

11261
2es
10

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PARTICIPACION DEL CALCIO EN LA REGULACION DEL
POTENCIAL DE RECEPTOR DE LAS CELULAS RETINULARES
DEL ACOCIL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)

PRESENTA

José María Farías Sánchez

México, D.F., mayo de 1989.

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN .

El potencial de receptor (PR) de las células retinulares del acocil consiste de una despolarización rápida o fase transitoria seguida de una despolarización sostenida o fase estable que antecede a la repolarización. Las características del PR se modifican por la cantidad de luz que reciben las células retinulares, por los cambios en el medio iónico extracelular y por los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Este trabajo tuvo por objeto analizar el papel del Ca^{2+} y de la adaptación a la oscuridad y a la luz sobre las características del PR. Para ello se utilizaron tallos oculares seccionados de acocil de los que se registraba el PR en tres condiciones de iluminación, distintas soluciones salinas y en soluciones a las que se había agregado DNP con el objeto de incrementar el Ca^{2+} intracelular. Los resultados muestran que: a) en los tallos oculares colocados en solución de Van Harreveld y que reciben cierto régimen de estimulación, las características del PR se mantienen estables; b) en condiciones estables, los niveles de Ca^{2+} extracelular determinan las características del PR; c) en la oscuridad la amplitud del PR aumenta (adaptación a la oscuridad) y durante la iluminación, disminuye (adaptación a la luz); d) la falta de Ca^{2+} mimetiza la adaptación a la oscuridad y su exceso, la adaptación a la luz; e) la acción del DNP mimetiza el estado de adaptación a la luz. Estos resultados sugieren que: a) el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana es un evento indispensable en la generación del PR, b) durante la oscuridad se reducen los niveles de Ca^{2+} intracelular, c) que los niveles intracelulares de Ca^{2+} durante la iluminación dependen tanto de su difusión a través de la membrana como de su liberación desde los depósitos intracelulares, d) que los niveles intracelulares de Ca^{2+} determinan, al menos, la amplitud del PR.

S U M M A R Y .

The receptor potential (PR) of the reticular cells of the crayfish presents a rapid depolarization or transitory phase followed by a sustained depolarization or stable phase, which precedes repolarization. The PR characteristics are modified by the amount of light received by the reticular cells, by the changes in the extracellular ionic medium, and by the intracellular levels of Ca^{2+} . This work analyzed the role of Ca^{2+} and of light and dark adaptation in the characteristics of the PR. Isolated eyestalks were used, in which the PR was recorded under three light conditions, with different saline solutions and with solutions to which DNP had been added to increase the intracellular Ca^{2+} . The results show: a) that the PR characteristics remain stable in the eyestalks placed in Van Harreveld solution and submitted to a given light regimen; b) under stable conditions, the extracellular levels of Ca^{2+} determine the PR characteristics; c) in darkness, the PR amplitude increases (darkness adaptation), and under illumination, it decreases (light adaptation); d) lack of Ca^{2+} mimics adaptation to darkness and its excess, adaptation to light; e) DNP acts mimicking the light adapted state. These results suggest: a) Ca^{2+} movements through the membrane are indispensable for PR generation; b) the levels of intracellular Ca^{2+} diminish during darkness; c) during illumination, the intracellular level of Ca^{2+} depend both on its diffusion through the membrane and on its release from the intracellular deposits, d) the intracellular levels of Ca^{2+} determine, at least, the amplitude of the PR.

I N D I C E .

1.	R E S U M E N -----	3
2.	A N T E C E D E N T E S -----	5
	a. Receptores a la luz -----	5
	b. Organización del ojo compuesto del acocil -----	6
	c. Registros intracelulares en ojos compuestos -----	8
	d. Fotorrespuesta eléctrica en el ojo del acocil -----	11
	e. Adaptación a la luz y a la oscuridad -----	12
	1) Cambios en los fotorreceptores -----	12
	2) Cambios en los pigmentos accesorios -----	15
	f. Papel del Ca ²⁺ en la actividad de la célula fotorreceptora -----	17
3.	O B J E T I V O S -----	23
4.	M A T E R I A L Y M E T O D O S -----	25
	a. Preparación biológica -----	25
	b. Sistema de registro y estimulación -----	26
	c. Diseño experimental -----	27
	d. Soluciones salinas de prueba -----	28
	e. Mediciones -----	29
5.	R E S U L T A D O S -----	31
	a. El PR en el estado estacionario -----	31
	b. El PR en adaptación a la oscuridad -----	33
	c. El PR durante la estimulación iterativa -----	36
6.	D I S C U S I O N -----	40
	a. Registro intracelular -----	40
	b. Papel del Ca ²⁺ en la respuesta fotorreceptora -----	44
	c. Acciones del DNP -----	58
7.	C O N C L U S I O N E S -----	63
8.	F I G U R A S -----	64
9.	R E F E R E N C I A S -----	80

A N T E C E D E N T E S .

a. Receptores a la luz.

Células sensoriales especializadas en la fotorrecepción se encuentran distribuidas en distintas regiones del cuerpo de animales relativamente simples como la anémona de mar, la lombriz de tierra, la almeja y muchos otros. En el otro extremo de la complejidad están los ojos de los grupos animales más evolucionados. Los ojos pueden ser simples o compuestos. En ellos se localizan los fotorreceptores visuales los cuales son de dos tipos básicos, ciliares y rabdoméricos; unos u otros se encuentran indistintamente en los ojos simples o en los compuestos lo que sugiere que las líneas ciliar y rabdomérica surgieron en forma independiente habiendo alcanzado un grado de desarrollo equivalente. El fotorreceptor de tipo ciliar recibe este nombre debido a que contiene un aparato ciliar modificado. Dentro de este tipo se incluyen, como ejemplo característico, los bastones y los conos de la retina del vertebrado los cuales muestran un gran desarrollo de los pliegues de la membrana que contienen al pigmento fotorreceptor. Se acepta, actualmente, que en la membrana se lleva a cabo el proceso de la transducción de los fotones absorbidos (desde un quantum de luz en adelante) la que culmina con la generación de un fenómeno eléctrico altamente amplificado, el cual se propaga hasta el extremo distal de la célula donde controla el fenómeno de la transmisión sináptica

subsecuente. El fotorreceptor de tipo rabdomérico posee microvellosidades, prolongaciones de la membrana celular con la forma de vellos o dedos de tamaño ultramicroscópico las cuales contienen el pigmento fotosensible; tales vellosidades se encuentran densamente arregladas y poseen una orientación muy regular dentro de la célula formando la estructura que se conoce con el nombre de rabdomo. Es en el rabdomo donde se lleva a cabo el proceso de la transducción. Las células rabdoméricas alcanzan su mayor desarrollo en ojos simples o compuestos de moluscos y de artrópodos.

b. Organización del ojo compuesto del acocil.

La organización del ojo compuesto del acocil es comparable, en sus aspectos básicos, con la que se encuentra en cualquier crustáceo decápodo (Prosser y Brown, 1961; Waterman, 1961, 1979; Horridge y Bullock, 1965; Wald, 1968). La primera descripción de esta organización fue realizada por Parker desde finales del siglo pasado (Parker, 1891). Existen trabajos más recientes en los que se estudia el desarrollo del ojo compuesto en embriones y formas juveniles de acocil con microscopía tanto de luz como electrónica (Hafner y cols., 1982). Esto ha permitido tener una descripción más detallada acerca de la estructura fina de este órgano.

La unidad funcional del ojo compuesto es la omatidia. Todos los ojos compuestos de los invertebrados están constituidos por un cierto número de omatidias que depende de la especie que se considere. Los tres siguientes partes se consideran

componentes esenciales de una omatidia (Parker, 1891; Waterman, 1961, 1979; Eguchi, 1965): a) un sistema conductor de la luz formado por la lente corneal y el cono cristalino; b) un sistema transductor de la señal luminosa en eléctrica formado por las microvellosidades rabdoméricas de las células retinulares las cuales, en conjunto, forman el rabdomo; c) un sistema regulador de la intensidad de la luz formado por las células de los pigmentos distal, proximal y reflector.

Los registros eléctricos intracelulares que se llevaron a cabo durante el desarrollo experimental de esta tesis se obtuvieron de las células retinulares del acocil, por lo tanto considero necesario discutir con más detalle la compleja organización estructural de estas células. El rabdomo, o porción transductora de la omatidia, está constituido por la agrupación de los rabdómeros (fig. 1) las cuales son prolongaciones de cada una de las siete células retinulares que se encuentran en la porción distal de la omatidia.

Las siete células retinulares están distribuidas en forma concéntrica; los rabdómeros (microvellosidades) se extienden hacia el centro de la omatidia formando capas alternas entrelazadas. Así, en una capa las células 1, 4 y 5 contribuyen a formar el rabdomo; mientras que en la siguiente son las células 2, 3, 6 y 7 las que lo hacen.

No todas las células retinulares tienen el mismo tamaño o forma. Nótese que en la figura 1 la célula número uno es más grande que las otras (Muller, 1973). En el acocil Procambarus clarki (Girard) las células retinulares presentan 100 μ de

longitud y 15 μ de diámetro (Eguchi, 1965). Cada capa de rabdomeros tiene aproximadamente 5 μ y hay alrededor de 30 capas en cada rabdomo.

Se ha postulado una octava célula retinular más pequeña (Cummins y Goldsmith, 1981), cuya estructura aún no ha estado bien caracterizada, lo que no ha sido obstáculo para adscribirle un papel importante en la detección de la luz polarizada (Muller, 1973).

Las respuestas de las distintas células de la omatidia podrían no ser iguales desde el punto de vista eléctrico (Waterman y Fernández, 1970; Eguchi y cols., 1973; Järvilehto, 1979). Esto nos lleva a preguntarnos acerca de la comunicación entre las células retinulares. En ciertas preparaciones histológicas no se encontró fusión de membranas o uniones especiales entre ellas (Eguchi, 1965; Eakin, 1971; Fernández y Nickel, 1976); no obstante, algunos autores (Muller, 1973) basan la explicación de los resultados obtenidos al aplicar luz polarizada, en la interrelación estructural que habría entre las distintas células retinulares que conforman la omatidia.

c. Registros intracelulares en ojos compuestos.

La introducción de la micropipeta hizo factible el registro primero extracelular (Hartline, 1928; Hartline y Graham, 1932) e intracelular posteriormente, a finales de la década de los cuarenta y principio de los cincuenta, como lo refiere Ferris (1974). Una vez perforada la córnea del ojo lateral del Limulus (Hartline y cols., 1952), se introdujo, por primera ocasión en

las células retinulares de los crustáceos, una micropipeta cuya punta tenía una micra de diámetro, y que permitía obtener registros de la actividad eléctrica de las células fotorreceptoras.

La respuesta que presentan los receptores retinianos ante un estímulo luminoso es un cambio de voltaje lento. Esta respuesta eléctrica es una despolarización de la membrana que se observa en las células receptoras de diferentes especies y que corresponde al llamado potencial generador o potencial de receptor (PR) (Davis, 1961). El término de potencial generador quedó, en nuestros días, reservado a los potenciales graduados que generan espigas, mientras que el de PR se usa si la respuesta es provocada por estímulos sensoriales (Järvilehto, 1979), por lo que, en lo sucesivo, emplearemos este término.

El empleo de un micromanipulador permite introducir un microelectrodo hasta ciertas profundidades del ojo compuesto del acocil y, de esta manera, relacionar el tipo de registro que se obtiene con la zona de la que se recoge la respuesta. Con esta técnica, Naka y Kuwabara (1959) lograron disociar el origen de las diferentes ondas que componen la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil.

Si se desciende el microelectrodo en un ojo aislado del acocil, se alcanza un punto en el que se observa una caída brusca de potencial del orden de los -40 mV, tal situación es atribuida al paso del electrodo a través de la membrana celular. La aplicación de un destello en estas condiciones provoca una respuesta eléctrica denominada PR.

Aunque no se haya demostrado aún desde un punto de vista histológico que la punta de la micropipeta que actúa como electrodo de registro se encuentre dentro de la célula, existen varios argumentos para suponer que se trata de una respuesta transmembranal. Por ejemplo, los cambios de voltaje obtenidos en el registro intracelular (10 a 12 mV) son mayores a los que se obtienen por registro extracelular (1 a 2 mV). El registro de estos últimos se denomina electrorretinograma. La caída brusca de potencial, antes mencionada, se repite al realizar tanto una penetración longitudinal como una transversal, lo cual descarta la posibilidad de atribuirla a la penetración de la membrana basal. Esta se encuentra como sostén de la parte proximal de las células retinulares. El descartar esta posibilidad sugiere que la caída brusca de potencial se debe a que se atravesó la membrana plasmática.

Además, durante la aplicación de luz con diferente ángulo de polarización (Muller, 1973) se contraponen la ausencia de cambios en la amplitud de la respuesta eléctrica en registros supuestamente extracelulares con respecto a cambios manifiestos cuando se considera intracelular al registro. Lo equivalente sucede con diferentes luces monocromáticas que no provocan cambios a no ser que haya la posibilidad de registrar la actividad de una sola célula.

También, con técnicas de fijación de voltaje a diferentes valores en células fotorreceptoras se ha medido cuándo la corriente pasa a ser de entrante a saliente (Cummins y Goldsmith, 1986). La realización de tal procedimiento sólo es posible si el tipo de registro es intracelular o transmembranal, porque la

respuesta se lleva a cabo solamente por la existencia primero de una fuerza electromotriz dada por el potencial de equilibrio del ion que la genera y, segundo, por la resistencia de la membrana.

d. Fotorrespuesta eléctrica en el ojo del acocil.

En las células fotorreceptoras del acocil, al igual que en las de muchas otras especies, existe un pigmento, la rodopsina, cuyo cromóforo, el retinal, al ser iluminado, cambia su estructura cuaternaria de la forma 11-cis a la forma trans (Wald, 1967; Waterman y cols., 1969; Cronin y Goldsmith, 1984). Este cambio origina, posteriormente, modificaciones en el flujo de iones a través de la membrana celular. Desde el punto de vista eléctrico, el resultado es un potencial graduado, el PR, el cual consta de dos partes (Naka y Kuwabara, 1959): una despolarización rápida o fase transitoria, cuya magnitud parece depender de la intensidad del estímulo, seguida por una despolarización sostenida, llamada también fase lenta o estable, la cual se asocia con la duración del estímulo luminoso (Naka y Eguchi, 1962; Baumann, 1968; Järvillehto, 1979; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1988).

La repolarización completa sobreviene después de que se termina la iluminación. Si el estímulo luminoso es muy prolongado, entonces la repolarización sigue aparentemente una función exponencial decreciente con respecto al estado de despolarización (Eguchi, 1965). Se ha propuesto que el Na^+ juega un papel fundamental en la despolarización rápida (Fulpius y

Baumann, 1969; Lisman y Brown, 1972; Muijser, 1979; Stieve y Classen-Linke, 1980).

El aumento de la concentración interna de Ca^{2+} ya sea por entrada o por liberación interna ha sido relacionado con el proceso de excitabilidad, con el estado de adaptación a la luz y con la duración total de la respuesta (Brown y Blinks, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman, 1976; Bolsover y Brown, 1985; Levy y Fein, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986). No obstante, se ha descartado la hipótesis del Ca^{2+} como transductor o mensajero inicial (Gold, 1986).

La repolarización, por su parte, es el proceso menos discutido hasta ahora, aún cuando parece estar relacionado con el K^+ , a través de conductancia sensible al voltaje (Pepose y Lisman, 1978), sensible a la concentración interna de Ca^{2+} (Cummins y Goldsmith, 1986; Payne, Corson y Fein, 1986) o canales de K^+ de diferente tipo (Edgington y Stuart, 1981).

e. Adaptación a la luz y a la oscuridad.

1) Cambios en los fotorreceptores.

Se ha dicho ya que un estímulo luminoso intenso y breve genera una respuesta eléctrica, pero si el estímulo luminoso es débil y prolongado entonces una de las primeras manifestaciones de la acción de esas condiciones particulares de luz sobre los receptores visuales de vertebrados e invertebrados es la de inducir una reducción de la amplitud del PR como consecuencia de la degradación del pigmento fotosensible; en estas condiciones, se dice el fotorreceptor está "adaptado a la luz". Otra acción

que también está bien establecida es la disminución de la resistencia eléctrica de la membrana, consecutiva al periodo largo de iluminación de baja intensidad (Glantz, 1968; Mack Brown y cols., 1969; Hanani y Hillman, 1976).

La aplicación de luz a los fotorreceptores de los invertebrados se asocia con un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (Lisman y Brown, 1972, 1975; Brown y Blinks, 1972, 1974; Fein y Lisman, 1975; Bader y cols., 1976). En contraposición, la reducción experimental de la concentración extracelular de Ca^{2+} incrementa la fotorrespuesta, lo cual equivale a reducir los efectos de la adaptación a la luz. En los ojos de los artrópodos, la luz provoca un rápido y marcado incremento en la velocidad de recambio de las membranas fotorreceptoras (Eguchi y Waterman, 1967, 1976; White y Lord, 1975). Este hecho contrasta con lo que sucede en los vertebrados, en los que se propone que la iluminación tiene sólo un efecto pequeño, aunque significativo, sobre la velocidad de regeneración de los discos del segmento externo de los bastones (Tsutsumi y cols., 1981).

Se descubrió que en las células secretoras y fagocíticas, células donde la exocitosis y la endocitosis son esenciales para sus funciones características, se lleva a cabo un ciclo que comprende el intercambio (pérdida y regeneración) entre la membrana plasmática y la membrana de los organelos intracelulares. En relación con el rabadomo, el reciclaje de membranas plasmáticas con las membranas de los organelos intracelulares parece ser una respuesta al exceso de luz

(Horridge y Bernard, 1965; Eguchi y Waterman, 1967, 1976; Meyer-Rochow y Eguchi, 1984; Mangini y cols., 1986). Tal recambio membranal constituye una modificación estructural fina, la cual es dependiente de la luz. También por acción de ésta se encontró la pérdida de un cierto orden inicial dentro de cada microvellosidad, la cual muestra vesiculaciones e incluso penetración de citoplasma en el rabdomo (Tsusumi y cols., 1981).

Durante el período de oscuridad el fotorreceptor muestra cambios estructurales y funcionales radicalmente opuestos a los que se llevan a cabo durante la iluminación. El más evidente de estos cambios es el incremento del PR que se obtiene como resultado de un estímulo luminoso el cual refleja la acumulación de pigmento fotosensible que se lleva a cabo en la ausencia de luz. También se sabe que en la oscuridad se lleva a cabo un proceso continuo de restauración estructural aunque algunos rabdomos retrasan el inicio de la recuperación de su forma. Como resultado de ello, en el transcurso de un proceso de adaptación a la oscuridad, se pueden observar dos clases de formas: las microvellosidades que ya recuperaron su apariencia en forma de bandas nítidas, y las que aún presentan vesiculaciones y gránulos de pigmento adheridos a sus superficies. En general, estas últimas microvellosidades tienen un alto contenido de metarrodopsina, mientras que las primeras, es decir las que ya recuperaron su forma (no vesiculada ni pigmentada), contienen mayor proporción de rodopsina. Basados en esta información, Cronin y Goldsmith (1984) postularon la hipótesis de que el mecanismo de la recuperación de la rodopsina implica una nueva síntesis química de la membrana rabdomérica.

Por otra parte, aparentemente sin relación con este reciclaje membranal, se han descrito otros cambios estructurales del rabadómero durante la adaptación a la oscuridad. Entre ellos, está la aparición de grandes cisternas, las cuales pueden ser sitios para el almacenamiento de Ca^{2+} dentro del fotorreceptor (Tsusumi y cols., 1981).

2) Cambios en los pigmentos accesorios.

Desde fines del siglo pasado se descubrió que los pigmentos que regulan la entrada de luz hasta los fotorreceptores están fuertemente influidos por los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad.

