorta el ciclo de muda de los crustáceos. La técnica de radioinmunoensayo para ecđisteroides de la hemolinfa o cultivos del órgano Y, brinda un útil bioensayo para la HIM (Bruce y Chang, 1984). La HIM bloquea la liberación de ecđisteroides del órgano Y y la acción de los mismos en los órganos blanco (Freeman, 1980). La aplicación de extractos del tallo ocular afectan la duración del ciclo de muda en su parte inicial y no tienen efecto en los estados más tardíos (Skinner, 1985). La liberación de HIM se ve modificada por el stress disminuyendo dramáticamente los niveles de ecđisteroides en la hemolinfa. También el fotoperíodo y la temperatura pueden controlar la muda a través de la HIM, regulando la liberación de ecđisteroides o la respuesta del órgano blanco.

El control de la muda en los crustáceos mediado por ecdisteroides ha sido documentado gracias al incremento en la resolución de técnicas de radioinmunoensayo (Chang, 1985). Los ecdisteroides en la hemolinfa alcanzan el nivel máximo antes de la ecdisis y caen en estado de reposo durante la exhubiación (etapa E) (Chang y cols, 1976). Se han observado dos incrementos en los niveles de ecdisteroides, el primero se relaciona con la retracción de la epidermis (Chang, 1984), y el segundo se presenta justo antes de la ecdisis. La cantidad total de ecdisteroides circulantes parece ser muy variable en los crustáceos. La liberación de ecdisteroides y su concentración en la hemolinfa varía a través del ciclo de muda. En las etapas tempranas del ciclo, se observa una relación de 1:1 ó 1:2 de alfa-ecdisona y beta-ecdisona. Conforme el ciclo avanza cambia su proporción a 1:4 o más (Hopkins, 1986). No se ha explicado el significado de este cambio en el patrón y composición de ecdisteroides en la hemolinfa, sin embargo estos datos manifiestan la complejidad en el sistema. Los estudios del órgano Y *in vitro*, han mostrado que los extractos crudos o parcialmente purificados pueden retardar o detener la liberación natural de ecdisteroides. La HIM puede actuar también, bloqueando el efecto de los ecdisteroides sobre los tejidos blanco. Los ecdisteroides pueden regular su propia producción a través de una retroalimentación directa del órgano Y (Hopkins, 1986). Los crustáceos tienen ecdisteroides en varios tejidos además del órgano Y, sin embargo se desconoce su función. Se ha

sugerido que los esteroideos regulan algunos aspectos de la reproducción en los crustáceos ya que se han encontrado en las gonadas de varias especies (Guackenbush, 1986).

## 1.2. Plasticidad

En la mayor parte de los sistemas biológicos, la regeneración consecutiva a lesiones o a la pérdida de tejido, implica la restitución de células y la restauración de sus conexiones. En algunos epitelios, la integridad del tejido se mantiene a través de una continuada proliferación celular. En el caso del Sistema Nervioso (SN) se presenta una situación muy diferente. La proliferación de los neuroblastos presenta diferentes tasas de crecimiento en las estructuras del cerebro durante el desarrollo fetal, pero una vez que se ha establecido la diferenciación neuronal, la mitosis cesa. La capa granular del cerebelo es quizá, la única región donde continúa la proliferación y la migración celular después del nacimiento, aunque sólo por un período muy limitado. El SN se desarrolla por el crecimiento y el aumento de la conectividad de las neuronas, pero no por un incremento en el número de ellas. Así se podría decir que un cerebro maduro se encuentra en "desventaja" en relación con otros sistemas en los que pueden ser formadas nuevas células (ver Scaravilli y Druchen, 1981). Sin embargo, ya desde finales del siglo pasado se postulaba que el tejido nervioso tiene la capacidad de modificarse por efecto de lesiones manifestando su capacidad plástica.

Esta idea fue extendida por Cajal (1884): "El entrenamiento mental no puede superar la organización del cerebro agregando un número de células. Sabemos que los elementos nerviosos han perdido la propiedad de multiplicación pasada la vida embrionaria, pero es posible imaginar que el ejercicio mental puede facilitar un gran desarrollo del aparato protoplasmático y de colaterales nerviosas en las estructuras del SN que permanecen funcionando. De esta forma, las conexiones preexistentes entre los grupos de células pueden reforzarse multiplicando sus ramas terminales, y además por la formación de nuevas colaterales nerviosas y expansiones protoplasmáticas".

Un impulso nervioso que se presenta con un patrón de frecuencia a través de la unión de dos neuronas, podría causar un incremento en el flujo de sustancias nutritivas que llevan a una "hipertrofia", tal y como ocurre con un músculo ejercitado. En el sistema nervioso, la "hipertrofia" se manifestaría por un alargamiento de las ramificaciones celulares y una reducción de la distancia entre las sinapsis. La conductividad de los nervios sería mayor porque su resistencia a la corriente está directamente relacionada con la distancia entre las sinapsis (Lugero, 1900).

Konorski (1948) y Hebb (1949) establecieron que aunque las conexiones anatómicas entre las neuronas se pueden desarrollar de acuerdo con un plan definitivo, la fuerza o efectividad de estas conexiones no está totalmente predeterminada. Esas y otras propiedades de las neuronas, pueden ser alteradas por la

experiencia. Las neuronas y sus sinapsis deben ser capaces de cambiar sus propiedades funcionales como resultado de la alteración de su actividad. Así Konorski escribió: "La aplicación de un estímulo lleva a cambios en el Sistema Nervioso de 2 tipos (...) la primera propiedad, con la cual la célula nerviosa reacciona a la entrada de impulsos con cierto ciclo de cambios la llamamos excitabilidad, y los cambios que se dan en los centros de integración los llamamos cambios debidos a la excitabilidad; la segunda propiedad, en virtud de la cual ciertas transformaciones funcionales permanentes surgen en sistemas particulares de neuronas, como resultado de un estímulo apropiado y su combinación la llamaremos plasticidad y sus correspondientes modificaciones, cambios plásticos". Konorski supone que la densidad máxima de contactos sinápticos se presenta en algunos sistemas funcionales antes del nacimiento, mediando estos sistemas patrones conductuales instintivos y reflejos incondicionados, mientras que en otros sistemas, la máxima densidad se presenta después del nacimiento, presentándose aquí la posibilidad de la plasticidad.

### 1.2.1. Plasticidad en los vertebrados.

Existen un número permanente de cambios morfológicos asociados con la actividad de neuronas a largo plazo, la "atrofia" por el desuso y la "hipertrofia" por el uso tienen repercusiones a todos los niveles y en todas las partes de la neurona como: el tamaño del núcleo y del nucleólo, las arborizaciones dendríticas, el diámetro del axón y el grado de

mielinización, el tamaño de las terminales y las características de las proteínas y los lípidos (Szentagothai, 1964). Bennett y cols. (1964) han demostrado que el peso, el grosor y la actividad de la acetilcolina (ACh) de la corteza cerebral están influidas por la función de ésta. Las ratas tanto jóvenes como adultas al ser expuestas a estimulación enriquecida (multisensorial), muestran un incremento de las variables mencionadas en relación con las ratas con estimulación empobrecida. Con la estimulación enriquecida los autores citados observaron incrementos de 6.2% en el peso de la corteza visual, y de 27% en la corteza somatosensorial concluyendo que la experiencia puede afectar específicamente regiones del cerebro que controlan las diferentes modalidades sensoriales estimuladas. Además, el empobrecimiento de un canal sensorial lleva al incremento en el uso de otra modalidad, y a un gran desarrollo cerebral ("compensación") en las áreas de ésta. En ratas ciegas, la corteza somestésica muestra un incremento en el peso y en la actividad de la ACh en relación con las testigo. Bennett y sus colegas sugieren que el número de sinapsis puede incrementarse con el enriquecimiento sensorial, y que un 5% de incremento en la actividad de la ACh puede reflejar un 20% de incremento en el número de sinapsis (Bennett y cols, 1964).

Ruiz Marcos y Valverde (1970) demostraron que las dendritas son las más afectadas durante la privación sensorial. La extirpación de los ojos en ratones jóvenes induce un decremento en la densidad de las dendritas de la capa III de la corteza

visual. En ratas sometidas a luz normal durante un mes continuo seguido de 3 meses de obscuridad, se observa que el diámetro de la sinapsis en el cuerpo geniculado lateral es superior en 11%, y la densidad de los axones 29 % más baja que en las testigo. En experimentos inversos, los animales sometidos inicialmente a obscuridad constante durante 3 meses, seguida de luz durante un mes, muestran 15% de decremento en el tamaño de las terminales sinápticas, pero estas terminales contenían un mayor número de vesículas (34%). Estos experimentos demuestran que la corteza visual cambia de manera reversible. Las neuronas corticales tienen un gran número de conexiones unas con otras, y esta gran interconexión neuronal, bien puede ser una de las bases de la plasticidad cerebral (Fesard, 1961).

La plasticidad y las modificaciones en la conducta han sido estudiadas en algunos sistemas. El sistema visual del gato, (en el que las transformaciones de la información neural han sido rastreadas hasta el sexto relevo sináptico) ha sido utilizado para estudiar las modificaciones que ocurren en cerebros inmaduros, y algunos reflejos de flexión en vertebrados e invertebrados (Kandel, 1977) han permitido estudiar las modificaciones en el sistema nervioso adulto.

### 1.2.2. Plasticidad en los invertebrados.

La capacidad plástica de las sinapsis no se limita al cerebro de los vertebrados, también se encuentra desarrollada en los invertebrados. La potenciación postetánica de corta y larga

duración ha sido observada en una variedad de sinapsis químicas de invertebrados (Parnase y cols, 1974; Schwartz y cols, 1971; Sherman y Atwood, 1971). En el ganglio abdominal de la Aplysia se ha observado facilitación postetélica monosináptica y heterosináptica (Kandel y Tauc, 1965), en Helix aspersa se presentan modificaciones en la resistencia de la membrana extrasináptica (Kandel y Tauc, 1966) y en Aplysia estos cambios se dan en las neuronas marcapasos (Parnase y cols, 1974).

Las técnicas morfológicas han evidenciado el crecimiento de fibras en las regiones sinápticas vacantes, la regresión de tal crecimiento se da con la reinervación y la posibilidad de sinapsis disponibles que aparecen morfológicamente intactas pero que no son funcionales (Kandel, 1977).

### 1.2.3. Plasticidad en los crustáceos.

\*

En el acocil, se ha estudiado la respuesta de escape a estímulos mecánicos aplicados en el abdomen. Este organismo responde con una flexión repentina del abdomen usando la cola como una remo. Este reflejo se habitúa rápidamente, aun cuando el estímulo mecánico fuese aplicado con intervalos de 5-min. Dos horas de reposo producen sólo una pequeña recuperación; la recuperación total requiere de más de 6 horas (Krasne y Woodsmall, 1969). Esta respuesta de habituación, considerada como la forma más elemental de aprendizaje, es una manifestación de cambios plásticos en este grupo zoológico.

#### 1.2.4. Plasticidad de los sistemas neurosecretores.

##### 1.2.4.1. Sistemas neurosecretores de vertebrados.

La capacidad para presentar modificaciones plásticas en sistemas neurosecretores ha sido investigada en algunos vertebrados. Se ha documentado que después de 3 ó 4 semanas de la hipofisectomía en ratas, el infundíbulo presenta cambios que semejan una regeneración, manifestada por una rica vascularización del material glial reorganizado y una subsecuente acumulación de material neurosecretor (Gaupp y Spatz, 1955; Gersh y Broocks, 1941; Jorgensen y cols, 1956; Scharrer y Wietenstein, 1952). La remisión de diabetes insipidus subsecuente a la hipofisectomía, puede ser correlacionada con la renovación de la secreción de hormona antidiurética del muñón infundibular (Jewell, 1953). En el sapo se ha descrito una verdadera regeneración en las fibras del tracto preóptico hipofisiario (Jorgensen y cols, 1956). Se ha demostrado que dos semanas después de la aplicación de 5,7 dihidroxiptamina (5,7-DHT), una toxina que induce axonolisis, se presenta un gran decremento en la hormona luteinizante (HL) liberada de la pituitaria. Dos meses después de la inyección, cuando se han recuperado la recaptura y síntesis de (3H)5-HT, la HL liberada de la pituitaria regresa a sus niveles normales. Esto sugiere que el retorno de la liberación de HL depende de la regeneración de las fibras serotoninérgicas (5-HT) en el hipotálamo (Wuttke y

cola, 1977). La administración intraventricular de neurotoxinas que inducen axonolisis de fibras serotoninérgicas, ha mostrado que el daño producido por aquellas las hacen crecer grandes distancias para reinervar algunas áreas del sistema nervioso (Bjorklund y Stevaní, 1979). Observaciones de degeneración y regeneración con técnicas de fluorescencia histoquímica en el sistema 5-HT bulboespinal, después de la aplicación de 5,6 dihidroxitriptamina (5,6-DHT), se han correlacionado con los parámetros bioquímicos de recaptura de (3 H-5-HT) y con los niveles de serotonina (5-HT) (Wiklund y Bjorklund, 1980). Con los mismos procedimientos se ha observado en el hipotálamo dorsolateral a los 3 días después de la lesión, que las fibras de 5-HT del hipotálamo ipsilateral están inflamadas y fuertemente teñidas para 5-HT. En el hipotálamo contralateral pocas fibras inflamadas fueron aparentes. Después de la lesión del fascículo longitudinal medio se observó en el hipotálamo ipsilateral, un evidente hinchamiento de las células de 5-HT desde los 3 a los 19 días; en ese tiempo se produjo un decremento gradual en su densidad. En la región media y paraventricular del hipotálamo ipsilateral no se observaron fibras de 5-HT desde los 7 hasta los 30 días después de la lesión. El crecimiento de las fibras de 5-HT se presentó desde los 12 y 19 días después de la lesión. A los 30 días de la axonolisis la densidad de las fibras de 5-HT en el fascículo longitudinal medio parece normal, sin embargo, las áreas medial y paraventricular permanecen denervadas. A los 50 días de la aplicación de la neurotoxina, se observa una aparente hiperinervación bilateral en la región lateral y

dorsomedial de la inyección, en comparación con los animales testigo. Estas evidencias morfológicas se presentan de manera paralela con los cambios en la recaptura de (3H) 5-HT. A los 7 días después de la lesión, la recaptura se redujo 27% en el hipotálamo ipsilateral y 57% en la región contralateral, ambos en relación con los testigos. A los 30 días de la axonolisis, la recaptura en el hipotálamo ipsilateral se incrementó 65% en relación con los testigos, y alrededor de los 50 días aumentó significativamente en el hipotálamo ipsilateral 141% (Frankfurt y Azmitia, 1984). Los resultados de estos experimentos son una clara evidencia de la capacidad plástica en sistemas neurosecretores de vertebrados.

#### 1.2.4.2 Sistemas Neurosecretores de invertebrados.

La capacidad de presentar cambios plásticos como consecuencia de lesiones ha sido poco documentada en los sistemas neurosecretores de invertebrados, aunque existen algunas evidencias indirectas que sugieren que esta capacidad también está presente en estos organismos. Así por ejemplo al realizar una sección transversal y la ligadura del tracto óptico del sistema intercerebralis-cardiacum-allatum del insecto Leucophaea maderae se ha comprobado que la estructura corpus allatum incrementa su tamaño en la parte operada. Ver Figura 2 (Scharrer, 1952).

Como resultado de la sección del tracto OX-OS de algunos crustáceos se presenta una depleción del material neurosecretor

Sistema Intercerebralis

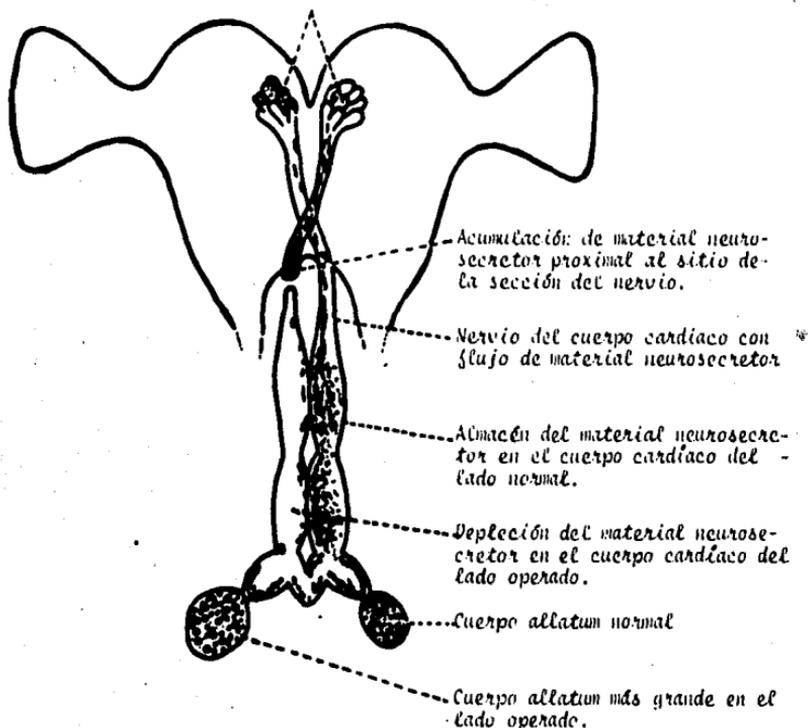


Figura 2.- Diagrama de la región dorsal del sistema intercerebralis-cardiacum-allatum de *Leucophaea madagasc*. En el lado izquierdo, el nervio del cuerpo cardíaco está seccionado, lo que provoca que el material neurosecretor se incremente en la región proximal y se deplete en la distal. En el lado operado, el cuerpo cardíaco se adelgaza y el cuerpo allatum incrementa su tamaño (Tomada de Ortman, 1960).

en el sitio del corte, seguida de una regeneración completa del sistema (Bliss y Welsh, 1952; Enami, 1954; Passano, 1953).

Por otro lado Aréchiga y cols (1979) describieron que después de la ablación bilateral de los tallos oculares, la concentración de MND disminuye en la sangre y en el sistema nervioso, hasta virtualmente desaparecer a los 4 días después de la lesión; a partir de ese tiempo y hasta los 30 días, la actividad se recupera alcanzando los niveles originales. Ellos observaron que la MND está de nuevo presente, siendo la recuperación más completa en el ganglio torácico y supraesofágico que en el ganglio abdominal. Los cambios observados en la concentración de MND en sangre son casi paralelos a los observados en el sistema nervioso. Los autores concluyeron que existe la posibilidad de una síntesis de neurohormonas fuera del tallo ocular, y que la recuperación puede ser debida en parte a una acumulación de la sustancia en otros elementos secretores provocada por la extirpación de la OS, el sitio normal de liberación. Estos resultados son sugerentes de la capacidad plástica del sistema neurosecretor del acocil.

En el presente trabajo se define la plasticidad en el acocil como la capacidad de las terminales que forman la OS para manifestar a consecuencia de lesiones experimentales, modificaciones en sus características morfológicas y funcionales.

#### 1.2.4.3. Experimentos de destallización unilateral.

El procedimiento de destallización e inyección de extractos de tallo ocular o la implantación de la GS, ha sido ampliamente utilizado en crustáceos para localizar el centro que sintetiza las hormonas que regulan la conducta y fisiología de estos organismos.

Entre los ejemplos que validan estas técnicas, se ha observado que la sección bilateral de los tallos oculares induce una aceleración del ciclo de muda, así como un crecimiento gonadal en una variedad de crustáceos (Brown y Jones, 1949; Fingerman, 1970; Fingerman y Fingerman, 1976; Mauvoit y Castell, 1976; Trieder y cols, 1979; Somirski y Kiek, 1974). En la langosta *Palinurus argus*, Gueckenbush y Herrnkind (1981) realizaron ablaciones bilaterales de los tallos oculares en tres grupos de langostas; en un grupo solo se hicieron las ablaciones; en otro grupo, además de la destallización, fueron implantadas un par de GS en la región cardíaca y en un tercer grupo se inyectaron extractos de tallo ocular de langosta además de la destallización. En estos experimentos se observó que, animales de ambos sexos responden a la ablación de los tallos oculares; los animales destallizados mostraron un desarrollo gonadal superior al observado en los grupos control. Las gonadas de los animales destallizados más el implante, mostraron menor desarrollo gonadal que los controles y las gonadas de los animales destallizados a los que fueron administrados los extractos, se desarrollaron menos que las de los grupos a los

que se le inyectó solución salina. Los autores concluyeron que la ablación del tallo ocular del Palinurus argus promueve el desarrollo gonadal y afecta la duración del ciclo de muda siendo estos procesos antagonistas.

La destallización en crustáceos genera un incremento en las dimensiones del caparazón y un decremento en la duración del intervalo de muda. (Abramowitz y Abramowitz, 1940; Scudamore, 1947; Koch, 1952; Bliss y cols, 1966; Fingerman y Fingerman, 1974; Nakatani y Otsu, 1979). La posible existencia de un factor inhibitor de la muda en el tallo ocular, se dedujo por el hecho de que la inyección de extractos induce la inhibición de la muda en camarones destallizados (Freeman y Bartell, 1976).

Se ha demostrado que los crustáceos destallizados, incrementan la dimensión del caparazón después de la muda en relación con los animales testigo. Este crecimiento ha sido observado en Eriocheir sinensis (Koch, 1952), Decapodius lateralis (Bliss y cols, 1966), Uca pugilator (Fingerman y Fingerman, 1974) Cambarus immunis y Cambarus virilis (Scudamore, 1947) y en Procambarus clarki (Nakatani y Otsu, 1979; 1981). Koch (1952) reportó que en el cangrejo E. sinensis sometido a destallización, existe una asimilación normal de nitrógeno a pesar del incremento en las dimensiones del caparazón, lo cual sugiere que la síntesis de proteínas se mantiene dentro de niveles normales. Smith reporta (1940), que el apetito de los acociles se incrementa fuertemente después de la destallización.

La destallización causa un aumento en el peso corporal, y un incremento en el contenido de agua (Scudamore, 1947; Kamemoto, 1966; Bliss y cols, 1966; Bliss, 1968; Kato y Kamemoto, 1969); un incremento en la producción de orina (Kamemoto y Ono, 1969); cambios en la osmolaridad de la hemolinfa y concentración de iones cloro (Kamemoto, 1966; Kamemoto y Ono, 1969 y Kamemoto y Tullis, 1972). Todos estos cambios son reversibles por inyección de extractos de tallo ocular en animales destallizados.

La concentración de proteínas en la hemolinfa depende del estado de muda (Hepper, 1977) y cambia después de la ablación de los tallos oculares (Mantel y cols 1975; Pietrzak, 1981).

La ablación de un tallo ocular disminuye la osmolaridad de la hemolinfa y concentración del ión cloro (Kamemoto y Tullis, 1972); disminuye la concentración del ión sodio (Heit y Fingerman, 1973); disminuye la concentración de proteínas (Mantel y cols, 1975).

