



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA HORMONA HIPERGLICEMIANTE
DE LOS CRUSTACEOS SOBRE LA ACTIVIDAD
ELECTRICA DE LA RETINA DEL ACOCIL
Procambarus clarkii ‘in vitro’”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MORELIA AIXCHEL SANCHEZ ORTIZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA LUISA FANJUL PERA



2004
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

NOMBRE: Morelia Aixchel Sánchez Ortiz
FECHA: 8-Junio-2004
FIRMA: Morelia A. Sánchez O.

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Efecto de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos sobre la actividad eléctrica de la retina del acocil Procambarus clarkii "in vitro""

realizado por Morelia Aixchel Sánchez Ortiz

con número de cuenta 09621162-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. María Luisa Fanjul Peña

Propietario

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Marcia Hiriart U.

Propietario

M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

Suplente

Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte

Suplente

M. en C. José Luis Arreola Ramírez

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

...Cuando me buscas
miras a todas partes
excepto a tu lado.
Cuando te buscas
miras a todas partes
pero no dentro de tí...

Peace: An end; *King Crimson*

Dedico este trabajo a las realidades y utopías que le dan diversos sentidos a mi existencia.

A los esfuerzos, alegrías, tristezas y experiencias que he vivido, compartido y superado con todos ustedes. Lo cual me ha hecho crecer y descubrir que la libertad se lleva en las neuronas de cada individuo y por lo tanto cada quien construye sus propias reglas para volar...

Le hablo al viento

Dijo el hombre puntual al hombre atrasado
¿Dónde has estado?
He estado aquí y he estado allí
y he estado entre ambos.

Le hablo al viento
Mis palabras se dispersan
Le hablo al viento
El viento no oye
El viento no puede oír.

Estoy en el exterior mirando el interior
que veo
muchoa confusión, desilución,
todo a mi alrededor.

Tú no me posees
no me impresionas
solo me disgustas
No puedes instruirme o conducirme
solo hacerme perder el tiempo.

Le hablo al viento
Mis palabras se dispersan
Le hablo al viento
El viento no oye
El viento no puede oír.

Ian McDonald y Peter Sinfield; *King Crimson*

Le agradezco al H. Jurado por el tiempo otorgado a la revisión de este trabajo, así como al Dr. Alberto Huberman por habernos proporcionado la isoforma II de la CHH para realizar los experimentos.

De forma especial quiero agradecer a la Dra. María Luisa Fanjul y al M. en C. Julio Prieto por la dirección de este trabajo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul Peña y el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN-212901

ÍNDICE

Página

1 RESUMEN	
2 INTRODUCCIÓN	1
2.1 GENERALIDADES DEL ACOCIL	1
2.2 SISTEMA NEUROENDOCRINO	2
2.2.1 SISTEMA NERVIOSO	2
2.2.2 MORFOFISIOLOGÍA DE LA RETINA DEL ACOCIL	4
2.2.3 SISTEMA ENDOCRINO	10
2.3 HORMONA HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS (CHH)	11
2.3.1 FAMILIA DE LA CHH EN LOS CRUSTÁCEOS	11
2.3.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y EL PAPEL DE LA CHH EN EL ACOCIL	12
2.3.3 METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN LA RETINA DE INVERTEBRADOS	19
2.4 RITMOS BIOLÓGICOS	20
2.4.1 DEFINICIÓN, CONCEPTOS Y CLASIFICACIÓN	20
2.4.2 RITMOS CIRCADIANOS EN EL ACOCIL	23
2.4.3 RITMO DE AMPLITUD DEL ERG	24
3 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	28
4 HIPÓTESIS	29
5 OBJETIVO	30
6 MATERIAL Y MÉTODO	31
6.1 ANIMALES	31
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	31
6.2.1 CONDICIONES LUMÍNICAS	31
6.2.2 DISECCIÓN DE LA RETINA Y REGISTRO DEL ERG	31
6.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	33

7 RESULTADOS	36
7.1 ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO	36
7.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CHH Y LA GLUCOSA	36
8 DISCUSIÓN	45
9 BIBLIOGRAFÍA	49

1 RESUMEN

Con el objeto de determinar tanto el efecto de la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH) como el de la D-glucosa sobre la amplitud del electroretinograma (ERG) de *Procambarus clarkii*, se registraron 50 retinas de animales adultos en período de intermuda, divididos en dos grupos experimentales y un control. En un primer grupo se caracterizó el efecto de la glucosa sobre la amplitud del ERG, en el segundo grupo se probó el efecto de tres diferentes concentraciones de CHH sobre este mismo parámetro. Cada grupo se subdividió en 2 subgrupos. En el primero, el registro se realizó durante el día subjetivo del acocil y en el segundo durante la noche subjetiva. Para cada uno de los experimentos se utilizaron 5 retinas *in vitro* por condición (control, CHH 100 pM, 1 nM, 10 nM y glucosa 1.6 mM). El protocolo para cada uno de los experimentos consistió en registrar la magnitud del ERG de la retina durante tres horas, aplicando la condición correspondiente durante la primera hora y activando el sistema de perfusión en las últimas dos horas de registro. Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov. Los resultados obtenidos revelan diferencias significativas entre el minuto -10 y el minuto 60 de los experimentos con CHH 1 nM y 10 nM a las 03 00 y diferencias significativas entre el minuto -10 con los minutos 20, 40 y 60 de los experimentos con glucosa 1.6 mM a las 10 00. Lo anterior indica que la CHH disminuye la amplitud del ERG durante la noche y la glucosa aumenta la amplitud de dicho parámetro durante el día, lo cual sugiere que la glucosa es un sustrato metabólico utilizado por los fotorreceptores y que la CHH podría tener una acción moduladora en la sensibilidad a la luz de la retina.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 GENERALIDADES DEL ACOCIL