En presencia de luz, los pigmentos accesorios migran, por mecanismos que no se han aclarado del todo, desde la posición polar que mantienen en la oscuridad hasta el centro de la omatidia. Este movimiento parece depender de influencias básicamente neuroendocrinas y asegura que las células fotorreceptoras reciban sólo la luz que proviene del eje mayor de la omatidia. Esto se manifiesta por una disminución de la pseudopupila (Hernández-Falcón y cols., 1987). Durante la adaptación a la oscuridad sucede exactamente lo contrario.

Parte de la luz que llega es reflejada debido a la presencia del pigmento reflector; esta reflexión se manifiesta por medio de un área clara, la pseudopupila, la cual puede notarse a simple vista en la superficie de la córnea. El tamaño de la pseudopupila es, por lo tanto, una medida indirecta, pero efectiva, de la posición que guardan los pigmentos retinianos

accesorios, en particular el pigmento contenido en las células distales.

En lo relativo al pigmento accesorio proximal, este se encuentra en las células retinulares mismas y sus movimientos hacia la posición de adaptación a la luz o a la oscuridad, parecen depender, en esencia, de los cambios del potencial de membrana de los fotorreceptores. Recientemente se estudió con mayor detalle la dinámica de este pigmento, de tal modo que es posible afirmar que su migración durante la adaptación a la luz se debe no a un movimiento independiente de cada una de las partículas o gránulos pigmentarios sino a un desplazamiento integral de la matriz citoplásmica, la cual sirve de estructura de sostén a estos mismos gránulos pigmentarios. Al desplazarse la matriz, arrastra consigo a los pigmentos. Evidencias recientes sugieren que el sistema de microtúbulos constituye una estructura con la cual muchos gránulos de pigmento establecen una unión temporal relacionada con los ciclos de adaptación a la luz y a la oscuridad (Frixione y Ruiz, 1988).

También las mitocondrias de la célula fotorreceptora son desplazadas durante la adaptación a la oscuridad, por lo que durante el movimiento de los pigmentos accesorios tiene lugar una transferencia masiva de componentes citoplásmicos. Sin embargo, de un desplazamiento longitudinal tan voluminoso es de esperar un cambio en la forma de la célula, lo cual ocurre en células retinulares de algunos anfípodos; no obstante, en las células retinulares del acocil aún no se describen modificaciones en el perfil o en el volumen como consecuencia de las variaciones en la distribución de los pigmentos accesorios (Frixione y Porter,

1986).

f. Papel del Ca^{2+} en la actividad de la célula fotorreceptora.

La respuesta eléctrica del fotorreceptor visual del acocíl se inicia con la acción de la luz sobre una molécula fotosensible, la cual desencadena una serie de cambios que inducen una cierta distribución de iones a través de la membrana celular en concordancia con la permeabilidad específica de ésta para cada uno de ellos. Son muchas y muy variadas las etapas de la respuesta fotorreceptora en las que el Ca^{2+} desempeña un papel importante, de ahí que presentemos, en seguida, un breve resumen sobre este punto en el que hacemos énfasis en los estudios hechos en invertebrados.

Aparentemente el Ca^{2+} relaciona la isomerización de la rodopsina por la luz con el cambio en la permeabilidad de la membrana al Na^+ (Millecchia y Mauro, 1969; Brown y Mote, 1974), pero la rodopsina constituye un sensor remoto y no un canal directamente responsable de la fotocorriente no obstante que en membranas artificiales la rodopsina activada por la luz funciona como un canal de Ca^{2+} , de Na^+ o de protones (Hille, 1984; Miller y Korenbrot, 1987).

También se ha planteado la posibilidad de que la isomerización de la rodopsina inicie el aumento intracelular de Ca^{2+} sin que sea ella misma la que lo transporte desde el exterior o desde los almacenes intracelulares.

Los iones de calcio contribuyen a la generación del PR (Brown y Blinks, 1974; Brown, Coles y Pinto, 1977; Brown, Brown y Pinto, 1977) y parecen desempeñar un importante papel en los procesos de inicio y duración de la respuesta. De hecho se sugiere que este ion induce cambios en la sensibilidad de la célula fotorreceptora (Lisman y Brown, 1975; Brown, Coles y Pinto, 1977; Stieve y Classen-Linke, 1980) ya que de los niveles intracelulares disponibles del mismo dependen la amplitud y la duración de la respuesta ante un determinado estímulo luminoso.

La participación del Ca^{2+} en la generación de las distintas etapas del PR de los fotorreceptores se ha estudiado con muy distintas técnicas y en diversas especies; esto ha llevado a la obtención de datos que, en algunos casos, pueden parecer contradictorios, pero que analizados con detenimiento ponen de manifiesto la ubicuidad del Ca^{2+} en el proceso de la fototransducción. Así, se ha propuesto que el Ca^{2+} que se libera al citosol como resultado de la estimulación luminosa regula la conductancia al Na^+ durante la primera parte del PR; esto es, durante la fase de despolarización rápida, de tal manera que el ingreso de Na^+ al fotorreceptor se llevará a cabo todo el tiempo que tarde en alcanzarse un determinado nivel en el Ca^{2+} intracelular (Bader y cols., 1976). Sin embargo, para otros autores como Gold (1986), la presencia del Ca^{2+} intracelular no se relaciona con la entrada de Na^+ durante la fotorrespuesta.

Para otros autores, al Ca^{2+} habría que asociarlo con la amplitud de la fase de despolarización rápida en la medida que es un acarreador de corriente de tal manera que compartiría con el Na^+ los canales que se abren como resultado del proceso de la

isomerización de la rodopsina por la luz (Fulpius y Baumann, 1969). Hay que aclarar que ésta es una interpretación actual de los datos de los autores quienes en esa época no podían hablar de "canales" dadas las técnicas que utilizaron. Sin embargo, tampoco hay un acuerdo sobre este punto de todos los estudiosos del tema. Por ejemplo, Payne y cols. (1986) subrayan que hasta el presente no existe evidencia experimental directa que sugiera que la liberación de Ca^{2+} por la luz sea suficiente para mediar el proceso de la despolarización. Ya Lisman y Brown (1975) hicieron notar que el cambio en la concentración interna de calcio libre no es indispensable para vincular a la absorción del fotón con el cambio inducido por la luz en la conductancia de la membrana, ya que las células en las que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} inducido por la luz se había reducido en forma importante con la aplicación de EGTA, fueron capaces de mantener su respuesta a la luz.

La presencia del Ca^{2+} en el citosol también se ha asociado con otras etapas del PR del fotorreceptor. La amplitud y la duración de la fase estable, por ejemplo, parecen depender del nivel intracelular de calcio libre de tal manera que cuando la concentración de éste alcanza un cierto valor se inicia la repolarización (Brown y Blinks, 1974; Muijser, 1979).

Los niveles de Ca^{2+} en el citosol se han relacionado también con los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad. A medida que aumenta la concentración del Ca^{2+} intracelular, el PR disminuye, lo que coincide con una disminución en la fotocorriente producida por cada fotón absorbido (Lisman y Brown,

1975). Este último efecto se ha comprobado en el acocil, en el cual el descenso de la concentración extracelular de Ca^{2+} utilizando EDTA produce un aumento en la duración del PR (Stieve y Classen-Linke, 1980), lo que sugiere un comportamiento de los fotorreceptores visuales en esta especie, similar al que se ha descrito con mucho mayor detalle en los fotorreceptores de otros invertebrados como Limulus. Sin embargo, si se comparan los efectos de incrementar los niveles de Ca^{2+} extracelular con los de la estimulación luminosa en forma sostenida, se comprueba que la luz produce una reducción del PR mucho más evidente que la producida por el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, consecutivo al incremento de Ca^{2+} extracelular. Por otra parte, la oscuridad y la disminución del Ca^{2+} extracelular incrementan la amplitud y la duración del PR.

Un procedimiento que se utiliza para incrementar el nivel de Ca^{2+} intracelular en los fotorreceptores, es el uso del 2,4-dinitrofenol (DNP), cuya acción más evidente es el desacoplamiento de la cadena oxidativa (Lehninger, 1970; Wong y cols., 1979; Lo y cols., 1980), lo que da como resultado que se suspenda la posibilidad de que las mitocondrias recapturen activamente el Ca^{2+} . Algo similar sucede en otras membranas celulares en las que la disminución de grupos ATP consecutiva a la alteración de la cadena oxidativa produciría una disminución del transporte activo de Ca^{2+} hacia cualquier otro receptáculo intracelular. Un posible mecanismo de la acción del DNP dentro de la célula es que tenga un efecto directo sobre la permeabilidad al Ca^{2+} de la membrana plasmática (Barker y Levitan, 1975). Sea o no válido este argumento, es un hecho que

el DNP produce un incremento en el Ca^{2+} libre intracelular. La veracidad de esta hipótesis se ha demostrado con arsenazo III, que es un colorante indicador de Ca^{2+} (Lo y cols., 1980). La elevación del Ca^{2+} intracelular puede afectar a su vez, en general, la permeabilidad de la membrana plasmática (Brown y Meech, 1976).

El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} por la aplicación del DNP puede revertirse al aplicarse EGTA, que es un quelante de Ca^{2+} (Wong y cols., 1979). Esta maniobra experimental permite restablecer la amplitud de la fotorrespuesta eléctrica, al menos temporalmente. Esto es un argumento a favor de que no obstante el bloqueo de la formación de ATP por el DNP, se puede recuperar la fotorrespuesta eléctrica siempre y cuando se recuperen los niveles bajos de Ca^{2+} . Hasta cierto punto, quizás dependiendo de las reservas, las alteraciones en los niveles del Na^{+} intracelular por el bloqueo de la bomba de $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ no tendrían peso, ni las alteraciones en la concentración de iones de hidrógeno, a menos que fuese excesivo el tiempo de exposición.

Además de los cambios metabólicos señalados, la aplicación de DNP produce una disminución del pH intracelular de alrededor de 0.5 unidad logarítmica en aproximadamente 30 minutos, medido con rojo de fenol (Lo y cols., 1980). La disminución del pH es, a su vez, causa de cambios en el nivel intracelular de Ca^{2+} y tiene también efectos bien establecidos sobre las uniones comunicantes, mediante las cuales una célula está o no acoplada eléctricamente con las células que la rodean

(Spray y cols., 1988).

De los datos anteriores se desprende que si bien es cierto la acción del DNP es compleja, también lo es que su llegada a la célula produce, inevitablemente, un incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} con todas las acciones que se derivan de ello.

O B J E T I V O S .

1. Caracterizar el PR de las células retinulares de tallos oculares seccionados de acocil sumergidos en solución salina de Van Harreveld.

2. Estudiar el papel que desempeña el Ca^{2+} extracelular en la generación del PR de las células retinulares del acocil.

3. Caracterizar el PR durante los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad.

4. Estudiar el papel del Ca^{2+} extracelular durante la adaptación a la luz y a la oscuridad.

5. Demostrar que el exceso de Ca^{2+} extracelular mimetiza el estado de adaptación a la luz.

6. Demostrar que el aumento en el Ca^{2+} intracelular inducido por su liberación desde los depósitos intracelulares, mimetiza el estado de adaptación a la luz.

Para cumplir con estos objetivos se realizaron los siguientes experimentos.

1. Se mantuvo el tallo ocular en solución salina de Van Harreveld, durante el tiempo necesario para que la amplitud y la duración del PR se mantuvieran estables.

2. En condiciones estables se midió el PR de tallos oculares inmersos en soluciones con distintas concentraciones de Ca^{2+} extracelular.

3. Se midió la amplitud del PR de tallos oculares colocados en solución salina de Van Harreveld al término de la exposición a la oscuridad y durante la estimulación luminosa iterativa.

4. Las maniobras que se indican en el inciso anterior se realizaron en soluciones salinas con diferentes concentraciones de Ca^{2+} .

5. En las condiciones señaladas en los incisos 1, 2 y 3, se obtuvo el PR de tallos oculares colocados en soluciones salinas a las que se añadió, además, 2, 4-dinitrofenol (DNP).

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

a. Preparación biológica.

La preparación biológica utilizada en estos experimentos fue el tallo ocular seccionado de acociles de la especie Procambarus digueti provenientes de Zamora, Michoacán. Una vez en el laboratorio, los animales fueron colocados en piletas en las que se hacía el recambio de agua cada tres o cuatro días.

Mediante bombas de aire para acuario se mantenía una aereación constante. La alimentación de los acociles se realizó a base del vegetal Anacharis (antes llamado Elodea), zanahoria cocida, papa cocida y pequeñas porciones de hígado de pollo. La iluminación y la temperatura fueron las del medio ambiente.

La sección del tallo ocular se realizaba en condiciones de iluminación muy tenue, y consistía en la inserción de una tijera de punta fina sobre el tejido blando, por detrás del tallo ocular en la base del ojo, sitio en el que se efectuaba el corte. Una vez seccionado el tallo, con una navaja fina se hacía un corte transversal en la parte superior de la córnea, procurando que la sección no fuese mayor al 50% de la esfera corneal.

Hecho esto, el tallo ocular se colocaba en posición perpendicular a la base de un recipiente comercial transparente (marca Falcon), el cual contenía aproximadamente 8 ml de solución salina normal (Van Harreveld, 1936) o modificada.

b. Sistema de registro y estimulación.

La caja de Falcon que contenía al tallo ocular inmerso en la solución salina correspondiente, se colocaba dentro de una jaula de Faraday en cuyo interior se encontraba el vástago de un portamicroelectrodos que se manejaba desde afuera por medio de un micromanipulador (Prior). Al portamicroelectrodos se le colocaba una micropipeta de vidrio cuya punta tenía un diámetro de aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$ llena de una solución salina de cloruro de potasio 2.7 M. Se medía la resistencia ohmica de las micropipetas dentro de la solución salina correspondiente y sólo se utilizaban aquellas que tenían resistencias de 20 a 50 $\text{M}\Omega$. Dentro de la caja de Falcon se colocaba un electrodo de plata previamente impregnado de cloruro por electrólisis que servía para cerrar el circuito.

Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss) y tratando de que el tallo ocular recibiera la menor cantidad posible de luz, se colocaba la punta de la micropipeta justo encima del tallo, sobre el centro del corte hecho en la superficie de la córnea; esto aseguraba un descenso del microelectrodo paralelo al eje longitudinal del tallo ocular, el cual favorecía la penetración de la célula fotorreceptora.

La micropipeta estaba conectada a un preamplificador de alta impedancia (WPI, modelo M707) y éste a un osciloscopio de rayos catódicos (Hewlett Packard, modelo 1201B). En forma paralela se enviaba la señal del preamplificador de alta impedancia hacia un amplificador de DC (Grass, modelo 7D) de un

polígrafo lo que permitía el registro gráfico de la respuesta eléctrica.

Los estímulos luminosos procedían de un fotoestimulador (Grass, modelo PS22), se hizo uso de la intensidad máxima (1,800 lx) con una duración cercana a 14 microsegundos.

En la figura número 2 se presentan los diagramas del dispositivo de registro utilizado.

c. Diseño experimental.

Una vez dentro de la jaula de Faraday, el tallo ocular se mantenía en oscuridad. Mediante el micromanipulador se descendía el microelectrodo hasta que se observaba en el osciloscopio una caída brusca de potencial del orden de -40 mV, la que corresponde al potencial de membrana de la célula retinular en reposo. La aplicación de un destello luminoso en estas condiciones genera una respuesta eléctrica, el PR.

La preparación biológica fue mantenida durante 10 minutos en oscuridad, sólo interrumpida por los destellos de prueba aplicados cada 2 minutos. Después, se mantenía la oscuridad constante durante 20 minutos, al término de los cuales se aplicó una ráfaga de destellos luminosos a una frecuencia de 0.5 Hz durante medio minuto.

Con el protocolo anterior es posible analizar la respuesta eléctrica fotorreceptora durante tres momentos diferentes. Al término de los primeros diez minutos se tiene una fotorrespuesta precedida por dos minutos de oscuridad, la cual puede llamarse estacionaria. En seguida, al término de los 20 minutos de

oscuridad, otra, considerada como en un estado de adaptación a la oscuridad. Por último, al registrarse las respuestas durante la estimulación luminosa iterativa cada dos segundos, es posible poner de manifiesto tanto la capacidad de recuperación (o de adaptación) del sistema a la luz como su grado de susceptibilidad a la misma, ya que un destello precedido por un estado de adaptación a la oscuridad genera una situación que va a repercutir en las siguientes respuestas.

En resumen, se trata de tres tipos de fotorrespuestas eléctricas: precedidas por 20 minutos de oscuridad, por 2 minutos de oscuridad y por 2 segundos de oscuridad.

d. Soluciones salinas de prueba.

El manejo de los periodos de luz y oscuridad permite modificar la sensibilidad de la célula fotorreceptora bajo estudio. En estas condiciones es posible estudiar el papel que desempeña el Ca^{2+} extracelular en los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad. Se eligieron las siguientes modificaciones en las soluciones salinas de prueba que se utilizaron, teniendo como referencia la solución de Van Harreveld (1936).

- (A) Sustitución de Ca^{2+} por Co^{2+} .
- (B) Reducción de la concentración de Ca^{2+} añadiendo EDTA.
- (C) Concentración normal de Ca^{2+} , y
- (D) Aumento en la concentración de Ca^{2+} .

Para obtener una solución salina baja en Ca^{2+} por una parte no se agregó Ca^{2+} y por otra se añadió EDTA a una concentración

de 3 mM/l.

Además de estas modificaciones, en otra serie experimental se añadió DNP a cada solución de prueba, a una concentración de 0.1 mM/l.

En todos los casos el pH del baño externo se mantuvo entre 7.4 y 7.6 (pH Meter Corning, mod. 5). Para ajustarlo se utilizó HCl o NaOH.

En el cuadro I se presenta la composición molar de cada una de las soluciones salinas utilizadas.

e. Mediciones.

Del potencial de receptor registrado al término de los primeros diez minutos de oscuridad, se hicieron las siguientes determinaciones: la amplitud máxima, o sea el cambio de potencial desde la basal hasta la altura máxima. La amplitud al término de la mitad de la duración de la respuesta ($t_{0.5}$). La duración, que es el tiempo transcurrido desde el momento en que se alcanza la mitad de la amplitud máxima en su fase de despolarización hasta el punto en que vuelve a presentar ese mismo voltaje medio en su fase de repolarización. La figura número 3 ilustra la forma de llevar a cabo las tres mediciones.

En los experimentos de adaptación a la oscuridad y con estimulación repetitiva, se midió la amplitud máxima de las primeras 16 respuestas de cada experimento.

Para graficar se calcularon los promedios con sus respectivos errores estándar. Para el análisis estadístico se eligió un nivel de P menor que 0.05. A todos los grupos de

datos se les aplicó la prueba de Bartlett (prueba F) la que permitió el trabajo con muestras de varianzas homogéneas. Posteriormente se utilizó un análisis de varianza para un modelo con dos criterios de clasificación y con interacciones, con el cual se estudiaron las diferencias entre: a) los efectos producidos por las distintas concentraciones de calcio, y b) los efectos producidos por el DNP.

Con este análisis se pone de manifiesto la existencia de diferencias en el conjunto pero no establece qué elementos de ese conjunto son los que difieren. Por lo tanto es necesario aplicar otras dos pruebas, para encontrar los grupos que provocan tal diferencia. La prueba de Dunnett permitió comparar una respuesta, la testigo (baño externo con solución salina de Van Harreveld), con cada una de las demás respuestas. Por último, para comparar todos los grupos de respuestas entre sí, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples y contrastes de Scheffé.

R E S U L T A D O S .

a. El PR en el estado estacionario.

La figura 4 muestra la amplitud máxima (en mV) del PR registrado de tallos oculares, sumergidos en las distintas soluciones salinas empleadas, al término de su permanencia en la oscuridad durante diez minutos. La oscuridad fue interrumpida cada dos minutos por un destello de prueba. La barra horizontal que se muestra en la parte superior de la figura representa el error estándar de la media para los valores obtenidos cuando la preparación se encontraba en la solución salina de Van Harreveld que corresponde también al de la tercera barra clara de derecha a izquierda (fig. 4 C).