Se ha estudiado el efecto de la extirpación de los tallos sobre la actividad locomotora (Kalmus, 1938; Roberts, 1957; Schallek, 1942; Edwards, 1950; Powell, 1965). Ellos reportaron que el ritmo de actividad locomotora desaparece después de la ablación en varios crustáceos decapodos. Bliss (1962) observó en un caso, que el ritmo persistía, sin embargo, presentó un cambio dramático en su periodicidad. Naylor y Williams (1968), sugieren la necesidad de distinguir entre el efecto del shock postoperatorio y el efecto sobre un centro o mediador de la

ritmicidad localizada en el tallo ocular. Los autores sugieren que la ritmicidad se abole a consecuencia de la ablación y que el mecanismo hormonal del tallo ocular, es al menos un mediador, si es que no es un reloj autónomo involucrado en el control de la ritmicidad de la actividad locomotora. Estudios subsiguientes propusieron que el componente endógeno del ritmo, está asociado con una hormona inhibidora de la actividad locomotora secretada por el complejo neuroendócrino del tallo ocular (Naylor y cols, 1973; Aréchiga y cols, 1974; Aréchiga y Naylor, 1976). Esta hormona se conoce en la actualidad con el nombre de hormona neurodepresora (Aréchiga y cols, 1977).

## 2. OBJETIVOS

No existen antecedentes formales sobre las características morfológicas de la GS y su significado funcional, y menos aún del estudio de su capacidad plástica consecutiva a lesiones experimentales. Estas características han resultado ser un modelo experimental adecuado para evaluar la plasticidad del sistema neurosecretor de los crustáceos, lo que podría contribuir al avance en el conocimiento de algunas de las siguientes interrogantes:

- 1.- ¿Podrían las características estructurales de la GS estar relacionadas con aspectos importantes de la función secretora?
- 2.- ¿Es la GS capaz de manifestar cambios plásticos estructurales y funcionales a consecuencia de lesiones como la DU?
- 3.- Como se mencionó en los antecedentes de este trabajo (pag. 9) la actividad eléctrica de ambas GS es muy similar (Chiang y Stell, 1985) lo cual sugiere que existe un acoplamiento en la actividad de las terminales secretoras, ¿Se manifiesta también este acoplamiento en la estructura de la glándula sinusal?

A continuación se enlistan los propósitos específicos de este trabajo.

- 1.- Describir algunas características estructurales de la OS del acocil Procambarus clarki, particularmente, su forma, su aspecto y sus dimensiones.
- 2.- Estudiar las posibles modificaciones de estas características, durante el desarrollo, el ciclo de muda y la muerte del animal.
- 3.- Evaluar la capacidad de la OS para manifestar cambios plásticos en sus características estructurales y funcionales como respuesta a la desatallización unilateral.
- 4.- Evaluar el posible acoplamiento estructural de las OS de ambos tallos oculares.

### 3. MATERIAL Y METODOS.

En esta sección se detalla en forma general la metodología utilizada, y en la sección de resultados se especifican en algunos casos, los aspectos metodológicos más particulares.

#### 3.1. Sujetos Experimentales.

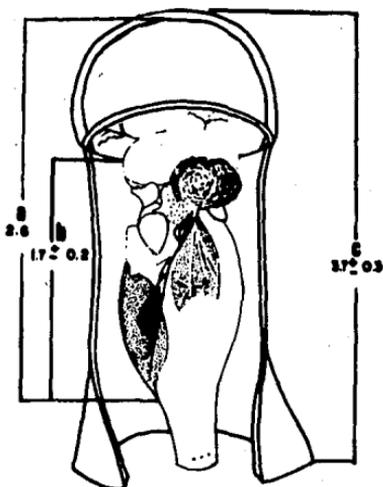
Durante el curso de este trabajo, las observaciones y los experimentos se llevaron a cabo en especímenes de acociles (machos y hembras) Procambarus clarki, que fueron recolectados en afluentes del Rfo Conchos en el estado de Chihuahua.

En el laboratorio, los animales se colocaron en estanques de plástico de 42 X 56 cm donde se aclimataron una semana previa a los experimentos, con ciclos naturales de luz-obscuridad y temperatura ambiente. Los acociles fueron alimentados ad libitum con Nutri-Cubos de Purina MR. La mayor parte de los experimentos se realizó en acociles en etapa C o D del ciclo de muda (Drasch y Tchernigovtzeff, 1967); sin embargo, dependiendo de los propóditos específicos, en algunos experimentos se utilizaron acociles en etapa A o B vivos y muertos.

A menos que se indique lo contrario, la longitud promedio del céfalo-tórax de los animales estudiados fue de,  $3.5 \pm 0.2$  cm y la rostro-caudal de  $7.1 \pm 0.3$  cm (Figura 3). La longitud de los tallos oculares fue, en promedio, de  $3.7 \pm 0.3$  mm. y la del sistema nervioso contenido en ellos de  $1.7 \pm 0.2$  mm. (Figura 4).



**Figura 3.- Dimensiones del acroli *Pyrausta nictitans*. A) longitud retrocaudal B) longitud del cefalotórax. Unidades en cm.**



**Figura 4.- Dimensiones del tallo ocular. A) longitud promedio del tejido nervioso y de la retina contenidos en el tallo ocular. B) longitud promedio del tejido nervioso a partir de la lamina ganglionar. C) longitud promedio del tallo ocular considerado desde su base hasta la córnea. Unidades en mm.**

### 3.2. Parámetros Estudiados.

Los parámetros seleccionados para evaluar las características estructurales de la GS fueron: los diámetros medial lateral (ML) y antero posterior (AP), la forma, el aspecto o la coloración y, en algunos casos el contenido y la liberación espontánea de material neurodepressor.

#### 3.2.1. Diámetros.

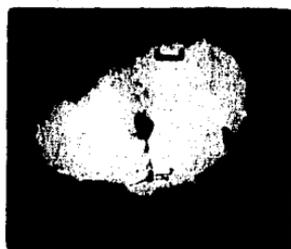
La evaluación en la GS del diámetro medio-lateral (ML) y antero-posterior (AP), se llevó a cabo por métodos micrométricos, utilizando un microscopio estereoscópico Zeiss modelo 475002, (Figura 5).

#### 3.2.2. Formas.

La forma de la GS (Figura 6) se estableció de acuerdo con la siguiente clasificación:

a) Formas Elipsoides.- Caracterizadas por presentar el diámetro ML con dimensiones mayores que el AP. En este tipo se observaron dos modalidades en la orientación de su eje mayor.

i) Elipsoides cuyo eje mayor mostró un ángulo de aproximadamente  $45^\circ$  con respecto al plano horizontal, orientándose de arriba a abajo y de izquierda a derecha.



DIAMETRO  
A-P

DIAMETRO M-L

**Figura 5.- Fotografía de la GS aislada, en donde se muestran las dimensiones Antero-Posterior; AP y Medial-Lateral; ML. Escala, 0.05 mm.**

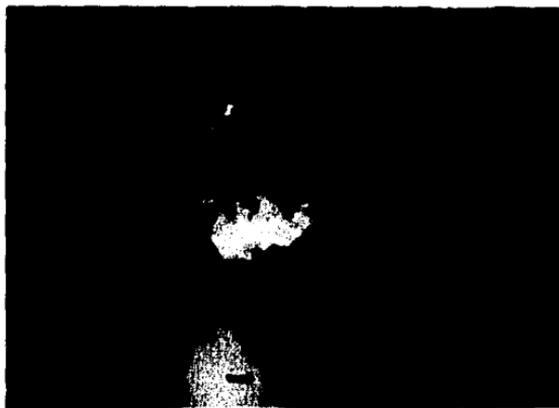
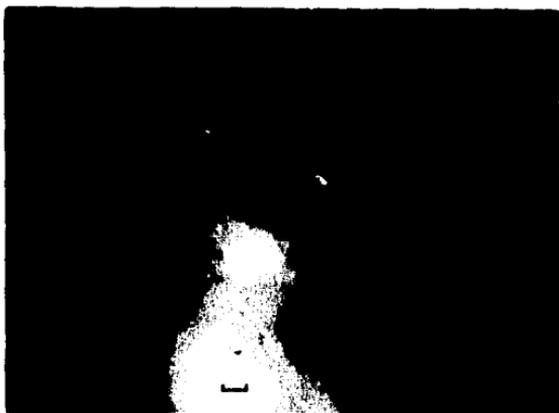


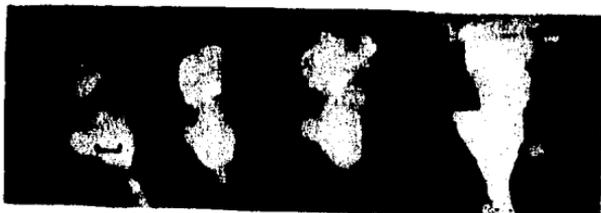
Figura 6.- Formas de la GS. A) GS con forma elipsoidal. B) GS con forma esferoidal. C) GS con forma atípica en la que se puede observar que la forma elipsoidal de base emite prolongaciones en dirección rostral. Escalas, 0.16; 0.2; 0.2 mm.

- ii) Elipsoides cuyo eje mayor mostró un ángulo de aproximadamente 45° con respecto al plano horizontal, orientándose de arriba a abajo y de derecha a izquierda.
- b) Formas esferoides.- Las que presentaban dimensiones similares en sus diámetros ML y AP.
- c) Formas Atípicas.- Las que no se podían incluir en ninguna de las modalidades anteriores, y mostraban límites y prolongaciones irregulares.

### 3.2.3. Aspecto o coloración.

La OS presenta una coloración blanco iridiscente (Passano, 1951), que en los distintos animales manifiesta variaciones en su tonalidad (Figura 7). Con base a la observación microscópica estas variaciones se clasificaron en cuatro fases de acuerdo con los siguientes criterios iniciales:

- a) Fase I.- Se consideró en esta fase, las OS que no pudieron ser identificadas por su color característico, debido a su semejanza con el resto del tejido.
- b) Fase II.- En este caso, la OS fue apenas visible y con dificultad se diferenciaba del resto del tejido nervioso.



I II III IV

Figura 7.- Aspecto o coloración de la GS. se muestran algunos ejemplos de la coloración la que fué clasificada en fases de I a IV. Notese que en la fase I no se aprecia la GS, sin embargo en la fase IV, la GS muestra la máxima intensidad observada. Escala 0.4 mm.

- c) Fase III.- Las glándulas en esta fase, eran claramente observables y diferenciables por su coloración del resto del tallo ocular.
- d) Fase IV.- En esta fase, la OS presentó la mayor coloración blanco iridiscente, lo que permitía observarla aún sin necesidad del microscopio.

#### 3.2.4. Liberación Espontánea.

Con el fin de estudiar la liberación espontánea de material neurodepressor del tallo ocular del acocil, se procedió a incubar de 5 a 8 tallos, en un volumen de 3 ml de solución van Harrevelde (1936) (V.H.) por un periodo de 6 horas, en condiciones de obscuridad constante y a 9 °C. (Flores, 1981). Posteriormente, los tallos eran extraídos de la solución y el medio de incubación era sometido a bioensayo para probar su efecto depressor.

#### 3.2.5. Extractos Crudos.

Los tallos oculares extraídos del medio de incubación, fueron homogenizados y sometidos a pasos sucesivos por acetona y cloroformo. El material obtenido resuspendido en V.H. y centrifugado durante 10 minutos a 1000 g, fue calentado en baño maría 10 minutos a 80 °C, para posteriormente ser sometido a bioensayo.

### 3.3. Bienesayo.

La evaluación del contenido de material neurodepressor en los tallos oculares, se realizó por bienesayo (Aréchiga, y cols., 1985) en el tensorreceptor abdominal tónico de la misma especie (Alexandrowicz, 1951; Wierana y cols, 1953) .

El procedimiento para la disección del tensorreceptor, se iniciaba con la sección de los segmentos abdominales al borde del tórax. Se cortaron los esternitos del pleon y el telson de la región abdominal. Los músculos extensores se sujetaban con una pinza de relojero hasta desinsertarlos de sus uniones anatómicas. Los segmentos fueron seccionados en la línea media, utilizando un hemisegmento para exponer los músculos receptores. La disección se realizó, en solución fresca para crustáceo dulceacuícola (van Harrevelde 1936). Después de cortar la rama que inerva los músculos profundus, se cortaron los músculos profundus lateralis y medialis, así como las ramas que inervan los músculos receptores con la musculatura profunda. El músculo superficial medialis se cortó en su totalidad dejando expuestas las unidades receptoras. Finalmente el músculo superficialis lateralis, se desinsertó de la base y se fueron desprendiendo las pequeñas ramas del tronco nervioso principal que lo inervan. De esta forma la longitud total del tronco que inerva los órganos receptores quedó libre, permitiendo una mayor área de acceso al electrodo de registro, y eliminando así, la posible influencia de otras estructuras sobre la respuesta de la

preparación. Después de la disección se cortaron los segmentos restantes, dejando un tercio de los adyacentes para sujetarla. En una cámara de lucita con un volumen de dos ml, la preparación se fijó con alfileres de uno de los segmentos adyacentes, y del otro con un gancho (sujeto a un micromanipulador Narishige) se aplicó estiramiento a los músculos receptores. Finalmente se perfundió continuamente con solución V.H.

La actividad tónica derivada del estiramiento de la neurona sensorial, fue registrada extracelularmente con un electrodo de succión conteniendo solución V.H. como medio conductor (Figura 8). La señal fue amplificada por medio de un amplificador diferencial Tektronix AM 502 cuya salida se conectaba en paralelo con un osciloscopio Telequipment DM 64, un audiomonitor Harco Biosystems Inc BFR-4, un registrador Gould 22008 y un contador Tektronix DC503 A. Una vez que se obtenía una preparación cuya respuesta al estiramiento era estable, se utilizaba para probar en ella la efectividad de la liberación espontánea y de los extractos crudos para modificar dicha respuesta.

Para la cuantificación del efecto depresor se utilizó el sistema de unidades de la HND (Aréchiga y cols, 1985), en el que un decremento del 1% en la frecuencia de disparo del tensorreceptor corresponde a una unidad de HND, lo cual fue comparado en todos los casos con el testigo.

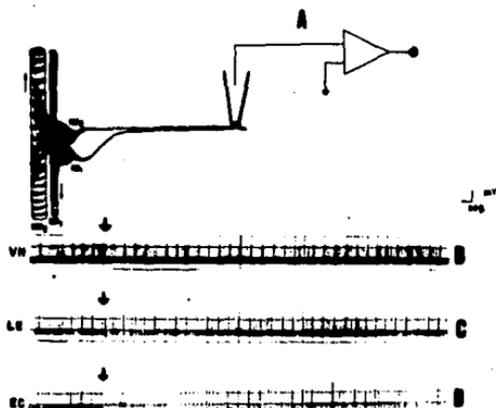


Figura 8.- Bioensayo del tensorreceptor abdominal tónico del acocil. A) Sistema de registro. B) Actividad de la neurona sensorial 1 en respuesta al estiramiento del músculo receptor 1, con flujo de solución van Harrevelde (VH). C) Modificación de la respuesta del tensorreceptor a la aplicación del medio de incubación de los tallos oculares. D) Y efecto de los extractos crudos. NS1, neurona sensorial 1; NS2, neurona sensorial 2; MR1 músculo receptor 1; MR2, músculo receptor 2; LE, Liberación Espontánea; EC, Extractos Crudos. Escala 2 mm/seg.

### 3.4. Grupos.

Para las observaciones y los experimentos realizados en este trabajo, se utilizaron diferentes grupos de acociles los cuales se describen a continuación.

#### 3.4.1. Grupo testigo:

Se utilizó un grupo de acociles intactos seleccionados por sus dimensiones y su estado de muda; previamente a las observaciones los animales fueron examinados para evitar alguna anomalía en los tallos y en el cuerpo.

Para la disección, inicialmente se cortó el corium con unas tijeras finas, lo que permitió tener un libre acceso a los tallos oculares. La ablación del tallo se realizó sujetándolo de la base con unas pinzas de relojero, y desplazándolo en dirección lateral para aumentar la superficie de la región blanda, donde se efectuaba el corte. Ambos tallos fueron colocados en una caja de petri conteniendo solución V.H. Las heridas fueron lavadas con gasa húmeda y cauterizadas con parafina líquida, formando así un tapón que evitaba el sangrado. El tejido nervioso contenido en los tallos oculares se obtuvo fracturando el exoesqueleto, y con un bisturí se separó de los músculos y del tejido conjuntivo, los que también fueron cuidadosamente disecados. Una vez que la observación de la OS fue clara a través de un microscopio estereoscópico, se procedió a la evaluación de los parámetros ya descritos.

### 3.4.2. Grupo con destallización unilateral (DU):

En este grupo, se llevó a cabo la disección de un solo tallo y la evaluación de las características de la GS como se describe en el lote anterior. Al término de la cirugía, los animales fueron regresados a sus estanques donde se separaron en lotes de 7, 14 y 30 días posteriores a la tallectomía. Al finalizar el periodo especificado para cada grupo, se procedía a extirpar el tallo ocular remanente para evaluar las características de la GS, las que se confrontaban con las observaciones de la GS correspondientes al tallo ocular previamente extirpado (consideradas como testigo).

### 3.4.2. Grupo con destallización unilateral y transplante autólogo:

Una vez que se evaluaban las características de la GS del tallo ocular extirpado (testigo), se procedía a realizar un orificio en el dorso del caparazón sobre la región pericárdica, de 0.5 cm de diámetro; se removían los músculos superficiales y se implantaba el tallo ocular en la región lateral derecha del corazón. Posteriormente se colocaban los músculos en su posición original y se cubría el orificio con parafina semilíquida. Los animales eran regresados a sus estanques, donde se clasificaban en grupos de 7, 14 y 30 días. Al término del periodo especificado para cada grupo, se procedía a extirpar el tallo ocular remanente, evaluando también los cambios en el tejido nervioso transplantado. Finalmente se evaluaban las

características de la OS del tallo ocular remanente y se comparaban con las del tallo contralateral evaluadas previamente al trasplante y consideradas como testigo.

#### 3.4.4. Grupo con ligadura en el nervio óptico:

Para estudiar el efecto de la lesión del nervio óptico, se formaron grupos de 3, 5 y 7 días, posteriores a la ligadura unilateral del nervio óptico. Previamente a la cirugía los acociles se anestesiaban disminuyendo la temperatura a 5 °C. Bajo microscopio estereoscópico, se tomaba el tallo con unas pinzas de relojero y se desplazaba cuidadosamente en dirección lateral, obteniendo así, una mayor superficie y tensión de la región blanda de la base del tallo. En esta región se realizaba una incisión de 0.5 cm aproximadamente, y se introducía un disector de vidrio con punta curva, y realizando un movimiento circular sobre la pared del tallo, se trataba de enganchar el nervio, la única estructura nerviosa presente en esa región. Cuando el nervio era exitosamente enganchado, se pasaba un hilo de sutura y se realizaba la ligadura del mismo. En los casos en los que el nervio era seccionado, el animal se desechaba del grupo. El hilo era cortado lo más cercanamente posible al nudo y el nervio ya ligado era regresado a su posición anatómica original. Se lavaba la herida y se cubría con gasa hasta que se obtenía un coágulo. Finalmente el animal era regresado a su respectivo estanque. Al finalizar el periodo determinado para

cada grupo se evaluaron los cambios ocurridos en la GS de ambos tallos.

#### 3.4.5. Grupo con sección del nervio óptico:

Se formaron 3 grupos de animales, de acuerdo con el tiempo (3, 5 y 7 días) que habían sido mantenidos en sus estanques después de la sección unilateral del nervio óptico. Los periodos elegidos para estos grupos fueron cortos debido a que el tallo lesionado degenera en tiempos mayores, lo que haría imposible la evaluación de los parámetros a estudiar. Para la disección del nervio se realizaba un corte de aproximadamente 5 mm, dejando un espacio entre los extremos del nervio para evitar una posible regeneración. Posteriormente se colocaban los extremos del nervio en su posición anatómica original. Se lavaba la herida y se cubría con gasa hasta que se obtenía un coágulo. El animal era devuelto al estanque y, al término del periodo especificado para cada lote, se evaluaba la GS de ambos tallos.

En los grupos con ligadura y sección del nervio óptico se consideraba como testigo el tallo intacto contralateral.

#### 4. Resultados.

##### 4.1 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LA GLANDULA SINUSAL Y SUS PROBABLES IMPLICACIONES FUNCIONALES.

###### 4.1.1 Características de la OS.

El propósito de las observaciones cuyos resultados se muestran a continuación, fue analizar algunas características de la glándula sinusal (OS) en acociles de 7.11.03 cm. de longitud rostro-caudal promedio, durante la etapa C-D del ciclo de muda, excepto cuando se especifiquen condiciones diferentes.

En la figura 9 A se muestran los resultados de la evaluación de las formas de la OS registradas en un lote de 102 animales. Se pudieron observar 63.72 % de OS con forma elipsoide. Estas formas se presentaron además con orientaciones distintas en su diámetro mayor; el 9.8 % le correspondió a las OS de forma elipsoide con una orientación de su eje mayor de arriba a abajo y de derecha a izquierda, y 1.96 % con orientación de este eje de arriba a abajo y de izquierda a derecha. Las formas esféricas alcanzaron el 20.59 % y finalmente las formas atípicas presentaron un porcentaje muy bajo de 3.92 %.

En la figura 9 B se presentan los resultados de la exploración de la coloración de la OS en un grupo de 118

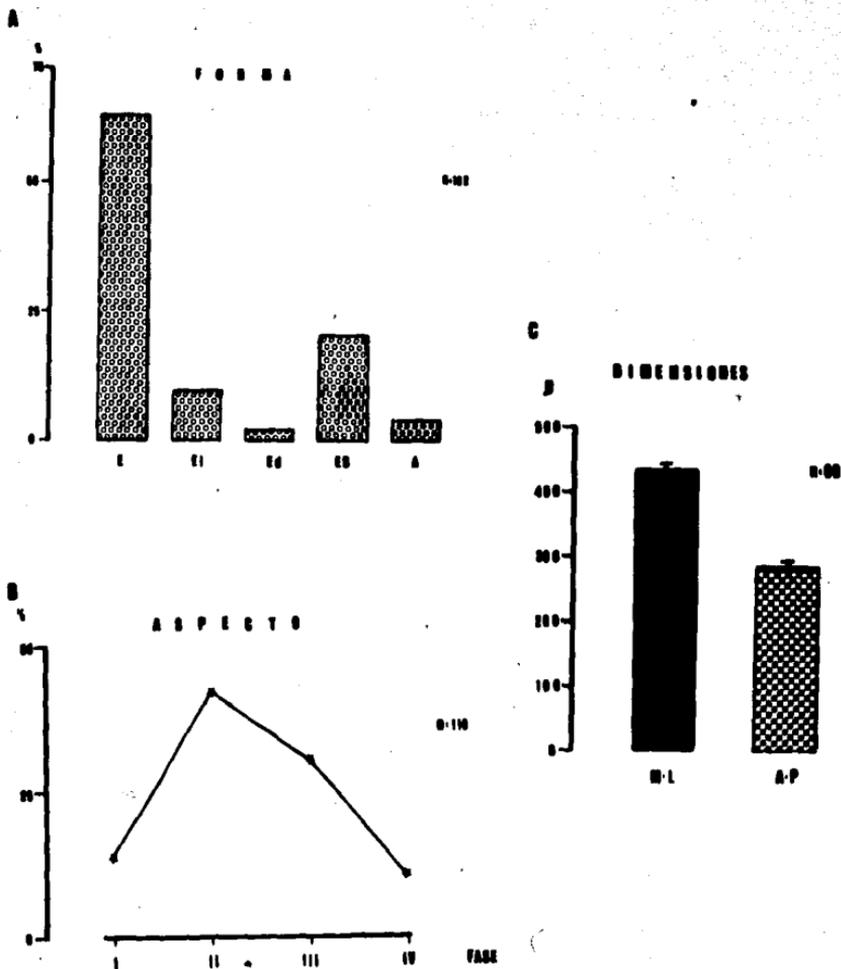


Figura 9.- Características de la OS en escorpión en etapa C o D del ciclo de muda y 7.1±.03 cm de longitud rostrocaudal. A) Distribución de formas de la OS; se observa el mayor porcentaje de formas elipsoides, seguida de esféricas y atípicas. E) Elipsoide; EI) Elipsoide izquierdo; ED) Elipsoide derecho; EB) Esféricas; A) Atípica. B) Aspecto de la OS; se observa una distribución normal con la moda situada en la fase II. C) Dimensiones de la OS; el diámetro Medial-Lateral ML presenta valores superiores al Antero-Posterior AP con escasa variabilidad biológica.

animales. En la fase I que corresponde a la coloración más tenue, (ver metodología) se observaron OS en 14.5 % de los casos, a la fase II le correspondió la máxima ocurrencia de 42.5 %, la fase III alcanzó 31 % y la fase IV el 11.5 % de los casos.