Los acociles son crustáceos de agua dulce pertenecientes al Orden Decapoda representando al grupo Astacida. El género *Procambarus* corresponde a la familia Cambaridae que se distribuye en el Hemisferio Norte (Holdich, 2002). Estos organismos presentan adaptaciones fisiológicas, morfológicas y conductuales ya que habitan en diversos ambientes (Nyström, 2002).

Algunos acociles como *Procambarus clarkii* son considerados como especies clave en su hábitat con un impacto biológico importante debido a sus actividades tróficas y cavadoras (Holdich, 2002). Esta especie se distribuye principalmente en el noreste de México y en la zona sur del centro de Estados Unidos. Presenta un plan corporal que incluye un caparazón que se extiende posteriormente para cubrir y envolver el tórax, tallos oculares móviles, antenas, un exópodo antenal, pereopodos con exopodos flageliformes bien desarrollados, abdomen con musculatura desarrollada, uropodos y de 1-5 pleopodos (Vogt, 2002).

Procambarus clarkii es un animal nocturno, activo durante el período de frío que presenta un alto grado de interacción social y hábitos caníbales (Gherardi, 2002). Esta especie como muchas otras, ha sido objeto de estudios electrofisiológicos que han dado información acerca del funcionamiento del sistema nervioso y de los ritmos circadianos. En la década de los años 70 los acociles se convierten en un modelo para examinar principalmente la fisiología de los ritmos biológicos (Gherardi, 2002).

2.2 SISTEMA NEUROENDOCRINO

2.2.1 SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso de los crustáceos es una de las formas más primitivas en los animales. Es un sistema en escalera formado por ganglios bilaterales unidos en una línea media por comisuras y de forma longitudinal por conectivos. En los decápodos consiste en un cordón ventral doble y series de ganglios fusionados: un ganglio cerebral que incluye el protocerebro, deutocerebro y tritocerebro, conectivos circumesofágicos, un ganglio subesofágico, 5 ganglios torácicos y 6 ganglios abdominales. De cada ganglio surgen tres pares de nervios que contienen elementos motores y sensoriales (Sandeman, 1982).

El sistema nervioso está constituido por tres tipos principales de neuronas: sensoriales, motoras e interneuronas. Los somas de las neuronas se encuentran localizados en los órganos sensoriales o en los ganglios que están organizados típicamente dentro de un neuropilo central. Éste incluye axones, dendritas y sinapsis, rodeados por grupos periféricos de somas celulares. Estos ganglios están llenos de vasos y cavidades venosas envueltos por el perineurio, una capa compuesta de fibras colágenas y láminas celulares (Vogt, 2002)

Dentro de la organización del sistema se puede distinguir el cerebro o ganglio supraesofágico y un cordón nervioso longitudinal que se localiza debajo del tracto digestivo. El cerebro se encuentra situado en la parte anterior del cefalotórax y está conectado al ganglio subesofágico por dos conectivos circumesofageales. El ganglio subesofágico da lugar al cordón nervioso ventral que consiste de 5 ganglios torácicos y 6 abdominales que están unidos por conectivos (Fig. 1). El lado derecho e izquierdo de los ganglios de cada segmento están fusionados dentro de una unidad, los conectivos de ambos lados están separados entre el ganglio torácico 3 y 5. La parte torácica del cordón nervioso ventral está situada en la cavidad esternal y rodeada por el esqueleto

endofragmático. La parte abdominal se extiende desprotegida entre el intestino y la arteria ventral abdominal.

El cerebro da lugar a 5 pares de nervios y a 2 nervios, los primeros incluyen al nervio óptico, nervio oculomotor, nervio antenular, nervio antenario y nervio tegumetario. Los otros dos nervios son los que unen al cerebro con el sistema estomatogástrico. El ganglio subesofágico tiene 11 raíces nerviosas sobre cada lado, 7 nervios se extienden a la glándula antenal, mandíbula, maxilula, maxila y maxilipedos 1-3. Cuatro nervios se extienden a los músculos dorsoventral y longitudinal del tórax. El ganglio torácico solo tiene una raíz sobre cada lado, el nervio pedal conecta los axones motores y sensoriales hacia y desde las patas, y tres pequeños nervios, los cuales corren desde las coxas, musculatura corporal segmental y el integumento hacia el corazón. Los ganglios abdominales 1-5 dan lugar a tres pares de nervios, supliendo la musculatura natatoria y abdominal de propioceptores y mecanorreceptores pleurales. El sexto ganglio abdominal tiene 6 raíces pareadas y una impar. Las pareadas son nervios sensoriales y motores de la musculatura rostral abdominal. La raíz impar se extiende dentro de tres branquias (Vogt, 2002).