La comparación entre las distintas soluciones sin DNP, puso de manifiesto que sólo en la solución en la que el Ca^{2+} fue sustituido por Co^{2+} , se produjo una disminución significativa, desde el punto de vista estadístico, de la amplitud del PR. La sustitución de Ca^{2+} por Co^{2+} en el baño externo hizo que la amplitud máxima del PR en estas circunstancias sólo alcanzara el 70 % con respecto a las respuestas obtenidas en solución salina control de Van Harreveld.

La comparación entre las respuestas obtenidas en las distintas soluciones a las que se les agregó DNP, mostró que no existen diferencias significativas entre ellas mismas, ni entre

la de cobalto y la de cobalto con DNP, pero sí con respecto a la respuesta en solución control. La presencia de DNP o Co^{2+} provocó una disminución de la amplitud, la cual sólo alcanzó en promedio el 60 % con respecto al control, no importando la concentración de Ca^{2+} en el baño externo.

La figura 5 muestra los valores (en mV) que alcanza la amplitud al término de la mitad de la duración, empleada como una aproximación al voltaje del PR durante su fase lenta. La barra horizontal que se muestra en la región superior de la figura, corresponde al error estándar que se obtuvo de las mediciones del PR en solución salina de Van Harreveld y que coincide con la barra clara cuya letra de identificación es la C.

Al comparar los voltajes medidos a la mitad de la duración, obtenidos de los registros realizados en las diferentes soluciones salinas empleadas, se encontró que sólo cuando el Co^{2+} sustituye al Ca^{2+} , se produce una disminución significativa. Al igual que la amplitud máxima, la amplitud al t (0.5) de la respuesta obtenida cuando en el baño externo hay Co^{2+} , sólo alcanza el 70 % de la que debería alcanzar si no lo hubiera.

Al añadir DNP a las soluciones, la amplitud al t (0.5) se redujo en forma significativa en todos los casos, entre los cuales desaparecieron las diferencias mostradas antes. La amplitud al t (0.5) alcanzada en presencia de DNP, fue en promedio del 70 % con respecto a la que hubiera alcanzado si no estuviera presente el DNP en la solución que baña a la preparación. En la solución con Co^{2+} , que ya se encontraba disminuida con respecto del control, se mantuvo la misma

disminución.

La figura 6 muestra los resultados de comparar los efectos de las distintas soluciones salinas sobre la duración de la respuesta. La disminución de la disponibilidad de Ca^{2+} extracelular sea por la acción del Co^{2+} o por la del EDTA, provocó un notable incremento en la duración de la respuesta, la cual llegó incluso a duplicarse (figura 6, barras claras A y B). A su vez, el incremento en la concentración de Ca^{2+} de la solución produjo una reducción en la duración de la respuesta (figura 6D). Hay que hacer notar, sin embargo, que el grado de dispersión de los valores obtenidos en los registros con bajo Ca^{2+} , tanto con Co^{2+} como con EDTA (barras 6 A y 6 B), muy grande, y muy pequeño en las soluciones testigo y de alto Ca^{2+} (barras 6 C y 6 D). La desigualdad de varianzas implícita en estas diferencias, impide establecer una comparación válida, desde el punto de vista estadístico, entre los dos conjuntos; aun cuando la relación inversa entre el nivel de Ca^{2+} extracelular y la duración del PR es evidente.

La adición de DNP a las distintas soluciones experimentales, puso de manifiesto la misma relación entre el nivel extracelular de Ca^{2+} y la duración de la respuesta, aunque como se puede ver de la gráfica (barras sombreadas de la fig. 6), el DNP produjo una reducción significativa de la duración en todos los grupos, y en particular, en los de bajo Ca^{2+} .

b. El PR en adaptación a la oscuridad.

La figura 7 muestra los valores del voltaje de la amplitud

máxima del PR registrado de tallos oculares aislados, sumergidos en las distintas soluciones salinas empleadas, al inicio de los 20 minutos de oscuridad (barra de la izquierda) y al término de los mismos (barra de la derecha). La barra horizontal que se muestra en la parte superior de la figura representa el error estándar de la media para los valores obtenidos cuando la preparación se encontraba en la solución salina de Van Harreveld, y corresponde con el error estandar conjunto del par de barras que se identifica con la letra C.

Después del periodo de oscuridad, el voltaje generado en la solución salina testigo mostró una tendencia del a crecer (3 %), la que, evidentemente, no fue significativa (figura 7C). La sustitución de Ca^{2+} por Co^{2+} produjo una reducción del 30 % en la amplitud de la respuesta con respecto a la respuesta control y después de los 20 minutos de oscuridad disminuyó 8 % más (figura 7A). La falta de Ca^{2+} en la solución salina extracelular, y su fijación por el EDTA, produjeron respuestas 6 % más grandes que las obtenidas en la solución testigo las cuales crecieron 12 % más, después del periodo de oscuridad (figura 7B). Los efectos del exceso de Ca^{2+} fueron opuestos a los de la solución anterior, ya que el periodo de oscuridad produjo una caída del 10 % en el voltaje generado por el destello después de los 20 minutos de oscuridad con respecto a la amplitud de la respuesta testigo registrada al inicio del periodo de oscuridad (figura 7D).

En la misma figura 7 las barras sombreadas representan los resultados obtenidos cuando los experimentos se hicieron en el mismo tipo de soluciones salinas, a las que además se les agregó

DNP. La presencia del inhibidor metabólico provocó una reducción en promedio del 40 % de la amplitud de las respuestas con respecto a la respuesta en la solución testigo. En ningún caso hubo diferencias significativas antes y después del periodo de oscuridad. Sólo se observa que hay un efecto simétrico entre la acción del DNP en la solución de Van Harreveld donde se produce un aumento de la respuesta de un 3 %, después de la oscuridad y la acción del DNP en la solución con Co^{2+} donde se observa una reducción de la respuesta también del 3 %, ante la misma situación de oscuridad (comparar las barras sombreadas 7 A y 7 C). La solución de bajo Ca^{2+} y con EDTA; indujo, además de la reducción de amplitud, una ligera inversión del efecto asociado con la adaptación a la oscuridad (figura 7B). Es decir, la reducción del Ca^{2+} externo incrementa la respuesta después de la oscuridad siempre que no haya DNP ya que cuando este se añade, la respuesta disminuye después de los 20 minutos de oscuridad (barra 7 B). La inversión contraria se puede apreciar en el par de barras identificadas con la letra D de la misma figura 7. Esto es, oscuridad y exceso de Ca^{2+} extracelular provocan disminución de la amplitud de la respuesta (10 %); en cambio, oscuridad, Ca^{2+} y DNP inducen un leve aumento (2.5 %) de la misma.

La figura 8 muestra también los valores de la amplitud del PR después de que los fotorreceptores permanecieron en la oscuridad durante 20 minutos. Los valores están porcentualizados y el 100% se muestra como una línea que corresponde al valor del PR registrado antes de la oscuridad en preparaciones colocadas en la solución salina de Van Harreveld.

Las barras claras muestran el valor porcentual de la respuesta que se obtuvo al término del periodo de oscuridad. Las barras sombreadas representan los experimentos hechos con soluciones salinas a las que se les agregó DNP.

Al quitar el Ca^{2+} y añadir EDTA a la solución salina extracelular, la amplitud aumentó un 12 % después del periodo de oscuridad de 20 minutos; si se sustituye el Ca^{2+} por el Co^{3+} , entonces hay una reducción del 10 % después de los 20 minutos de oscuridad (fig. 8 A y B). Con DNP la tendencia es a disminuir ya sea con o sin Co^{2+} . En la solución con exceso de Ca^{2+} la amplitud de la respuesta disminuyó un 20 % después de que la preparación se mantuvo 20 minutos en la oscuridad (Fig. 8 D).

Al agregar DNP, se presenta una tendencia del 10 % a aumentar, la que aunque con un error estándar contrasta grandemente con la reducción que se muestra en la solución sin DNP (Fig. 8 D).

c. El PR durante la estimulación luminosa iterativa.

La figura 9 muestra los valores de la amplitud del PR ante estímulos luminosos aplicados cada 2 segundos durante 30 segundos. El 100% corresponde a la amplitud del PR registrado en la solución salina control de Van Harreveld, al inicio de esta etapa experimental, por esta razón las respuestas iniciales son distintas en cada solución. Cada curva corresponde a una de las soluciones empleadas.

Es evidente que como resultado del destello aplicado, la

segunda respuesta cae y llega en algunos casos a desaparecer. Las mayores caídas se presentan con las soluciones testigo y 3 Ca^{2+} , mientras que en las soluciones con Co^{2+} sustituyendo al Ca^{2+} y sin Ca^{2+} (EDTA) se observa una caída sólo del 50 %.

A partir de la tercera respuesta se observa una tendencia del PR a recuperar su amplitud inicial. Sin embargo, el grado de recuperación en el transcurso del tiempo depende de la solución salina empleada en el baño, de tal manera que alcanzan el máximo (Fig. 7 C) en la solución testigo (ligeramente mayor al 100 %) y el mínimo (Fig. 7 D) en la solución rica en Ca^{2+} (75 %). En la solución con Co^{2+} y en la solución sin Ca^{2+} más EDTA, los regímenes de recuperación tuvieron valores semejantes entre sí e intermedios con respecto a las otras dos soluciones (Fig. 7A y B).

En registros semejantes a los descritos en el párrafo anterior, pero realizados en soluciones salinas a las que se les añadió DNP se obtuvieron los siguientes efectos: al comparar la respuesta inicial en cada solución con respecto a la que se observa en la solución testigo (100 %) se observa la existencia, en todos los casos, de una respuesta inicial relativamente baja (entre el 75 y el 50 %) seguida de una reducción que llegó al 25 % o 35 % según la solución.

Las siguientes respuestas mostraron muy poca recuperación, siendo la máxima la de la solución control, la cual alcanzó sólo el 50 %. En la solución rica en Ca^{2+} y en la solución sin Ca^{2+} más EDTA la recuperación fue del 40 %, mientras que en la solución con Co^{2+} se observó una tendencia a la disminución, lo que significó una respuesta estable en el 30 % de la amplitud con

respecto a la de la solución testigo. Los tiempos de recuperación para alcanzar una amplitud estable no mostraron diferencias significativas entre las cuatro soluciones.

Las figuras de la 11 a la 14 muestran los efectos de la estimulación iterativa en tallos sumergidos en una determinada solución sin y con DNP. En cada caso el 100 % de la respuesta correspondió a la respuesta inicial con respecto a la ráfaga de destellos, la cual se obtenía después de que el tallo ocular estuvo colocado previamente en la oscuridad durante 20 minutos. Los destellos luminosos de prueba se aplicaban cada dos segundos durante 30 segundos y llevaron a construir las curvas correspondientes de respuestas a la ráfaga de estímulos luminosos.

La curva de la figura 11 muestra, con símbolos claros, el efecto del Co^{2+} sobre el PR registrado en las condiciones descritas. Se puede ver que la caída inicial de la amplitud de la segunda respuesta fue de solo 20 % y que la recuperación fue tal que, para la tercera respuesta el PR había alcanzado ya el valor inicial. La adición de DNP a la solución no mostró efecto alguno sobre la caída; no así sobre la recuperación, ya que según se muestra con símbolos oscuros en la figura 11, hubo un ligero ascenso en la segunda y tercera respuestas y una clara tendencia a la disminución a partir de esta última.

La figura 12 muestra que tanto en la solución baja en Ca^{2+} con EDTA (símbolos claros) como en la solución también baja en Ca^{2+} con EDTA pero además con DNP (símbolos oscuros), el PR se redujo como consecuencia del primer destello hasta alcanzar el 50

% del valor original. La recuperación sólo alcanzó el 75 % del valor inicial.

La figura 13 muestra, con símbolos claros, las amplitudes de las respuestas de los fotorreceptores visuales a la estimulación luminosa iterativa, registradas de tallos oculares sumergidos en solución testigo de Van Harreveld; con símbolos oscuros está la respuesta que se obtuvo cuando se añadió DNP. En la solución testigo, la caída fue del 85 % y del 70 % en la solución con DNP. La magnitud de la recuperación fue también mayor en la solución control, donde a los 20 segundos se alcanzó el 100 %, de la respuesta, que en la solución con DNP donde después de los 30 segundos se detectó una recuperación estacionaria de sólo el 70 %.

En la figura 14, se muestran los efectos provocados por añadir el triple de Ca^{2+} (40.5 mM) a la solución salina sin DNP (símbolos claros) y con el inhibidor metabólico (símbolos oscuros). Es notable la reducción hasta cero de la segunda respuesta en la solución sin DNP así como la relativa lentitud con la que se lleva a cabo la recuperación, la cual llega al 80 %, del valor inicial. El DNP produjo efectos muy distintos ya que la caída sólo llegó al 50 % y la recuperación no rebasó el 65 % del valor inicial aunque se alcanzó en un tiempo relativamente corto (menos de 10 segundos).

D I S C U S I O N .

a. Registro intracelular.

El primer registro intracelular de la actividad eléctrica de fotorreceptores visuales fue obtenido por Hartline y sus colaboradores en 1952, en las células del ojo lateral del Limulus. Posteriormente, mediante microelectrodos, Naka y Kuwabara (1959) estudiaron el origen de las componentes del electrorretinograma del ojo de acocil Procambarus clarki, y encontraron que esta respuesta se origina en las células retinulares. Desde entonces se diferenciaron las respuestas eléctricas registradas según la región en la que se colocaba la punta del electrodo, desde la córnea hasta la membrana basal.

Las características, las dependencias iónicas y el comportamiento de las respuestas obtenidas en retinulas de acociles, muestran patrones comparables con los observados en las respuestas obtenidas por registro intracelular en retinulas de otros invertebrados; aunque también presentan algunas diferencias, entre las que destaca la ausencia de la espiga que acompaña al PR de la célula excéntrica de Limulus o de los fotorreceptores de Apis mellifera (Naka y Eguchi, 1962; Bauman, 1968; Bader y cols., 1976).

El origen intracelular de la respuesta eléctrica de la retinula del acocil registrada con microelectrodos no ha sido

demostrado de manera irrefutable, pues no se tiene la evidencia directa que relacione la ubicación del microelectrodo con las características de la respuesta; sólo se cuenta con evidencia indirecta que incluye la constancia en el valor y en la estabilidad del potencial de membrana en reposo (Eguchi, 1965; Glantz, 1968, 1971; Goldsmith, 1978; Fuentes-Pardo y cols., 1984); los cambios de resistencia correspondientes a las propiedades eléctricas pasivas que se registran de preparaciones de las que se ha obtenido un PR (Goldsmith, 1975; Cummins y Goldsmith, 1986); los cambios de amplitud de la respuesta inducidos por cambios en el ángulo de polarización de la luz, que no se presentan cuando el registro es extracelular (Muller, 1973); y, por último, la amplitud de la respuesta registrada (de 10 a 15 mV) que no corresponde a la de los registros extracelulares (de 1 a 2 mV).

Las respuestas analizadas en este trabajo fueron del mismo tipo que las obtenidas por otros autores en preparaciones biológicas similares de diversos invertebrados (Naka y Kuwabara, 1959; Eguchi, 1965; Baumann, 1968; Millecchia y Mauro, 1969; Brown y Blinks, 1974; Goldsmith, 1975; Hanani y Hillman, 1976); además, se trabajó sólo con preparaciones cuyo potencial de membrana en reposo tuviera un valor mínimo de - 30 mV y se mantuviera con una variación no mayor a 5 mV durante el transcurso del experimento. Debido a ello, los cambios observados en las características de las respuestas se pueden atribuir fundamentalmente a las modificaciones del estado funcional de cada célula registrada y, en una perspectiva más amplia, a las interacciones que puedan existir entre las células

de una misma omatidia.

Nuestros registros muestran que la respuesta eléctrica a la luz de los receptores visuales del acocíl es un potencial que consiste de una despolarización relativamente rápida llamada fase transitoria, seguida de una despolarización sostenida o fase estable, que antecede a la repolarización.

La fase transitoria se asocia con el inicio y la intensidad del estímulo, mientras que la fase estable parece estar más relacionada con la duración del mismo (Naka y Kuwabara, 1959; Eguchi, 1965; Glantz, 1968; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Cummins y Goldsmith, 1986; Hernández Falcón y Fuentes Pardo, 1988). Poco se sabe de los mecanismos que llevan a la repolarización. Sólo podemos afirmar que al término de la fase estable la célula se repolariza en forma espontánea; sin embargo, ante estímulos sostenidos por periodos muy prolongados la amplitud de la respuesta declina en forma continua.

Dado que la duración del estímulo luminoso que utilizamos fue del orden de los 14 μ s, se puede plantear que el PR se origina por mecanismos cuya activación ocurre en un tiempo de cuando más ese valor, pero cuyas consecuencias persisten durante tiempos más de 10,000 veces mayores, ya que en condiciones testigo la respuesta tuvo una duración de más de 200 ms.

Una de las dificultades a las que hubo que enfrentarse fue la medición de los componentes del PR (figura 2), pues en los estudios realizados por diferentes autores no se plantea un criterio de medición que permita comparar los resultados en forma equivalente. Por otra parte, no siempre resulta simple

distinguir entre las fases transitoria y estable, ya que con frecuencia ésta cambia a expensas de aquélla lo que en ocasiones las hace indistinguibles. Por ello se decidió tomar la amplitud máxima de la respuesta como una medida aproximada de la fase transitoria, y la amplitud al t (0.5) como un índice relacionado con la amplitud de la fase estable. Nuestra medida de la duración de la respuesta corresponde fundamentalmente a la de la fase estable y toma poco en cuenta la duración de la repolarización.

Debido a que los experimentos se realizaron en células diferentes en cada ocasión, la variación individual dio origen a una gran variabilidad en los resultados de las mediciones. Por ello, fue necesario validar los resultados por medio de pruebas estadísticas, prefiriendo por su confiabilidad, las de tipo paramétrico. El primer criterio que se utilizó en el análisis, fue el de la homogeneidad de varianzas. Su aplicación a las respuestas únicas al término de los primeros diez minutos de oscuridad permitió comparar las diferencias entre los grupos a los que se les modificó una variable (la concentración de Ca^{2+} en la solución salina de prueba) y al mismo tiempo la comparación entre estos grupos y aquéllos en los que además se agregó DNP. Pese a lo riguroso del análisis estadístico, es evidente que los resultados son sólo aproximaciones válidas bajo nuestras condiciones experimentales que no permiten proponer una generalización para otras situaciones.

b. Papel del Ca^{2+} en la respuesta fotorreceptora.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental de este trabajo mostraron el importante papel que desempeña el Ca^{2+} en la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil. En efecto, en cada una de las tres situaciones experimentales en las que se analizó la respuesta eléctrica del fotorreceptor, es decir, en un estado estacionario, en adaptación a la oscuridad y con estimulación iterativa, encontramos que las características de la respuesta eléctrica dependieron de la concentración de Ca^{2+} en el medio externo.

Las 4 soluciones salinas que empleamos aseguraron distintos niveles de Ca^{2+} extracelular. De más a menos fueron: un incremento de tres veces (40.5 mM/l de Ca^{2+}), la condición testigo con solución salina de Van Harreveld (13.5 mM/l de Ca^{2+}), una solución salina a la que no se le agregó Ca^{2+} y a la que se le añadió un quelante del mismo como es el EDTA (lo que sólo asegura una reducción marcada pero no una eliminación completa del Ca^{2+} que llega a la célula); y una solución salina en la que el Ca^{2+} fue sustituido por 13.5 mM/l de Co^{2+} , con el objeto de bloquear los canales de Ca^{2+} de la membrana celular (Kohlhardt y cols., 1973).