En la figura 9 C se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la OS en un lote de 88 acociles. Se observó un promedio de  $435 \pm 9$  u en el diámetro ML y de  $284.38 \pm 7.65$  u en el diámetro AP.

Estos resultados muestran que la OS de la especie estudiada presenta una gran diversidad de formas, las que dependen principalmente de las relaciones entre sus ejes principales, correspondiendo el porcentaje más elevado a las elipsoides y observándose una muy baja ocurrencia de éstas en sus diversas orientaciones. Considerando la suma de todas sus variedades, las formas elipsoides representan el 75.48 % del total. Las formas esféricas presentaron una incidencia menor y, valores aún más bajos, correspondieron en estos animales a las formas atípicas.

El aspecto de la OS mostró, la mayor frecuencia de OS en la fase II. Por otro lado, a las fases I y IV le correspondieron los porcentajes más bajos.

En relación a las dimensiones de la OS se pudo observar que el diámetro ML es en una muy elevada proporción de los casos, mayor que el diámetro AP, hecho que guarda relación con la

predominancia de formas elipsoides. De un total de 102 GS observadas en el presente estudio, solo una presentó como diámetro mayor al AP. En este caso fue considerada como una glándula atípica.

De los resultados obtenidos se concluye que las características de la GS muestran una diversidad en cuanto a su forma y aspecto; sin embargo se aprecia que los diámetros ML y AP presentan dimensiones muy constantes que se ven reflejadas en el bajo valor observado en el error estándar. Lo anterior lleva a la búsqueda de la posible significancia de estos parámetros con la función secretora.

#### 4.1.2 La GS durante el desarrollo.

El objetivo de los siguientes experimentos fue estudiar la relación entre las características de la GS de animales con diferentes dimensiones rostrocaudales y en etapa C-D del ciclo de muda (n=128), con el fin de evaluar la posible evolución de los parámetros descritos en la sección precedente, durante el desarrollo. Si bien se carece de métodos precisos para evaluar la edad en esta especie, se ha documentado que las dimensiones y el peso de los animales guardan estrecha relación con aquella (Roberts, 1957).

La evaluación estadística de las formas y el aspecto en todos los grupos estudiados se realizó con la prueba Chi cuadrada,

comparando las distribuciones totales observadas en cada grupo, y no confrontando punto a punto

En la figura 10 A se ilustran los resultados de la evaluación de las formas de la GS en animales con distintas dimensiones rostrocaudales. En el grupo de animales con dimensiones de  $4.9 \pm 0.07$  cm. (n=40) se observó 85 % de formas elipsoides, 10 % de formas esferoides y 5 % de formas atípicas. Al grupo con dimensiones de  $7.13 \pm 1.1$  cm. (n=102) le correspondió 75.48% de formas elipsoides, 20.58 % de formas esferoides y 3.92 % de formas atípicas. Finalmente en el grupo de animales de mayor dimensión rostrocaudal ( $9.5 \pm 0.15$  cm, n=22), se observó 43.18 % de formas elipsoides, 9.54 % de esferoides y 47.27 % de atípicas. Se observaron diferencias significativas en el grupo de animales de 9.5 cm de longitud rostrocaudal en relación con los animales de menor tamaño ( $p < 0.005$ ).

En la figura 10 B se presentan los resultados del examen del aspecto de la GS en los mismos grupos de animales. En el grupo con dimensiones rostrocaudales de  $4.9 \pm 0.07$  cm. se observó, una ausencia de GS en la fase I; a la fase II y III les correspondió 22.4 % y 57.5 % respectivamente y la fase IV alcanzó 20%. En el grupo de animales de  $7.13 \pm 1.1$  cm. se pudo observar 14.5 % de GS en la fase I, 50.5 % en la fase II; la fase III obtuvo un 27 % de ocurrencia y 8.5 % fue observado en la fase IV. Finalmente los resultados del grupo de  $9.5 \pm 0.15$  cm. muestran una ausencia de GS en la fase I y II, en la fase III

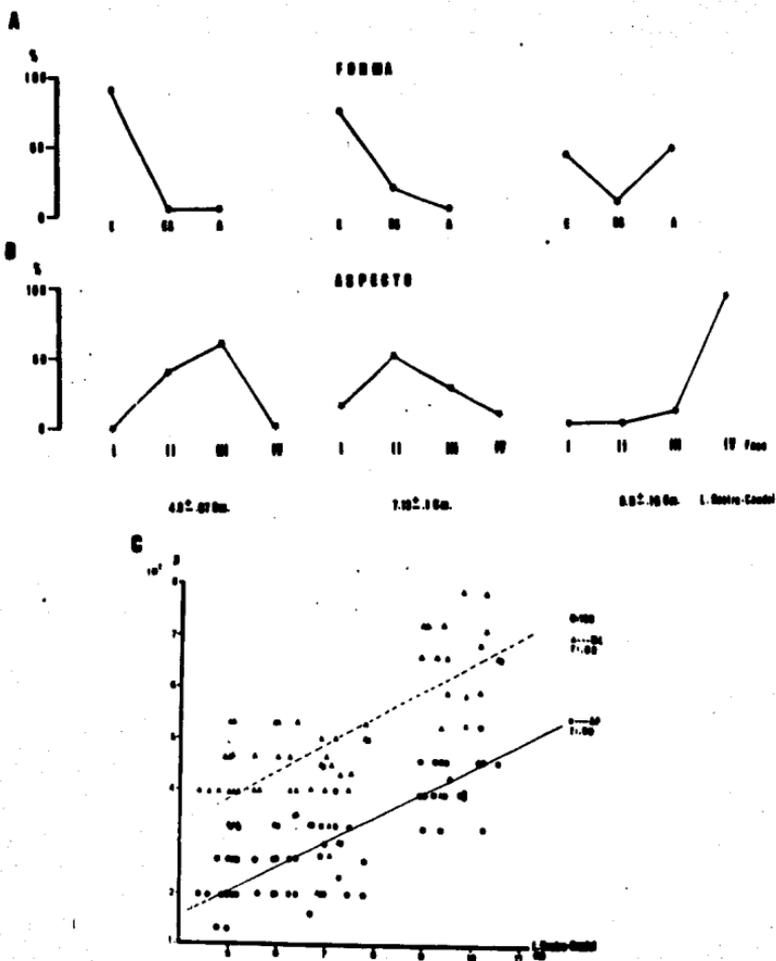


Figura 10.- Características de la GS en animales con diferente longitud rostrocaudal. A) Forma, B) Aspecto y C) Relación entre la longitud rostrocaudal y las dimensiones Medio-Lateral (ML) y Antero-Posterior (AP); se observa que el crecimiento del acocil se acompaña de modificaciones de la GS, las dimensiones muestran un crecimiento lineal en función de la talla del acocil; siendo este más acentuado en el ML. E, Elipsoidal; ES, Esferoidal; A, Atípica.

se observó 9.54 % y 90.45 % de ocurrencia se presentó en la fase IV. De nuevo se observa, que los animales de mayores dimensiones, presentan un cambio significativo en la distribución del aspecto ( $p<.005$ ) en relación con los de menores longitudes.

En la figura 10 C se muestran los resultados de la evaluación de los diámetros de la GS, en relación con distintas dimensiones rostro-caudales ( $n=64$ ). Se puede observar que los puntos se distribuyen de manera muy dispersa en la gráfica; sin embargo, es posible diferenciar grupos para cada una de las dimensiones evaluadas. Como se mencionó en la sección anterior, el diámetro ML es siempre mayor que el diámetro AP de manera constante en los animales con diferentes dimensiones rostrocaudales. Además, se obtuvo un índice de correlación satisfactorio mediante la aplicación de la  $r$  de Pearson (0.829 para el ML y de 0.90 para el AP en relación con la dimensión rostrocaudal), estadísticamente significativo ( $p<.0001$ ). Asimismo fue posible ajustar una función lineal para ambos diámetros; ML ( $R^2=0.68$ ) y AP ( $R^2=0.81$ ).

En los grupos de 4.9 y de 7.1 cm. de longitud rostrocaudal promedio, se observó que tanto las formas como el aspecto muestran tendencias de distribución muy similares; sin embargo, en el primer caso, se ve disminuida la presencia de GS con formas esferoides y en el aspecto no se observaron GS en fase I. En el grupo de los animales de mayor longitud, la distribución

de las formas y del aspecto de la GS cambia de manera notable, mostrando una disminución de las formas esferoides y un importante incremento de las formas atípicas, además de que el mayor porcentaje le correspondió a las GS en fase IV, que en los otros grupos aparece con valores muy bajos.

Los resultados de estas observaciones sugieren, que existe una alta correlación entre las características de la GS y las dimensiones rostrocaudales de los acociles, y muy probablemente con el desarrollo y la edad de los animales, correspondiendo ajustes similares para las funciones del diámetro AP y ML, sin embargo, la pendiente es mayor en el ML ( $n=51.54$ ) que en el AP ( $n=49.95$ ). Esto sugiere un crecimiento de la GS de manera mas acentuada en el ML. Las formas y el aspecto se ven modificadas de forma evidente en los animales de mayores dimensiones.

La talla de los animales es un factor que se relaciona de manera muy importante sobre las características de la GS y muy probablemente sobre su función. Se ha sugerido que los animales con distinto peso corporal, presentan diferencias notables en el efecto de la Hormona Concentradora de Eritróforos HCE sobre la concentración de eritroforos tegumentarios, (Ontiveros, 1995).

#### 4.1.3 La GS durante el ciclo de muda.

Entre los fenómenos que influyen de manera más decisiva en la función global de los crustáceos se encuentra el ciclo de muda,

es uno de los procesos más importantes en la vida de los crustáceos, tanto en lo que respecta al crecimiento como a la reproducción (Kaestner, 1970). Drash y Tchernigovtzeff (1967) estableció un ciclo de 5 estadios (A, B, C, D, E), divididos en varios subestadios. El estado A, es aquel que se presenta inmediatamente después de mudar, el exoesqueleto es fácilmente deformable por ligeras presiones, razón por la cual a los organismos en esta etapa se les llama "blandos". El estado B, se caracteriza porque la porción dorsal del tegumento del organismo ya no es deformable, sin embargo, aún se encuentran regiones blandas como el caso de la región ventral. En la etapa C, se van endureciendo y perdiendo flexibilidad algunas regiones por el crecimiento de tejidos. A esta etapa se le llama "reposo fisiológico" o animales "duros". La etapa D, o de preparación para la muda, se divide en 5 subestadios. Finalmente la etapa E, o de exuviación propiamente dicha, se divide en una fase pasiva y una fase activa (Drash y Tchernigovtzeff 1967). Este ciclo está determinado de manera importante por la liberación de neurohormonas, entre las que se encuentran las provenientes del propio Sistema OXMT-GS (Passano, 1953). El propósito de las siguientes observaciones fue evaluar las características de la GS consideradas en el presente estudio en función del ciclo de muda, especialmente en las etapas A-B (animales blandos) y C-D (animales duros). La evaluación se realizó en acociles con dimensión rostrocaudal promedio de 9.5 cm.

En la figura 11 A se presentan los resultados de la evaluación de las formas de la OS. Se observó en el grupo de animales en la etapa A-B (n=40) 74.5 % de OS de formas elipsoides, 19 % de esferoides y 4 % de atípicas. El grupo de animales en la etapa C-D (n=20) se observó una modificación en la distribución de las formas mostrando 44 % de formas elipsoides, 9 % de esferoides y 47 % de atípicas.

En la figura 11 B se muestra la distribución del aspecto de la OS en los mismos lotes. El grupo en la etapa A-B (n=40) mostró una baja aparición (3 %) de OS en la fase I, en la fase II se observó 29.5 %, el mayor porcentaje le correspondió a la fase III encontrándose 46.25 % de ocurrencia y por último se observó 21.75 % en la fase IV. El grupo en la etapa C-D (n=20) mostró una ausencia de OS en las fases I y II, un valor pequeño se obtuvo para la fase III (9 %) y, finalmente, la fase IV alcanzó el máximo valor de 91 %.

En la figura 11 C se presentan los resultados de la evaluación de las dimensiones de animales en las etapas consideradas del ciclo de muda. En el lote de animales en etapa A-B (n=36), se observó un promedio de  $465 \pm 13$  u en el día. ML y de  $343.5 \pm 12$  u en el día. AP. Los valores promedio obtenidos en el grupo de animales en etapa C-D (n=20) fueron para el día. ML de  $651 \pm 33.3$  u y para el día. AP de  $439.8 \pm 22.9$  u.

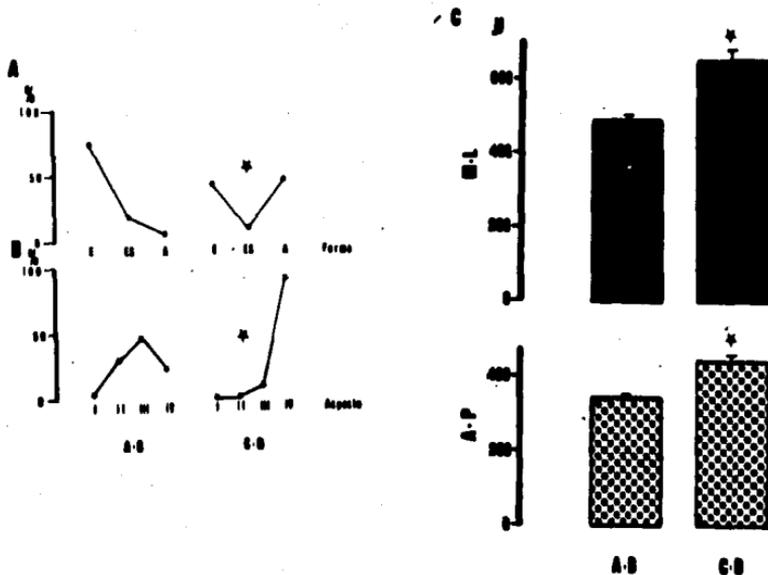


Figura 11.- Características de la GS en acociles en etapas A o B, y C o D del ciclo de muda. A) Forma. B) Aspecto. C) Dimensiones. Se observa que la distribución de la forma, cambia considerablemente con el ciclo de muda. La distribución normal de la coloración, observada en la etapa A o B, se modifica en la C o D por un incremento importante de la GS en fase IV. Se aprecia que los diámetros ML y AP son superiores en los acociles en etapa C o D. El Elipsoidal; ES; Esferoidal; A; Atípica. \* Cambio estadísticamente significativo

La GS de los animales en etapa C o D, presentan diferencias significativas en la distribución de las formas ( $p < 0.001$ ) y la coloración ( $p < 0.001$ ), presentándose en acociles "blandos" una mayor proporción de formas elipsoides y esferoides y una menor coloración de la GS. Los acociles en etapa C o D, presentan dimensiones significativamente mayores que los clasificados en etapa A o B (NL  $p < 0.005$ ; AP  $p < 0.005$ ).

Los resultados sugieren que en animales en las distintas etapas del ciclo de muda, las características de la glándula sinusal se modifican de manera muy importante, mostrando en los animales en la etapa C o D dimensiones mayores, así como un cambio en la distribución de las formas y el aspecto. El hecho de que se observen diferentes características de la GS en las etapas de este ciclo, ilustra la posible participación que tiene la glándula sinusal, en este importante proceso fisiológico. Esto probablemente puede estar traduciendo, cambios en sus funciones secretoras evidenciando el papel que juega la GS en la regulación de la muda (Passano, 1951).

#### 4.1.4 La GS en animales muertos.

El propósito de los siguientes experimentos fue evaluar comparativamente las características de la GS en animales vivos y animales con 0 a 36 horas de muerte (9.5 cm de longitud rostrocaudal promedio). En la figura 12 A, se muestran los

resultados de la evaluación de las formas en un lote de 120 animales, todos en etapas A-B del ciclo de muda.

En el lote de animales vivos (n=60) se observó un 74.5 % de formas elipsoides, 19 % de esféricas y 4 % de formas atípicas. Una distribución muy similar fue observada en el grupo de animales muertos (n=60), el cual mostró 62.48 % de formas elipsoides y 14.79 % de esféricas, en el caso de las formas atípicas (21.79 %), se apreció un incremento en relación con el observado para los animales vivos, siendo este en base a un decremento de las formas elipsoides.

En la figura 12 B, se presenta la evaluación del aspecto de la GS en los mismos grupos de animales. En los acociles vivos, la fase I mostró una baja ocurrencia de 3 %, en la fase II se observó 29.5 % de glándulas, correspondiendo la máxima frecuencia de 46.25 % a la fase III. En la fase IV se alcanzó un porcentaje mayor (21.75 %) en relación con los animales muertos. La evaluación del lote de animales muertos presentó valores muy bajos de glándulas en fase I (4 %), a la fase II le correspondió el máximo porcentaje de ocurrencia de 57.75 % seguido de 38.25 % en la fase III. No se observaron GS en la fase IV.

En la figura 12 C se representan los resultados de la evaluación de las dimensiones de animales vivos y con 0 a 36 horas de muerte en etapa A o B del ciclo de muda. En los animales vivos se observó un promedio de 445.10  $\mu$  en el diámetro

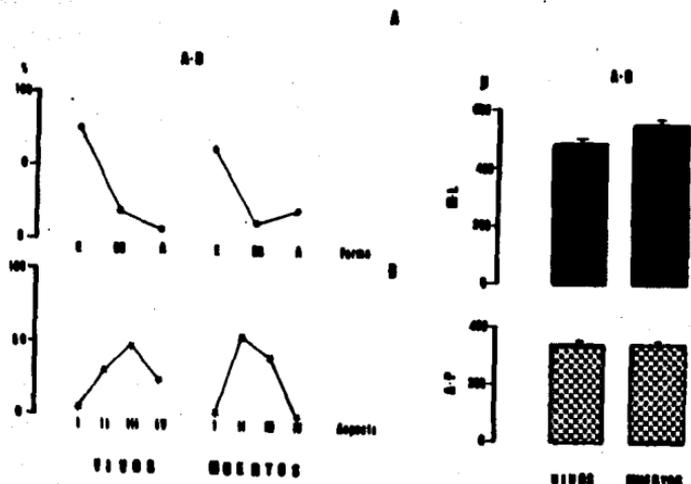


Figura 12.- Características de la OS en animales vivos y con 0 a 36 horas de muerte en etapa A o B del ciclo de muda. A).- Forma. B) Aspecto. C) Dimensiones. Se observa en los acoriles muertos en relación con los vivos un decremento de las formas Elipsoides (E) y un incremento de las alípticas (A); la coloración se modifica, con un incremento en la fase II y decremento en la IV; en el diámetro Medio-Lateral ML se observa un ligero incremento. En el diámetro Antero-Posterior AP no se observan cambios.

ML y de  $348 \pm 14$  u en el AP. Los valores promedio obtenidos en el grupo de animales muertos fueron para el día. ML de  $478 \pm 12$  u y para el AP de  $349 \pm 13$  u. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los animales vivos y los muertos en el día. ML ( $p < .05$ ).

En estos grupos se pudo observar, que en los animales muertos, la forma de la GS se modifica mostrando un incremento de las formas atípicas y una disminución de las elipsoides. Asimismo, el aspecto se modifica disminuyendo la coloración de la GS en forma notable para la fase IV e incrementando la frecuencia para la fase II. El diámetro ML muestra un crecimiento significativo y el AP permanece sin cambios. En el estado de muerte, en el periodo estudiado, no se observan a través del microscopio cambios degenerativos aparentes, y las glándulas no pueden ser diferenciadas de las aisladas de los animales vivos.

Los resultados anteriores sugieren que la muerte del animal, manifiesta un probable bloqueo de la función de la GS, que se acompaña de una modificación inicial de sus características, principalmente el aspecto y las dimensiones del diámetro ML. La muerte es un factor que pone de manifiesto cambios en la mayoría de las características de la GS, siendo las más resistentes a estos cambios la longitud del diámetro AP y las formas.

La Morfología de la OS, estudiada en este capítulo, refleja modificaciones dependiendo del estado fisiológico del animal, lo cual sugiere que las características evaluadas pueden estar relacionadas con aspectos importantes de la función secretora.

Sería conveniente realizar en el futuro evaluaciones de animales con diferente tiempo post-mortem para evaluar la evolución de estas modificaciones.

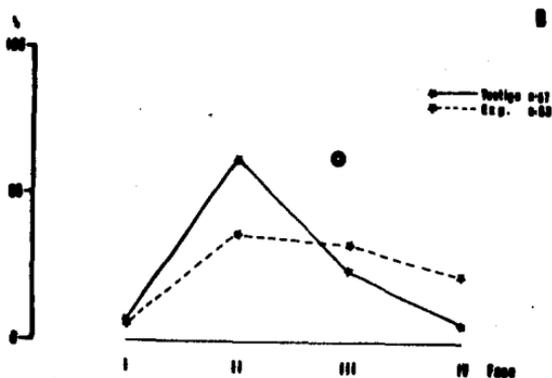
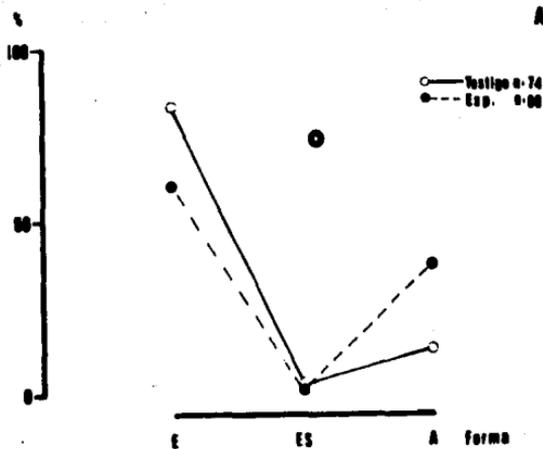
## 4.2. EFECTO DE LA DESTALLIZACION UNILATERAL SOBRE LAS CARACTERISTICAS DE LA GLANDULA SINUSAL.

### 4.2.1. Modificaciones en la OS por efecto de la destallización unilateral (DU).

Con el fin de evaluar la posible capacidad del sistema neurosecretor para manifestar cambios ante lesiones, el propósito de los siguientes experimentos fue estudiar las características de la OS en animales que fueron sometidos a (DU) por períodos de 1 a 4 semanas.