Órganos sensoriales

Los acociles poseen interoceptores y exteroceptores que proveen información del exterior e interior del cuerpo del animal al sistema nervioso central. Los exteroceptores comprenden órganos sensoriales como los ojos, los quimiorreceptores, y pelillos que detectan los estímulos que llegan a la superficie del cuerpo, como la luz, olor, sonidos y estímulos hidrodinámicos. Los interoceptores son estructuras sensoriales internas que responden a los cambios dentro del cuerpo del animal, incluyen a los propioceptores que envían información al sistema nervioso sobre la posición y movimiento del cuerpo, los quimiorreceptores y los barorreceptores regulan el estado químico de los fluidos corporales y la presión sanguínea respectivamente (Vogt, 2002).

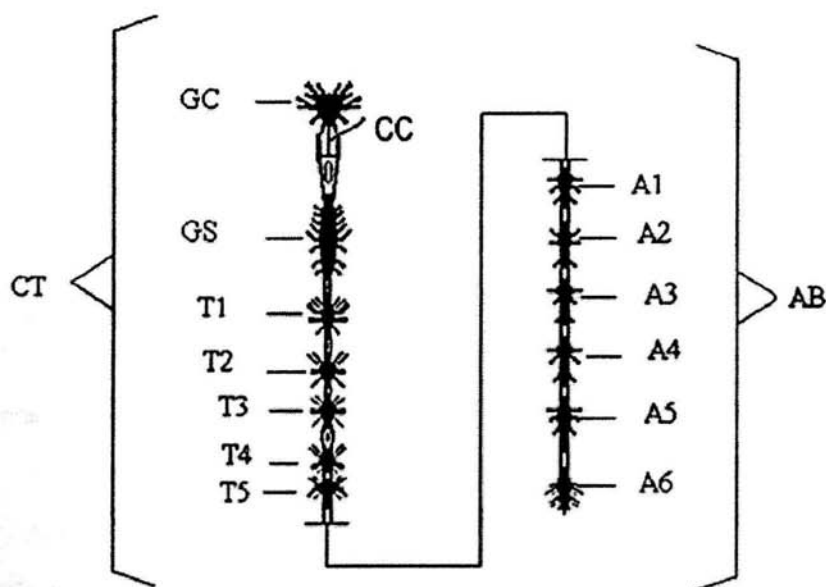


Figura 1: Sistema nervioso central del acocil. CT cefalotórax; AB abdomen; GC ganglio circumesofágico; CC conectivos circumesofágicos; GS ganglio subesofágico; T1-T5 ganglios torácicos; A1-A6 ganglios abdominales (Modificado de Sandeman, 1982)

2.2.2 MORFOFISIOLOGÍA DE LA RETINA DEL ACOCIL

Los acociles poseen tallos oculares que en la parte distal conforman a los ojos de tipo compuesto, constituidos por omatidias que forman la retina (Fig. 3A), debajo de esta se encuentran los lóbulos ópticos que comprenden todo el tejido nervioso (neuropilos y prolongaciones neuronales) y conectan a los ojos con el ganglio cerebroides.

Retina

La unidad básica del ojo es la omatidia (Fig. 3B) y alrededor de 2500 constituyen la retina del acocil. Cada omatidia está formada por cuatro elementos, el aparato dióptico, el aparato fotosensible, una capa de pigmentos y células tapetales. El aparato dióptico incluye la córnea que está constituida por una cutícula transparente de un grosor de $60\mu\text{m}$ y forma el límite óptico entre el medio externo y el medio acuoso o cono cristalino. La córnea es secretada por un par de pequeñas células cornéagenas en cada omatidia. Los conos cristalinos son estructuras acuosas transparentes formadas por cuatro células llamadas cono estrechamente unidas por la parte central, en las cuales las principales inclusiones intracelulares visibles son partículas de glucógeno (Shaw y Stowe, 1982; Vogt, 2002).

El aparato fotosensible lo constituyen ocho células retinulares (R1-R8) bien desarrolladas que poseen una porción fotosensible orientada hacia el eje central de la omatidia llamada rabdomero, en la que la superficie membranosa que contiene el fopigmento se expande formando microvellosidades estrechamente empaquetadas, aumentando así el área fotosensible en el receptor.

Las microvellosidades de las células R1 a R7 forman el rabdomo central de tipo cerrado que contiene el pigmento rodopsina, mientras que la célula R8 forma un rabdomo separado con microvellosidades horizontales, lo cual sugiere que esta célula es un receptor con diferente espectro de sensibilidad o es parte de un sistema fotosensible especializado que funciona como un filtro de luz. Los axones de las células retinulares penetran en la membrana basal formando fascículos (Nassel, 1992; Randall *et al.*, 1998).