La estimulación luminosa de los fotorreceptores induce la isomerización de la rodopsina que contienen. Este cambio en la estructura cuaternaria del fotopigmento parece ser el responsable del inicio de la cadena de eventos cuya manifestación eléctrica más importante es el PR. Se han postulado diversos modelos que

tratan de explicar el encadenamiento entre el fenómeno fotoquímico y los cambios en la conductancia de la membrana de las células receptoras (Smith y cols., 1968; Brown y Lisman, 1972; Goldsmith, 1972; Järvilehto, 1979; Payne y Howard, 1981; Berridge e Irvine, 1984).

El cambio en la estructura cuaternaria del fotorreceptor parece desencadenar los cambios en la permeabilidad de la membrana que permiten la generación de por lo menos la fase transitoria del PR. En el fotorreceptor ventral del Limulus y en el de Balanus, se demostró una corriente entrante inducida por la luz que muestra una dependencia notable de la disponibilidad de Na^+ extracelular (Millecchia y Mauro, 1969; Mack Brown y cols., 1969, 1970; Brown y Mote, 1974; Bacigalupo y cols., 1986).

En el mismo tipo de preparaciones se encontraron corrientes entrantes y salientes que pueden ser modificadas por los niveles de Ca^{2+} extracelular; sin embargo, no se ha demostrado que el Ca^{2+} sea un acarreador de corriente (Millecchia y Mauro, 1969; Mack Brown y cols., 1970; Brown y Mote, 1974; Hanani y Shaw, 1977; Pepose y Lisman, 1978; Edgington y Stuart, 1981; Bacigalupo y cols., 1986).

Por otra parte, en dichos fotorreceptores se ha encontrado una relación proporcional entre el nivel extracelular de Ca^{2+} y el grado de adaptación a la luz del fotorreceptor (Eguchi, 1965; Fulpius y Baumann, 1969; Lisman y Brown, 1972; Brown y Blinks, 1972, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976; Brown, Brown y Pinto, 1977; Brown, Coles y Pinto, 1977; Järvilehto, 1979; Stieve y Classen-Linke, 1980; Stieve y Bruns, 1983; Hochstrate y Hamdorf, 1985). En el caso del

fotorreceptor visual del acocil se cuenta con poca información sobre la participación del Ca^{2+} en el proceso fotorreceptor. Se ha propuesto que existe una relación inversa entre la amplitud y la duración de la fase estable del PR y la concentración de Ca^{2+} extracelular, así como una disminución de la fase transitoria cuando se reduce el Ca^{2+} en el medio extracelular (Fuentes-Pardo y cols., 1984). Aunque en el acocil no se ha demostrado que el Ca^{2+} participe en la generación del PR, hay datos que sugieren que es el ion más importante en los procesos de adaptación a la luz y a la oscuridad (Eguchi, 1965; Fuentes-Pardo y cols., 1984).

La participación del Ca^{2+} en la generación del PR de los fotorreceptores del invertebrado ha sido estudiada bajo diversas condiciones experimentales. Los resultados de estos estudios dieron origen a las dos hipótesis más aceptadas sobre el papel del Ca^{2+} en el proceso fotorreceptor: se ha considerado al Ca^{2+} sólo como mediador de la adaptación a la luz (Lisman y Brown, 1975) y como acarreador de corriente (Bader y cols., 1976; Bolsover y Brown, 1985). A partir de los primeros estudios donde se encontró que las modificaciones en el nivel de Ca^{2+} extracelular inducían cambios conspicuos en las características del PR (Eguchi, 1965; Fulpius y Bauman, 1969; Millecchia y Mauro, 1969) apareció una serie de trabajos que se basaron en la hipótesis de Lisman (Lisman y Brown, 1972) de que el Ca^{2+} es un mensajero intracelular que media la adaptación a la luz del fotorreceptor (Brown y Blinks, 1972, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976; Lisman, 1976; Brown, Brown y Pinto, 1977; Brown, Coles y Pinto, 1977; Muijser, 1979).

En estos trabajos se hizo énfasis en la participación del Ca^{2+} fundamentalmente en el proceso de adaptación a la luz y se le postuló como el responsable de la disminución de la sensibilidad a la luz de los fotorreceptores estudiados. Bajo esta perspectiva se postuló que como resultado de la isomerización de la rodopsina, la corriente entrante inducida por la luz despolariza al fotorreceptor; un incremento del Ca^{2+} intracelular (proveniente del exterior, de depósitos intracelulares o de ambos sitios) reduce la sensibilidad del receptor y lo adapta a la iluminación. Cuanto más dure el estímulo luminoso mayor será el nivel de la concentración intracelular de Ca^{2+} y menor la sensibilidad celular. Sin embargo no ha habido trabajos que en forma directa exploren la posibilidad de que el Ca^{2+} participe como acarreador de corriente durante el PR. Recientemente han aparecido datos sobre la acción sinergista del Ca^{2+} en la excitación del fotorreceptor del ojo lateral de Limulus (Bolsover y Brown, 1985; Bacigalupo y cols., 1986; Payne y cols., 1986; Payne y Fein, 1986).

Aunque en el PR de todos los fotorreceptores de invertebrado estudiados, siempre se han descrito por lo menos una fase transitoria y una estable, la mayor parte de los trabajos hace poco énfasis en las características de aquélla mientras que abundan en detallar la participación del Ca^{2+} en el proceso de adaptación a la luz y en la duración de la fase estable. Por esta razón el modelo propuesto por Millecchia y Mauro (1969) para explicar la participación del Na^+ , del Ca^{2+} y del K^+ en la fase transitoria, en la fase estable y en la repolarización de una respuesta única del fotorreceptor ventral del Limulus, no había

sido modificado de manera importante hasta muy recientemente gracias a la acumulación de datos sobre la participación del Ca^{2+} en otras etapas del PR (Brown y cols., 1984; Bolsover y Brown, 1985; Levy y Fein, 1985; Payne y Fein, 1986; Payne, Corson y Fein, 1986; Payne y cols., 1986; Corson y Fein, 1987).

El modelo de Millecchia y Mauro (1969), parece complementarse en forma razonable con el propuesto por Lisman y Brown en 1972 para explicar la adaptación a la luz del receptor. Sin embargo, el papel del Ca^{2+} en la generación del PR como acarreador de corriente no es contemplado por ninguno de los dos modelos.

Para aclarar si el Ca^{2+} participa en los cambios de sensibilidad del fotorreceptor inducidos por la iluminación así como en la generación del PR, se realizaron los experimentos que constituyen esta tesis y cuyos resultados permitieron elaborar un modelo donde el movimiento de Ca^{2+} y su concentración juegan un papel importante.

En el modelo se parte de la isomerización de la rodopsina inducida por la luz, la cual generaría un incremento en la conductancia de la membrana del fotorreceptor que favorecería el movimiento de iones a través de la membrana, generándose así la corriente entrante que induce la despolarización.

Esta corriente estaría acarreada tanto por iones de sodio como de calcio, ya sea a través de un mismo canal mixto (no selectivo) o de canales selectivos para cada uno de estos iones (Bacigalupo y cols., 1986). El ingreso de Ca^{2+} además de que contribuiría a la despolarización de la célula fotorreceptora durante la fase transitoria del PR incrementaría la concentración

de Ca^{2+} intracelular. La amplitud del PR estaría determinada principalmente por la magnitud del desplazamiento de los iones de sodio aunque también contribuirían los de calcio; la terminación del PR (repolarización) dependería del nivel intracelular de Ca^{2+} , de tal modo que una vez que éste alcanzara cierto valor ("umbral") se interrumpiría la despolarización y se iniciaría la repolarización. Por ejemplo, por un sistema de canales de K^+ dependientes de la concentración del Ca^{2+} intracelular (Fulpius y Bowman, 1969; Edgington y Stuart, 1981; Payne, Corson y Fein, 1986). En la figura 6 puede verse el incremento notable de la duración del PR en la solución salina con baja concentración de Ca^{2+} y la brevedad de la duración del PR en la solución con alta concentración de Ca^{2+} extracelular.

Con este modelo como punto de partida, se discutirán las tres condiciones de estimulación que se trabajaron: la de estado estacionario, la de adaptación a la oscuridad y la de estimulación iterativa.

En el primer caso se obtienen respuestas cuya amplitud y duración se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Es decir, la frecuencia de estimulación utilizada es tal que permite un equilibrio dinámico entre los procesos asociados con la generación de la fotorrespuesta de tal manera que las características de ésta son siempre las mismas. En esta condición tendríamos, según el modelo, la siguiente secuencia de eventos: a) activación de la rodopsina por la luz; b) aumento de la conductancia de la membrana; c) flujo de Na^+ y de Ca^{2+} que causaría la despolarización de la célula retinular; d) aumento

del nivel de Ca^{2+} libre intracelular debido al ingreso del ion desde el medio externo y a su liberación de los depósitos intracelulares, e) al alcanzarse una concentración "umbral" de Ca^{2+} intracelular se suspende la despolarización y se inicia la repolarización.

De acuerdo con el modelo, al mantener a los fotorreceptores en solución salina con un incremento de tres veces el Ca^{2+} testigo cabría esperar que la amplitud y la duración de las respuestas fueran menores que en la solución testigo, de la misma manera que se ha observado en preparaciones similares (Fulpius y Bauman, 1969; Lisman y Brown, 1972; Bader y cols., 1976; Goldsmith, 1978; Muijser, 1979; Fuentes-Pardo y cols., 1984); el aumento resultante en el nivel de Ca^{2+} intracelular por la entrada de Ca^{2+} extracelular se complementaría con la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Este rápido incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} sería el responsable de la rápida suspensión en el ingreso de Na^+ con la consiguiente reducción en la duración del PR (Brown y Blinks, 1974; Brown, Brown y Pinto, 1977; Brown y cols., 1984; Bolsover y Brown, 1985; Levy y Fein, 1985; Payne y Fein, 1986; Corson y Fein, 1987) (Figuras 4, 5, 6C y 6D). La situación opuesta se debería encontrar en la solución salina deficiente en Ca^{2+} y con EDTA, en donde la reducción notable del Ca^{2+} debido a su secuestro por el quelante, permitiría que el ingreso de Na^+ al interior celular se mantuviera durante más tiempo, lo que se traduciría en respuestas de mayor amplitud que en la solución salina testigo y, fundamentalmente, de gran duración ya que la disminución en la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana celular

retardaría el momento en que se alcanzara la concentración "umbral" de Ca^{2+} intracelular que haría posible la terminación de la respuesta. Nuestros resultados (Figuras 4, 5 y 6B) están acordes con las predicciones del modelo y con aquellos reportados por otros autores.

Un aspecto que puede resultar controversial se refiere a las posibles acciones que tiene el EDTA sobre la permeabilidad de la membrana de las células (Tritthart y cols., 1973); experimentos realizados en nuestro laboratorio mostraron que los efectos del EDTA a las concentraciones utilizadas en este trabajo son totalmente reversibles (Hernández Falcón, Hernández López y Fuentes Pardo, 1987).

Dado que el Co^{2+} es uno de los bloqueadores más específicos de los canales de Ca^{2+} (Kohlhardt y cols., 1973), su presencia en el exterior de la membrana de la célula retinular se traduce en la imposibilidad del Ca^{2+} extracelular para ingresar a la célula, como consecuencia de la estimulación luminosa. El resultado de esta acción traería como consecuencia que la luz produjera respuestas pequeñas pero de duración muy grande puesto que también faltaría la contribución del ingreso de Ca^{2+} para alcanzar el nivel de Ca^{2+} intracelular necesario para la terminación de la respuesta (Figuras 4A y 6A). En las condiciones experimentales que denominamos de estado estacionario, el modelo de participación del Ca^{2+} en el PR permite explicar de manera satisfactoria los resultados experimentales.

En la oscuridad, los niveles intracelulares de Ca^{2+}

disminuyen (Brown y Blinks, 1972, 1974; Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976; Brown, Brown y Pinto, 1977; Brown y cols., 1984; Boisvert y Brown, 1985; Levy y Fein, 1985; Payne y Fein, 1986; Payne y cols., 1986; Payne, Corson y Fein, 1986; Corson y Fein, 1987). Los mecanismos que participan en esta disminución parecen depender de la captura del Ca^{2+} intracelular probablemente por sistemas de transporte a nivel mitocondrial (Lo y cols., 1980).

Después de que los fotorreceptores han permanecieron en solución salina testigo y en la oscuridad durante 20 minutos, la respuesta a la luz es un poco mayor que la que se registra antes del periodo de oscuridad. De acuerdo con el modelo propuesto, la diferencia se explica porque durante la adaptación a la oscuridad la captura constante de Ca^{2+} desde el citosol incrementaría la diferencia de los niveles de Ca^{2+} en el exterior con respecto al interior de la célula retinular, de manera que el ingreso de Na^{+} y de Ca^{2+} asociado con la estimulación luminosa se llevaría a cabo en forma más rápida y proporcionalmente mayor, lo que produciría respuestas de gran amplitud.

En la solución salina con una concentración de Ca^{2+} del triple con respecto a la solución salina testigo, el exceso del ion determinaría inicialmente la existencia de un mayor gradiente entre el exterior y el interior de la célula retinular. En realidad se estaría ante una situación en la que el nivel del Ca^{2+} intracelular dependería de dos procesos antagónicos: el ingreso de Ca^{2+} extracelular hacia el citosol y la captura de Ca^{2+} desde el citosol hasta los sitios de almacenamiento intracelular asociado con la oscuridad en la que se mantiene la

preparación, ya que el destello de prueba desencadenaría tanto la entrada de Ca^{2+} como su liberación.

La activación de la rodopsina por la luz ocasionaría un ingreso de Ca^{2+} relativamente reducido el que junto con el Ca^{2+} liberado desde los depósitos intracelulares por la acción de la luz aseguraría que se alcanzara el nivel umbral de Ca^{2+} intracelular en un tiempo más breve. Esto daría como resultado la reducción de la sensibilidad de la célula fotorreceptora que se traduciría en una despolarización de menor amplitud y de menor duración. De hecho, la respuesta que se obtiene después de 20 minutos de oscuridad es más pequeña que la que se obtiene en la solución salina testigo en las mismas condiciones, por lo que se puede decir que la sensibilidad de la célula decreció, efecto atribuible al exceso de Ca^{2+} extracelular, pese a haber mantenido la preparación en oscuridad (Figuras 7 y 8D) (Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Lisman, 1976; Brown y cols., 1984; Levy y Fein, 1985; Bolsover y Brown, 1985; Payne y Fein, 1986; Payne, Corson y Fein, 1986; Payne y cols., 1986).

La falta de Ca^{2+} en la solución de prueba más su secuestro con el EDTA implican una reducción importante del Ca^{2+} extracelular aunque no su ausencia ni la imposibilidad de su ingreso a través de la membrana de la célula retinular; el gradiente generado en la oscuridad persiste aunque se encuentra disminuido con respecto al que se establece en la solución salina testigo. Según el modelo, el ingreso de Ca^{2+} que resultara de la activación de la rodopsina por la luz sería pequeño, lo que aseguraría un mayor ingreso de Na^+ y durante mayor tiempo. La

sensibilidad de la célula, medida en función de la amplitud de la respuesta eléctrica, sería mayor (Brown y Lisman, 1975; Lisman y Brown, 1975; Wong y cols., 1979; Levy y Fein, 1985; Bolsover y Brown, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986; Payne y cols., 1986). Las respuestas obtenidas en nuestros experimentos mostraron un incremento significativo en la oscuridad que pone de manifiesto la validez del modelo empleado (Figuras 7 y 8B).

La presencia de Co^{2+} en el medio extracelular bloquea la entrada de Na^+ y de Ca^{2+} a través de la membrana celular (Kohlhardt, 1973). Durante la adaptación a la oscuridad cabría esperar que aunque el nivel de Ca^{2+} intracelular disminuiría debido a la captura, su ingreso desde el exterior se reduciría como consecuencia del bloqueo de los canales iónicos. Así, la sensibilidad a la luz de la célula retinular sumergida en una solución salina en la que el Co^{2+} sustituye al Ca^{2+} se vería disminuida, pese a la adaptación a la oscuridad, y la respuesta que se obtuviera después de 20 minutos de permanecer en ella fuera aún menor que la obtenida antes de ese periodo, probablemente como consecuencia de un mayor número de sitios bloqueados por el Co^{2+} en el transcurso del tiempo.

De acuerdo con el modelo, durante la estimulación iterativa en la solución salina de Van Harreveld se llevaría a cabo la siguiente secuencia de fenómenos. La primera respuesta sería siempre mayor que las subsecuentes ya que el siguiente estímulo se aplicaría después de un intervalo que resultaría insuficiente para que se restituyeran los niveles iniciales de fotorpigmento, de Ca^{2+} intracelular, etc. Después del primer estímulo la amplitud de la respuesta disminuiría como resultado del ingreso

brusco de Ca^{2+} a la célula, su liberación desde los depósitos intracelulares y la reducción consecutiva de la sensibilidad de la célula retinular. Aunque durante el intervalo de oscuridad entre cada estímulo haya recaptura del Ca^{2+} intracelular, durante los primeros segundos ésta sería insuficiente para compensar el incremento producido por la entrada procedente del exterior más la liberación de los depósitos intracelulares cada vez que se aplicara un destello. Así, el gradiente de Ca^{2+} entre el exterior y el interior de la célula sería pequeño, la sensibilidad estaría disminuida y las respuestas serían de baja amplitud. Al transcurrir el tiempo, se establecería un balance entre el ingreso y la recaptura de Ca^{2+} , por lo que se llegaría a un nuevo equilibrio. En las condiciones de estimulación utilizadas la amplitud de la respuesta se recupera al cien por ciento a los 25 segundos de iniciada la estimulación (figs. 9 y 13, rombos claros), por lo que se puede suponer que el nivel de Ca^{2+} intracelular se reduce durante los dos segundos que dura el periodo de oscuridad entre uno y otro estímulo ya que la sensibilidad del fotorreceptor se recupera (Levy y Fein, 1985; Bolsover y Brown, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986).

Cuanto más Ca^{2+} intracelular existe, menor es la sensibilidad del receptor y menor su capacidad de respuesta (Brown y Blinks, 1972, 1974; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976; Lisman, 1976; Stieve y Classen-Linke, 1980; Stieve y Bruns, 1983; Levy y Fein, 1985). En la solución salina con triple Ca^{2+} , cabría esperar una reducción notable de la sensibilidad a la luz cuando los fotorreceptores reciben

destellos cada dos segundos. De ahí que la respuesta al segundo destello se esperaría fuera muy pequeña dado que no existe el tiempo suficiente para que se capture, durante el breve periodo de oscuridad que precedió al segundo destello, todo el Ca^{2+} que difunde al citosol. Si el sistema de captura de Ca^{2+} se hubiera saturado como consecuencia de la gran cantidad de Ca^{2+} que ingresó, durante el periodo de oscuridad que precedió a la estimulación iterativa o simplemente debido a cada destello de prueba, entonces cabría esperar que la sensibilidad de la célula no se hubiese recuperado durante la estimulación iterativa; pues entraría el Ca^{2+} desde el exterior, se liberaría desde los depósitos intracelulares y el sistema de captura (ya saturado) sería incapaz de reducir el Ca^{2+} intracelular.

Si por el contrario, el sistema de recaptura fuera capaz de manejar la alteración en el Ca^{2+} libre intracelular ocasionado por el exceso de Ca^{2+} externo, entonces se restablecería el equilibrio de manera que la respuesta se recuperaría en la medida y el tiempo que determinara la capacidad de la célula para restaurar los niveles bajos de Ca^{2+} intracelular. Se puede observar (figs. 9 y 14, cuadros claros) que la amplitud de la respuesta tiende a recuperarse después del segundo destello, lo que de acuerdo al modelo indica que el sistema de captura de Ca^{2+} es capaz de restaurar los niveles bajos de Ca^{2+} necesarios para restablecer la sensibilidad del receptor a pesar del exceso de Ca^{2+} extracelular y llegar a un 80 % de la amplitud inicial al final de la estimulación iterativa.

Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular disminuyen durante la adaptación a la oscuridad o por aplicación intracelular de

agentes quelantes, la duración y la amplitud del PR son mayores que cuando se incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular (Lisman y Brown, 1972, 1975; Brown y Lisman, 1975; Bader y cols., 1976; Wong y cols., 1979; Lo y cols., 1980; Levy y Fein, 1985; Payne, Corson y Fein, 1986; Corson y Fein, 1987).

Según nuestro modelo, cabría esperar que durante la estimulación iterativa, en la solución salina sin Ca^{2+} y con EDTA, la caída en la amplitud de la segunda respuesta fuera menor que en la solución testigo, ya que bajo esta condición disminuiría la entrada y la liberación del Ca^{2+} , por lo que implicaría más tiempo el lograr un incremento intracelular de Ca^{2+} , lo cual le permitiría un mayor y más prolongado ingreso de Na^+ . En las figuras 9 y 12 (triángulos claros) se encuentran los resultados de la estimulación iterativa a fotorreceptores inmersos en una solución salina sin Ca^{2+} y con EDTA. De acuerdo con lo propuesto por el modelo, la caída es pequeña y la recuperación rápida aunque a un nivel menor que el de la solución salina testigo, lo que puede asociarse con la necesidad de que haya también una cierta concentración de Ca^{2+} extracelular para mantener la estabilidad de la respuesta.

El bloqueo en el ingreso del Ca^{2+} y del Na^+ ejercido por el Co^{2+} mantendría reducido el movimiento de estos iones durante la estimulación iterativa; por lo que la caída como consecuencia de la iluminación debería ser pequeña y la recuperación también pequeña y tendiente a disminuir como consecuencia del aumento del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares resultante de la estimulación luminosa. En las figuras 9 y 11 (con círculos

claros) se muestran los resultados predichos por el modelo cuando los fotorreceptores, bañados por una solución salina en la que el Co^{2+} sustituye al Ca^{2+} , han sido sometidos a destellos aplicados cada dos segundos. También puede observarse una tendencia decreciente en la amplitud de las respuestas en la solución salina con Co^{2+} hacia el final del periodo de estimulación.

c. Acciones del DNP.

Los mecanismos que subyacen a los incrementos en el nivel de Ca^{2+} intracelular han sido abordados por diferentes métodos experimentales; entre ellos cabe destacar los que han relacionado los niveles de Ca^{2+} intracelular con el bloqueo de la actividad metabólica por diversos mecanismos, como la anoxia, el bióxido de carbono, el cianuro y el 2,4-dinitrofenol (DNP) (Lantz y Mauro, 1978; Wong y cols., 1979; Lo y cols., 1980). Desde este punto de vista, el uso del DNP llevaría a aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular debido a que el bloqueo de la síntesis de ATP haría que se suspendieran los mecanismos de transporte activo y por lo tanto la captura de Ca^{2+} desde el citosol hasta los receptáculos intracelulares. Wong y colaboradores (1979) quitaron el Ca^{2+} extracelular y añadieron DNP, la fotorrespuesta fue disminuyendo gradualmente y después de 30 minutos había desaparecido, sin embargo la aplicación intracelular de EGTA hizo que la fotorrespuesta eléctrica reapareciera. En la misma preparación, el fotorreceptor ventral del Limulus, Lo y colaboradores (1980) midieron con arsenazo III el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} al aplicar DNP en el baño, y con rojo de

fenol el pH intracelular. Estos dos experimentos proporcionan evidencia directa de un aumento intracelular de Ca^{2+} a expensas de mecanismos intracelulares al aplicar DNP, y un incremento en la sensibilidad al disminuir el Ca^{2+} intracelular con EGTA no obstante el estado de acidez o de posible aumento en la concentración del Na^{+} intracelular al verse afectada también la bomba de $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$.

Con base en estos antecedentes, se llevaron a cabo experimentos en soluciones salinas en las que además del cambio iónico, analizado en los capítulos anteriores, se añadió DNP. De acuerdo con el modelo de participación del Ca^{2+} en la generación del PR que hemos propuesto, se pueden hacer predicciones cualitativas sobre lo que cabría esperar si la acción principal del DNP es, en efecto, la elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en cada una de las condiciones experimentales que se han estado estudiando.

En estas predicciones habría que considerar que las características de la fotorrespuesta eléctrica deben reflejar la suma algebraica de los efectos de la solución salina considerada más los producidos por el DNP. En el estado estacionario, las respuestas obtenidas en solución salina testigo a la que además se agregó DNP mostraron una reducción en la amplitud máxima, en la amplitud al $t(0.5)$ y en la duración, de acuerdo con lo esperado de un aumento en el nivel de Ca^{2+} intracelular (Figuras 4C, 5C y 6C).

El efecto del exceso de Ca^{2+} externo de la solución salina con una concentración de Ca^{2+} tres veces mayor que la testigo

(reducción de la amplitud y duración debidas a la difusión del ion) más el efecto del DNP debería significar una reducción mayor, que fue del orden del 66 % en la amplitud de la respuesta en la solución salina de $3Ca$ más DNP; la comparación de las barras sombreadas D y C de la figura 4 pone de manifiesto que la reducción en la amplitud del PR fue menor a la esperada.

Cuando el mismo tipo de comparación se hace entre las soluciones restantes, se encuentra que el efecto depresor del PR prevalece en la solución salina sin Ca^{2+} y con EDTA, y también en la solución salina con Co^{2+} sustituyendo al Ca^{2+} , de manera que es difícil asociar el efecto del inhibidor metabólico sólo con las modificaciones que pueda ocasionar en los niveles de Ca^{2+} intracelular.

En las demás condiciones experimentales se observa que en todos los casos prevalece la depresión del PR debida al DNP (Figuras 7, 8 y 10). En la figura 10 es donde el efecto del DNP es más marcado. Todas las respuestas fueron reducidas casi hasta la misma magnitud por el inhibidor metabólico sin que sea posible establecer una diferencia entre una solución salina testigo o cualquiera de las modificadas; es decir, parece confirmarse que las acciones del DNP no son de carácter específico.

En este sentido cabe mencionar que no existe acuerdo en cuanto al efecto específico del DNP sobre el metabolismo celular. El DNP forma parte de un grupo de agentes químicos que son capaces de influir sobre la fosforilación oxidativa conocidos como desacoplantes de la misma y entre los que además se encuentran el dicumarol, las fenilhidrazonas del cianuro de carbonilo, las salicilanilidas y el arseniato (Lehninger, 1980).

En general, estos agentes desacoplan las reacciones que producen energía de las que la conservan, de manera que estimulan la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias, aumentan la actividad hidrolítica del ATP en las mismas (la cual en condiciones normales es mínima).

El DNP fue el primer agente descoplante que se describió en 1948 por Loomis y Lipman. El DNP afecta las cuatro reacciones parciales de la fosforilación oxidativa: incrementa la actividad ATP-ásica de las mitocondrias e inhibe el intercambio ATP-Fosfato, el intercambio fosfato-agua y la reacción de intercambio ATP-ADP. Además, el DNP permite que la membrana de la mitocondria sea permeable a los iones de hidrógeno, con lo que se reducen el gradiente de hidrogeniones a través de la membrana mitocondrial y la producción de ATP (Mac Brown y Meech, 1976; Lehninger, 1980).

Por su carácter desacoplador de la respiración celular, el DNP se utiliza para inhibir la división celular (Giese, 1979), para inhibir el cotransporte de glucosa y Na^+ en microvellosidades intestinales (Hall y Baker, 1977) y para eliminar el transporte de Na^+ a través de la membrana celular (Hodgkin y Keynes, 1955). Debido a que el transporte activo de Ca^{2+} es un proceso dependiente de la respiración en las mitocondrias, su almacenamiento también es afectado como consecuencia del envenenamiento celular por DNP, de manera que el Ca^{2+} intracelular se incrementa. El DNP también reduce la excitabilidad celular (Godfraind y cols., 1971; McLaughlin, 1972; McDonald y MacLeod, 1972; Barker y Levitan, 1975).

En resumen, por la diversidad de acciones que el DNP parece tener a nivel celular, que involucran el desacoplamiento de la respiración celular, la acidificación del medio intracelular, el bloqueo de algunos sistemas de transporte a través de la membrana y el del almacenamiento de Ca^{2+} en las mitocondrias entre los más conocidos, no es posible asociar las modificaciones en el PR únicamente con el incremento en el Ca^{2+} intracelular y establecer similitudes entre este fenómeno y la adaptación a la luz (Wong y cols., 1979; Lo y cols., 1980).

No obstante, se puede señalar como hallazgo interesante lo siguiente. La acción esperada del DNP es una disminución de la sensibilidad del sistema (estado de adaptación a la luz) o una disminución de la excitabilidad de la célula, lo cual de hecho se caracteriza por respuestas de amplitudes pequeñas, 25 a 50 % con respecto a la amplitud testigo (fig. 10); pero no desaparece la respuesta. Analizando la figura 14 llama la atención que el destello inicial en exceso de Ca^{2+} genere una adaptación máxima a la luz: excitabilidad mínima con saturación transitoria del sistema ya que la segunda respuesta no está presente (cuadro claro a los 2 segundos), pero solamente cuando no hay DNP (y además haya Ca^{2+} en exceso). El DNP impide esa disminución de la sensibilidad o de la excitabilidad (cuadro oscuro a los 2 segundos que representa una amplitud de la respuesta y pone de manifiesto la ausencia de saturación). Esto sugiere que la adaptación a la luz (disminución transitoria y fisiológica, no patológica, de la sensibilidad) es un fenómeno, además de dependiente de Ca^{2+} , activo; aunque el PR no necesariamente tenga que serlo, en forma directa.

CONCLUSIONES .

1. La respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil (PR) consiste de una despolarización rápida o fase transitoria, seguida de una despolarización sostenida o fase estable que antecede a la repolarización.

2. En condiciones de estado estacionario los niveles de Ca^{2+} extracelular determinan la amplitud y la duración del PR.

3. Durante la oscuridad aumenta la amplitud y la duración del PR. Durante la iluminación, se reduce la amplitud y la duración del PR.

4. La disminución en la concentración de Ca^{2+} extracelular mimetiza el efecto de la adaptación a la oscuridad. El exceso de Ca^{2+} extracelular mimetiza el efecto de la adaptación a la luz.

5. El aumento del Ca^{2+} intracelular inducido por la aplicación del DNP mimetiza el efecto de la adaptación a la luz. Sin embargo esta acción del DNP no se puede dissociar de sus efectos deletéreos sobre el metabolismo celular.

6. El nivel de Ca^{2+} en el citosol parece provenir de su ingreso a través de la membrana celular y de su liberación desde los depósitos intracelulares.

7. Nuestros resultados se pueden explicar mediante un modelo en el que el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana es un elemento indispensable en la generación del PR.

T a b l a I
(m M / l)

	A	B	C	D
NaCl	205.3	205.3	205.3	205.3
KCl	5.4	5.4	5.4	5.4
CaCl ₂	--	--	13.5	40.5
MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2
NaHCO ₃	2.4	2.4	2.4	2.4
CoCl ₂	13.5	--	--	--
EDTA	--	3.0	--	--
DNP	0.1			

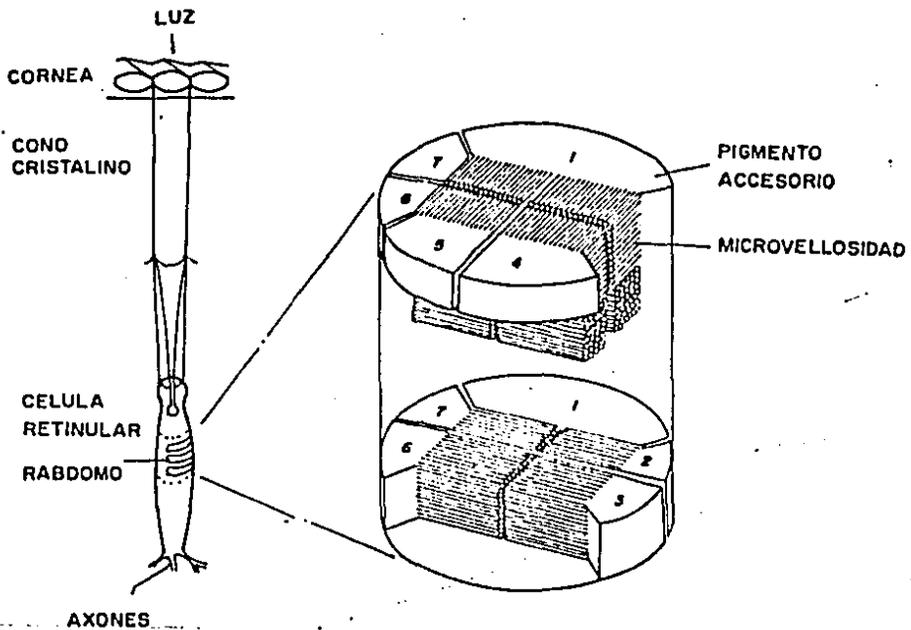


Figura 1 .

Representación esquemática de una sección longitudinal que muestra el eje óptico. En la parte izquierda se muestra el diagrama de una omatidia del ojo compuesto del acocil Procambarus clarki. La luz entra a través de la córnea, pasa por el cono cristalino y llega hasta la región rabdomérica de los fotorreceptores donde se lleva a cabo su transducción en una señal eléctrica, el potencial de receptor. Desde el rabdomo esta señal eléctrica se transmite al axón, el cual la conduce bajo la forma de potenciales de acción, hasta el sistema nervioso central. En la parte derecha de la figura se muestra el rabdomo, el cual tiene un arreglo característico de sus microvellosidades. Una de las células retinulares es el doble de grande que cualquiera de las otras seis. Esquema modificado de Muller, K.J., 1973.

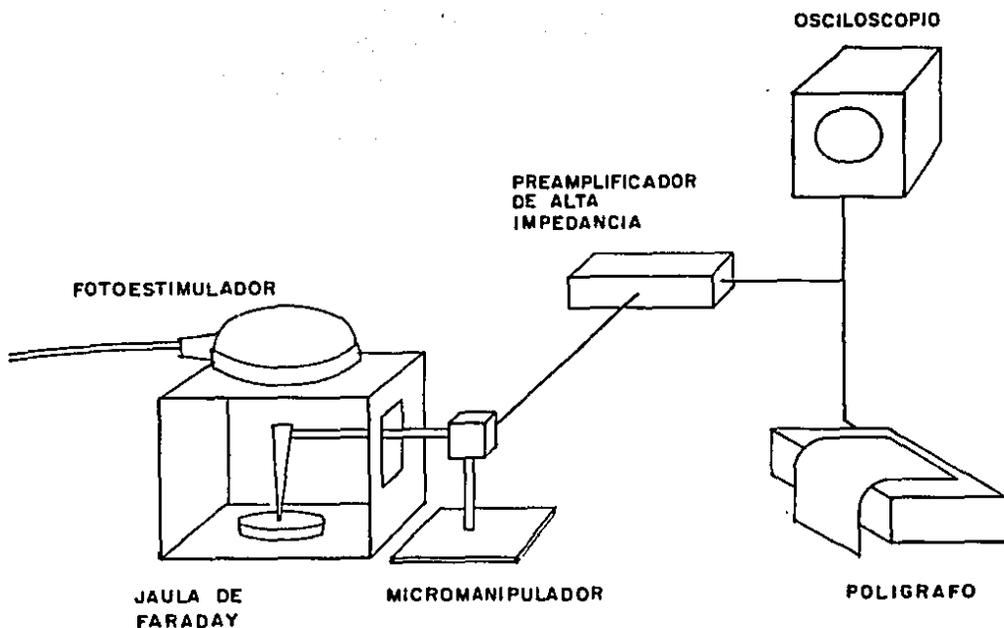


Figura 2.

Esquema que representa los dispositivos de registro y de estimulación utilizados en todos los experimentos. Los fotorreceptores del tallo ocular seccionado del acocil se mantenían en oscuridad y en la solución salina correspondiente. Para obtener la respuesta eléctrica se aplicaron destellos luminosos de intensidad de 1800 lx y duración de 14 μ s.

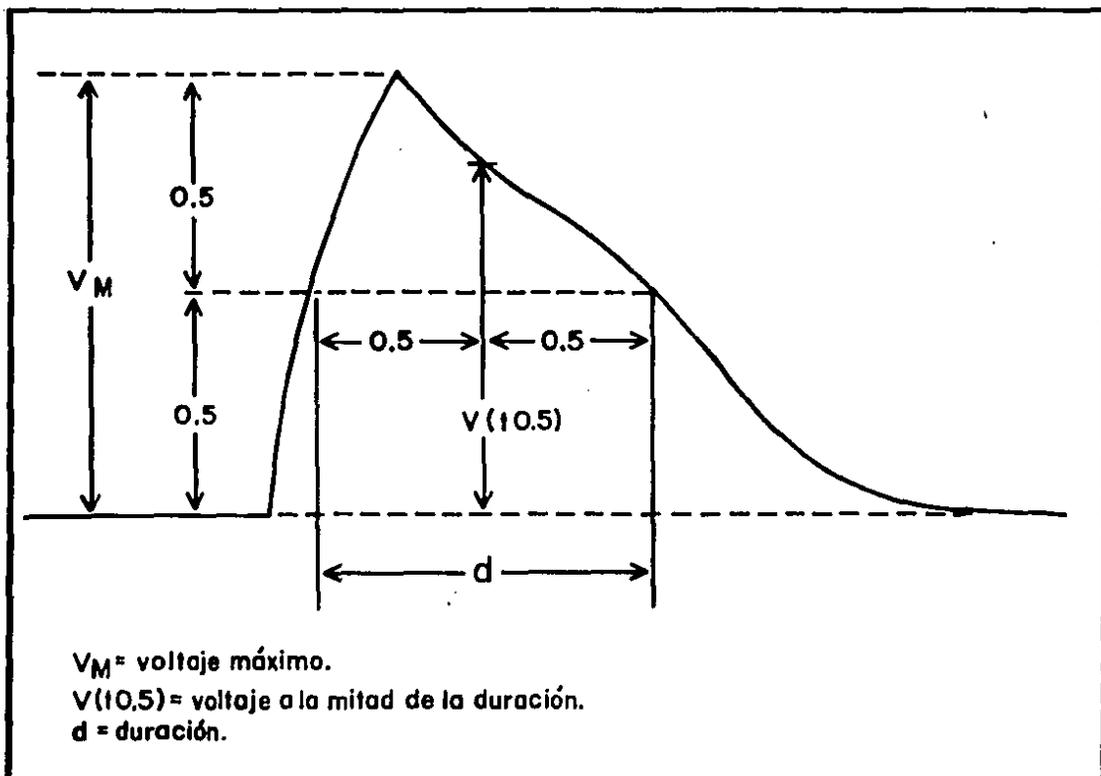


Figura 3.

Método empleado para obtener los parámetros del registro gráfico de la fotorrespuesta eléctrica del potencial de receptor. El cambio de potencial desde el valor del potencial de reposo hasta el pico máximo es el valor de la fase transitoria (amplitud máxima). La amplitud al t 0.5 se midió teniendo en cuenta en primer lugar la mitad de la amplitud máxima y en segundo lugar la mitad del tiempo de duración de la respuesta. La duración de la respuesta se midió desde el punto en que la respuesta alcanzó la mitad del voltaje máximo en su fase de despolarización hasta el punto en que volvió a presentar ese mismo voltaje en su fase de repolarización.