En todos los experimentos de DU se consideró como testigo a las glándulas del tallo ocular extirpado inicialmente, y como experimental a las glándulas del tallo ocular intacto remanente. Los cambios en la forma y el aspecto se evaluaron de la misma forma que en las descripciones anteriores.

En la figura 13, se ilustran los resultados de la evaluación de las formas de la OS en un total de 74 animales considerados como testigo y 86 experimentales. Se puede observar que el mayor porcentaje (82.5 %) de formas elipsoides correspondió al grupo testigo (OT), el grupo experimental (OE) mostró 60.8 % de estas formas. Las formas esteroideas presentaron valores muy bajos en ambos grupos, presentando un 3.5 % el OT y 1.4 % el OE. Las formas atípicas mostraron 14 % de aparición en el OT, y 37.9 %



**Figura 13.- Forma y aspecto de la OS de animales sometidos a destallización unilateral. A) Distribución de las formas de la OS, en el grupo experimental se observa una disminución de las formas elipsoides y un incremento de las atípicas. B) Distribución del aspecto de la OS; el grupo experimental se modifica significativamente mostrando decremento en la fase II y un incremento de las fase III y IV. Exp; Experimental. ‡ Cambio estadísticamente significativo.**

en el GE. La distribución de las formas entre ambos grupos, mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < .005$ ) al aplicar la prueba chi cuadrada.

En la figura 13 B, se presentan los resultados de la evaluación del aspecto de la GS. La fase I mostró 7.0 % en el GT y en el GE se observó un valor de 6.3 %. En la fase II se observan diferencias entre ambos grupos, siendo de 61.4 % para el caso del GT y de 36.5 para el GE. La fase III mostró 24.6 % en el GT y 33.3 % en el GE. En la fase IV el GT obtuvo 7.01 % y el GE 23.8 % de ocurrencia. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < .01$ ) entre las distribuciones del aspecto de los grupos estudiados.

En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS, de los lotes de acociles sometidos a DU. Los valores obtenidos en el grupo testigo fueron menores a los observados en el grupo experimental, en el cual se presentó un crecimiento en ambos diámetros, siendo más acentuado el cambio en el ML.

Los resultados de la destallización unilateral muestran una modificación en la distribución de las formas de la GS, las elipsoides disminuyen y las atípicas aumentan. Las formas esferoides se modifican solo en un 2 %. La distribución del aspecto observada en el GT, también se ve modificada por la destallización unilateral en el GE, presentando una disminución

T A B L A 2

DESTALLACION UNILATERAL									
TESTIGO					EXPERIMENTAL				
DIAMETRO	SEMANAS	n	Xu	DS u	n	X u	DSu	SIGNIFICANCIAS	
ML	1 - 4	67	517	24	67	558	37	p<0.05	
AP	1 - 4	67	300	20	67	335	18	p<0.01	

.....  
 t Prueba t de Student apareada.

de las GS en la fase II y un incremento de las mismas en las fases de mayor coloración (III y IV). También las dimensiones de la GS son afectadas por la DU, observándose un incremento significativo con respecto al testigo en ambos diámetros (ML  $p < .05$  y AP  $p < .01$ ). Los resultados anteriores muestran que la ablación de uno de los pedúnculos oculares produce modificaciones en el sistema neurosecretor localizado en el tallo ocular remanente.

#### 4.2.2. Curso temporal de los cambios morfológicos en la GS.

Una vez que se han evidenciado las modificaciones en la GS por la extirpación del tallo ocular, el propósito de los siguientes experimentos fue evaluar el curso temporal de los cambios observados en las características de la GS del tallo ocular remanente por efecto de la DU. En la figura 14 A, se evaluaron las distribuciones de las formas de la GS en grupos de animales con 7, 14 y 30 días de DU. En estos experimentos se realizó la DU como se explica en la sección 3.4.2. de la metodología. En el grupo de 7 días se pudo observar en la GS extirpada, considerada como testigo, (GT) ( $n=19$ ), formas elipsoides en 70.9 % y en la GS remanente, que se consideró como grupo experimental, GE ( $n=17$ ) solo fue observado 47.1 %. Las formas esferoides obtuvieron un bajo valor de 5.3 % en el GT y estuvieron ausentes en el GE. Finalmente se observó un 15.0 % de formas atípicas en el GT resultado que se vio incrementado de forma muy acentuada en el GE presentando 52.9 % de ocurrencia.

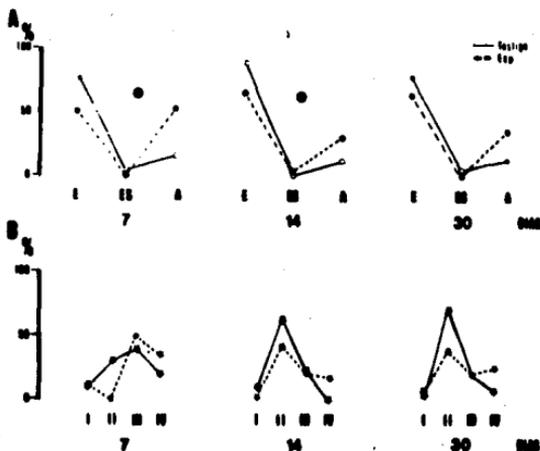


Figura 14.- Características de la OS en grupos de acociles sometidos a DU. A) Distribución de la forma; en los grupos experimentales se observan modificaciones significativas a los 7 y 14 días, principalmente se presenta una disminución de las formas elipsoides y un incremento de las formas atípicas. B) Distribución del aspecto; se observa en todos los grupos, un incremento de la fase IV, y una disminución de la fase II, sin embargo este cambio no alcanza la significancia estadística. #Cambio estadísticamente significativo.

El resultado de la aplicación de la prueba chi cuadrada, mostró diferencias significativas entre ambas distribuciones ( $p < .05$ ). En el grupo de 14 días (GT  $n=34$ , GE  $n=29$ ), se observó un valor muy elevado de formas elipsoides de 38.2 % en el GT, aunque éste fue de 47.5 % en el GE. No fueron observadas formas esferoides en el GT y un porcentaje muy bajo de 3.4 fue obtenido por el GE. Las formas atípicas se presentaron en un 11.8 % en el GT y un valor 3 veces mayor de 31 % fue alcanzado por el GE. La evaluación estadística arrojó diferencias poco significativas entre la distribución de la forma de ambos grupos ( $p < .1$ ). Por último el grupo de 30 días (GT  $n=33$ , GE  $n=28$ ), mostró distribuciones de la forma muy similares en los dos grupos estudiados. Las formas elipsoides fueron observadas en un 78.8 % en el GT y en un 64.3 % en el GE. Se observaron de nuevo valores bajos en las formas esferoides de 6.1 % en el GT y no se presentaron en el GE. Las formas atípicas representaron un 15.2 % en el GT y 35.7 % en el GE. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambas distribuciones.

La distribución de las formas, se modifica tempranamente a consecuencia de la DU, incrementando las formas atípicas y decrementando las formas elipsoides. Este cambio es reversible de manera progresiva, ya que a los 14 días la diferencia estadística disminuye y a los 30 días desaparece.

En la figura 14 B, se ilustran los resultados de la evaluación del aspecto de la GS en los grupos de 7, 14 y 30 días posteriores a la DU. En el grupo de 7 días, se observaron en la fase I, 10 % de ocurrencia en el OT y 12.5 % en el OE. En la fase II fue donde se observaron las mayores diferencias entre los dos grupos, correspondiendo 30.3 para el OT y ausencia de GS en esta fase en el OE. El mayor porcentaje para ambos grupos le correspondió a la fase III siendo de 40% y 50 % para el OT y OE respectivamente. La fase IV mostró 20 % en el OT y 37.5 % en el OE. El grupo de 14 días presentó una distribución similar entre ambos grupos. A la fase I le correspondió 10 % en el OT y 3.7 % en el OE. La fase II alcanzó en este tiempo los mayores porcentajes siendo para el OT de 65 % y para el OE de 44.4 %. En la fase III se observaron en el OT 25 % y en el OE 33.3 %. El OT no mostró GS en la fase IV, mientras que en el OE representó el 16.5 %. En el grupo de 30 días, la distribución del aspecto de la GS en ambos grupos es muy parecido al anterior. En la fase I se obtuvo un 3.7 % en el OT y 7.1 % en el OE. El porcentaje más elevado de ambos grupos, se presenta en la fase II, siendo de 70.37% para el OT y de 39.3 % para el OE. En la fase III se obtuvieron 18.5 % en el OT y 28.6 % en el OE. Finalmente, en la fase IV, el OT mostró 7.4 % y el OE 25 %. Al aplicar la prueba estadística chi cuadrada no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos estudiados.

Los cambios observados en este parámetro, muestran una tendencia general desde los 7 a los 30 días a mostrar una

disminución de las GS ubicadas en la fase II, que se ve compensado con un incremento en las fases de mayor coloración (III y IV).

En la tabla 3, se presentan los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS en los grupos con DU. En el grupo de 7 días no se observaron diferencias significativas entre el JT y el GE. Es hasta que han transcurrido los primeros 14 días, cuando se modifican ambos diámetros, observándose que el ML es el que presenta cambios muy significativos ( $p < .05$ ). El AP mostró algunos cambios a partir de los 14 días, sin embargo dada la baja significancia estadística, no es posible concluir que este parámetro también se modifica. Sería necesario realizar experimentos utilizando grupos de DU con períodos más prolongados a los aquí estudiados para evaluar si la baja significancia se incrementa o desaparece.

En resumen la DU provoca un efecto diferencial en el tiempo de las características de las GS estudiadas. Las formas presentan cambios muy tempranos, los cuales son gradualmente reversibles; el aspecto de la GS también muestra modificaciones cuya tendencia principal es un incremento temprano de la coloración de la GS, la cual se mantiene hasta los 30 días. La GS muestra un incremento más tardío en el diámetro ML (14 días) el cual es reversible.

T A B L A 3

DESTALLIZACION UNILATERAL

DIAMETRO	DIAS	TESTIGO			EXPERIMENTAL			SIGNIFICANCIA
		n	Xu	DSu	n	Xu	DSu	
ML	7	17	520	32	17	594	57	-
AP	7	17	311	19	17	325	16	-
ML	14	29	500	17	29	535	21	p(0.05)
AP	14	29	305	17	29	325	15	p(0.1)
ML	30	23	531	22	23	524	30	-
AP	30	23	303	23	23	354	23	p(0.1)

E Prueba t de Student.

#### 4.2.3. Curso temporal de los cambios funcionales en la OS.

El propósito de los siguientes experimentos fue evaluar algunos cambios funcionales y su curso temporal en animales sometidos a DU. Los grupos testigo y experimental estuvieron integrados con animales de 7.1 cm de longitud rostrocaudal, los que fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales de temperatura, luz-obscuridad y alimentación. El grupo testigo se formó de acociles intactos y el grupo experimental de animales con DU. Estos acociles fueron clasificados en grupos de 7, 14 y 30 días. Al finalizar el período especificado para cada uno, al grupo testigo se le extirpo un tallo y al experimental, el tallo remanente. Con los tallos de cada grupo se procedió a obtener el medio de incubación y el extracto crudo.

En la Tabla 4, se muestran los resultados de la evaluación del efecto neurodepresor de los extractos crudos y de la liberación espontánea de los tallos oculares testigo y de los tallos oculares remanentes en animales sometidos a DU, los cuales fueron también agrupados en lotes de 7, 14 y 30 días. Durante el bioensayo, se probaron los extractos crudos de tallo ocular y el medio de incubación (ver metodología). Se procedió a registrar la frecuencia de disparo del RMI con flujo continuo de solución V.H. durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se cerró el flujo y se registró la frecuencia bajo estas condiciones durante dos minutos. Posteriormente, se aplicó ya sea el extracto crudo, o

T A B L A 4

B I O E N S A Y O

MATERIAL NEURODEPRESOR	TESTIGO	EXPERIMENTAL		
		7	14	30 DIAS
		(Unidades de MID)		
A.-EXTRACTO CRUDO	16.5	3*	5*	52.4*
B.-LIBERACION ESPONTANEA	0	0	0	14*

-----  
 \* Estadisticamente significativos mediante la prueba t de Student.

el medio de incubación y se registró durante 1 minuto la respuesta del receptor. Finalmente, se restauró el flujo y se lavó durante 3 minutos o hasta alcanzar la frecuencia inicialmente registrada.

En la tabla 4A se enlistan los resultados de la evaluación en el bioensayo de los grupos testigo y experimental al probar el equivalente a 0.4 Tallos oculares del extracto crudo. En el grupo de animales testigo, se observó un efecto neurodepresor equivalente a 16.5 unidades de HND; el grupo con 7 días de DU, mostró una depresión equivalente a 2.7 unidades de HND; no se observó depresión en la frecuencia de disparo de la neurona sensorial tónica en el grupo de 14 días. Resultados similares se obtuvieron al probar el mismo volumen de V.H. El mayor efecto, equivalente a 52.4 unidades, fue observado en el grupo de animales con 30 días de DU. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo testigo y todos los grupos experimentales ( $p < 0.05$ ).

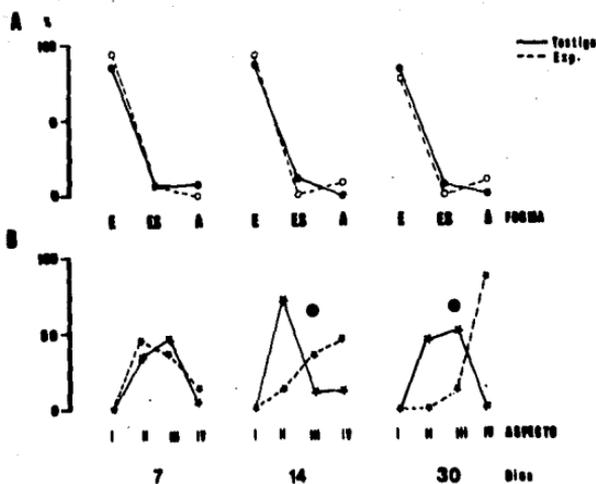
En la tabla 4B se muestran los resultados de la evaluación de la liberación espontánea de la GS en los grupos testigo y experimental (7, 14 y 30 días). En los grupos testigo, y los correspondientes a 7 y 14 días, no se observó efecto neurodepresor sobre el disparo de la neurona sensorial tónica, al aplicar el equivalente a 0.4 tallos obtenidos durante la liberación espontánea de 5 tallos oculares. Resultados similares fueron obtenidos al probar igual volumen de solución V.H. Se

observó una depresión equivalente a 14 unidades de HND en el grupo de 30 días de DU. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) al comparar el grupo de 30 días con el testigo.

La evaluación de los extractos crudos presenta un efecto neurodepresor en el grupo testigo, que representa el contenido normal de HND en los animales intactos. Los grupos de 7 y 14 días de DU, muestran una disminución del efecto neurodepresor en relación con el grupo testigo. En el grupo de 30 días, se observa un incremento notable en el contenido de material neurodepresor, que sobrepasa con mucho al testigo. Por otro lado, la respuesta del bisensayo a la liberación espontánea de las glándulas, sólo mostró un efecto importante a los 30 días.

#### 4.2.4. Cambios en la OS por efecto de la DU y trasplante autólogo.

Los resultados de los experimentos anteriores sugieren que los cambios consecutivos a la DU, se deben a que esta maniobra produce una disminución inicial de la función neurosecretora particularmente sobre los niveles de hormonas circulantes. El propósito de los siguientes experimentos fue contrarrestar esta reducción, mediante el trasplante autólogo del tallo ocular extirpado (OT) y evaluar, de este modo, las características de la OS remanente (OE), en grupos de 7, 14 y 30 días posteriores a la DU. En la figura 15 A se muestran los resultados de la



**Figura 15.- Características de la OS en animales sometidos a DU y trasplante autólogo. A) Distribución de la forma; se observa un elevado porcentaje de formas elipsoides y una baja proporción de formas esféricas y atípicas. Esta distribución es muy parecida en el testigo y experimental en todos los grupos. B) Distribución del aspecto; se modifica en relación con el testigo en los grupos de 14 y 30 días, presentando el experimental, un incremento de las fases de coloración III y IV y un decremento de las fases I y II. C) Fotografías del tallo ocular implantado en la región pericárdica a los 7, 14 y 30 días. Se observa a los 7 días, el tallo en proceso de absorción, a los 14 días solo se aprecia una cicatriz y a los 30 días no se observan rastros del tallo ocular implantado. † Cambio estadísticamente significativo.**

evaluación de las formas. En el grupo de 7 días se puede observar que el mayor porcentaje corresponde a las formas elipsoides (85.7 % y 92.3 %) en el OT y OE. Las formas esferoides mostraron 7.1 % en el OT y 7.7 % en el OE. Se observó 7.1 % de formas atípicas en el OT y estuvieron ausentes en el OE. En el grupo de 14 días se observa una distribución muy similar a la del grupo anterior, presentándose 86.6 % y 91.6 % de formas elipsoides en el OT y OE respectivamente. Se observaron formas esferoides en el OT (13.3 %) y en el OE estuvieron ausentes. No se observaron formas atípicas en el OT y se presentan en el 8.3 % de los casos en el OE. En el grupo de 30 días se observan nuevamente distribuciones parecidas, presentándose una alta incidencia de formas elipsoides (93.6 % y 87.5 %) en el OT y OE. Las formas esferoides se observaron en el OT (6.5 %) y no se presentaron en el OE. También estuvieron ausentes las formas atípicas en el OT y alcanzaron 12.5 % en el OE. No fueron observadas diferencias estadísticas al comparar la distribución de formas entre el OT y el OE en los 3 grupos evaluados.

En la figura 15 B, se muestra la evaluación del aspecto de la OE. En el grupo de 7 días, se observa en la fase I, una ausencia de OE en el OT y OE. En el fase II, se observa 35.7 % en el OT y 46.2 % en el OE. En la fase III, el OT muestra 57.1 % de ocurrencia y 33.5 % en el OE. La fase IV presenta 7.1 % en el OT y 15.4 % en el OE. En este grupo, la distribución del aspecto, tiende a una distribución normal en ambos tallos y no son

diferentes desde el punto de vista estadístico. En el grupo de 14 días, no se observaron OS en la fase I en los animales evaluados. La fase II muestra una alta incidencia de 73.3 % en el OT y una baja ocurrencia de 15.4 % en el OE. En la fase III se aprecia 13.3 % en el OT y 38.9 % en el OE. Por último se observa en la fase IV un bajo porcentaje (13.3 %) en el OT y la mayor ocurrencia en el OE (46.2 %). Se observaron diferencias estadísticas entre el OT y el OE ( $p < .05$ ). En el grupo de 30 días, de nuevo se observa una ausencia de OS de ambos tallos en la fase I. El OT presenta 46.4 % y en el OE no se observan OS en la fase II. La fase III presenta la mayor incidencia de OS en el OT (93.3 %) y en el OE comienza a observarse un pequeño porcentaje (12.5 %). Finalmente para la fase IV, se observa una ausencia de OS en el OT y el OE muestra el mayor porcentaje (87.5 %) de ocurrencia. Se observan diferencias estadísticas ( $p < .01$ ) entre la distribución del aspecto de la OS del OT y el OE.

El el grupo de 7 días no se observan diferencias entre la distribución del aspecto de la OS en ambos tallos. Los cambios se evidencian a partir de 14 días mostrando un incremento en las fase de coloración III y IV y una disminución en las fases I y II. En la figura 19 C se muestra una fotografía del tallo ocular transplantado en la región pericárdica en los grupos de 7, 14 y 30 días; se puede observar que el tallo en proceso de absorción.

En la tabla 5, se ilustra la evaluación de las dimensiones de la GS en los grupos con transplante autólogo y DU (7, 14 y 30 días). A los 7 días se observa una disminución en ambos diámetros, siendo poco significativa en el ML. En el grupo de 14 días el GE muestra un incremento en los diámetros evaluados y finalmente a los 30 días, se observa un incremento muy significativo en el GE con respecto al GT en los parámetros evaluados. Además se puede observar que los valores del GT se mantuvieron sin grandes variaciones, en cambio en el GE se observa una tendencia a incrementar con el transcurso del tiempo.

Los experimentos anteriores sugieren que el transplante autólogo en animales con DU, provoca un bloqueo de las modificaciones en las formas de la GS que han sido observadas en grupos con DU exclusivamente. Dicho bloqueo aparece tempranamente y se continúa hasta los 30 días. El aspecto de la GS también muestra un retraso de los cambios provocados por la DU. Además presenta una modificación gradual (14 días) y potenciada (30 días). Por otro lado, se observa una disminución temprana de las dimensiones en el GE; es decir, se observa un efecto contrario al observado en experimentos de DU. A los 14 días se observa un incremento de la GE el cual se potencia en el grupo de 30 días.

T A B L A 5

GRUPO CON DESTALLIZACION UNILATERAL MAS TRANSPLANTE AUTOLOGO

TESTIGO (Destallización unilateral)					EXPERIMENTAL (DU y Transplante autólogo)			
DIAMETRO	DIAS	N	$\bar{X}_u$	DSu	N	$\bar{X}_u$	DSu	SIGNIFICANCIAS
ML	7	12	420	17	12	392	16	P<0.1
AP	7	12	263	10	12	245	15	-
ML	14	12	428	19	12	475	25	-
AP	14	12	265	0	12	285	20	-
ML	30	8	400	15	8	525	27	P<0.01
AP	30	8	234	12	8	308	8	-

-----  
t: Prueba t de Student.

### 4.3. ACOPLAMIENTO DE SISTEMAS NEUROSECRETORES DEL TALLO OCULAR

#### 4.3.1. Relaciones de la OS de ambos tallos oculares.

El propósito de los experimentos cuyos resultados se muestran a continuación, fue el estudio comparativo de las características de la OS del tallo ocular izquierdo (TOI) y del tallo ocular derecho (TOD), con el fin de evaluar las posibles relaciones de la OS entre ambos tallos. Los experimentos se realizaron en animales con dimensiones rostrocaudales de 7.11.03 cm y que se encontraban en etapa C o D del ciclo de muda.

En la figura 16 A, se ilustran los resultados de la evaluación de las formas de la OS de ambos tallos oculares en un lote de 51 acociles. Se observaron 76.46 % de formas elipsoides en el TOI y 74.5 % en el TOD. Las formas esféricas mostraron 19.6 % en el TOI y 21.56 % en el TOD. Las formas atípicas presentaron valores muy bajos (3.92 %) en ambos tallos. Se observa que la distribución de formas es muy parecida en ambos tallos. No se observaron diferencias estadísticas entre las formas de TOI y el TOD.