La luz penetra a través del cono cristalino y es conducida hasta las células retinulares, parte de está es absorbida por las moléculas del fopigmento rodopsina que se encuentra en la membrana del rabdomero donde comienza la fototransducción. El primer paso en el proceso visual, consiste en la transducción de la energía fótica a energía electroquímica mediante la isomerización del fopigmento, esto hace que se modifique la estructura de las moléculas de rodopsina por una conversión del isómero 11-cis-retinal al isómero todo-trans-retinal (Ghidalia, 1985). El proceso de transducción de la luz culmina

cuando se producen potenciales de receptor que consisten en despolarizaciones del potencial de membrana de las células receptoras, debido a la apertura de canales iónicos que permiten la entrada de cationes en las células. En la oscuridad, estos canales se cierran y la membrana se repolariza.

El término de *pigmentos accesorios* se utiliza para describir a los pigmentos filtrantes que se encuentran rodeando a las omatidias (Halberg y Elofsson, 1989), son otros elementos importantes en la captación de la luz y su migración dentro del ojo está relacionada con los niveles de iluminación. Su posición modula el flujo de luz sobre la membrana fotosensible en el rabdomo, de forma similar a una pseudopupila. Los pigmentos más importantes son: el pigmento distal (PD) compuesto por gránulos oscuros que se localizan dentro de las células alargadas adyacentes a los elementos omatidiales de la córnea y la membrana basal. El pigmento proximal (PP) localizado en el interior de las células retinulares rodeando el rabdomo. En oscuridad, el pigmento distal se retrae hacia la córnea mientras que el pigmento proximal migra en posición opuesta, es decir, hacia los axones de las células retinulares. Como resultado de lo anterior, la zona cristalina y el área que rodea el rabdomo se encuentran totalmente expuestas. Bajo iluminación, ambos pigmentos se dispersan, ocupando gran parte de las células y modulando la cantidad de luz que llega a los fotorreceptores (Fig. 3B). Los gránulos oscuros que conforman a estos dos pigmentos son melanina y omocromos. El tercer tipo de pigmento es el llamado reflector, que es blanco cuando refleja la luz y se vuelve café cuando absorbe la luz, este pigmento es una mezcla de purinas y pterinas (Kleinholz, 1961).

En el acocil las células que contienen el pigmento reflejante denominadas células tapetales, se encuentran alrededor de las omatidias, el papel de estas células es el de aislar a las omatidias de rayos de luz oblicuos (Ghidalia, 1985; Rao, 1985) aunque se ha propuesto que pudieran tener una función similar a la glial (Escamilla *et al.*, 2001). Además de su influencia en la sensibilidad absoluta, sensibilidad angular y sensibilidad espectral, los pigmentos accesorios juegan un papel importante en la protección de los fotorreceptores de la luz brillante y parecen tener un efecto modulador sobre la organización de las membranas de los fotorreceptores (Rao, 1985).

La respuesta eléctrica de los fotorreceptores a la luz se puede medir a través del electroretinograma (ERG). Esta es una respuesta que se registra de forma extracelular, mide la diferencia de potencial a través del fluido extracelular entre el electrodo colocado en el ojo y el electrodo de referencia (Fig. 2). El ERG de *P. clarkii* es originado por dos estructuras, las células retinulares y el rabdomo, su magnitud y polaridad dependen de la duración del estímulo e intensidad (Naka y Kuwabara, 1959). En otros grupos de animales, este registro ha sido una herramienta importante para estudiar los procesos metabólicos (disponibilidad de glucosa) que se reflejan en la electrofisiología de la retina (Lopez y Sannita, 1997; Macaluso *et al.*, 1992; Niemeyer, 1997).

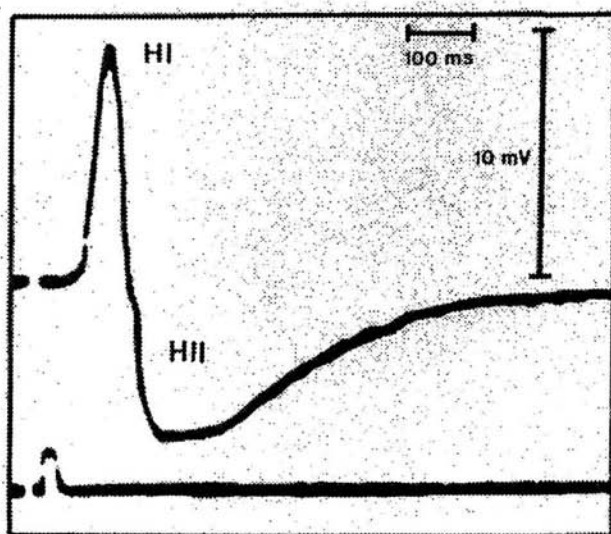


Figura 2: Componentes del electroretinograma (ERG). Este dibujo representa el ERG obtenido en la parte exterior de las células retinulares. Se observan tanto el componente HI como el componente HII. El trazo de abajo muestra un artefacto en el momento en el que se aplica la estimulación luminosa, el dibujo está basado en una fotografía de la pantalla del osciloscopio. Las barras señalan los valores de calibración del registro. (Redibujado de Naka y Kuwabara, 1959).