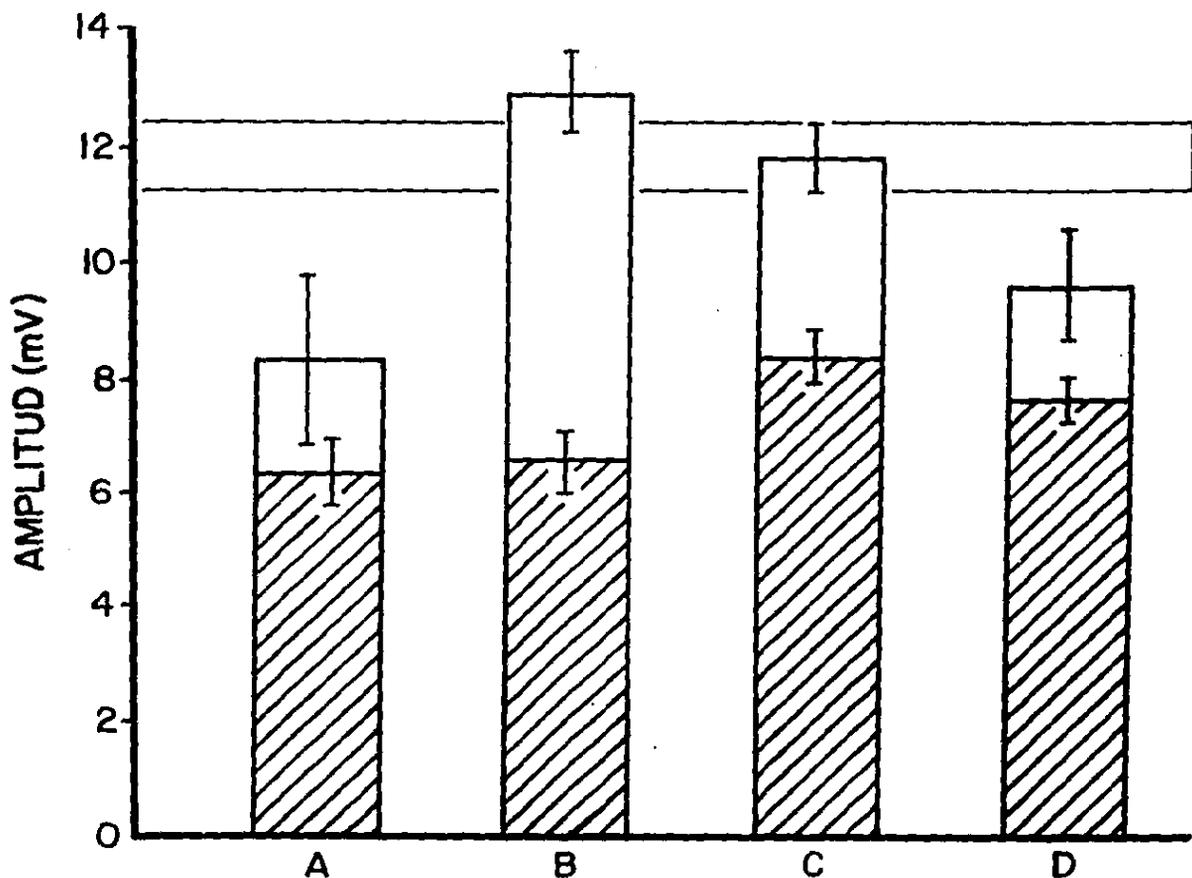


Figura 4.

Valores promedio, en milivoltios, de 6 experimentos en los que se midió la amplitud máxima del PR registrado del tallo ocular en condiciones estables. Las barras claras corresponden a los voltajes registrados en las distintas soluciones empleadas. En (A) se sustituyó el Ca^{2+} por el Co^{2+} , en (B) se añadió EDTA a una solución salina sin Ca^{2+} , en (C) corresponde a la solución salina de Van Harreveld. En la solución (D) se triplicó la cantidad de Ca^{2+} testigo. Las barras con rayas corresponden a las amplitudes del PR cuando la solución salina extracelular en la que se sumergía el tallo ocular fue en cada caso equivalente a las anteriores pero además se le había añadido DNP. La banda horizontal indica el error estándar de las amplitudes de las respuestas en la solución salina testigo. Las líneas verticales corresponden al error estándar medido para los registros obtenidos en cada solución.

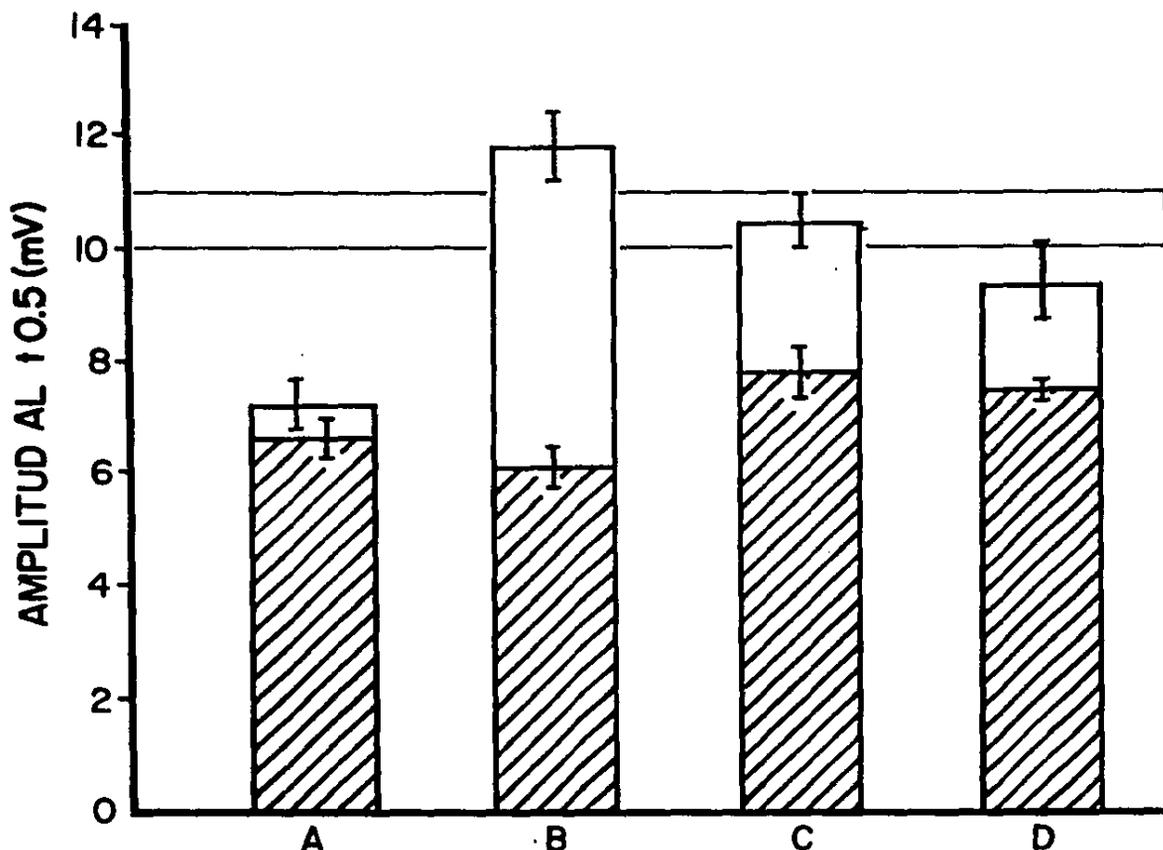
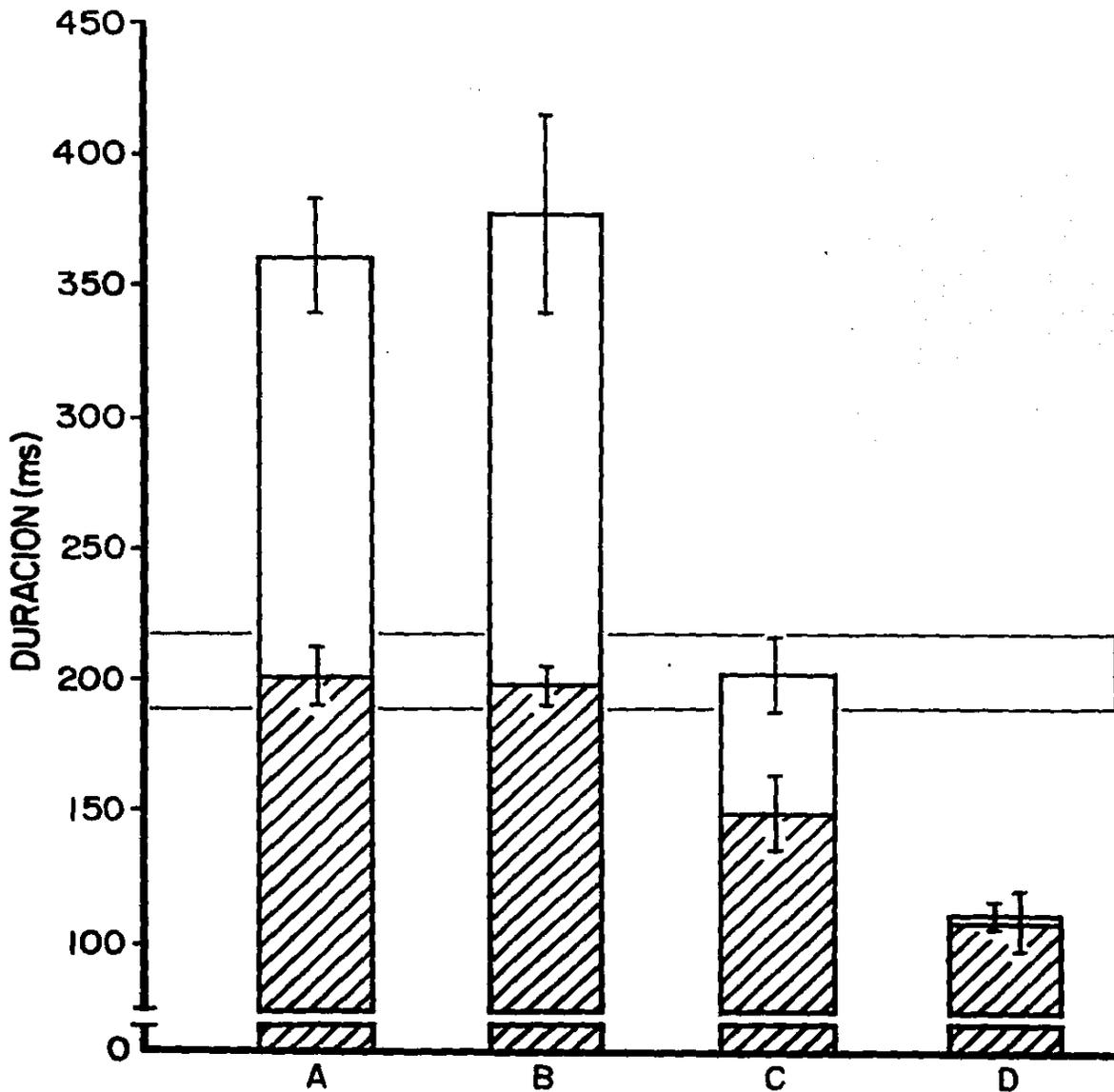


Figura 5.

Valores promedio, en milivoltios, de 6 experimentos en los que se midió la amplitud al t 0.5 del PR registrado en el tallo ocular en condiciones estables. Las barras claras corresponden a los voltajes registrados cuando en el baño, (A) se había sustituido el Ca^{2+} por el Co^{2+} , (B) se añadió EDTA a una solución sin Ca^{2+} , (C) cuando se empleó solución salina de Van Harreveld, (D) cuando se añadió tres veces la cantidad de Ca^{2+} testogp. Las barras con rayas corresponden a las amplitudes al t 0.5 de registros obtenidos de soluciones salinas quivalentes a cada una de las anteriores, pero a las que se les había añadido DNP. La banda horizontal indica el error estándar de las amplitudes de los registros obtenidos en solución salina testigo. Las líneas verticales corresponden al error estándar medido para los registros obtenidos en cada solución.



(Pie de figura, en la siguiente página.)

Figura 6.

Valores promedio de 6 experimentos en los que se midió, en milisegundos, la duración del PR registrado del tallo ocular en condiciones estables. Las barras claras corresponden a los tiempos registrados cuando en el baño, (A) se había sustituido el Ca^{2+} por el Co^{2+} , (B) se había puesto EDTA sin añadir Ca^{2+} , (C) se empleó una solución salina de Van Harreveld, y (D) cuando se aplicó tres veces la cantidad de Ca^{2+} testigo. Las barras con rayas corresponden a las duraciones de las respuestas en soluciones equivalentes a cada una de las anteriores, sólo que se les había añadido DNP. La banda horizontal indica el error estándar de los valores de las respuestas correspondientes a la solución salina testigo. Las líneas verticales indican el valor del error estándar medido para los registros de cada solución.

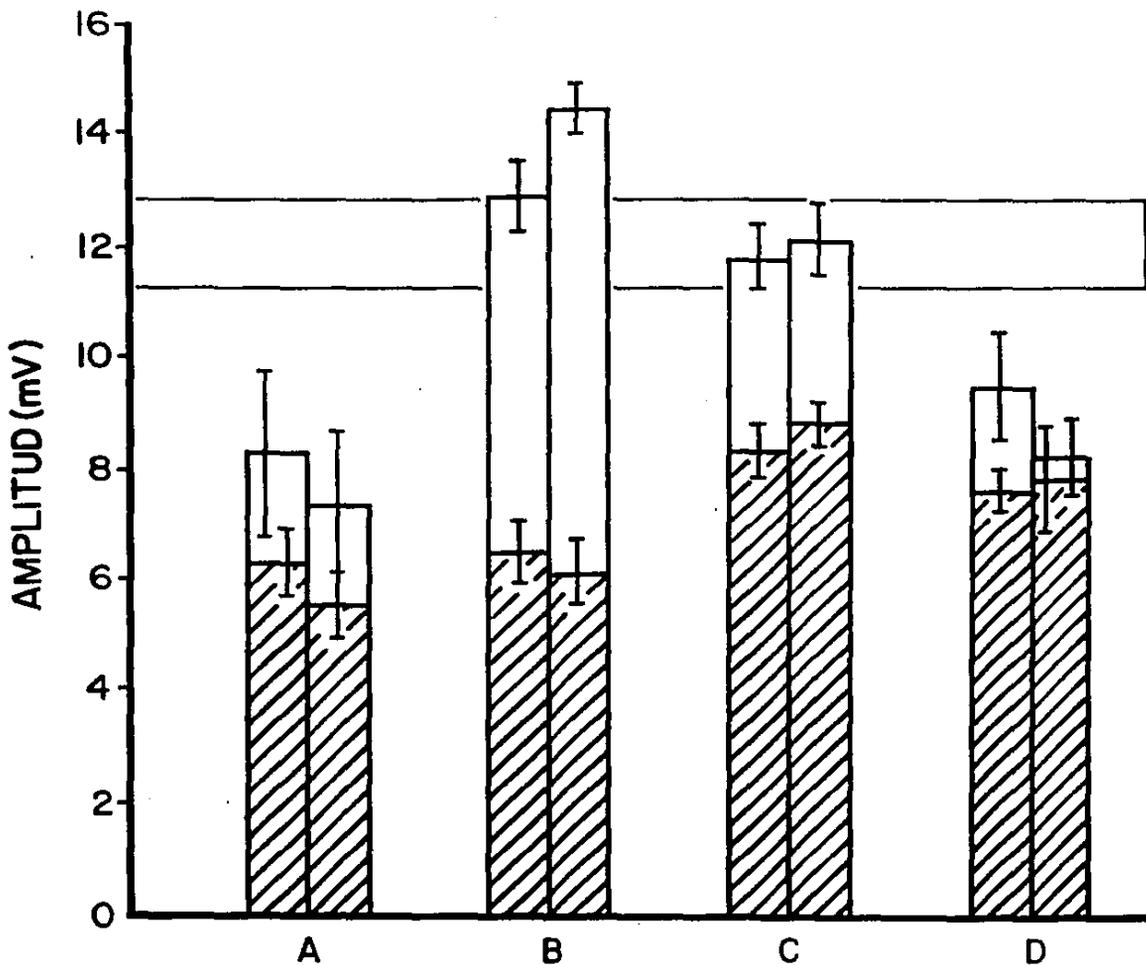


Figura 7.

Valores promedio de 6 experimentos en los que se midió, en milivoltios, la amplitud máxima del PR registrado en el tallo ocular seccionado del acocil. De cada par de barras claras la de la izquierda corresponde a la condición de estado estable y la de la derecha a los voltajes registrados después de 20 minutos de oscuridad. En (A) se substituyó el Ca^{2+} por el Co^{2+} , en (B) se añadió EDTA en la solución sin Ca^{2+} , en (C) se empleó solución salina de Van Harreveld y en (D) se añadió tres veces la cantidad de Ca^{2+} testigo. Las barras con rayas corresponden a las respuestas obtenidas en las mismas condiciones experimentales que las anteriores pero habiendo añadido DNP a cada solución. La banda horizontal indica el error estándar de las amplitudes de las respuestas en solución salina testigo. Las líneas verticales corresponden al error estándar medido para los registros obtenidos en cada solución.

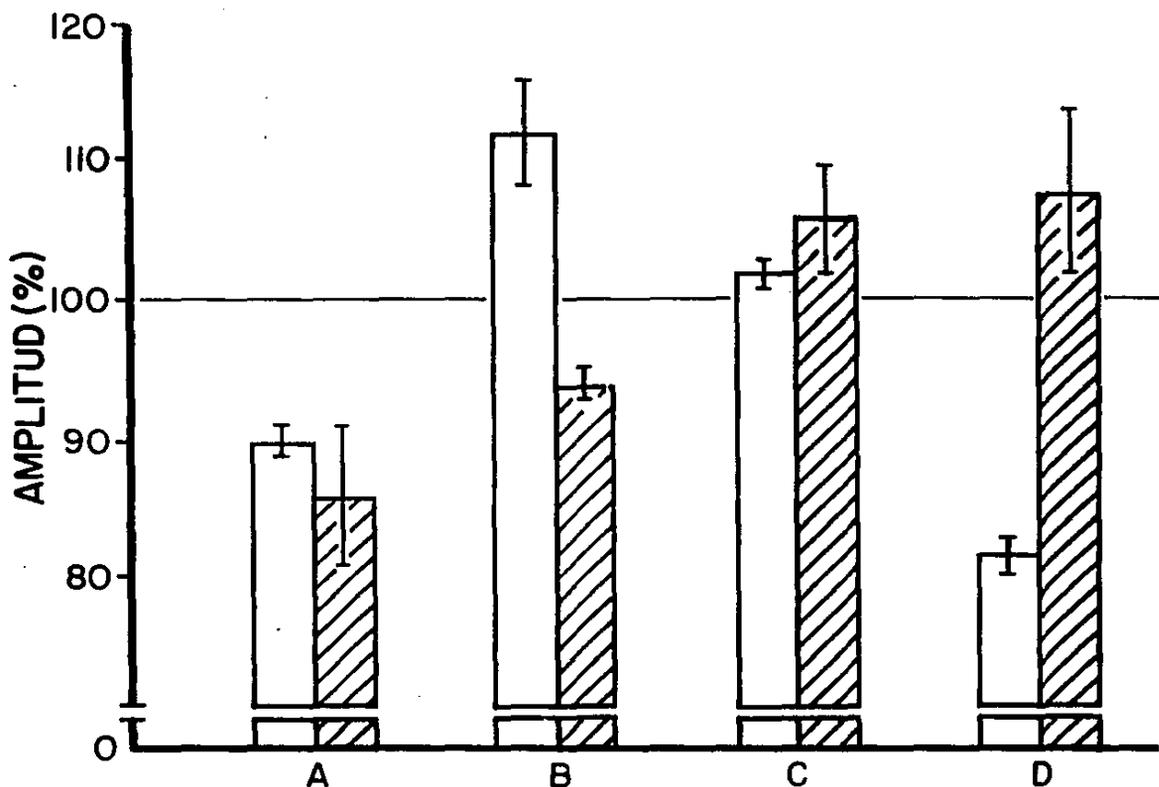


Figura 8.