En la figura 16 B, se presentan los resultados del examen comparativo del aspecto de la OS de ambos tallos oculares en un lote de 59 animales. Se observó en la fase I, 16.9 % en el TOI y 11.86 % en el TOD. En ambas OS, el mayor porcentaje le correspondió a la fase II, siendo de 40.67 % para el TOI y de

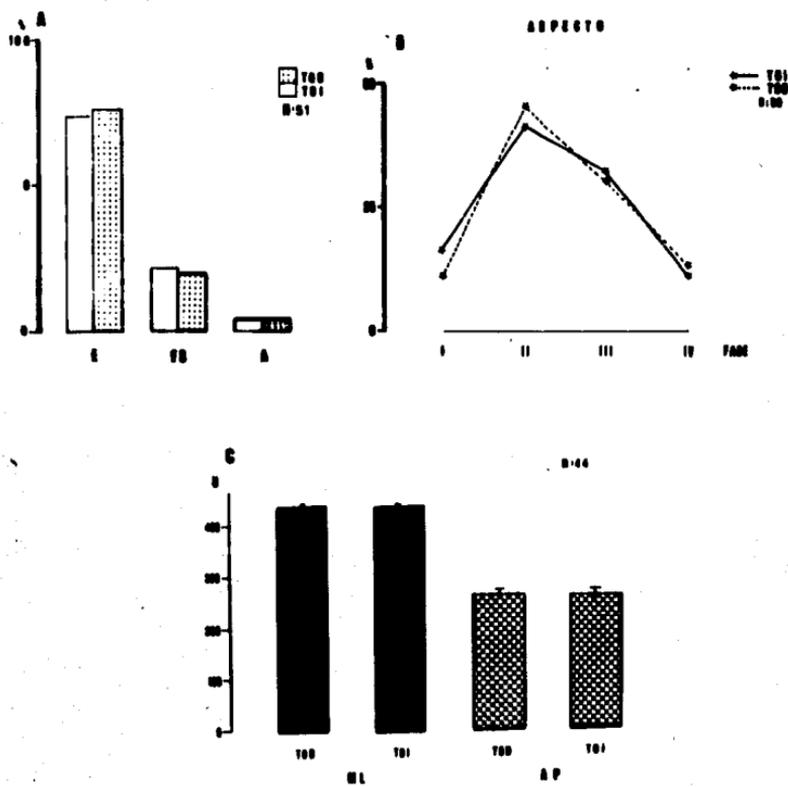


Figura 14.- Características de la GS en el TOB y TOI en etapa C o B del ciclo de muda. A) Formas. B) Aspecto. C) Dimensiones. En todos los casos los parámetros evaluados en la GS muestran valores muy similares en el TOI y TOB.

45 % para el TOD. La fase III mostró 32.2 % en el TOI y 30 % en el TOD. Por último, en la fase IV se observó una incidencia de 10.16 % en el TOI y 13 % en el TOD. El aspecto de la OS muestra una distribución normal para las distintas fases de coloración, correspondiendo los mayores valores a las fases II y III, y los valores más bajos a las fases I y IV. De nuevo se observan coloraciones muy parecidas de las OS de ambos tallos.

En la figura 16 C se presentan los resultados de la evaluación de las dimensiones de la OS del TOI y del TOD en un lote de 44 animales. El diam. ML midió en promedio  $435.17 \pm 10.7$  u en el TOI y  $436.23 \pm 13$  u en el TOD. El diam. AP obtuvo  $283.8 \pm 10.68$  u en el TOI y  $291.37 \pm 9.9$  u en el TOD, además, la magnitud del error estándar (10 a 13 u) en los animales explorados resultó muy pequeña.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las OS de ambos tallos en ninguno de los parámetros evaluados. Las dimensiones de la OS, muestran una gran similitud entre el TOI y el TOD.

#### 4.3.2 Relaciones de la OS en distintas etapas de muda.

En animales con dimensión rostrocaudal de  $7.1 \pm 0.03$  cm, en etapa C-D del ciclo de muda, la morfología y el aspecto del sistema neurosecretor en ambos tallos oculares parece estar en estrecha relación, el propósito de los experimentos que se

describen a continuación fue averiguar si esta relación está presente también en animales de mayor tamaño y en distintas etapas del ciclo de muda. En estos experimentos se formaron 2 grupos de animales: a) "blandos" (etapa A-B) con dimensiones rostrocaudales de  $9.43 \pm .13$  cm. b) animales "duros" (etapa C-D) y de  $9.53 \pm .15$  cm. de longitud rostrocaudal. Los experimentos fueron realizados en el mes de Abril.

En la figura 17 A se presentan los resultados de la evaluación de las formas. En el grupo de acociles en etapa A-B, (TOI, n=20; TOD, n=30), se observaron formas elipsoides en un 70 % en el TOI y 71 % en el TOD. Las formas esferoides mostraron 17 % en el TOI y 21 % en el TOD. Las formas atípicas obtuvieron porcentajes muy bajos en ambos tallos, correspondiendo al TOI 4 % y al TOD 8 %. En el grupo de animales en etapa C-D, (TOI, TOD, n=10), las formas elipsoides mostraron una disminución correspondiendo 30 % al TOI y 50 % al TOD. Las formas esferoides obtuvieron valores muy bajos; el TOI mostró 8 % y el TOD 10 %. Se observó un incremento notable de las formas atípicas alcanzando 54 % el TOI y 40 % el TOD. En este grupo de animales, se observaron diferencias poco significativas entre la distribución de las formas del TOI y del TOD (p.1).

Los resultados anteriores muestran, tal como se había mencionado anteriormente, que la distribución de las formas en animales grandes es muy parecida; en los animales en etapa A-B se observan formas muy semejantes entre el TOI y el TOD. En los

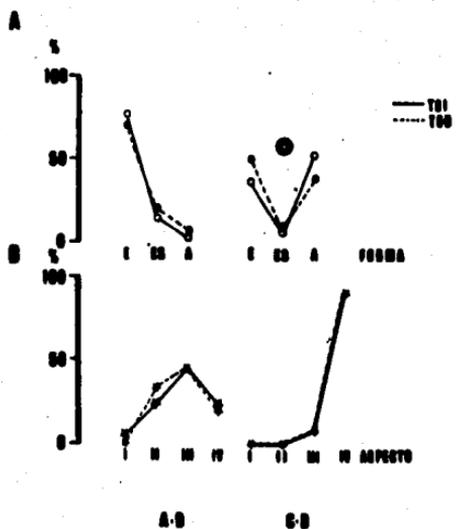


Figura 17.- Características de la OS en acociles en etapas A o B y C o D del ciclo de muda. A) Distribución de la formas; notese que la distribución es similar en ambos tallos en la etapa A o B; en la etapa C o D se presentan ligeras diferencias entre el TOI y el TOD; además se puede observar que la distribución de las formas se modifica durante el ciclo de muda. B) Distribución del aspecto; en las etapas A o B y C o D no se observan diferencias entre ambos tallos, sin embargo, la distribución cambia totalmente con la etapa del ciclo de muda. \* Cambio estadísticamente significativo.

animales en etapa C-D se observa una pequeña diferencia entre las formas de la OS de ambos tallos, pero dada su baja significancia estadística no se considera que existan diferencias en este grupo.

En la figura 17 B, se muestran los resultados de la evaluación del aspecto de la OS. El grupo en etapa A-B (TOI, TOD, n=30), mostró en la fase I, 6 % en el TOI y una ausencia en el TOD. La fase II obtuvo 24 % en el TOI y 35 % en el TOD. A la fase III le correspondió 46.5 % en el TOI y 45 % en el TOD. Por último la fase IV mostró 23.5 % en el TOI y 20 % en el TOD. En el grupo de animales en etapa C-D (TOI, TOD, n=10) del ciclo de muda estuvieron ausentes las OS en las etapas I y II. Se observó una baja ocurrencia (9 %) en ambos tallos de glándulas en la fase III. La mayoría de las OS se situaron en la fase IV, obteniendo 91 % en ambos tallos.

El aspecto mostró en animales en etapa A-B del ciclo de muda una distribución normal con una predominancia de OS en la fase III. Bicha distribución se presentó de manera muy parecida en las OS del TOI y del TOD. En los animales en etapa C-B, la distribución del aspecto cambió significativamente ( $p<0.001$ ), observándose más del 80 % de OS en la fase IV; el patrón de distribución de ambos tallos muestra muy pocas diferencias. En la tabla 6 se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la OS en los mismos grupos. No se observaron

T A B L A 6

DIAMETRO	ETAPA DE MUDA	T O I			T O D			SIGNIFICANCIA <sup>1</sup>
		N	Xu	DSu	N	Xu	DSu	
ML	A-B	28	501	16	28	469	10	-
AP	A-B	29	353	14	28	334	11	-
-----								
ML	C-D	10	436	32	10	466	35	-
AP	C-D	10	444	28	10	436	18	-

.....  
<sup>1</sup> Prueba t de Student apareada.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

diferencias estadísticamente significativas entre las dimensiones de la OS de ambos tallos en los grupos estudiados.

#### 4.3.3. Relaciones de las OS en animales vivos y muertos.

Otro procedimiento que permite estudiar la posible relación entre las OS de ambos tallos, es la comparación de sus características entre animales vivos y en aquellos con 0 a 36 horas de muerte. En estos experimentos los grupos de animales se encontraban en etapa A-B del ciclo de muda. En el caso de los animales vivos, las dimensiones rostrocaudales fueron de  $9.43 \pm 0.13$  cm. y de los animales muertos de  $9.21 \pm 0.11$  cm.

En la figura 18A se muestran los resultados de la evaluación de las formas de la OS. En el grupo de animales vivos (TOI, n=28; TOD, n=30), se observaron las formas elipsoides en un 78 % en el TOI y 71 % en el TOD. Las formas elipsoides mostraron 17 % en el TOI y 21 % en el TOD. Las atípicas presentaron 4 % en el TOI y 8 % en el TOD. En el grupo de animales muertos (TOI, n=30; TOD, n=29), las elipsoides se observaron en 56 % en el TOI y 48.7 % en el TOD. Las esféricas alcanzaron 26 % en el TOI y 34.4 % en el TOD. Las formas atípicas mostraron un incremento siendo para el TOI de 16 % y 27.5 % para el TOD. En este grupo se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de la forma de la OS de ambos tallos ( $\alpha < 0.05$ ). Las formas elipsoides mostraron la mayor proporción seguida de las esféricas y atípicas en ambos tallos oculares en el grupo de

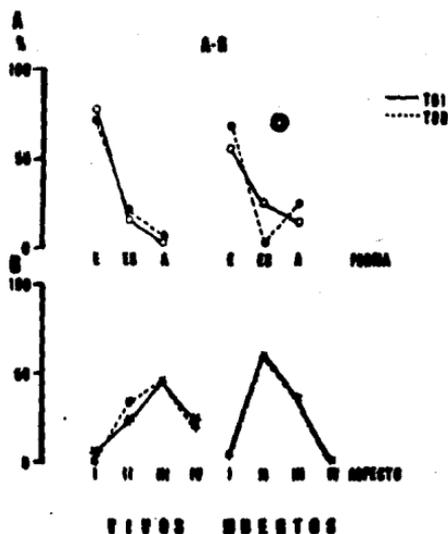


Figura 16.- Examen comparativo de las características de la GS en animales vivos y con 0 a 36 horas de muerte en etapa A o B del ciclo de muda. A) Distribución de la forma; notese que en los animales muertos, la distribución de ambos tallos se modifica significativamente. B) En la distribución del aspecto, se observan valores muy parecidos entre el TOI y el TOB; además se presenta una disminución en la fase IV. \* Cambio estadísticamente significativo.

animales vivos. En los animales muertos se aprecia un posible desacoplamiento entre ambos sistemas neurosecretorios con un incremento de formas atípicas y una disminución de esferoides.

En la figura 16 B, se ilustran los resultados de la evaluación del aspecto de la GS. En el grupo de animales vivos (TOI, TOD, n=30), se observó en la fase I, 6 % en el TOI y una ausencia en el TOD. A la fase II le correspondió 24 % en el TOI y 35 % en el TOD. En la fase III se presentó un 46.5 % en el TOI y 45 % en el TOD. La fase IV obtuvo 23.5 % en el TOI y 20 % en el TOD. El grupo de animales muertos (TOI, TOS, n=30), mostró en la fase I, 4 % en ambas GS. En la fase II se observó 60 % en el TOI y 55.5 % en el TOD. La fase III presentó 36 % en el TOI y 40.5 % en el TOD y por último en la fase IV estuvieron ausentes las GS de ambos tallos.

En los animales vivos se observó la moda en la fase III, siendo los valores de la fase II y IV, muy parecidos en ambos tallos. En los muertos se observó una disminución en la coloración de la GS en ambos tallos. Este parámetro muestra una semejanza entre ambos tallos en el grupo de animales vivos y muertos.

En la tabla 7 se ilustran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS de los grupos de animales vivos y muertos. No se observaron diferencias estadísticamente

T A B L A 7

		ETAPA A-B DEL CICLO DE MUDA						
		T O I			T O D			
DIAMETRO		N	Xu	DSu	N	Xu	DSu	SIGNIFICANCIAS
ML	VIVOS	28	501	16	28	469	10	-
AP	VIVOS	29	353	14	28	334	11	-
ML	MUERTOS	30	532	20	27	573	24	-
AP	MUERTOS	30	352	15	27	326	11	-

=====

± Prueba t de Student.

significativas entre las dimensiones de la OS del TOI y del TOD en los grupos estudiados.

En los acociles estudiados las características de la OS de ambos tallos mantienen valores muy parecidos. sin embargo, se observa una variación de las formas en los animales muertos. este cambio sugiere que la muerte del animal provoca de manera inicial una pérdida de la semejanza de la forma entre ambos tallos. Nuevamente se aprecia que las formas constituyen uno de los parámetros más sensibles, pues se pierde en este caso la similitud entre los dos sistemas secretores. Los resultados de los experimentos anteriores permiten apoyar la idea de la existencia de un acoplamiento entre los dos sistemas, el cual desaparece parcialmente con la muerte del animal.

#### 4.3.4. Posibles vías de acoplamiento.

##### 4.3.4.1. Efecto de la ligadura del Nervio Óptico.

Uno de los procedimientos utilizados con el fin de interrumpir el acoplamiento entre las OS de ambos tallos oculares fue la ligadura del nervio óptico, descrita en la metodología. Se utilizaron acociles con dimensión rostrocaudal de 8±.5 cms. Los experimentos se realizaron en el mes de Diciembre de las 14 a las 17 horas.

En la figura 19 A, se ilustran los resultados de la evaluación de las formas de la GS. En el grupo de 3 días, las formas elipsoides fueron observadas en un 44 % en el TOI y 55.5 % en el TOD. No se observaron formas esferoides en ambos tallos. Las formas atípicas mostraron una alta incidencia de aparición de 55.5 % en el TOI y 44.4 % en el TOD. En el grupo de 5 días se observó 77.7 % en el TOI y 50 % en el TOD de formas elipsoides. Las formas esferoides mostraron valores muy bajos de 11.1 % en el TOI y 10 % en el TOD. Las formas atípicas obtuvieron 11.1 % en el TOI y un porcentaje muy elevado de 40 % en el TOD. Se observaron diferencias significativas ( $p < .001$ ) entre las formas de ambos tallos. En el grupo de 7 días, las formas elipsoides alcanzaron 66.6 % en ambos tallos. No se observaron formas esferoides. Las formas atípicas presentaron 33.3 % de ocurrencia en el TOI y TOD.

Los resultados anteriores muestran un patrón de distribución de formas muy similar al observado en animales de 9.5 cm de longitud rostrocaudal. La distribución de la forma entre los 2 sistemas no muestra modificaciones por efecto de la lijadura del nervio óptico en los grupos de 3 y 7 días. Se observa un probable desacoplamiento entre la GS en el grupo de 5 días.

En la figura 19 B se presentan los resultados de la evaluación del aspecto de la GS en los grupos de 3, 5 y 7 días. En el grupo de 3 días, se observó una ausencia de GS en ambos tallos en las fases I, II y III. La fase IV mostró el 100 % de

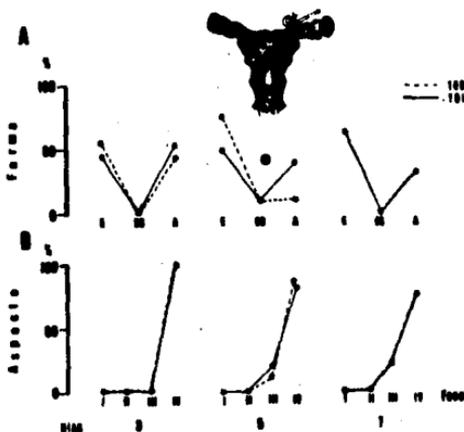


Figura 19.- Características de la GS en acociles sometidos a ligadura del nervio óptico en el TOI. A) Distribución de formas de la GS; se aprecia un desacoplamiento de las GS de ambos tallos a los 5 días. B) Distribución del aspecto de la GS; notese que el aspecto es muy parecido entre la GS del TOI y TOD en los grupos estudiados. \* Cambio estadísticamente significativo.

aparición en el TOD y TOI. En el grupo de 5 días no se observaron GS en las fases I y II, se aprecia un incremento de GS en la fase III siendo para el TOI de 11.1 % y de 20 % para el TOD. De nuevo el mayor porcentaje se presentó en la fase IV, 88.8 % para el TOI y 80 % para el TOD. En el grupo de 7 días se repite la ausencia de GS en las fases I y II. La fase III obtuvo 22.2 % de aparición en ambos tallos. Por último, la fase IV alcanzó la ocurrencia más alta de 77.7 % en ambos tallos.

La coloración de la GS es muy constante en los 3 grupos estudiados. La ligadura del nervio óptico no causó una pérdida en el acoplamiento evaluado por la coloración de la GS; la distribución del aspecto no mostró modificaciones con respecto al testigo.

En la tabla 8 se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS de grupos con ligadura del nervio óptico. No se observaron diferencias significativas del día ML y AP entre el TOI y TOD en los grupos estudiados. Las dimensiones de la GS no se ven modificadas cuando se liga el nervio óptico de uno de los tallos oculares. En la figura 20 se muestra una fotografía de los tallos oculares de un acocil sometido a la ligadura del nervio óptico en el TOI. Se puede observar que las GS de ambos tallos presentan una coloración de fase IV, así como formas atípicas, dicha forma es más irregular en el tallo ligado, ya que envía una prolongación en dirección rostral. Además, se aprecian dimensiones muy similares.

T A B L A 3

LIGADURA DEL NERVO OPTICO									
T O I									
DIAMETRO	DIAS	T O I			T O D			SIGNIFICANCIAS	
		N	Xu	DSu	N	Xu	DSu		
ML	3	9	623	25	9	609	44	-	
AP	3	9	381	18	9	369	23	-	
ML	5	9	645	33	9	634	68	-	
AP	5	9	425	25	9	409	26	-	
ML	7	9	602	75	9	711	21	-	
AP	7	9	440	26	9	410	31	-	

\*\*\*\*\*  
 x Prueba t de Student.

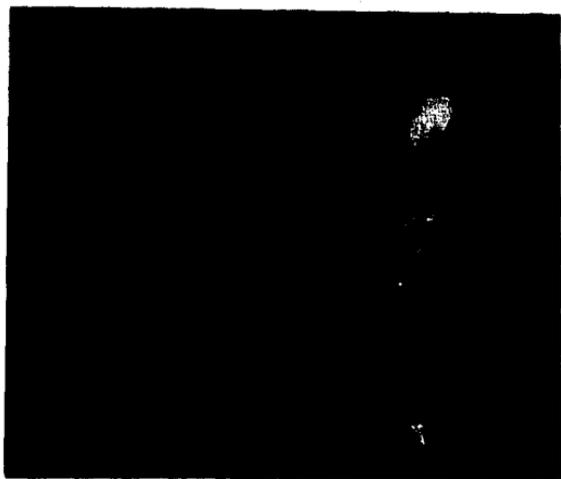


Figura 20.- Fotografía de dos tallos oculares. A la izquierda, el tallo con ligadura del nervio óptico y a la derecha el tallo contralateral intacto. Se aprecia que las glándulas en cada tallo, son de forma atípica, de coloración y dimensiones similares; sin embargo, en el tallo ligado se observa una prolongación de la GS en dirección rostral. Escala 0.16 mm.

En la figura 21 se muestran fotografías de algunos ejemplos de OS de tallos sometidos al mismo procedimiento en las que se puede observar que el aspecto de la OS corresponde a la fase IV, observándose glándulas con formas atípicas.

#### 4.3.4.2. Experimentos con sección del nervio óptico.

Otro procedimiento más severo utilizado para interrumpir el posible acoplamiento entre las OS de ambos tallos fue la sección del nervio óptico ( ver metodología pag. 40). Se utilizaron accociles con dimensión rostrocaudal de 6.6 cm.±.12. Los experimentos se realizaron en el mes de Junio de las 13 a las 14 horas.

En la figura 22 A, se muestran los resultados de la evaluación de las formas de la OS en grupos de animales con sección en el nervio óptico en uno de los tallos oculares. Se observó en el grupo de 3 días, 50 % de formas elipsoides en la OS del TOD y 60 % en el TOI. No se observaron formas esferoides en ambos tallos. Las formas atípicas presentaron 50 % en el TOD y 40 % en el TOI. En el grupo de 5 días, se observó el mayor porcentaje de formas atípicas en el TOD de 83.3 %, en el TOI se presentó 44.4 % de estas formas. De nuevo las formas esferoides se encuentran ausentes en ambos tallos. Las formas atípicas presentan una baja ocurrencia en el TOD de 16.6 % y una alta incidencia de 55.5 % en el TOI.

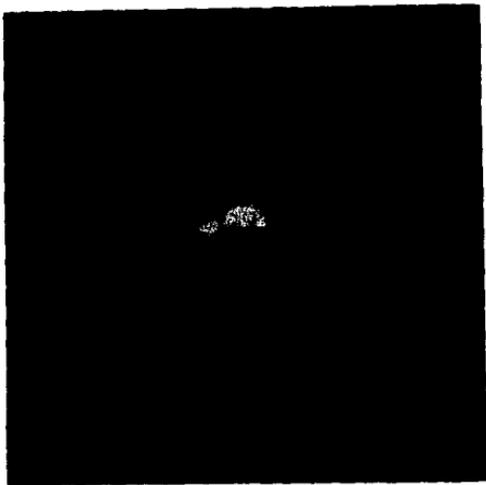


Figura 21.- Fotografías de tallos con ligadura del nervio óptico (del grupo de 7 días); notese que en ambos casos la GS muestra formas atípicas y coloración correspondiente a la fase IV. Escala 0.2 mm.

En el grupo de 7 días, las formas elipsoides mostraron 66.6 % en el TOD y 87.5 % en el TOI. No se observaron formas esferoides en ambos tallos. Las formas atípicas alcanzaron 33.3 % en el TOD y 12.5 % en el TOI. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la distribución de las formas de la OS del TOD y TOI en los grupos de 3 y 7 días. Sin embargo, estas diferencias si fueron significativas ( $p < .1$ ) en el grupo de 5 días. El patrón de distribución de las formas es muy similar al observado en los animales "grandes".