Lóbulo óptico

Por debajo de la retina se encuentra la lámina ganglionaris, seguida por cuatro neuropilos, la médula externa, médula interna, médula terminalis y el cuerpo hemielipsoidal, estos últimos dos se distinguen de los anteriores por que carecen de una estructura geométrica bien definida y además el cuerpo hemielipsoidal es un neuropilo glomerular. La lámina ganglionaris y las médulas están constituidas por una región fibrosa central formada por fibras nerviosas, glía y algunas neuronas, y una región periférica formada por células nerviosas neurosecretoras (Shivers, 1967). Los cinco ganglios del lóbulo óptico se encuentran empaquetados en el segmento distal del tallo ocular (Fig 3C). Estos neuropilos están interconectados mediante dos quiasmas el externo y el interno, el primero se encuentra entre la médula externa y la médula interna, el segundo se localiza entre la médula interna y la médula terminalis; entre la médula externa y la interna, hacia la región lateral externa, se encuentra un conjunto de terminales axónicas rodeada de senos venosos, la glándula sinusal, y hacia la región frontal lateral interna de la médula terminalis está el órgano X constituido por células neurosecretoras, cuyos axones terminan formando la glándula sinusal (Fig. 3C). Por último, se origina de la médula terminalis el tracto óptico también llamado nervio óptico que llega al ganglio cerebroide (Sandeman, 1982).

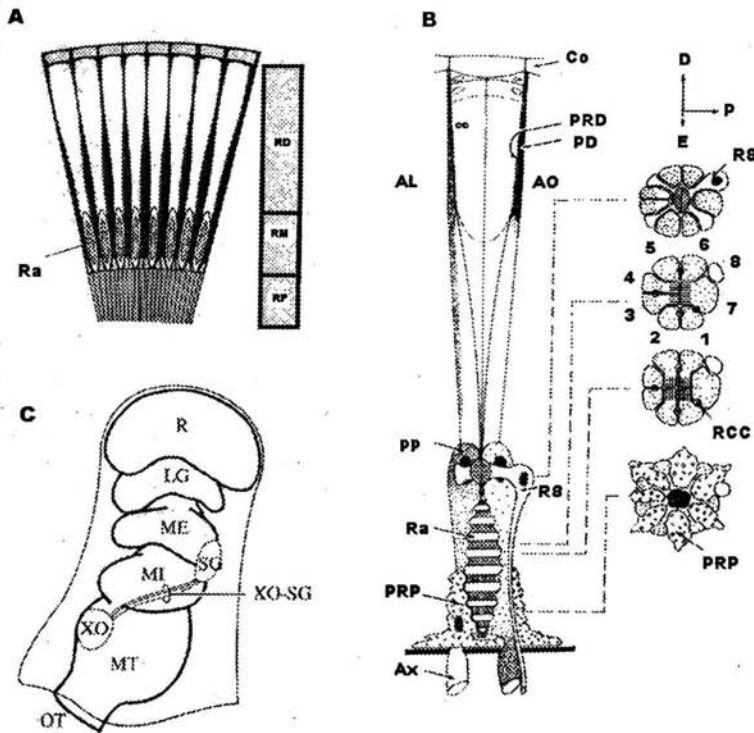


Figura 3: (A) Representación esquemática de un grupo de ommatidias y axones de las células retinulares. RP región proximal; RM región media; RD región distal. (B) Ommatidia del acocil. El dibujo de la izquierda muestra un corte longitudinal en el que se observa el movimiento de pigmentos tanto en adaptación a la luz (AL) como en adaptación a la oscuridad (AO). Los dibujos de la derecha muestran cortes transversales de la ommatidia a diferentes niveles según lo indican las líneas punteadas. Los números en el segundo corte de estos dibujos, señalan las diferentes células de la ommatidia. Las coordenadas de referencia D, P, E, en la parte superior de esta serie de dibujos indican la dirección dorsal, posterior y ecuatorial, respectivamente. Co córnea, PRD pigmento reflejante distal, CC cono cristalino, PD pigmento distal, PP pigmento proximal, R8 célula retinular 8, Ra rabdomo, PRP pigmento retiniano proximal, Ax axón, RCC raíz del cono cristalino. (C) Tallo ocular. R retina; LG lámina ganglionaris; ME médula externa; MI médula interna; MT médula terminalis; SG glándula sinusal; XO órgano X; XO-GS tracto órgano X-glándula sinusal; OT tracto óptico. (Redibujado de Escamilla *et al.*, 2001 y Shaw y Stowe, 1982).

2.2.3 SISTEMA ENDOCRINO

El sistema endocrino del acocil está constituido por órganos de origen neural o epitelial, compuestos por una agrupación de somas de neuronas secretoras que sintetizan hormonas. Los axones proyectan dentro de órganos neurohemales donde las hormonas se liberan a la hemolinfa. Los órganos neuroendocrinos del acocil incluyen el complejo órgano X- glándula sinusal (OXGS), el órgano postcomisural y el órgano pericardial. Los órganos endocrinos de naturaleza epitelial están compuestos por grupos de células epiteliales modificadas que sintetizan hormonas y las liberan a los senos venosos adyacentes. El órgano mandibular, órgano Y y la glándula androgénica son típicos órganos endócrinos epiteliales. Las hormonas que secretan estos órganos son de naturaleza peptídica (Vogt, 2002).