Valores porcentuales obtenidos del promedio de 6 experimentos en los que se midió la amplitud máxima del PR registrado en el tallo ocular previamente adaptado a la oscuridad. Se tomó como el cien por ciento la respuesta inicial y se comparó con la respuesta posterior a 20 minutos de oscuridad. Las soluciones empleadas fueron: (A) con sustitución de Ca^{2+} por Co^{2+} ; (B), con EDTA y sin Ca^{2+} ; (C), salina testigo de Van Harreveld; (D), con tres veces la cantidad testigo de Ca^{2+} en la solución salina externa. Las barras con rayas corresponden a las mismas soluciones pero habiéndole añadido DNP. La línea horizontal indica el cien por ciento. Las líneas verticales indican el error estándar.

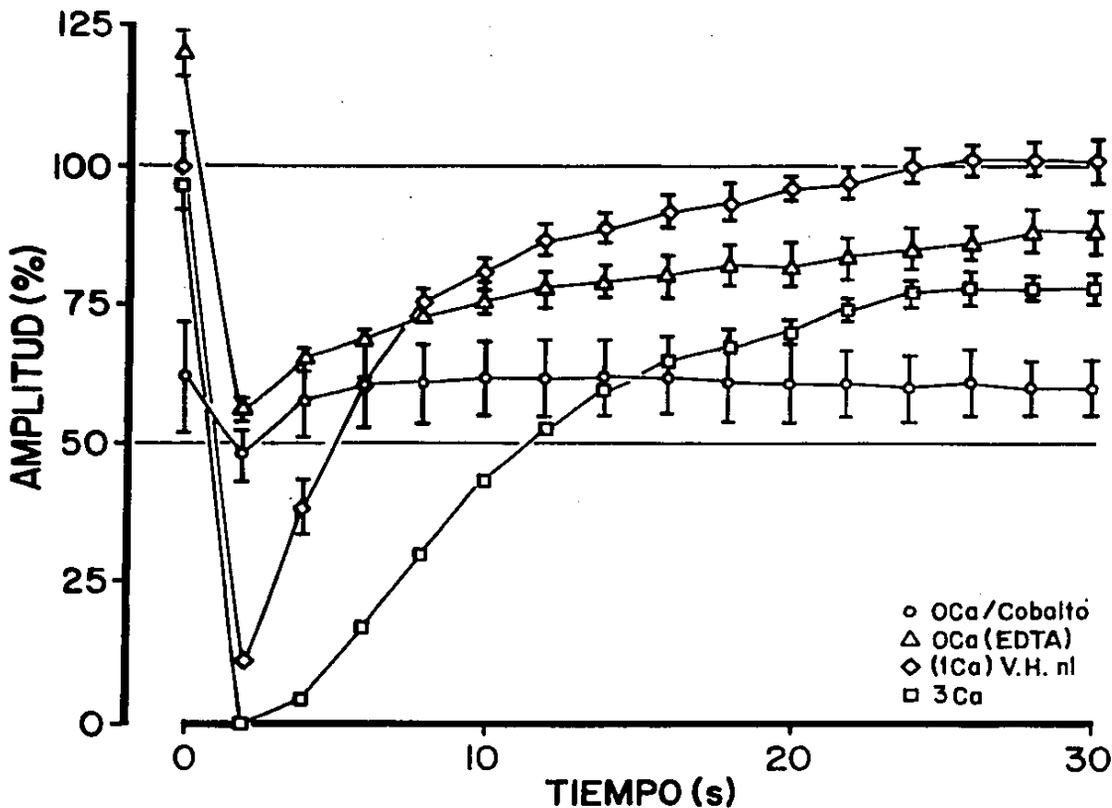


Figura 9.

Curvas obtenidas después de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicaba a los tallos oculares, previamente colocados en la oscuridad durante 20 minutos, una ráfaga de destellos a una frecuencia de 0.5 Hz. El cien por ciento corresponde al promedio de las respuestas obtenidas en solución de Van Harreveld. Los círculos corresponden a la solución salina con sustitución de Ca^{2+} por Co^{2+} (13.5mM); los triángulos, con EDTA (3mM) y sin Ca^{2+} ; los rombos, con solución de Van Harreveld (testigo: 13.5mM de Ca^{2+}); los cuadros, con tres veces la cantidad testigo de Ca^{2+} (40.5mM). Las líneas verticales corresponden al error estándar de cada punto promedio. En algunos puntos el valor del error estándar es más pequeño que los símbolos de cuadros, por lo que no aparecen al inicio de esta curva.

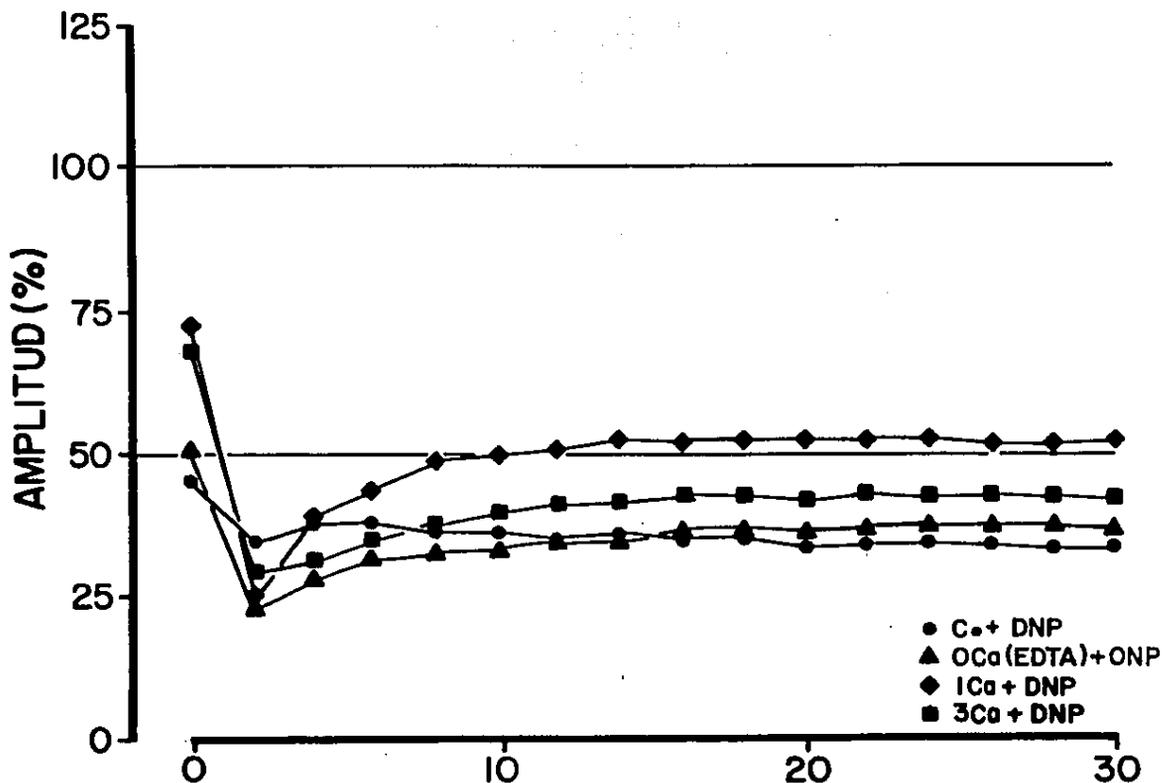


Figura 10.

Curvas obtenidas de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicaba una ráfaga de estímulos luminosos de 0.5 Hz a los tallos oculares colocados en la oscuridad durante 20 minutos. El cien por ciento corresponde al promedio de las respuestas obtenidas en solución de Van Harreveld. Los símbolos corresponden a la solución salina más DNP que se indican en la figura. No se representó al error estándar de cada punto promedio ya que no hay diferencias significativas entre las cuatro curvas.

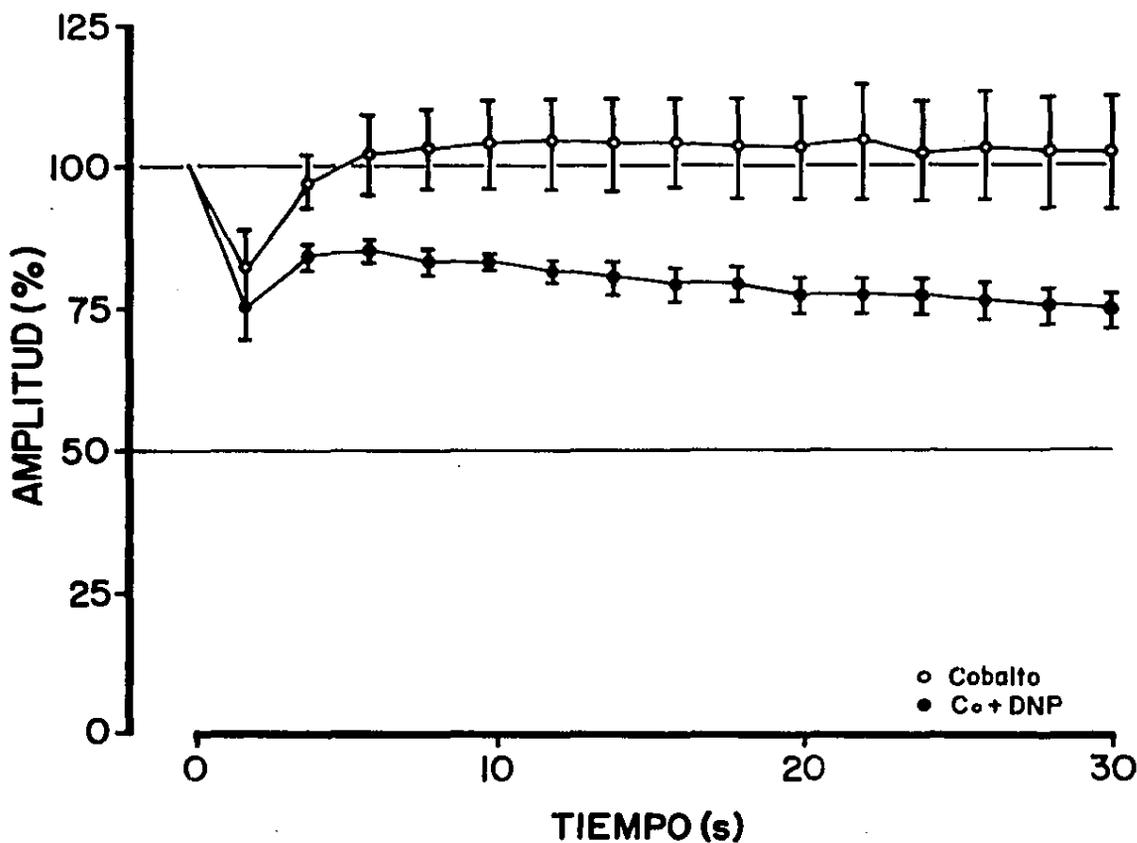


Figura 11.

Curvas obtenidas de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicaba una ráfaga de estímulos luminosos de 0.5 Hz a los tallos oculares colocados en la oscuridad durante 20 minutos. El cien por ciento corresponde al valor inicial del promedio obtenido en la solución con cobalto (círculos claros) o con cobalto más DNP (círculos oscuros). Las líneas verticales corresponden al error estándar de cada punto promedio.

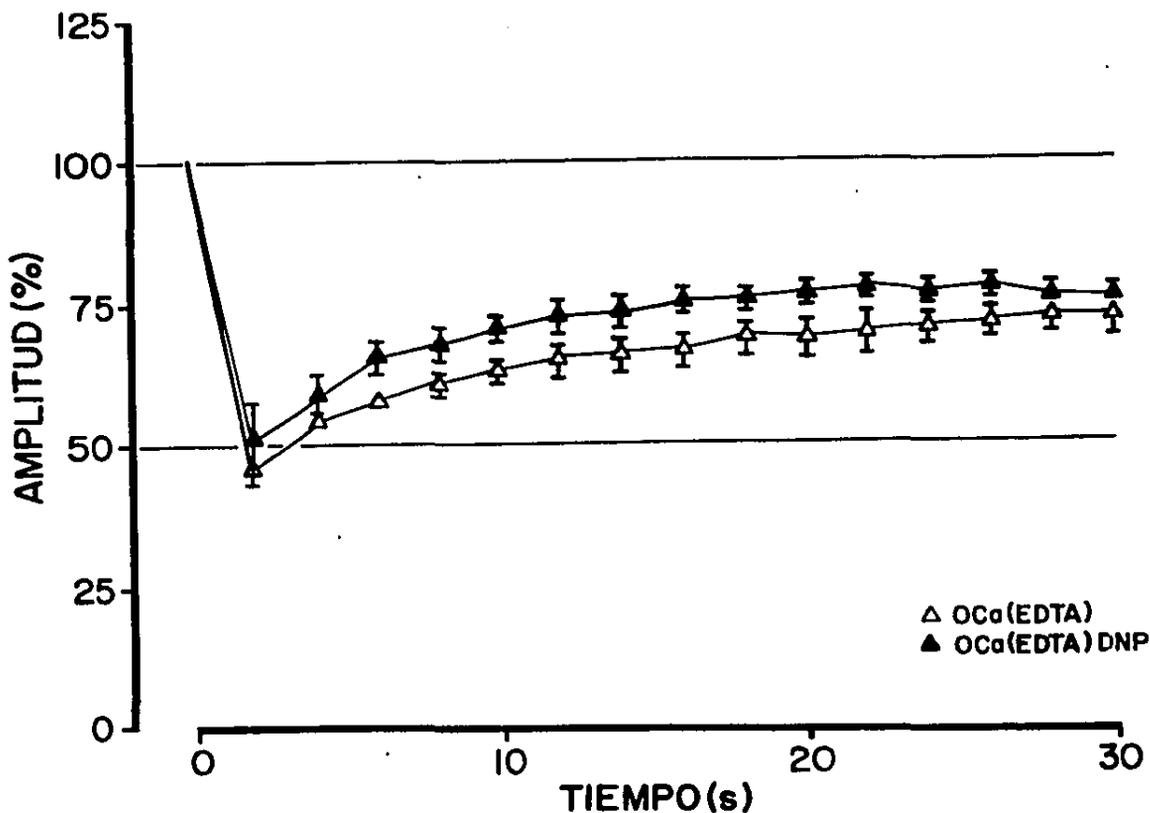


Figura 12.

Curvas obtenidas de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicó una ráfaga de estímulos luminosos de 0.5 Hz a los tallos oculares colocados en la oscuridad durante 20 minutos. El cien por ciento corresponde al valor inicial del promedio obtenido en la solución con EDTA y sin calcio (triángulos claros) o sin calcio y con EDTA más DNP (triángulos oscuros). Las líneas verticales corresponden al error estándar de cada punto promedio.

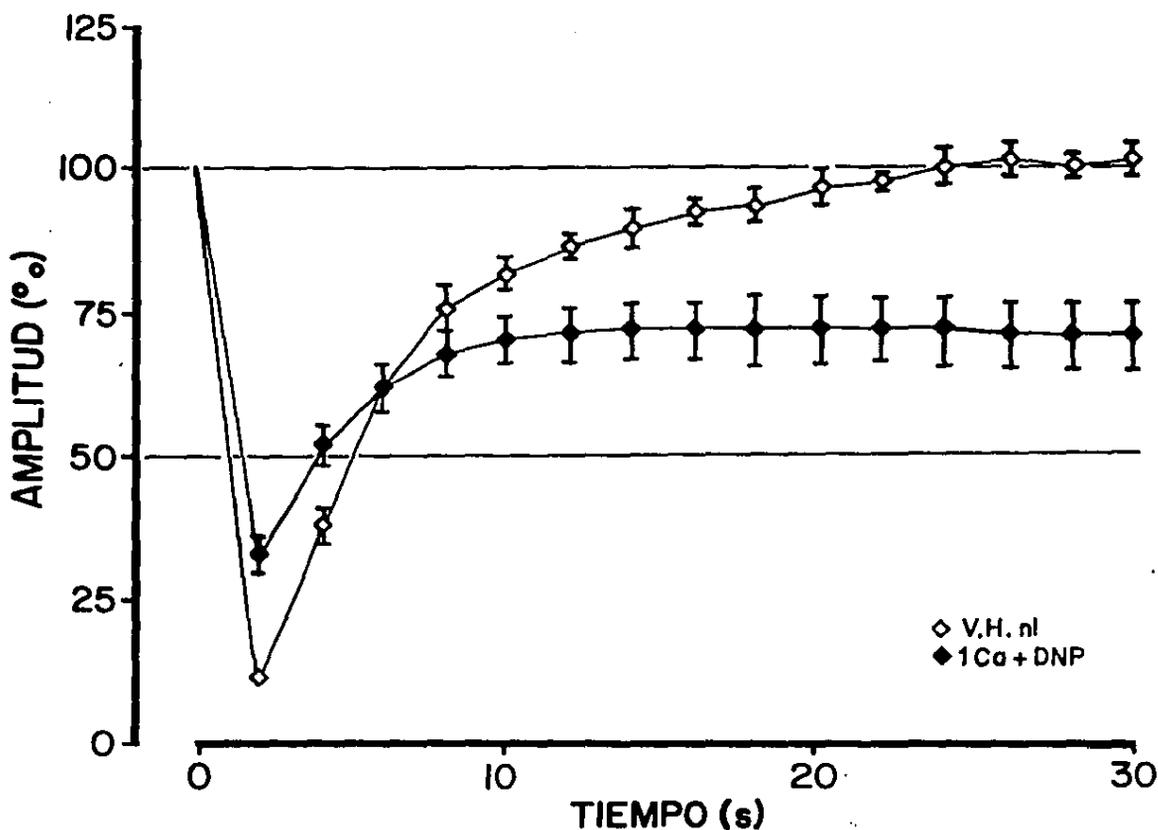


Figura 13.

Curvas obtenidas de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicó una ráfaga de estímulos luminosos de 0.5 Hz a los tallos oculares colocados en la oscuridad durante 20 minutos. El cien por ciento corresponde al valor inicial del promedio obtenido con la solución salina testigo de Van Harrevelde (rombos claros) o con el equivalente a la solución testigo más DNP (rombos oscuros). Las líneas verticales corresponden al error estándar de cada punto promedio.

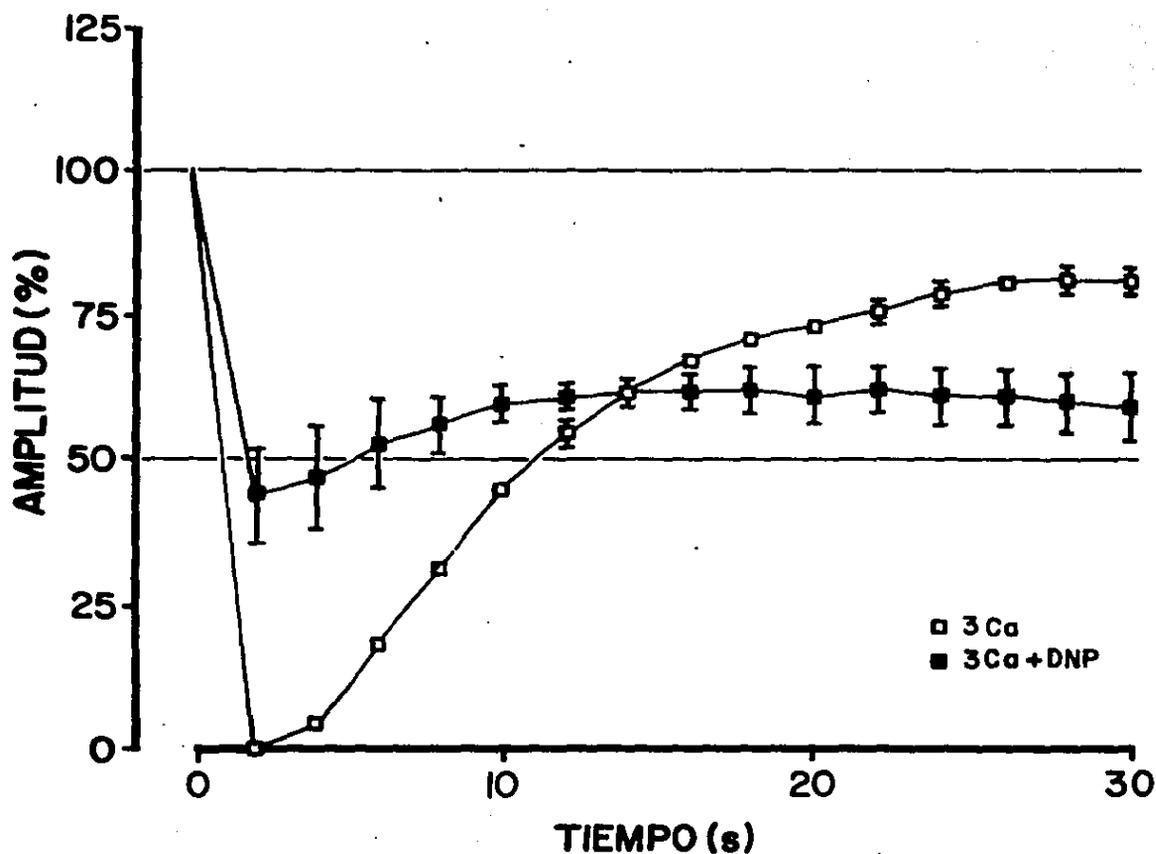


Figura 14.