En la figura 22 B, se muestra la evaluación de la coloración de la OS. El grupo de 3 días mostró una ausencia de OS en la fase I en ambos tallos. En la fase II, se observó 12.5 % en el TOD y una ausencia de OS en el TOI. La fase III muestra 12.5 % en el TOD y 30 % en el TOI. Los mayores porcentajes se localizan en la fase IV, correspondiendo 75 % al TOD y 70 % al TOI. El grupo de 5 días mostró de nuevo una ausencia de OS de ambos tallos en la fase I. En la fase II, se presentó 16.6 % en el TOD y cero en el TOI. Ambos tallos presentaron 33.3 % en la fase III; los mayores porcentajes se localizaron en la fase IV siendo de 50 % para el TOD y 66.66 % para el TOI. Por último, en el grupo de 7 días se observó una ausencia en la OS de ambos tallos para las fases I y III. La fase II mostró 33.3 % en el TOD y 12.5 % en el TOI. El porcentaje más alto de aparición correspondió a la fase IV con 66.6 % en el TOD y 87.5 % en el TOI. No fueron apreciadas diferencias estadísticamente significativas en la distribución del aspecto de la OS entre el



Figura 22.- Características de la GS en acociles con sección del nervio Óptico. A) Formas. B) Aspecto. C) Dimensiones. Las formas de la GS de ambos tallos se desacoplan por efecto de la sección a los 3 días. El diámetro ML también se desacopla, pero más tempranamente (3 días). \* Cambio estadísticamente significativo.

TOB y el TOI en los grupos evaluados; la distribución observada en los tres grupos fue muy semejante a las observadas en los grupos de animales grandes.

En la tabla 9 y figura 22 C y D, se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS de los grupos con sección del nervio óptico. No se aprecian diferencias significativas en los días. ML y AP en los grupos estudiados, con excepción del día. ML en el grupo de 3 días y en el AP en el de 7 días. Los resultados muestran cambios significativos que sugieren el desacoplamiento entre las GS de ambos tallos, cambio que ocurre tempranamente en el día. ML y tardamente en el AP. Tal parece, que es necesario cortar el nervio óptico para desacoplar los sistema neurosecretores y aún así, solo se observan algunos cambios parciales; esto apoyaría la hipótesis de que alguna vía, (posiblemente a través de la circulación) además de la influencia neural, pudiera estar manteniendo este acoplamiento.

En la figura 23 se muestran fotografías de tallos oculares de acociles con sección en el nervio óptico a diferentes tiempos. En A se puede observar en la base del tallo ocular la cicatriz que se forma después de 3 días de la ligadura o de la sección del nervio óptico; en E, se aprecia la degeneración de la córnea y retina después de 5 días de sección; en C, se observan ejemplos de degeneración de todo el tejido contenido en el tallo ocular, se puede apreciar que la región basal del tallo está

T A B L A 9

SECCION DEL NERVIÓ OPTICO

DIAMETRO	DIAS	T O I			T O D			SIGNIFICANCIA
		N	Xu	DSu	N	Xu	DSu	
ML	3	0	475	27	0	510	20	P(0.05)
AP	3	0	322	25	0	307	18	
ML	5	6	470	52	6	420	30	
AP	5	6	310	20	6	270	25	
ML	7	6	400	42	6	440	62	p(0.05)
AP	7	6	230	24	6	200	31	

! Prueba t de Student.

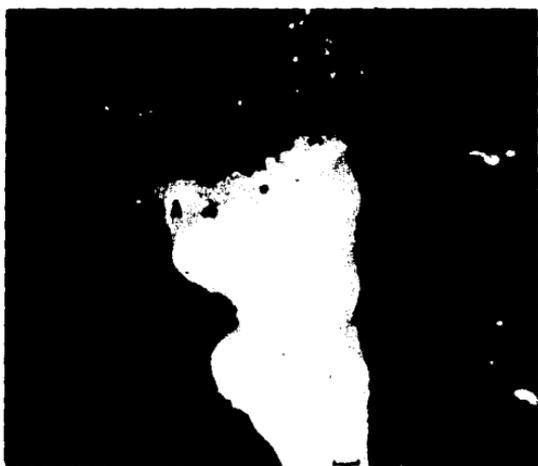


Figura 23.- A) En la base del tallo ocular se aprecia la cicatriz que se forma después de 3 días de la sección o ligadura del nervio óptico. B) A los 5 días de la sección se presenta una degeneración de la cornea y retina del tallo ocular. C) Ejemplos de degeneración del tejido contenido en el tallo ocular, notese que la retina ocupa la region basal del tallo, dejando vacío el exoesqueleto.

ocupado por la retina, quedando el exoesqueleto completamente vacío.

En la figura 24 A se muestran los tallos oculares de un accoil del lote de 5 días, a la derecha se observa el tallo ocular intacto y a la izquierda, el tallo con sección del nervio óptico. En 24 B, se muestran los tallos oculares después de 7 días de la sección. Notese que, en ambos casos, se pueden diferenciar claramente las estructuras nerviosas y la GS de los tallos intactos; sin embargo, en el tallo seccionado, ya desde los 5 días, se empieza a perder la diferenciación de ellas, y a los 7 días el tejido adquiere una consistencia de "algodón"; aún en esta fase, se logra diferenciar la GS en algunos casos, la cual muestra generalmente formas atípicas muy irregulares.

La figura 25 ilustra fotografías de tallos con sección del nervio óptico en los diferentes tiempos evaluados. En A, la GS muestra a los 3 días de la sección, un crecimiento anormal y en el tejido nervioso se observa un proceso inicial de hinchamiento; en B, el tejido está muy degenerado después de 5 días de la sección; sin embargo, la GS se aprecia fácilmente; por último en C, el tejido ha perdido su forma, pero aún es posible distinguir la GS con forma atípica.

La figura 26 muestra un ejemplo de los tallos oculares de un accoil con 7 días de sección del nervio óptico derecho. Se puede observar que el tallo intacto muestra un incremento en las



Figura 24.- Fotografías de tallos oculares con sección del nervio óptico (izquierda) y del tallo contralateral intacto (derecha). A) Tallos del grupo de 5 días. B) Tallos del grupo de 7 días. Notese a los 5 días un crecimiento e incremento de la coloración en ambos tallos, en cambio a los 7 días, el tallo degenerado muestra mayor coloración y dimensiones en relación con el tallo intacto, además la forma muestra prolongaciones en dirección caudal. Escala 0.15 mm.

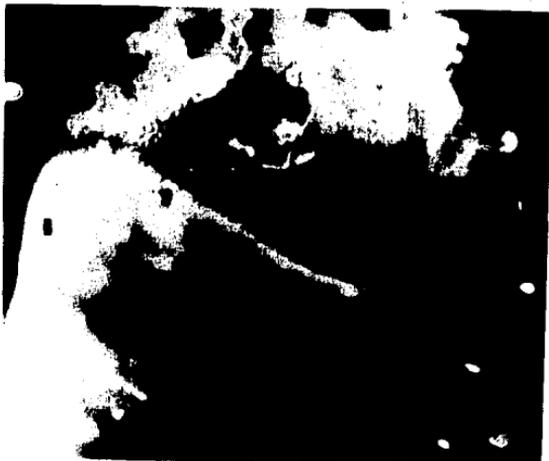


Figura 25.- Fotografías de tallos con sección del nervio óptico A) 3 días. B) 5 días. C) 7 días. Notese que a los 3 días, la GS muestra un crecimiento anormal y el tejido nervioso muestra un proceso inicial de hinchamiento; A los 5 días el tejido nervioso está muy degenerado, sin embargo, se aprecia fácilmente la GS; y finalmente a los 7 días, el tejido ha perdido su forma, pero aún se logra distinguir la GS con forma atípica. Escalas 0.12; 0.25; 0.12 mm.



**Figura 24.- A) Tallos oculares aislados. A la izquierda se aprecia tejido de un tallo intacto y a la derecha un tallo con sección del nervio óptico, el cual ha desarrollado degeneración (7 días). B) Tejido nervioso contenido en el tallo intacto. C) Tejido nervioso degenerado contenido en el tallo con sección del nervio óptico. Escala 0.2 mm.**

dimensiones y coloración de la OS, y el tallo con sección se encuentra en una etapa de degeneración avanzada. Es interesante notar que a pesar de ello la OS aún permanece visible presentando una evidente forma atípica.

#### 4.3.4.3. Experimentos de Destallización Unilateral (DU).

Finalmente la supresión de un pedículo ocular permite evaluar el comportamiento de cada uno de los sistemas secretores por separado. Como vimos en el capítulo anterior, la DU induce cambios en la OS del tallo ocular remanente; el objetivo de los siguientes experimentos fue evaluar las modificaciones de las características de la OS del TOI y TOD en grupos sometidos a DU.

En la figura 27 A se muestran los resultados del examen de la distribución de las formas en grupos de animales con el tallo ocular izquierdo como remanente (TR). En el grupo de 7 días (TR, TE, n=10), se pudo observar en las formas elipsoides, 80 % en el tallo extirpado (TE) y 60 % en el TR; las formas esféricas, estuvieron ausentes en ambos tallos. Se observó 20 % en el TE y 40 % en el TR de formas atípicas. No se observaron diferencias estadísticas en las distribuciones de las formas entre el TE y el TR. El grupo de 14 días, (TE n=16; TR n=12) mostró el mayor índice de ocurrencia de formas elipsoides de 75 % en el TE y 50 % en el TR. Las formas esféricas, estuvieron ausentes en el TE y presentaron 8.3 % en el TR. Las formas atípicas alcanzaron 25 % en el TE y 41.6 % en el TR. No fueron

observadas diferencias significativas entre las distribuciones de ambos tallos. En el grupo de 30 días, (TE, n=17; TR, n=14) se presentó una alta incidencia de formas elipsoides en el TE de 82 % y de 42.8 % en el TR. Las formas esferoides obtuvieron 0 % en el TE y en el TR se observó un 7.1 % de ocurrencia. Las formas atípicas mostraron un bajo índice de 17.6 % en el TE y un índice mayor de 30 % en el TR. La distribución de las formas en este grupo fueron diferentes significativamente ( $p<0.1$ ). La DU en el grupo con el TOI como remanente, provoca modificaciones en la distribución de las formas a los 30 días mostrando un incremento de las formas atípicas y un decremento en las elipsoides.

En la figura 27 B, se evaluó la distribución de las formas de la OS en grupos en los que el Tallo ocular derecho permaneció como el tallo remanente. En el grupo de 7 días (TE n=9; TR n=7), se pudo observar la mayor incidencia de formas elipsoides en el TE (77.7 %) y en el TR solo se observó un 28.6 %. Las formas esferoides obtuvieron 11.1% en el TE y estuvieron ausentes en el TR. Se pudo apreciar 11.1 % de formas atípicas en el TE y 71.42 % en el TR. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la distribución de las formas de ambos tallos ( $p<0.5$ ). En el grupo de 14 días (TE n=18; TR n=16), se observó la mayor incidencia de formas elipsoides, presentando 100 % en el TE y 69 % en el TR. Las formas esferoides estuvieron ausentes en el TE y se observaron en un 6.2 % en el TR. Se obtuvieron 0 % de formas atípicas en el TE y 25 % en el TR. Se

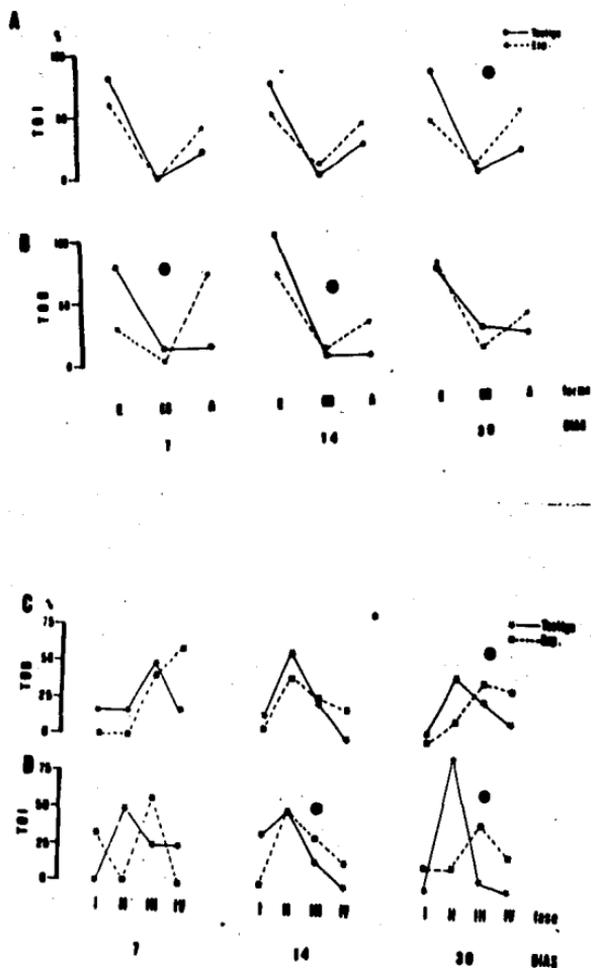


Figura 27.- Características de la GS del TOD y TOI, en grupos sometidos a DU. A) Formas. B) Aspecto. Se observa que el comportamiento ante la DU, es diferente en la GS del TOI y TOD. El TOI muestra cambios más tardíos en relación con el TOD, el cual se modifica temprana y reversiblemente. El aspecto presenta cambios tardíos en ambos tallos, sin embargo son más tempranos en el TOI. \* Cambio estadísticamente significativo.

observaron diferencias significativas entre la distribución de las formas del TE y del TR ( $p < 0.05$ ). El grupo de 30 días (TE  $n=16$ ; TR  $n=14$ ), presentó una distribución similar a la anterior, mostrando la mayor incidencia de formas elipsoides (68.7 %) en el TE y (71.4 %) en el TR. Las formas esféricas mostraron 18.7 % en el TE y 0 % en el TR, y las atípicas 12.5 % y 28.6 % en el TE y TR respectivamente. No se observaron diferencias significativas en este caso, en la distribución de las formas entre el TE y TR.

La DU en el grupo en el que el TOD fue el tallo remanente, provocó cambios en las formas a los 7 y 14 días, con un decremento de las elipsoides y un incremento en las atípicas. La distribución del grupo control muestra una regularidad en ambos tallos mostrando la mayor ocurrencia de formas elipsoides y una baja frecuencia de esféricas y atípicas.

En la figura 27 C, se muestra la evaluación de la distribución del aspecto de la GS en grupos de animales con el tallo ocular derecho como tallo remanente. El grupo de 7 días (TE, TR  $n=20$ ), mostró 16.6 % de GS en el TE para la fase I y una ausencia de GS del TR; en la fase II, se observó 16.6 % en el TE y una ausencia en el TR. En la fase III el TE mostró 50 % y en el TR 40 %; a la fase IV le correspondió 16.6 % en el TE y 40 % en el TR. En el grupo de 14 días (TE  $n=12$ ; TR  $n=14$ ), se observó en la fase I 16.6 % en el TE y 7.1 % en el TR. La fase II obtuvo un alto índice de ocurrencia de 58.3 % en el TE y 42.8 % en el

TR. En la fase III, el TE mostró 25% y el TR 28.5 %; en la fase IV no se observan OS en el TE, y el TR alcanzó una incidencia de 21.4 %. Se pudo observar en el grupo de 30 días (TE n=13; TR n=18), el TE mostró 7.69 % de aparición, y el TR mostró una ausencia de aparición en la fase I. En la fase II se obtuvo 46.1 % en el TE y 16.6 % en el TR. Se pudo apreciar en la fase III, 31 % en el TE y 44.4 % en el TR. En la fase IV se alcanzó un 15.3 % en el TE y 38.8 % en el TR.

En el grupo de 30 días se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las distribuciones del aspecto del TR y TE ( $p < 0.05$ ). En los grupos de 7 y 14 días no se observaron diferencias significativas entre las distribuciones de ambos tallos.

En la figura 27 D, se evaluó la distribución del aspecto de la OS, en grupos de animales en los que el Tallo ocular izquierdo fue el remanente. En el grupo de 7 días (TE n=8; TR n=6), en la fase I se observó, una ausencia de OS en el TE y 33.3 % en el TR en la fase II se observó 50 % de incidencia en el TE y una ausencia de OS en el TR. En la fase III, se obtuvo 25 % en el TE y 66.6 % en el TR. En la fase IV se observó 25 % en el TE y 0 % en el TR. En el grupo de 14 días (TE n=12; TR n=12), se observó 33.3 % en el TE y 0 % en el TR en la fase I. En la fase II, se observó 50 % de incidencia en ambos tallos. La fase III mostró una ocurrencia de 16.6 % en el TE y 33.3 % en el TR. En la fase IV, se observó 0 % en el TE y 16.6 % en el TR. En

el grupo de 30 días (TE n=14; TR n=13), en la fase I se observó una baja ocurrencia de GS (15.3 %) en el TE y una ausencia en el TR. Se presentó un incremento en la fase II, mostrando 92.8 % en el TE y 15.4 % en el TR. En la fase III, se observaron porcentajes de 7.1 % en el TE y 46.1 % en el TR. En la fase IV se observó una disminución en el porcentaje del TE, (0 %) y un incremento (23.1 %) en el TR. El grupo de 14 y 30 días, presentan diferencias estadísticamente significativas en la distribución del aspecto del TE y del TR ( $p<0.05$ ) y ( $p<0.001$ ) respectivamente.

El aspecto de la GS se modificó a los 14 y 30 días. La tendencia general de ambos tallos mostró proporciones altas en las fases III y IV en relación al control. En el aspecto se observaron diferencias al extirpar el TOI o el TOD observándose en el TOI cambios más tempranos.

En la tabla 10 se muestran los resultados de la evaluación de las dimensiones de la GS de animales en los que el TOD fue el tallo remanente. Se observaron modificaciones del diam. ML en el grupo de 14 días ( $p<0.01$ ) y en el grupo de 30 días ( $p<.1$ ). El diam. AP solo mostró un incremento de la GS del TR en el grupo de 14 días ( $p<.1$ ). Dicho incremento fue reversible a los 30 días. En la tabla 11, en cambio, las modificaciones en el TOI remanente solo se observaron a los 14 días ( $p<0.01$ ) en el diam. ML y fueron reversibles a los 30 días. El diam. AP mostró un

T A B L A 10

GRUPOS CON DESTALLIZACION UNILATERAL DEL TALLO OCULAR BERECHIO

DIAMETRO	CONTROL				EXPERIMENTAL				SIGNIFICANCIA
	DIAS	n	Xu	DSu	n	Xu	DSu		
ML	7	9	566	37	9	570	60		
AP	7	9	322	29	9	300	20		
ML	14	20	547	26	20	628	35	(P<0.1)	
AP	14	21	322	17	21	352	16	(P<0.01)	
ML	30	16	535	22	16	577	31	(P<0.1)	
AP	30	17	343	20	17	378	26	-	

■ Prueba t de Student.

T A B L A 11

GRUPOS CON DESATLIZACION UNILATERAL DEL TALLO OCULAR IZQUIERDO

DIAMETRO	DIAS	CONTROL			EXPERIMENTAL			SIGNIFICANCIA
		n	Xu	DSu	n	Xu	DSu	
11L	7	9	476	42	9	511	23	
AF	7	9	205	22	9	340	20	(P<0.025)
14L	14	17	539	32	17	409	35	(P<0.01)
AF	14	17	296	24	17	376	29	(P<0.025)
16L	30	16	514	33	16	568	45	
AF	30	17	276	19	17	370	27	(P<0.005)

† Prueba t de Student.

incremento en la GS del TOI remanente desde los 7 días ( $p<.025$ ) y se mantuvo en el grupo de 14 ( $p<.025$ ) y 30 días ( $p<.005$ ).

La DU provoca una respuesta diferente de la GS dependiendo del tallo que se trate.

El TOI se modifica a los 14 días en el diam. ML de manera reversible / desde los 7 hasta los 30 días en el día AP. En cambio, el TOD se modifica desde los 14 hasta los 30 días en el día ML y solo a los 14 días y de manera reversible en el diam. AP. La respuesta a la DU es diferente para el TOI y TOD. El TOD permanece sin cambios en ambos diámetros a los 7 días y es hasta los 14 días cuando la GS crece, aunque de manera mucho más discreta en el ML, ya que la diferencia muestra una baja significancia estadística. El diam. AP presenta cambios en el TOI mucho mayores y tempranos, la significancia muestra que el crecimiento es más acentuado conforme transcurre el tiempo en el diam. AP. La respuesta del TOD muestra un cambio transitorio y con una significancia reducida. Las formas también muestran diferencias entre los tallos. El TOD muestra cambios tempranos y reversibles. El TOI muestra cambios más tardíos. En el aspecto los cambios son más tempranos en el TOI ocurriendo en el TOD hasta los 30 días.

Los resultados anteriores sugieren que la interrupción definitiva de la comunicación entre ambos tallos oculares, produce una respuesta diferencial en cada uno de los sistemas

neurosecretoras, lo que hace evidente un comportamiento independiente de cada glándula cuando se elimina la contralateral.

### 5. Discusión.

El sistema neurosecretor de los crustáceos (OX-GS) ha sido ampliamente estudiado desde principios de los años treinta. Sin embargo en la actualidad no hay estudios adecuados sobre la morfología global de la GS, más allá de la información que desde esa década existe en torno a ella. De ahí que estudiar algunas de sus características como la forma, las dimensiones y la coloración, en animales sometidos a destilización unilateral lleve a conocer un modelo experimental muy útil en el estudio de la función secretora y su capacidad plástica.

En el presente estudio, las características de la GS fueron evaluadas en términos cualitativos y cuantitativos. La definición cuantitativa de las dimensiones consideró, los valores numéricos en micras de los diámetros ML y AP, y a partir de estas dimensiones se procedió a definir las formas, las que fueron consideradas elipsoides en los casos en que el diámetro ML fue mayor que el AP; con este mismo criterio numérico se determinaron las formas circulares y atípicas (Ver metodología, sección 3.2.2). En términos cualitativos se evaluó la coloración de la GS.

Al parecer no existen antecedentes acerca de la cuantificación de las variaciones de la coloración que presenta la GS, y menos aún, sobre su significancia funcional. Algunos autores han reportado anecdóticamente modificaciones en la

coloración de la GS después de lesiones o ablaciones de las células que forman el Organó X (Passano, 1953). Sería de gran utilidad en el futuro profundizar en la búsqueda de alternativas para cuantificar y comprender la significancia funcional de este fenómeno, cuya existencia es incontrovertible cuando se observa a la GS con algún detenimiento. Además de esto, sería importante correlacionar la coloración de la GS con el contenido de proteínas total y/o péptidos neuroactivos. Otras alternativas podrían ser, la evaluación del número de gránulos de neurosecreción contenidos en la GS mediante la utilización de técnicas de microscopía electrónica, el consumo de oxígeno, etc. Estos planteamientos podrían proporcionar un criterio evaluativo de tipo numérico así como funcional.

Ya que uno de los objetivos generales de este trabajo fue evaluar las características mencionadas en acociles en diversos estados fisiológicos como son: el desarrollo, el ciclo de muda, y la muerte, y si bien en la actualidad no se conocen las posibles relaciones entre las formas, las dimensiones y el aspecto de las estructuras secretoras con sus funciones, surge entonces la posibilidad, en el caso de los crustáceos, de que la morfología de estas estructuras sufra modificaciones durante dichas situaciones fisiológicas.

En los acociles que no fueron sometidos a las condiciones experimentales, la GS presenta algunas características variables como la forma y el aspecto, y otras muy constantes como las

dimensiones del diámetro ML y AP. Tal vez los parámetros variables se relacionen más con la capacidad plástica de esta estructura durante ciertos estados fisiológicos particulares, tales como el ciclo de muda, el crecimiento, etc., y las segundas parecieran ser susceptibles a modificarse bajo condiciones ambientales adversas como lo puede ser la lesión de alguno de los sistemas secretores, aunque en este caso las formas y el aspecto son mucho más sensibles.