Como en los vertebrados, el sistema endocrino del acocil está organizado jerárquicamente. El complejo OXGS es análogo en función al eje hipotalámico-hipofisario de los vertebrados y es una glándula de gran importancia en el sistema endocrino de los acociles ya que secreta hormonas glandotrópicas y hormonas metabólicas. Las primeras actúan sobre glándulas endocrinas y regulan la secreción de distintas hormonas. Las hormonas efectoras de naturaleza metabólica actúan directamente sobre los tejidos regulando su metabolismo, un ejemplo de este tipo de hormonas producida por el complejo OXGS es la hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) que actúa sobre el hepatopáncreas.

Complejo OX-GS

El complejo órgano X-glándula sinusal (OXGS) es el centro neuroendocrino del acocil y sobre el que se han hecho diversas investigaciones (Fingerman, 1992; Taketomi *et al.*, 1992; citados en Vogt, 2002). Se localiza en los tallos oculares y se compone del órgano X y la glándula sinusal. El OX es un conglomerado de 150-200 células neurosecretoras localizadas en la periferia de la médula terminalis. Los axones de estas neuronas proyectan dentro de la glándula sinusal (Andrew *et al.*, 1978; citado en Vogt, 2002) que se encuentra situada en una posición dorsolateral sobre la médula externa e

interna. La GS está constituida por terminales axónicas y cavidades venosas, muchos de estos axones se proyectan desde el órgano X, pero otros provienen de áreas endocrinas del tallo ocular o del cerebro. La liberación de hormonas en las cavidades hemales está bajo control neural y puede ser influenciado por neuromoduladores (Vogt, 2002).

La función del complejo OXGS involucra procesos como: muda, crecimiento, maduración sexual y regulación del metabolismo, también es el origen de hormonas que median adaptaciones de funciones metabólicas a condiciones ambientales. Estas funciones incluyen, regulación de niveles de glucosa en la hemolinfa y concentración osmótica e iónica, adaptación a la luz y quizá al mantenimiento de diferentes ritmos circadianos (Cooke y Sullivan, 1982).

Este complejo sintetiza hormonas metabotrópicas que actúan sobre el metabolismo y hormonas cromatoforotrópicas que actúan sobre los cromatóforos (Keller, 1992). Algunas de estas hormonas son miembros de la familia de la CHH que incluyen la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH), hormona inhibidora de la muda (MIH), hormona inhibidora de la vitelogénesis (VIH) y la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH). Las cromatoforotropinas comprenden a la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH) y la hormona dispersora del pigmento distal (PDH) (Vogt, 2002).

2.3 HORMONA HIPERGLUCEMIANTE DE CRUSTÁCEOS (CHH)

2.3.1 FAMILIA DE LA CHH EN LOS CRUSTÁCEOS

En los crustáceos existen tres neuropéptidos con características químicas y secuencias similares que sugieren tener un ancestro común molecular, estos tres neuropéptidos son la CHH, MIH y VIH. Se sintetizan en la médula terminalis del OX y son transportados a través el tracto axonal hasta la GS, donde son almacenadas y liberadas. A diferencia de otros neuropéptidos se ha sugerido que además de su papel humoral realizan una función adicional como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el sistema nervioso de los crustáceos. En la especie *Carcinus maenas*, la CHH es el péptido más abundante en la GS, su papel central es la regulación del metabolismo de carbohidratos, mientras que las funciones principales de la MIH y de la VIH son, la inhibición de la

síntesis de ecdisteroides y la inhibición de la vitelogénesis respectivamente (Keller, 1992; Huberman, 2000). La CHH se ha caracterizado como un péptido de 8.3 KDa, que presenta especificidad en su actividad biológica, demostrando diferencias en las respuestas fisiológicas a la inyección de extracto de tallos oculares entre diferentes especies de crustáceos decápodos (Huberman *et al.*, 1993; Kleinholz y Keller, 1973).

A través de pruebas bioquímicas e inmunohistoquímicas se ha reportado la presencia de CHH en la GS de cinco especies de crustáceos, *Homarus americanus*, *Procambarus clarkii*, *Procambarus bouvieri*, *Astacus leptodactylus* y *Orconectes limosus*, así como en las células del ganglio subesofágico y en las raíces del ganglio torácico de la langosta *Homarus americanus*, y también en las células tapetales de la retina del acocil *Procambarus clarkii* (Chang *et al.*, 1999, Escamilla *et al.*, 2001, Huberman y Aguilar, 1988, Ollivaux y Soyez, 2000, Yasuda *et al.*, 1994)

En el acocil *Procambarus clarkii* se han caracterizado dos isoformas de la hormona hiperglucemiante, CHH-I y CHH -II, las cuales contienen entre 72 y 73 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuro que interconectan a seis residuos de cisteína y difieren una de la otra por el cambio en la configuración del tercer aminoácido, el cual puede ser L o D-fenilalanina, la CHH-II presenta la forma D (Yasuda *et al.*, 1994). Ambas isoformas tienen un residuo Val-amida como carboxilo terminal y un residuo piro-Glu como amino terminal (Yasuda *et al.*, 1994). La CHH se sintetiza a partir de un preproCHH constituido por un péptido señal, un propéptido denominado CPRP y la secuencia de CHH (Van Herp, 1998).