Curvas obtenidas de promediar el PR de 6 experimentos en los que se aplicó un tren de estímulos luminosos de 0.5 Hz a los tallos oculares colocados en la oscuridad durante 20 minutos. El cien por ciento corresponde al valor inicial del promedio obtenido en la solución con tres veces más Ca^{2+} que la testigo (cuadros claros) o con el triple de Ca^{2+} más DNP (cuadros oscuros). Las líneas verticales corresponden al error estándar de cada punto promedio.

REFERENCIAS .

- Bacigalupo, J., Chinn, K. y Lisman, J.E. (1986) Ion channels activated by light in Limulus ventral photoreceptors, *J. Gen. Physiol.*, 87, pp. 73-89.
- Bader, C.R., Baumann, F. y Bertrand, D. (1976) Role of intracellular calcium and sodium in light adaptation in the retina of the honeybee drone Apis mellifera, *J. Gen. Physiol.*, 67, pp. 475-491.
- Barker, J.L. y Levitan, H. (1975) Mitochondrial uncoupling agents: effect on membrane permeability of molluscan neurones. *J. Membr. Biol.* 25, pp. 361-381.
- Baumann, F. (1968) Slow and spike potential from reticular cells of the honeybee drone in response to light, *J. Gen. Physiol.*, 52, pp. 855-875.
- Berridge, M.I. e Irvine, R. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction., *Nature*, 312, pp. 315-321.
- Bolsover, S. R. y Brown, J. E. (1985) Calcium ion, an intracellular messenger of light adaptation, also participates in excitation of Limulus photoreceptors, *J. Physiol.* 364, pp. 381-393.
- Brown, H.M. y Meech, R.M. (1976) Intracellular pH and light adaptation in barnacle photoreceptors. *J. Physiol.* 263, pp. 218P.
- Brown, J.E. y Blinks, J.R. (1972) Changes in Ca^{2+} in of Limulus ventral photoreceptors measured with aequorin., *Biol. Bull.*, 143, p. 456.
- Brown, J.E. y Lisman, J.E. (1972) An electrogenic sodium pump in Limulus ventral photoreceptor cells., *J. Gen. Physiol.* 59, p. 720.
- Brown, J.E. y Blinks, J.R. (1974) Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin., *J. Gen. Physiol.*, 64, pp. 643-665.
- Brown, J.E. y Mote, M.I. (1974) Ionic dependence of reversal voltage of the light response in Limulus ventral photoreceptors., *J. Gen. Physiol.*, 63, pp. 337-350.
- Brown, J.E. y Lisman, J.E. (1975) Intracellular Ca^{2+} modulates

- sensitivity and time scale in Limulus ventral photoreceptors., Nature, 258, pp. 252-253.
- Brown, J.E., Coles, J.A. y Pinto, L.M. (1977) Effects of injections of calcium and EGTA into the outer segments of retinal rods of Bufo marinus. J. Physiol. 269, pp. 707-722.
- Brown, J.E., Brown, P.K. y Pinto, L.H. (1977) Detection of light-induced changes of intracellular ionized calcium concentration in Limulus ventral photoreceptors using Arsenazo III., J. Physiol., 267, pp. 299-320.
- Brown, J.E., Rubin, L.J., Ghalayini, A.J., Tarver, A.P., Irvine, R.F., Berridge, M.J. y Anderson, R.E. (1984) Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in Limulus photoreceptors., Nature, 311, pp. 160-162.
- Corson, D.W. y Fein, A. (1987) Inositol 1,4,5-trisphosphate induces bursts of calcium release inside Limulus ventral photoreceptors, Brain Res., 423, pp. 343-346.
- Cronin, T.W. y Goldsmith, T.H. (1984) Dark regeneration of rhodopsin in crayfish photoreceptors. J. Gen. Physiol. 84, pp. 63-81.
- Cummins, D.R. y Goldsmith, T.H. (1981). Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. J. Comp. Physiol. 142, pp. 199-202.
- Cummins, D.R. y Goldsmith, T.H. (1986) Responses of crayfish photoreceptor cells following intense light adaptation. J. Comp. Physiol. A, 158, pp. 35-42.
- Davis, H. (1961) Some principles of sensory receptor action, Physiol. Rev., 41, pp. 391-416.
- Eakin, R.M. (1971) Structure of invertebrate photoreceptors. In H.J.A. Dartnall (ed.), Handbook of Sensory Physiology, Springer Verlag, Berlin, pp. 625-684.
- Edgington, D.R. y Stuart, A.E. (1981) Properties of tetraethylammonium ion-resistant K⁺ channels in the photoreceptor membrane of Giant Barnacle. J. Gen. Physiol. 77, pp. 629-646.
- Eguchi, E. (1965) Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells., J. Cell Comp. Physiol., 66, pp. 411-429.
- Eguchi, E. y Waterman, T. (1967) Changes in retinal fine structure induced in the crab Libinia by light and dark adaptation., Z. Zellforsch., 79, pp. 209-229.
- Eguchi, E., Waterman, T.H. y Akiyama, J. (1973) Localization of

- the violet and yellow receptor cells in the crayfish retina., J. Gen. Physiol., 62, pp. 355-374.
- Eguchi, E. y Waterman, T. (1976) Freeze-etch and histochemical evidence for cycling in crayfish photoreceptor membranes., Cell. Tiss. Res., 169, pp. 419-434.
- Fein, A. y Lisman, J.E. (1975). Localized desensitization of Limulus photoreceptors produced by light or intracellular calcium ion injection. Science 187, pp. 1094-1098
- Fernandez, H.R. y Nickel, E.E. (1976) Ultrastructural and molecular characteristics of crayfish photoreceptor membranes. J. Cell. Biol., 69, pp. 721-732.
- Ferris, C.D. (1974). Introduction to bioelectrodes. Plenum Press (1st. ed.), New York.
- Frixione, E. y Porter, R.M. (1986) Volume and surface changes of smooth endoplasmic reticulum in crayfish retina cells upon light- and dark-adaptation. J. Comp. Physiol. A 159, pp. 667-674.
- Frixione, E. y Ruiz, L. (1988) Calcium uptake by smooth endoplasmic reticulum of peeled retinal photoreceptors of the crayfish. J. Comp. Physiol. A 162. pp. 91-100.
- Fuentes-Pardo, B., Hernandez-Falcon, J. and Nogueron, I. (1984) Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty-four hour cycle., Comp. Biochem. Physiol., 78A, pp. 723-729.
- Fulpius, B. y Baumann, F. (1969) Effects of sodium, potassium and calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptors., J. Gen. Physiol., 53, pp. 541-561.
- Giese, A.C. (1979) Cell Physiology. W.B. Saunders Co. (5a. ed.) pp. 338, 576-577.
- Glantz, R.M. (1968) Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish *Procambarus clarkii*, Vision Res., 8, pp. 1407-1421.
- Glantz, R.M. (1971) Peripheral versus central adaptation in the crustacean visual system. J. Neurophys. 34 (4), pp. 485-492.
- Godfraind, J.M., Kawamura, H., Krnjevic, K. y Pumain, R. (1971). Actions of dinitrophenol and some other metabolic inhibitors on cortical neurones. J. Physiol. (London) 215, pp. 199-104
- Gold, G.H. (1986) Plasma membrane calcium fluxes in intact rods

are inconsistent with the "Ca-hypothesis". Proc. Nat. Acad. Sci. 83, pp. 1150-1154.

- Goldsmith, T.H. (1972) The natural history of invertebrate visual pigments. In H.J.A. Dartnall (ed.), Handbook of Sensory Physiology., Springer Verlag, Berlin, pp. 685-719.
- Goldsmith, T.H. (1975) Photoreceptor processes: some problems and perspectives., J. Exp. Zool., 194, pp. 89-101.
- Goldsmith, T.H. (1978) The spectral absorption of crayfish rhabdoms: pigment, photoproduct and pH sensitivity. Vision Res. 18, pp. 463-473.
- Hall, J.L. y Baker, D.A. (1977) Cell membranes and ion transport. Longman Inc., New York, 127 pp.
- Hafner, G.S., Tokarski, T. y Hammond-Soltis, G. (1982) Development of the crayfish retina : A light and electron microscopic study., J. Morphol., 173, pp. 101-118.
- Hanani, M. y Hillman, P. (1976) Adaptation and facilitation in the barnacle photoreceptor. J. Gen. Physiol. 67, pp. 235-249.
- Hanani, M. y Shaw, C. (1977) A potassium contribution to the response of the barnacle photoreceptor. J. Physiol. 270, pp. 151-163.
- Hartline, H.K. (1928) A quantitative and descriptive study of the electric response to illumination of the arthropod eye. Am. J. Physiol., 83, pp. 466-483.
- Hartline, H.K. y Graham, C.H. (1932) Nerve impulse from single receptors in the eye. J. Cell. Comp. Physiol., 1, pp. 277-295.
- Hartline, H.K., Wagner, H.G. y Mac Nichol, E.F. (1952) The peripheral origin of nervous activity in the visual system. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 17, pp. 125-141.
- Hernández Falcón, J., Hernández López, A. y Fuentes Pardo, B. (1987) Papel del sodio y del calcio en la generación del potencial de receptor de las clulas retinulares del acocil. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Jalapa, Ver., del 26 al 30 de julio, resumen No. 100.
- Hernández-Falcón, J., Moreno-Sáenz, E., Farias, J.M. y Fuentes-Pardo, B. (1987) Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity. I. Pseudopupil circadian rhythm. Comp. Biochem. Physiol. 87A, pp. 111-118.

- Hernández-Falcón, J. y Fuentes-Pardo, B. (1988) Relaciones estímulo-respuesta en las células retinulares del acocil. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Gro., Resumen O-27.
- Hille, B. (1984) Ionic Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Mass. Cap. 4 Calcium channels, pp. 76-98; cap. 13 Modifiers of gating, pp. 303-328.
- Hochstrate, P. y Hamdorf, K. (1985) The influence of extracellular calcium on the response of fly photoreceptors. J. Comp. Physiol., 156, pp. 53-64.
- Hodgkin, A.L. y Keynes, R.D. (1955) Active transport of cations giant axons of Sepia and Loligo. J. Physiol. 128, pp. 28-34
- Horrige, G.A. y Barnard, P.B.T. (1965) Movement of palissade in locust retinula cell when illuminated., Quart. J. micr. Sci., 106(2), pp. 131-135.
- Horrige, G.A. y Bullock, T.H. (1965) Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Vol. II, W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Järvilehto, M. (1979) Receptor potentials in invertebrate visual cells. In H. Autrum (ed.), Handbook of Sensory Physiology. Springer Verlag, Berlin, pp. 315-356.
- Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H. and Fleckenstein, A. (1973) Selective inhibition of the transmembrane calcium conductivity by Ni, Co and Mn ions., Pflugers Arch., 338, pp. 115-123.
- Lantz, R.C. y Mauro, A. (1978) Alteration of sensitivity and time scale in invertebrate photoreceptors exposed to anoxia, dinitrophenol and carbon dioxide., J. Gen. Physiol., 72, pp. 219-231.
- Lehninger, A.L. (1970) Mitochondria and Ca ion transport. Biochem. J. 119, pp.129-138.
- Lehninger, A.L. (1980) Biochemistry. Worth Pub., Inc. (2nd. ed.) New York, pp. 519-520.
- Levy, S. y Fein, A. (1985) Relationship between lighth sensitivity and intracellular free calcium in Limulus ventral photoreceptors. J. Gen. Physiol. 85, pp. 805-841.
- Lisman, J.E. y Brown, J.E. (1972) The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of Limulus ventral photoreceptors.,

- J. Gen. Physiol., 59 pp. 701-719.
- Lisman, J.E. y Brown, J.E. (1975) Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in Limulus ventral photoreceptors, J. Gen. Physiol., 66, pp. 489-506.
- Lisman, J.E. (1976) Effects of removing extracellular Ca²⁺ on excitation and adaptation in Limulus ventral photoreceptors. Biophysical J. 16, pp. 1331-1335.
- Lo, M.V.C., Wong, F. y Pak, W.L. (1980) Increase in intracellular free calcium concentration of Limulus photoreceptors caused by a metabolic inhibitor., Vision Res., 20, pp. 539-544.
- Loomis y Lipman 1948 citado por Lehninger 1980.
- Mack Brown, H., Meech, R.W., Koike, H. y Hagiwara, S. (1969) Current-voltage relations during illumination: photoreceptor membrane of a barnacle. Science, 166, pp. 240-243.
- Mack Brown, H., Hagiwara, S., Koike, H. y Meech, R.M. (1970) Membrane properties of a barnacle photoreceptor examined by the voltage clamp technique. J. Physiol. 208, pp. 385-413.
- Mack Brown, H. y Meech, R.W. (1976) Intracellular pH and light adaptation in barnacle photoreceptors., J. Physiol. 263, p. 218P.
- Mangini, N.J., Pepperberg, D.R. y Bachr, W. (1986) Light-dependent binding of G-protein to outer segment membranes of toad photoreceptors., J. Gen. Physiol., 88, pp. 675-694.
- Meyer-Rochow, V.B. y Eguchi, E. (1984) The effects of temperature and light on particles associated with crayfish Procambarus clarkii visual membrane; a freeze-fracture analysis and electrophysiological study., J. Neurocytol., 13(6), pp. 935-960.
- McDonald, T.F., MacLeod, D.P. (1972) The effect of 2,4-dinitrophenol on electrical and mechanical activity, metabolism and ion movements in guinea-pig ventricular muscle. Brit. J. Pharmacol. 44, pp. 711-717
- McLaughlin, S.G.A. (1972) The mechanism of action of DNP on phospholipid bilayer membranes. J. Membrane Biol. 9, pp. 361-368
- Millecchia, R. y Mauro, A. (1969) The ventral photoreceptor cells of Limulus. III: A voltage clamp study., J. Gen. Physiol., 54, pp. 331-351.

- Miller, D.L. y Korenbrot, J.I. (1987) Kinetics of light-dependent Ca fluxes across the plasma membrane of rod outer segments. *J. Gen. Physiol.* 90, pp. 397-425.
- Muijser, H. (1979) The receptor potential of reticular cells of the blowfly Calliphora: The role of sodium, potassium and calcium ions., *J. Comp. Physiol.*, 132, pp. 87-95.
- Muller, J.K. (1973) Photoreceptors in the crayfish compound eye: Electrical interactions between cells as related to polarized-light sensitivity., *J. Physiol.*, 232, pp. 573-595.
- Naka, K. y Eguchi, E. (1962) Spike potentials recorded from the insect photoreceptor., *J. Gen. Physiol.*, 45, pp. 663-680.
- Naka, K. y Kuwabara, M. (1959) Two components from the compound eye of the crayfish. *J. exp. Biol.* 36, pp. 51-61.
- Parker, G.H. (1891) The compound eyes in crustaceans. *Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard)*, 21, pp. 45-140.
- Payne, R., Corson, D.W. y Fein, A. (1986) Pressure injection of calcium both excites and adapts Limulus ventral photoreceptors., *J. Gen. Physiol.*, 88, pp. 107-126.
- Payne, R., Corson, D.W., Fein, A. y Berridge, M. (1986) Excitation and adaptation of Limulus ventral photoreceptors by inositol 1,4,5 triphosphate result from a rise in intracellular calcium., *J. Gen. Physiol.*, 88, pp. 127-142.
- Payne, R. y Fein, A. (1986) The initial response of Limulus ventral photoreceptors to bright flashes. Released calcium as a synergist to excitation., *J. Gen. Physiol.*, 87, pp. 243-269.
- Payne, R. y Howard, J. (1981) Response of an insect photoreceptor: a simple log-normal model., *Nature (Lond.)*, 290, pp. 415-416.
- Pepose, J.S. y Lisman, J.E. (1978) Voltage-sensitive potassium channels in Limulus ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 71, pp. 101-120.
- Prosser, C.L. y Brown, C.L. (1961) *Fisiologia Comparada*. Ed. Interamericana, S.A., 2a. ed., México, pp. 539-574.
- Smith, T.G., Steel, W.K. y Brown, J.E. (1968) A role for the sodium pump in photoreception in Limulus., *Science*, 162, pp. 456-458.
- Spray, D.C., Saez, J.C., Burt, J.M., Watanabe, T., Reid, L.M. y

- Bennett, M.V.C. (1988) Gap junctional conductance. Multiple sites of regulation. En: Modern Cell Biology (Gap junctions). Vol. 7, eds. Hertzberg, E.L. & Johnsson, R.G., pp. 227-244. New York; Alan R. Liss, Inc.
- Stieve, H. y Classen-Linke (1980) The effect of changed extracellular calcium and sodium concentration on the electroretinogram of the crayfish retina., Z. Naturforsch., 35C, pp. 308-318.
- Stieve, H. y Bruns, M. (1983) Bump latency distribution and bump adaptation of Limulus ventral nerve photoreceptor in varied extracellular calcium concentrations., Biophys. Struct. Mech., 9, pp. 329-339.
- Tritthart, H., MacLeod, D.P., Stierle, H.E. y Krause, H. (1973) Effects of Ca-free and EDTA-containing tyrode solution on transmembrane electrical activity and contraction in guinea pig papillary muscle. Pflugers Arch. 338, pp. 361-376.
- Tsutsumi, V., Frixione, E. y Arechiga, H. (1981) Transformations in the cytoplasmic structure of crayfish retinula cells during light- and dark-adaptation. J. Comp. Physiol. A, 145, pp. 179-189.
- Van Harreveld, A. (1936) A physiological solution for fresh water crustaceans., Soc. Exptl. Biol. Med., 34, pp. 428-432.
- Wald, G. (1967) Visual pigments of crayfish., Nature, 215, pp. 1131-1133.
- Wald, G. (1968) Single and multiple visual systems in arthropods. J. Gen. Physiol., 51, pp. 125-156.
- Waterman, T.H. (1961) The Physiology of Crustacea. Sense organs, integration and behaviour. Vol. II, Academic Press, New York - London.
- Waterman, T.H. (1979) Handbook of Sensory Physiology. Vision in Invertebrates. H. Autrum, ed., vol. VII/6B, Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 281-469.
- Waterman, T.H., Fernandez, H.R. y Goldsmith, T.H. (1969) Dichroism of photosensitive pigment in rhabdomes of the crayfish Orconectes., J. Gen. Physiol., 54, pp. 415-432.
- Waterman, T.H. y Fernandez, H.R. (1970) E-vector and wavelength discrimination by retinular cells of the crayfish Procambarus., Z. Vgl. Physiol., 68, pp. 154-174.
- White, R.H. y Lord, E. (1975) Diminution and enlargement of the mosquito rhabdom in lighth and darkness. J. Gen.

Physiol. 65, pp. 583-598.

Wong, F., Lantz, R.C. y Mauro, A. (1979) The role of calcium ions in the suppression of the photoresponse during anoxia and application of metabolic inhibitors. Vision Res. 19, pp. 251-254.