Las formas elipsoides de la OS son las más frecuentes, lo que podría implicar su relación con estados fisiológicos normales en el acocil. Las formas circulares presentan porcentajes muy bajos y en muchas ocasiones se encuentran ausentes, por lo que resulta difícil a partir de estos resultados establecer su probable significancia funcional. En cambio las formas atípicas parecen estar muy relacionadas con aspectos plásticos en este sistema, es decir, que podrían ser el recurso biológico tendiente a compensar el déficit hormonal. Generalmente estas formas incrementan su frecuencia en condiciones de lesión experimental y las prolongaciones, ramificaciones o brazos que emergen de una forma elipsoidal de base, probablemente están traduciendo la necesidad del sistema de una mayor área de acceso al torrente sanguíneo, para así facilitar el mecanismo de liberación de las terminales. Por otro lado, las OS mostraron diferencias en su color blanco iridizante, el cual varió a través de los distintos estados fisiológicos y experimentales estudiados, y significancia funcional será discutida posteriormente.

Durante el desarrollo del acocil la GS muestra un crecimiento relacionado con la talla. El incremento de la longitud de los diámetros ML y AP se ajusta a una función lineal, mientras que las formas y el aspecto presentan cambios en su distribución, sobre todo en los animales de mayor tamaño. Se aprecia que los parámetros considerados como "constantes" están determinados por la talla del animal, a partir de la cual se pueden predecir dentro de un cierto rango, las dimensiones de la GS, lo que no sucede con las características que presentan mayores variaciones, sin cuando es posible esperar GS de formas atípicas y coloración muy intensa en los animales de mayores dimensiones.

En 1973 Sochasky demostró que la ablación de los tallos oculares de la langosta Homarus americanus y Palinurus argus no acelera el ciclo de muda en animales adultos, sin embargo, en las langostas juveniles, el intervalo para la muda sí se ve acelerado. Sochasky sugirió que la función del tallo ocular es diferente a lo largo del desarrollo de la langosta. Por otro lado se ha sugerido que en animales con distinto peso corporal, existen diferencias notables en el efecto de la Hormona Concentradora de Eritróforos sobre los efectores tegumentarios (Ontiveros, 1985). Los resultados de este trabajo y las evidencias de los autores mencionados apoyan la idea, de que la función secretora varía con el desarrollo, siendo la talla del animal, un factor importante que además se relaciona de acuerdo con los datos del presente estudio con las características de la GS. La actividad neurosecretora del acocil varía con la edad, la

cual al parecer se refleja también en las características de la GS.

Por otro lado, Durand (1959) propuso que después de la muda pocas células neurosecretoras de tipo 2 contienen material secretor. Asimismo, Pyle (1943) observó cambios pronunciados en esta misma etapa en la cantidad y calidad de tinción del material secretor en la GS de Orconectes virilis. También se observó una importante reducción en el número de gránulos presentes en la GS después de la muda. Passano (1953) ha reportado que las células neurosecretoras del tallo ocular muestran cambios histológicos correlacionados con la muda. Estas evidencias apoyan las observaciones del presente trabajo de que durante la etapa A o B del ciclo de muda, la coloración de la GS se sitúa en las fases II y III, y se presenta una reducción en sus dimensiones. El cambio en la coloración, así como la disminución en el tamaño de la GS sugieren un posible decremento en el número de gránulos de neurosecreción, como lo indican Durand, Pyle y Passano, lo cual explicaría la reducción de su tamaño y su palidez; sin embargo sería necesario en el futuro contar con evidencias histológicas.

Además se pudo observar que la histólisis, es un proceso que afecta parcialmente las características de la GS, disminuyendo su coloración, significativamente para la fase IV e incrementando la longitud del diámetro ML. La palidez del color en los animales muertos, se podría relacionar con la eliminación

de su estado fisiológico activo de síntesis y liberación es posible que el contenido de material neurosecretor de la GS se relacione con su color, ya que en los animales "grandes" y destallizados la GS muestra coloraciones muy intensas, lo que podría ser indicativo de una mayor actividad neurosecretora. El crecimiento que se observa en la GS de los acociles muertos en relación con los animales testigo de las mismas dimensiones, se podría interpretar como el hinchamiento inicial que forma parte del proceso de putrefacción que comienza a manifestarse; sin embargo, se podrían observar mayores cambios a los aquí observados después de 36 horas de muerte.

La morfología de la GS expresa al parecer, modificaciones relacionadas con el estado fisiológico del animal como su desarrollo, el ciclo de muda, e incluso la muerte, lo cual sugiere que las características evaluadas en este trabajo representan parámetros que no habían sido considerados anteriormente y que se relacionan con aspectos importantes de la función secretora.

Será interesante realizar estudios en glándulas por periodos de 24 horas, con la finalidad de evaluar las posibles modificaciones de estos parámetros durante el ciclo nictameral, lo que podría relacionarse con cambios circadianos de la función secretora.

Por otra parte, se sabe que entre las propiedades más importantes del Sistema Nervioso se encuentra la capacidad de compensar una pérdida causada por lesiones. Esta capacidad demuestra que otras áreas neuronales están disponibles para asumir funciones que fueron previamente mediadas por el tejido nervioso perdido (Dach-Rita, 1972). Las manipulaciones experimentales como la extirpación o lesión en la GS, son técnicas que han sido utilizadas desde los años cincuenta para obtener información acerca de los mecanismos de acción de los sistemas secretores (Bliss y cols 1954; Passano, 1951; Kleinholz, 1947). La ablación del tejido es una aproximación tradicional para estudiar la función de estructuras y elementos dentro del Sistema Nervioso Central y Periférico. Por muchos años, esta fue la técnica principalmente utilizada por neuropsicólogos y endocrinólogos en estudios de la relación del cerebro y la conducta (Wolf y cols, 1978). Los avances en la inducción de lesiones electrolíticas y mecánicas, y el análisis histológico de su efecto, han demostrado la utilidad de estos procedimientos. Técnicas y análisis bioquímicos y neurofarmacológicos han aportado algunas ventajas en la elucidación de la anatomía del SNC, proporcionando un mayor entendimiento de los mecanismos de recuperación de las funciones perdidas, y de diversos procesos que están involucrados en el control del sueño y despertar, la presión sanguínea, la regulación de la temperatura, la motivación en la ingesta y de varios descordones más (Wolf y cols, 1978).

El procedimiento de destallización e inyección de extractos de tallo ocular o la implantación de la GS, es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en crustáceos, con el fin de identificar en la mayoría de los casos, el centro de la síntesis de las hormonas que regulan la conducta, el metabolismo y desarrollo de estos animales como: el ciclo de muda, la concentración de proteínas, de taurina y la actividad locomotora entre otras. Cabe hacer notar que la inyección de extractos crudos de tallo ocular, o el implante de la GS revierte los efectos del déficit hormonal provocados por la destallización. Sin embargo, a pesar de que existe abundante información sobre este efecto, poco se sabe acerca de la capacidad del Sistema Neurosecretor de los crustáceos, para presentar cambios plásticos consecutivos a lesiones experimentales.

Retomando esta técnica se propuso evaluar las modificaciones en el sistema neurosecretor desde el punto de vista morfológico y funcional, y así obtener información sobre la capacidad plástica de la GS para compensar la pérdida de uno de los sistemas secretores. También se evaluaron los cambios en la GS en relación a su curso temporal, el contenido de material neurodepressor, y el efecto de los trasplantes autólogos del tallo ocular.

En los experimentos de DU, se observó en la glándula sinusal remanente un mayor número de formas atípicas, así como un aumento en la coloración de la GS. Estos cambios podrían estar

probablemente relacionados con un incremento en el contenido de proteínas y del material neurosecretor. Además de estas modificaciones se presentó un crecimiento de las dimensiones de la GS. En condiciones normales, los niveles hormonales en la hemolinfa están determinados por la liberación de la GS de ambos pedúnculos oculares, la extirpación de uno de los tallos y en consecuencia, la eliminación de las células neurosecretoras contenidas en él, produce una disminución de estos niveles. Esta reducción podría ser la responsable de disparar el mecanismo de compensación generado por la pérdida funcional de un sistema neurosecretor.

Los cambios en las características de la GS muestran diferencias en cuanto a su curso temporal. Las modificaciones en las formas y el diámetro ML son reversibles durante el tiempo estudiado. El AP, sin embargo, presenta cambios que se prolongan hasta los 30 días. El examen del aspecto muestra una tendencia a incrementar la coloración hacia las fases III y IV desde los primeros 7 días.

Estos cambios morfológicos se acompañan además, por una respuesta doble en el bioensayo, caracterizada por una depresión temprana y un incremento potenciado y tardío en el contenido de material neurodepresor. Los cambios tempranos en las características de la GS descritos, no se ven acompañados al parecer, por cambios funcionales inmediatos, sino que existe una latencia entre la manifestación de los cambios morfológicos y

los funcionales. Es probable que el crecimiento de la GS, sea un proceso que anteceda al incremento en la síntesis y liberación de péptidos con actividad biológica, lo cual se podría relacionar con un cambio en la coloración. Además sería necesario realizar bioensayos de las hormonas en todos los grupos estudiados.

Es factible que la GS pueda modificarse en sentido inverso al mencionado anteriormente. En los experimentos de DU más el trasplante autólogo, se observó un bloqueo temprano y/o un retardo en la aparición de los cambios observados solo con la DU. Con el tiempo este retraso se invierte y se potencia, lo cual probablemente sugiere que, la DU provoca una disminución en la función secretora, que es inicialmente restituida e incrementada por el tejido transplantado, lo cual explicaría el decremento del diámetro ML. A los 7 días, se observa que el tallo ocular transplantado se encuentra aún en proceso de absorción (Figura 15 C); a los 14 días no se manifiestan diferencias, a excepción de la coloración, la cual incrementa su tonalidad blanco iridiscente. En este momento el tallo transplantado ha sido absorbido en su totalidad, y solo se observa una cicatriz delineando su forma (Figura 15 C). La aportación funcional del tejido transplantado ha disminuido, y se comienzan a evidenciar algunos cambios en los parámetros evaluados inducidos por la DU. A los 30 días, se observa un crecimiento de la GS y un aumento en su coloración. Estos cambios también están potenciados. En la región del implante se

observa que el tallo ocular ha sido completamente absorbido y no existen rastros de él (Figura 15 C).

El hecho de que se presenten algunos cambios que se ven potenciados en el tiempo, sugiere una respuesta de sobreexcitación del sistema, causada por las abruptas modificaciones en el contenido de hormonas circulantes, como pueden ser el incremento inicial provocado por el implante y la y la subsecuente disminución una vez que ha sido totalmente absorbido.

A partir de estos resultados se puede inferir que la OS, es capaz de manifestar modificaciones en el tamaño, la forma, la coloración y el contenido de material neurodepresor como respuesta a la pérdida de su contralateral. Estas modificaciones tendientes a un crecimiento de la OS remanente, en direcciones que deforman su típica forma elipsoidal y la convierten en una glándula con formas irregulares, así como un progresivo incremento en su coloración y contenido de material neurodepresor, son probables manifestaciones de reajustes morfológicos y funcionales que compensan la drástica pérdida de uno de los dos sistemas. Los cambios hormonales en la hemolinfa del animal son probablemente detectados por la OS en dos sentidos, cuando son disminuidos y cuando son incrementados. Los experimentos de DU, apoyan la primera afirmación y los de trasplante la segunda.

Bliss y cols, (1954) obtuvieron resultados que van en ese sentido en el cangrejo *Decarcinus lateralis*. Ellos describieron que la GS presenta una regeneración parcial a los 22 días, presentándose la regeneración total a los 7 y medio meses después de la extirpación. Los autores reportan que la GS regenerada, fue más pequeña de lo común y se encontraba anormalmente localizada en la Medula Terminal, sin embargo, seguía conservando sus típicas propiedades de tinción. En Spargna también se ha documentado que después de la extirpación de las células que forman el órgano X, la GS generalmente se reduce de tamaño y su coloración se vuelve más opaca al igual que el tracto OX-GS (Passano, 1953).

Las evidencias presentadas llevan a la afirmación de que la GS es una estructura neurosecretora, que manifiesta una capacidad plástica en condiciones de lesiones experimentales como las practicadas en este estudio.

Uno de los posibles fenómenos que podrían estar involucrados en la regeneración y crecimiento de la GS remanente como medida compensatoria en el sistema estudiado, es el incremento en el número de gránulos y/o colaterales en las terminales nerviosas. También es posible que pudiera estar presente un crecimiento o incremento de las células gliales o de los gránulos contenidos dentro de ellas. Se ha reportado que estas células también participan en el proceso de neurosecreción (Koritsanszky, 1967). además, se ha documentado que juegan un papel importante en la

contribución de materiales para la producción de hormonas y su empaquetamiento, en el aporte de sustancias nutritivas, y tal vez, algún tipo de función reguladora para la liberación de material neurosecretor (Weatherby, 1981). Para poder dilucidar estas posibilidades sería muy interesante realizar experimentos, utilizando técnicas de microscopía de luz y electrónica en grupos de acociles destallizados.

Los cambios compensatorios del sistema neurosecretor se van a manifestar probablemente en la dirección en la que se presente menos resistencia, y quizás una mayor área de acceso al seno sanguíneo, donde se pueda liberar más fácilmente el material secretor. El crecimiento de la GS causado por lesiones se facilita en sentido lateral, lo que al mismo tiempo explica la típica forma de esta estructura secretora.

Ya que los crustáceos poseen dos glándulas sinusales localizadas dentro de los pedúnculos oculares, se asume que las terminales neurosecretoras eléctricamente activas de una, lo son también en la contralateral. Chiang y Steel (1985) registraron extracelularmente en Oniscus asellus la actividad eléctrica de la GS del tallo ocular izquierdo y derecho observando las primeras evidencias de sincronización en la actividad de los dos sistemas. Al parecer, en la especie estudiada, los sistemas neurosecretores del tallo ocular no son independientes uno del otro, sino que se aprecian entre ellos características morfológicas y funcionales muy similares, por lo que es muy

probable que las GS de cada tallo ocular guarden una estrecha relación entre sí en su actividad y su morfología; es decir, que se encuentren acopladas.

En los animales considerados como testigo en la especie estudiada, el sistema neurosecretor de cada tallo ocular, particularmente la GS, muestra características morfológicas muy parecidas. Esta similitud se encuentra presente en animales con diferentes dimensiones, en distintos estados del ciclo de muda y aún durante la muerte. La forma y el diámetro ML podrían ser las más sensibles, debido a que muestran un ligero desacoplamiento en los distintos estados del ciclo de muda estudiados, y de manera más acentuada durante la muerte del animal.

Estos resultados apoyan la idea de que las GS de ambos tallos oculares están acopladas, aún, en animales con diferentes dimensiones y en distintos estados funcionales.

Con respecto al examen más detallado de este posible acoplamiento y de las vías responsables del mismo, se procedió en primera instancia considerar el nervio óptico como el responsable de mantener tal sincronización. La ligadura y la sección del nervio óptico, no producen un desacoplamiento de los parámetros estudiados, a excepción de las formas, que a los 5 días presentaron un desacoplamiento transitorio y reversible. Se

observa adicionalmente el mismo fenómeno en el diámetro ML pero a los 3 días, y un cambio tardío en el AP.

Es interesante mencionar, que en los experimentos de ligadura del nervio óptico, además de apreciarse un incremento en la coloración de la GS, se observó en la mayoría de los casos, en la región de la Médula Terminal una coloración blanco iridiscente en las células del Órgano X, similar a la comúnmente observada en la GS. Asimismo, se presentó una distribución de las formas y el aspecto muy parecida a la de los acociles de 9.5 cmf considerando que este lote de animales (0.5 cm) es intermedio entre los acociles "medianos" y "grandes", se explica el tipo de distribución observada. El cambio presente en el grupo de 5 días, muestra que la forma sigue siendo el parámetro más sensible. Con la ligadura del nervio óptico se bloqueó muy probablemente la información que se transmite por las fibras ópticas. El hecho de no haber observado un desacoplamiento en la mayoría de las características, sugiere que las GS de ambos tallos conservan su comunicación, tal vez, por medio de la irrigación superficial, ya que la arteria óptica se encuentra obstruida por la ligadura o la sección del nervio. La apariencia del tejido nervioso del tallo ocular no se afectó por la ligadura del nervio.

La ligadura y la sección del nervio óptico provocan un incremento en las formas atípicas, en las dimensiones y la coloración de la GS, lo que probablemente sugiere que la

información que llega al sistema es de tipo inhibitorio, porque cuando se bloquea, la OS manifiesta cambios tendientes a un crecimiento, un cambio en la forma y un incremento en la tonalidad de su color.

El papel que juega el nervio óptico en dichos experimentos, lleva al planteamiento de la posible existencia de dos vías de acoplamiento entre los sistemas secretores del tallo ocular: a) una vía neural probablemente inhibitoria en virtud de los cambios observados en la forma y el crecimiento de la OS. b) y una vía humoral, puesto que la mayor parte de las características se mantienen acopladas.

Por otro lado, la DU es una maniobra drástica, que anula el acoplamiento entre los dos sistemas, dejando que se expresen independientemente cada una de las OS ante una lesión y, como consecuencia, cada una de ellas responde de manera diferente. Un hecho que ilustra lo anterior es que en el TOI, el diámetro AP presenta mayores cambios y en el TOD, es el diámetro ML el que se ve más modificado. Además, la latencia que se observa en los cambios de la forma y el color es distinta para cada uno de los tallos. Es probable que la diferencia en los cambios observados entre el TOI y el TOD, estén implicando que la plasticidad no manifiesta un plan específico e igualmente definido, sino que en cada tallo existen diferencias debidas a la resistencia del

tejido o a la necesidad de liberación de ciertas terminales y no de otras en un momento determinado.

Los resultados anteriores sugieren que en los animales intactos, la gran similitud observada en los parámetros de ambos tallos obedece a un probable acople entre estas estructuras secretoras. Algunos estados funcionales, como el ciclo de muda o bien la muerte del animal, hacen sugerentes la pérdida parcial de este acoplamiento, así mismo las lesiones practicadas ponen de manifiesto su interrupción parcial, quedando involucradas como posibles vías en esta relación, la neural y la humoral.

Para discernir entre estas dos posibilidades resultará de enorme utilidad realizar experimentos tendientes a manipular cada una de estas vías por separado; todo lo anterior sin descartar la posibilidad de que las 2 vías puedan estar íntimamente relacionadas con este fenómeno.

## 6.- CONCLUSIONES

- 1.- En animales normales (testigo) las características de la GS muestran una diversidad en cuanto a su forma y coloración, mientras que los diámetros ML y AP presentan valores mucho más constantes.
- 2.- La talla, el ciclo de muda y la muerte en el acocil son factores que influyen de manera importante sobre las características de la GS.
- 3.- A partir de los datos anteriores se sugiere que las características de la GS se relacionan con la función secretora.
- 4.- La ablación de uno de los pedúnculos oculares produce modificaciones significativas en función del tiempo en las características de la GS del pedúnculo contralateral.
- 5.- La DU modifica el contenido de material neurodepresor mostrando un decremento inicial y un incremento que se potencia en el tiempo.

- 6.- Los cambios en las características de la GS en los animales con DU muestran un bloqueo temprano y en algunos casos una potenciación tardía en animales con DU más trasplante autólogo.
- 7.- La glándula sinusal es una estructura que manifiesta cambios morfológicos y funcionales que compensan la pérdida del sistema contralateral. Estos cambios muy probablemente están relacionados con la capacidad plástica de la GS.
- 8.- Las características de la GS de ambos pedúnculos oculares apoyan la idea de un posible acoplamiento de los sistemas secretores.
- 9.- Los experimentos de ligadura y sección del nervio óptico sugieren que éste último participa en el mantenimiento del acople de las glándulas sinusales del acocil.

## -7. BIBLIOGRAFIA.

- Abramowitz, R.K. and Abramowitz, A.A. (1940). Moulting growth and survival after eyestalk removal in *Uca pugilator*. Biol. Bull. 78: 179-188.
- Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L., and Papandrea, D.N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. Biol. Bull. 86: 1-5.
- Alexandrowicz, J.S. (1951). Muscle receptor organs in the abdomen of *Homarus vulgaris* y *Palinurus vulgaris*. Quart. J. Micr. Sci. 92: 163-199.
- Andrews, P.H., Copeland, D.E. and Fingerman, M. (1971). Ultrastructural study of the neurosecretory granules in the sinus gland of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Z. Zellforsch. 113: 461-471.
- Andrew, R.D., Orchard, I. and Saleudin, A.S.M. (1978). Structural reevaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. Cell.Tiss.Res. 190: 235-246.
- Andrew, R.D. and Saleudin, A.S.M. (1978). Structure and innervation of a crustacean neurosecretory cell. Canad. J. Zool. 56: 423-430.
- Aréchiga, H., Huberman, A. and Naylor, E. (1974). Hormonal modulation of circadian neural activity in *Carcinus maenas* (L.). Proc. R. Soc. London, B. 187: 299-313.
- Aréchiga, H. and Naylor, E. (1976). Endogenous factors in the control rhythmicity in decapod crustacean, in: Biological rhythms in the marine environment, (P.J. De Coursey, ed.). University of South Carolina Press. pp. 1-16. En Aréchiga, H., García, U. and Rodríguez-Sosa, L. (1985). Neurosecretory role of crustacean eyestalk in the control of neuronal activity. En Model Neural Networks and behaviour. Allen I. Selverston. Ed. Plenum Publishing Corporation.
- Aréchiga, H. (1977). La ritmicidad circádica de los crustáceos. Tesis Doctoral CINVESTAV, IPN. México.
- Aréchiga, H., Huberman, A. and Martínez-Falero, A. (1977). Release of a neuro-depressing hormone from the crustacean sinus gland. Brain Res. 128: 93-108.
- Aréchiga, H., Cabrera-Peralta, C. and Huberman, A. (1979). Functional characterization of the neuro-depressing hormone in the crayfish. J. of Neurobiol. 10: 409-422.

- Aréchiga, H., Atkinson, R.J.A. and Williams, J.A. (1980). Neurohumoral basis of circadian rhythmicity in Nephrona norvegicus (L), Mar Behav. Physiol. 7: 185-197.
- Aréchiga, H., Garcia, U. and Rodriguez-Sosa, L. (1985). Neurosecretory role of crustacean eyestalk in the control of neuronal activity. En Model Neural Networks and behaviour. Allen I. Selverston. Ed. Plenum Publishing Corporation
- Bach-Y-Rita, P. (1972). Brain mechanisms in sensory substitution. Academic Press. Pag. 111.
- Bennett, E.L., Diamond, M.C., Krech, D., and Rosensweig, M.R. (1964). Chemical and anatomical plasticity of brain. Science. 146: 610-619.
- Berlind, A. (1977). Cellular dynamics in invertebrate neurosecretory systems. Int. Rev. Cytol. 49: 171-251.
- Bjorklund, A. and Steveni, A. (1979). Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. Physiol. Rev. 59: 62-100.
- Bliss, D.E. and Welsh, J.H. (1952). The neurosecretory system of brachyuran Crustacea. Biol. Bull. 103:157-169.
- Bliss, D.E., Durand, J.B. and Welsh, J.H. (1954). Neurosecretory systems in decapod crustacea. Z. Zellforsch, B.D. 39, S: 520-536.
- Bliss, D.E. (1956). In: Festschr. B. Hanstrom. Lund: Zool Inst. pag. 56. En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Bliss, D.E. (1962). Neuroendocrine control of locomotor activity in the land crab Gecarcinus lateralis. En Naylor, E. and Williams, B.G. (1968). Effects of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in Carcinus. J. Exp. Biol. 49: 107-116.
- Bliss, D.E., Wang, S.M.E. and Martinez, E.A. (1966). Water balance in the land crab, Gecarcinus lateralis during the intermolt cycle. Am. Zool. 6: 197-212.
- Bliss, D.E. (1968). Transition from water to land in decapod crustaceans. Am. Zool. 8: 355-392.
- Bomirski, A. and Klek, E. (1974). Action of eyestalks on the ovary in Rithropanopeus harrisii and Crangon crangon Mar. Biol. 24: 329-337.