2.3.2 METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y EL PAPEL DE LA CHH EN EL ACOCIL

CHH y metabolismo de la glucosa

La CHH induce hiperglucemia e hiperlipemia en la hemolinfa y juega un papel crucial en el metabolismo de carbohidratos y lípidos requeridos por los órganos y tejidos (Vogt, 2002). La secreción de dicha hormona se ha estudiado en diferentes especies de acociles.

En los tallos oculares del acocil *Astacus leptodactylus*, las células productoras de CHH forman parte de la médula terminalis del OX (MTOX), son una agrupación de 32 células que se encuentran en la parte distal de la MTOX, sus axones forman un tracto que atraviesa desde el neuropilo de la médula terminalis hasta la médula externa formando la GS. Estudios de microscopía electrónica revelan una reacción inmunopositiva a los gránulos que contienen CHH en las células secretoras, en la GS la inmunoreacción se limita a solo un tipo de gránulo (Gorgels-Kallen y Van Herp, 1981).

Estudios de inmunocitoquímica de los tallos oculares durante el ciclo de vida larval y postlarval del acocil *Astacus leptodactylus*, demuestran inmunopositividad a la CHH en la MTOX, en el tracto MTOX-GS y en parte de los axones terminales de la GS, inmediatamente después de la eclosión. El número de las células inmunopositivas y el tamaño de los gránulos incrementa durante el desarrollo (Gorgels-Kallen y Meij, 1985).

Los estados secretores de las células individuales productoras de CHH en los tallos oculares del acocil *Astacus leptodactylus* se han determinado mediante estudios de inmunohistoquímica y morfometría. Los análisis morfométricos con microscopía de luz sugieren la existencia de tres categorías de células inmunopositivas que representan diferentes estados en el proceso de síntesis de la CHH en el curso del ciclo de 24 horas. Las células que sintetizan la CHH, inician su actividad dos horas antes de que inicie la fase de oscuridad, resultando en una transferencia de los gránulos de CHH a los axones. Estos gránulos llegan a las terminales axonales de la GS al comenzar la fase de oscuridad y se inicia la actividad exocitótica, causando la liberación de la CHH en la hemolinfa. Cuatro horas después de la liberación, se presenta la hiperglicemia (Gorgels-Kallen y Voorter, 1984; Gorgels-Kallen y Voorter, 1985).

Con respecto al papel de la CHH en el metabolismo de los carbohidratos, también se han hecho estudios en distintas especies de acociles que han esclarecido la función de la hormona en los mecanismos que intervienen en la regulación de los niveles de glucosa.

Keller y Jaros (1985), sugirieron que la CHH induce hiperglicemia mediante una movilización de glucosa desde las reservas de carbohidratos actuando sobre diversas vías metabólicas y contribuyendo a la adaptación metabólica del animal. En los crustáceos, la

glucogenólisis y glucogénesis se llevan a cabo mediante dos vías, la que involucra la UDPG-GT y en la que interviene la enzima glucógeno fosforilasa (Ramamurthi *et al.*, 1968). Las investigaciones sobre el papel fisiológico de la CHH se han enfocado en la acción que tiene sobre dichas vías. Se ha demostrado un aumento de glucógeno después de la ablación de los tallos oculares y una disminución después de la administración de extracto de tallos oculares en diferentes especies de crustáceos (Santos y Keller, 1993b).

En el acocil *Orconectes limosus* se reportó una disminución de glucógeno y una reducción de incorporación de glucosa [^{14}C] a glucógeno después de la incubación del hepatopáncreas con CHH y se sugirió que era éste un importante órgano blanco (Sedlmeier, 1987). Posterior a dicho estudio, Kummer y Keller (1993) reportaron una alta afinidad de unión de la CHH a las membranas del plasma del hepatopáncreas en las especies *Carcinus maenas* y *Orconectes limosus* sugiriendo la existencia de receptores específicos para la CHH.

La extirpación de los tallos oculares resulta en un incremento en la actividad de la glucógeno sintasa I en el músculo del acocil *Orconectes limosus*. La inyección de CHH en animales sin tallos oculares disminuye la actividad de la enzima y aumenta los niveles de nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc, lo cual sugiere una correlación entre la inactivación de la glucógeno sintasa y el incremento de los nucleótidos cíclicos evocada por la CHH. Los nucleótidos cíclicos provocan el mismo efecto que la CHH *in vivo* e *in vitro*. Además la proteína cinasa dependiente de nucleótidos es activada por la hormona llevando a cabo una fosforilación y una posterior inhibición de la enzima glucógeno sintasa, es decir, que la CHH inhibe la actividad de la glucógeno sintasa a través de la proteína cinasa por una vía de segundos mensajeros (Sedlmeier, 1982, 1985, 1987). La dependencia del calcio en el proceso de la glucogenólisis y la acción de la CHH involucran a la proteína calmodulina ligada al Ca^{+2} , esta proteína existe como una subunidad de la fosforilasa cinasa (Smullen *et al.*, 1996). Las enzimas adenilato ciclasa y guanilato ciclasa que sintetizan los nucleótidos son dependientes de Ca^{+2} /calmodulina y también se encuentran relacionadas con el proceso de glucogenólisis (Sedlmeier, 1985) (Fig. 4).