- Bressac, C. (1976). Etude ultrastructurale de la glande du sinus du crabe Pachygrapsus marmoratus. C.R. Acad. Sci. D 282: 1529-1531.
- Brodie, D.A. and Halcrow, K. (1977). The ultrastructure of the sinus gland of Gammarus oceanicus (Crustacea: Amphipoda). Cell. Tiss. Res. 192: 557-564.
- Brown, F.A. and Jones, G.M. (1949). Ovarian inhibition by a sinus gland principle in the fiddler crab. Biol. Bull. 96: 228-232.
- Bruce, M., and Chang, A. S. (1984). Demonstration of a molt inhibiting hormone from the sinus gland of the lobster, Homarus americanus. Comp. Biochem. Physiol. 79A: 421-424.
- Bullock, T.H. and Horridge, G.A. (1965). Structure and function of nervous system of invertebrates. W.H. Freeman and Co. San Francisco, U.S.A.
- Bunt, A.H. and Ashby, E.A. (1967). Ultrastructure of the sinus gland of the crayfish, Procambarus clarkii. Gen. Comp. Endocr. 9: 334-342.
- Cajal, S. R. (1894). La fine structure du centre nerveux Proc. Roy. Soc. London Ser. B. 55 : 444-468.
- Carlisle, D.B. (1959). On the sexual biology of Pandalus borealis I. Histology of incretory elements. J. Mar. Biol. Ass. UK. 36: 381-394.
- Carlisle, D.B. and Passano, L.M. (1953). The X organ of crustacea. Nature, London 171: 1070-1071.
- Chang, E. (1984). Ecdysteroids in Crustacea: Role in reproduction, Molting, and larval development, p. 223-230.
- Chang, E. (1985). Hormonal control of molting in decapod Crustacea. Am. Zool. 25: 179-185.
- Chang, E., Sage B.A. and O Connor J.O. (1976). The qualitative and quantitative determinations of ecdysones in tissues of the crab, Pachygrapsus crassipes, following molt induction. Gen. Comp. Endocrinol. 30: 21-33
- Chiang, R.G. and Steel, C.G.H. (1985). Coupling of electrical activity from colateral sinus gland. Brain Res. 331:142-144.
- Collin, R. (1924). Comp. rend. soc. de biol. 21: 1334-1924.
- En Ortmann, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.

- Cooke, I.M. (1977). Electrical activity of neurosecretory terminals and control of peptide hormone release. In "Peptides in Neurobiology" (H. Gainer ed.), pp 345-374. Plenum, N.Y.
- Cooke, I.M., Haylet, B.A. and Weatherby, T.M. (1977). Electrically elicited neurosecretory and electrical responses of the isolated crab sinus gland in normal and reduced calcium salines. *J. Exp. Biol.* **20**: 125-149.
- Daniel, P.M. and Prichard, M.M.L. (1975). Studies of the hypothalamus and the pituitary gland. *Acta Endocrinol. Suppl.* **201**.
- Drach, P. and Tchernigovtzeff, C. (1967). Sur le methode de determination des stades des intermue son application générale aux crustacés vie et milieu. *ib (3a)*: 595-609.
- Durand, J.B. (1956). Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish. *Biol. Bull. (Woods Hole, Mass)* **III**: 62-76.
- Durand, J.B. (1959). Neurosecretory cell type and their secretory activity in the crayfish. *Biol. Bull.* **III**: 62-72.
- Edwards, G.A. (1950). The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab. *Physiol. Comp.* **2**: 34-50.
- Enami, M. (1954). The functional significance of beta-neurosecretory cells in Squilla. *Publ. stn. zool. napol.* **24**:70-71.
- Fernlund, P. (1971). Chromactivating hormones of Pandalus borealis: isolation and purification of a light-adapting hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* **237**: 517-529.
- Fernlund, P. (1976). Structure of a light adapting hormone from the shrimp Pandalus borealis. *Biochim, Biophys. Acta.* **439**: 17-25.
- Fernlund, P. and Josefson, L. (1968). Chromactivating hormones of Pandalus borealis: Isolation and purification of the red-pigment-concentrating hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* **158**: 262-273.
- Fernlund, P. and Josefson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science.* **122**: 173-175.
- Fessard, A. (1963). Integration: A commentary on the pisa symposium. *Prog. Brain Res.* **1**: 466-474.
- Fingerman, M. (1970). Perspectives in crustaceans endocrinology. *Scientia.* **105**: 422-444.

- Fingerman, S.W. and Fingerman, M. (1976). Effect of time of year and limb removal on rates of ecdysis of eyed and eyestalkless fiddler crabs Uca pugilator. Mar. Biol. 32: 354-362.
- Fingerman, M., Aoto, T. (1959). The neurosecretory system of the dwarf crayfish Cambarillus shufeldti revealed by electron and light microscopy. Trans. Amer. Microsc. Soc. 78: 305-317.
- Fingerman, M. and Fingerman, S.W. (1974). The effects of limb removal on the rates of ecdysis of eyed and eyestalkless fiddler crabs, Uca pugilator. Zool. J.B. Physiol. 78: 301-309.
- Flores, J. (1981). Regulación de la secreción de la hormona neurodepresora en el tallo ocular del acocil. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN. México.
- Frankfurt, M. and Azaitia, E. (1984). Regeneration of serotonergic fibers in the rat Hypothalamus following unilateral 5,7 dihydroxytryptamine injection. Brain Res. 298: 273-282.
- Freeman, J. A. (1980). Hormonal control of chitinolytic activity in the integument of Palanus amphitrite, in vitro. Comp. Biochem. Physiol. 65A:13-17.
- Freeman, J.A. and Bartell, C.K. (1976). Some effects of the molt inhibiting hormone and 20 hydroxyecdysone upon molting in the grass shrimp, Palaemonetes pugio. Gen. Comp. Endocr. 28: 131-142.
- Gaupp, J. and Spatz, H. (1955). Acta Neuroveg. 12: 285 En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Gersh, I. and Droucks, McC. (1941). Endocrinology 28: 6 En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Hanström, B. (1933). Neue untersuchungen über sinnesorgane und nervensystem der crustaceen. II. Zool. Jb (Abt Anat). 56: 387-520. En Strolenberg, Godfried E.C.M., Hermy, P.M. van Helden, and Francois, var. Herp (1977). The ultrastructure of the sinus gland of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordman) Cell.Tiss.Res. 180: 203-210.
- Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior a neurophysiological theory. N.Y. Wiley.

- Heit, M. and Fingerma, M. (1973). Neurohormonal control of ion concentrations and total osmolarity of the blood in the fiddler crab, Uca pugnator. Am. Zool. **13**: 1275.
- Hepper, B.T. (1977). Changes in blood serum protein levels during the moulting cycle of the lobster, Homarus gammarus. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **28**: 293-296.
- Hisano, S. (1974). The eyestalk neurosecretory cell types in the freshwater prawn Palaeomon pauceidens. I. A light microscopical study. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool. **19**: 503-514.
- Hisano, S. (1976a). Neurosecretory cell types in the eyestalk of the freshwater prawn Palaeomon pauceidens. An electron microscopic study. Cell. Tiss. Res. **166**: 511-520.
- Hisano, S. (1976b). The ultrastructure of the sinus gland of the freshwater prawn, Palaeomon pauceidens. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool. **20**: 167-174. En Strolienber, Godfried E.C.M., Hermy, P.M. van Helden, and Francois, van Herp (1977). The ultrastructure of the sinus gland of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordman). Cell.Tiss.Res. **180**: 203-210.
- Hodge, M.H. and Chapman, G.B. (1958). Some observations on the fine structure of the sinus gland of a land crab, Gecarcinus lateralis. J. Biophys Biochem. Cytol. **4**: 571-574.
- Hopkins, P. M. (1986). Ecdysteroid titers and Y-organ activity during late intermolt and proecdysis in the fiddler crab, Uca pugnator. Gen. Comp. Endocrinol. **63**: 362-373.
- Iwasaki, S. and Satow, Y. (1971). Sodium and calcium-dependent spike potentials in the secretory neuron soma of the X-organ of the crayfish. J. Gen. Physiol. **52**: 216-238.
- Jewell, P.A. (1953). The occurrence of vesiculated neurons in the hypothalamus of the dog. J. Physiol. **121**: 167.
- Jorgensen, C.B.; Rosenkilde, P. and Wingstrand, K.G. (1956). Endocrinology **52**: 601. En Ortmann, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Josefson, L. (1975). Structure and function of crustacean chromatophorotropins. Gen. Comp. Endocrinol. **25**: 199-202.
- Kaestner, A. (1970). Invertebrate Zoology. Vol. III Crustacea Wiley-Interscience. N.Y.

- Kalmus, H. (1938). Das aktogram des flusskrebsees. Z. Vergl. Physiol. 25:798-802. En Naylor, E. and Williams, B.G. (1968). Effects of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in Carcinus. J. Exp. Biol. 49: 107-116.
- Kameoto, F.I. (1966). Neuroendocrinology of osmoregulation in Decapod, Crustacea. Am. Zool. 16: 141-150.
- Kameoto, F.I. y Ono, J.K. (1969). Neuroendocrine regulation of salt and water balance in the crayfish Procambarus clarkii Comp. Biochem. Physiol. 22: 393-401.
- Kameoto, F.I. y Tullis, R.E. (1972). Hydromineral regulation in Decapod Crustacea. Gen Comp. Endocr. Suppl. 3: 299-307.
- Kandel, E.R., and Tauc, L. (1965). Heterosynaptic facilitation in neurones of the abdominal ganglion of Aplysia desilans. J. Physiol. London. 181: 1-27.
- Kandel, E.R., and Tauc, L. (1966). Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. J. Physiol. London. 183: 287-304.
- Kandel, E.R. (1977). Neuronal plasticity and the modification of behavior. In Handbook of Physiology. The Nervous System (J.M. Brookhart, V.S. Mountcastle, E.R. Kandel and S.R. Geiger eds). American Physiological Society, Bethesda, Maryland. pp. 1137-1182.
- Kato, K.H. y Kameoto F.I. (1969). Neuroendocrine involvement in osmoregulation in the grassid crab Metopograpsus messor. Comp. Biochem. Physiol. 28: 665-674.
- Keller, R. (1977). Comparative electrophoretic studies of crustacean neurosecretory hyperglycemic and melanophore stimulating hormones from isolated sinus glands. J. Comp. Physiol. 122: 359-373
- Keller, R. and Sedlmeir, D. (1978). Hyperglycemic hormones in crustaceans. In Comparative Endocrinology (P.J. Caillard and H.H. Boer, Eds.), pp 437-440 Elsevier, Amsterdam.
- Keller, R. and Wunderer, G. (1978). Purification and aminoacid composition of the neurosecretory hyperglycemic hormone of the sinus gland of the Carcinus maenas. Gen. Comp. Endocrinol. 34: 328-335.
- Kleinholz, L.H. (1947). A method for removal of the sinus gland from the eyestalk of crustaceans. Biol. Bull. Woods Hole. 23: 52-55.

- Kleinholz, L.H., (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans In: The functional organization of the compound eye, C.G. Bernhard, Ed. Pergamon, N.Y. pp.89-101.
- Kleinholz, L.H., (1975). Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity. *Nature*. London **258**: 256-257.
- Kleinholz, L.H. (1976). Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *Amer. Zool.* **16**: 151-166.
- Knowles, F.G.W. (1954). *Pubbl. ataz zool napolì* 24, suppl: 91 en Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In *Handbook of Physiology*. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Knowles, F.G.W. (1959). The control of pigmentary effectors. In *Comparative Endocrinology*, p. 223-232. Ed. Gordan. N.Y. Wiley, Press.
- Koch, J.M.D. (1952). Eyestalk hormones, postmolt volume increase and nitrogen metabolism in the crab *Eriocheir sinensis*. *Meded. K. vlaam Acad.* **14**: 3-11.
- Konorski, J. (1948). *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge. Cambridge. Univ. Press.
- Koritsanszki, S. (1967). Morphophysiological examination on glial cells containing Gomori-positive substance in the central nervous system of various species. *Gen.Comp. Endocr.* **2**: 466.
- Krasne, F.B., and R.S. Woodsmall. (1969). Waning of the crayfish escape response as a result of repeated stimulation. *Animal Behavior*. **17**: 416-424.
- Lugaro, E. (1900). I. Recenti progressi dell anatomia del sistema nervoso in rapporto alla psicologia ed alla psichiatria. *Riv. Sper. Freniatria.* **26**: 831-894.
- Mantel, L.H.; Bliss, D.E.; Sheehan, S.W. and Martinez, E.A. (1975). Physiology of hemolymph, gut fluid and hepatopancreas of the land crab *Gecarcinus lateralis* F. in various neuroendocrine states. *Comp. Biochem. Physiol.* **51**: 663-671.

- Martin, G. (1972). Contribution a l'etude ultrastructurale de la glande du sinus de l'Oniscoides Porcellio dilatatus (Brandt). C.R. Acad. Sci. D. 273: 839-842. En Stroblenberg, Godfried E.C.M. Hermy, P.M. van Heiden, and Francois, van Herp (1977). The ultrastructure of the sinus gland of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordman) Cell.Tiss.Res. 180: 203-210.
- Nauvoit, J.C. and Castell, (1976). Moulit and growth-enhancing effects at bilateral eyestalk ablation on juvenile and adult American lobsters Homarus americanus. J. Fish. Res. Bd. Can. 33: 1922-1929.
- Meusy, J.J. (1968). Précisions nouvelles sur l'ultrastructure de la glande du sinus d'un crustacé décapode brachyours, Carcinus maenas L. Bull. Soc. Zool. Fr. 93: 291-299.
- Nakatani, I. and Otsu, T. (1979). The effects of eyestalk, leg and uropod removal on the molting and growth of young crayfish Procambarus clarkii. Biol. Bull. 152: 182-188.
- Nakatani, I. and Otsu, T. (1981). Relations between the growth and the moult interval in the eyestalkless crayfish Procambarus clarkii. Comp. Biochem. Physiol. 68A: 549-552
- Naylor, E., Smith, G. and Williams, B. (1973). The effect of eyestalk extracts on the circadian locomotor rhythms of Carcinus, In Neurobiology of invertebrates (J. Salanki, ed.). Publishing house of the Hungarian Academy of Science, Budapest pp. 423-429.
- Naylor, E. and Williams, B.G. (1968). Effects of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in Carcinus. J. Exp. Biol. 49: 107-116.
- Ontiveros Y.R. (1969). Estudio del desfaseamiento del ciclo nictameral de migración de los eritróforos tegumentarios del acocil Procambarus clarkii Tesis para obtener el título de Biólogo. ENEPI, UNAH. Tlanepantla, Edo de Mex.
- Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Palay, S.L. and Mising, S.L. (1953). Anat Rec. 116: 301 En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Parnase, I., D. Armstrong, and F. Strumwasser. (1974). Prolonged excitatory and inhibitory synaptic modulation of a bursting pacemaker neuron. J. Neurophysiol. 37: 594-608.

- Passano, L.M. (1951). The X organ, a neurosecretory gland controlling molting in crabs. *Anat. Rec.* **111**: 559.
- Passano, L.M. (1953). Neurosecretory control of molting in crabs by the X-organ-sinus gland complex. *Physiol. Comp. Zool.* **3**: 155-189.
- Pietrzak, E.R. (1981). Influence of eyestalks and chelae ablation on loss of hemolymph protein and weight in crayfish *Orconectes limosus* (RAF). *Comp. Biochem. Physiol.* **70A**: 447-450.
- Potter, D.D. (1956). Observations on the neurosecretory system of portunid crabs. Phd. Thesis, Harvard University. En Weatherby, T.M. (1981). Ultrastructural study of the sinus gland of the crab, *Cardisoma carnifex*. *Cell. Tiss. Res.* **220**: 293-312.
- Powell, B.L. (1965). The hormonal control of the tidal rhythms of locomotor activity in *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Endoc.* **5**: 705.
- Pyle, L. (1943). The histogenesis and cyclic phenomena of the sinus gland and X organ in crustacea. *Biol. Bull.* **95**: 87-102.
- Quackenbush, L. S. (1986). Crustacean endocrinology, a review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**: 2271-2282.
- Quackenbush, L.S. and Herunkind, W.F. (1981). Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster, *Penaeus argus* (Crustacea: Palinuridae) effect of eyestalk ablation. *Comp. Biochem. Physiol.* **69A**: 523-527.
- Rehn, M. (1959). Observations on the localisation and chemical constitution of neurosecretory material in nerve terminals of *Carcinus maenas*. *Acta Histochem.* **2**: 88-106.
- Roberts, T.W. (1957). Evidence that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish *Cambarus virilis*. *Anat. Rec. Suppl.* **8**: 46-47.
- Ruiz-Marcos, A., and Valverde, F. (1970). Dynamic architecture of the visual cortex. *Brain Res.* **12**: 25-39.
- Scaravilli, F. and Druchen, L.W. (1981). Regeneration in the central nervous system. *Tissue Repair and Regeneration*. L.E. Glynn Ed. Elsevier-North Holland. Biomedical Press N.Y.
- Schallek, W. (1942). Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. *J. Exp. Zool.* **21**: 155-166.

- Scharrer, B. (1930). Pubbl. staz. zool. napoli 15: 132. En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Scharrer, B. (1952). the effect of the interruption of the neurosecretory pathway in the insect Leucophaea maderae Anat. Rec. 112: 386-387.
- Scharrer, E. and Wietenstein (1952). Anat. Rec. 112: 307. En Ortman, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.
- Scharrer, M. (1969). Neurohumours and Neurohormones: Definitions and terminology. J. Neurn-viscer. Relat., Suppl. IX: 1-20. En Brodie, D.A. and Halcrow, K. (1977). The ultrastructure of the sinus gland of Gammarus oceanicus (Crustacea: Amphipoda), Cell. Tiss. Res. 182: 557-564.
- Schwartz, J.H., V.F. Castelluci, and E.R. Kandel. (1971). Functionary of identified neuron and synapses in abdominal ganglion of Aplysia in absence of protein synthesis. J. Neurophysiol. 34: 939-953.
- Scudamore, H.H. (1947). The influence of the sinus glands upon molting and associated changes in the crayfish. Physiol. Zool. 20: 187-208.
- Sherman, R.G., and H.L. Atwood. (1971). Synaptic facilitation: long term neuromuscular facilitation in crustacean. Science. 171: 1248-1250.
- Shivers, R.R. (1967). Fine structure of Crayfish optic ganglia. Univ. Kansas. Sci. Bull. 42: 677-733.
- Shivers, R.R. (1976a). Exocytosis from crayfish sinus gland in freeze fracture. Anat. Rec. 184: 528.
- Shivers, R.R. (1976b). Exocytosis of neurosecretory granules from the crustacean sinus gland in freeze fracture. J. Morphol. 150: 227-252.
- Silverthorn, G.U. (1973). Neurosecretion in the sinus gland of the fiddler crab Uca pugnax. Cell.Tiss.Res. 145: 129-132
- Skinner, D. E. (1983). Interacting factors in the control of the crustacean molt cycle. Am. Zool. 25: 275-284.
- Smith, R.I. (1940). Studies on the effects of eyestalk removal upon young crayfish (Cambarus, clarkii) Biol. Bull. 22: 145-152.

- Smith, G. (1974). The ultrastructure of the sinus gland of Carcinus maenas (Crustacea:Decapoda). Cell. Tiss. Res. 155: 117-125.
- Smith, G. (1975). The neurosecretory cells of the optic lobe in Carcinus maenas (L) Cell. Tiss. Res. 156: 403-409.
- Smith, G. and Naylor, E. (1972). The neurosecretory system of the eyestalk of Carcinus maenas (Crustacea:Decapoda). J. Zool. London 166: 313-321.
- Sochasky, J.D. (1973). Failure to accelerate molting following eyestalk ablation in decapod crustacean. Fish. Res. Bd. Can. Tech. Rep. 431
- Strolenberg, G.E.C.M., Bellion-Humbert, C., Van Herp, F., van Wornhoudt, A. (1977a). Etude ultrastructurale des granules de neurosécrétion dans la glande du sinus de Palaeomon serratus (Pennant). C.R. Acad. Sci. D 284: 123-126.
- Strolenberg, G.E.C.M., Herby, P.M., van Helden and Francois van Herp. (1977b). The ultrastructure of the sinus gland of the crayfish Astacus leptodactylus (Nordman) Cell. Tiss. Res. 180: 203-210.
- Szentagothai, J. (1964). Discussion. In information processing in the nervous system. (R.W. Gerard and J.W. Duff, eds.), Int. Congr. Ser. 42: 443. Excerpta Med. Found., Amsterdam.
- Trieder, D.J.; Mason, E.G. and Castell, J.D. (1979). Survival and growth of juvenile American lobster (Homarus americanus) after eyestalk ablation, J. Fish. Res. Bd. Can. 36: 93-97.
- Van Harreveld, A. (1936). A Physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124: 428-432.
- Weatherby, T.M. (1981). Ultrastructural study of the sinus gland of the crab Cardisoma carnifex. Cell. Tiss. Res. 220: 293-312.
- Welsh, J.H. (1930). Diurnal rhythms of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 16: 384-395.
- Weyer, F. (1935). Zool. Anz. 112: 137 En Ortmann, R. (1960). Neurosecretion. In Handbook of Physiology. Section 1. Neurophysiology. Vol II. John Field, H.W. Magoun and V. E. Hall Eds. American Physiological Society. Wash. D.C.

- Vierasa, C.A.G. | Furschpan, E. and Florey, E. (1953). Physiological and pharmacological observations on muscle receptor organs of the crayfish Cambarus clarkii Girard. J. Exp. Biol. 20: 134-150.
- Winklund, L. and Bjorklund, A. (1980). Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence Histochemical observations. Brain Res. 191: 129-155.
- Wolf, G. | Stricker, E.M. and Zigmond, M.J. (1978). Brain lesions: Induction, Analysis, and the problem of recovery of function. En Recovery from Brain Damage Research and theory. Stanley Finger, Ed. Plenum Press. N.Y., pag.91.
- Wuttke, W., Bjorklund, A., Baumgarten, H.G., Lachenmayer, L., Fenske, M. and Kiess, H.P. (1977). De and regeneration of brain serotonin neurons following 5,7-dihydroxytryptamine treatment: effects on serum LH, FSH and prolactin levels in male rats, Brain Res. 124: 317-331.
- Zeleny, C. (1905). The relation of the degree of injury to the rate of regeneration. J. Exp. Zool. 2: 347-349. En Gusackenbush L.S. (1986). Crustacean endocrinology, a review. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 2271-2282