Por otro lado, también se sugirió la acción de la CHH sobre la enzima glucógeno fosforilasa. Ramamurthi y colaboradores (1968) reportaron la disminución en la

actividad de esta enzima en el tejido muscular de la especie *Hemigrapsus mudus* después de la ablación de los tallos oculares y su activación con la administración del extracto de los tallos oculares.

Las investigaciones que hasta ahora se han mencionado, han resultado en un esquema general en el que la CHH regula los niveles de glucosa al unirse a los receptores de membrana en el hepatopáncreas y el músculo abdominal (Kummer y Keller, 1993), seguida de la producción de AMPc y GMPc, los cuales se unen a una proteína cinasa, activando la enzima glucógeno fosforilasa e inhibiendo a la glucógeno sintasa (Sedlmeier, 1985) (Fig. 4).

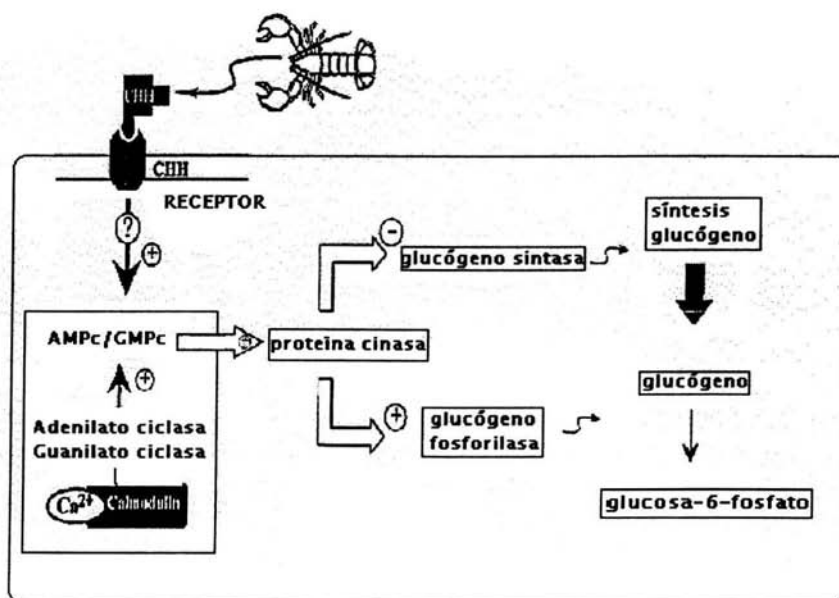


Figura 4: Modelo propuesto para la regulación de glucogenólisis por activación de un receptor de CHH. Evidencias experimentales indican que existen receptores específicos a CHH en diversos tejidos. Explicación en el texto. + activación, - inhibición. (Redibujado de Smullen *et al.*, 1996)

Por otro lado, también se han realizado investigaciones de la regulación entre los niveles de glucosa y los de CHH que han reportado un mecanismo de retroalimentación negativa entre ellas.

Santos y Keller (1993a) demostraron que la inyección de glucosa y lactato en el cangrejo *Carcinus maenas* provocan cambios significativos en los niveles de CHH. La glucosa provoca disminución de CHH y lactato, mientras que el lactato presenta un efecto estimulador en los niveles de la hormona y la glucosa. Lo anterior sugiere que durante el incremento del flujo glucolítico, el lactato puede causar una liberación de CHH a través de un mecanismo de retroalimentación positiva, por lo cual la hormona puede estimular la glucogenólisis aumentando la glucosa disponible provocando que el exceso de concentración suprima la liberación de CHH. Posterior a esta investigación, se reportó que las neuronas productoras de CHH en el complejo OXGS parecen estar bajo una regulación a través de una asa de retroalimentación negativa con los niveles de glucosa en la hemolinfa. Esto se demostró en experimentos con cultivo de células neuroendocrinas del OX del cangrejo *Cancer borealis*, donde una subpoblación de estas células responde a la D-glucosa mediante una hiperpolarización ya que se activa la corriente de K^+ , en este estudio también se encontró que estas células presentan inmunoreactividad a la CHH. Cuando los niveles de D-glucosa son bajos en la hemolinfa, la corriente de K^+ decrece por lo que las células productoras de CHH se despolarizan y liberan la hormona, induciendo la hidrólisis del glucógeno con un consecuente incremento en la concentración de la D-glucosa en la hemolinfa (Fig. 5A). Cuando la concentración de D-glucosa en la hemolinfa aumentan, los transportadores de la glucosa en las células productoras de CHH son activados, los canales de K^+ se abren, las células se hiperpolarizan y se inhibe liberación de la CHH, como consecuencia los niveles de glucosa en la hemolinfa disminuyen (Fig. 5B) (Glowik *et al.*, 1997).

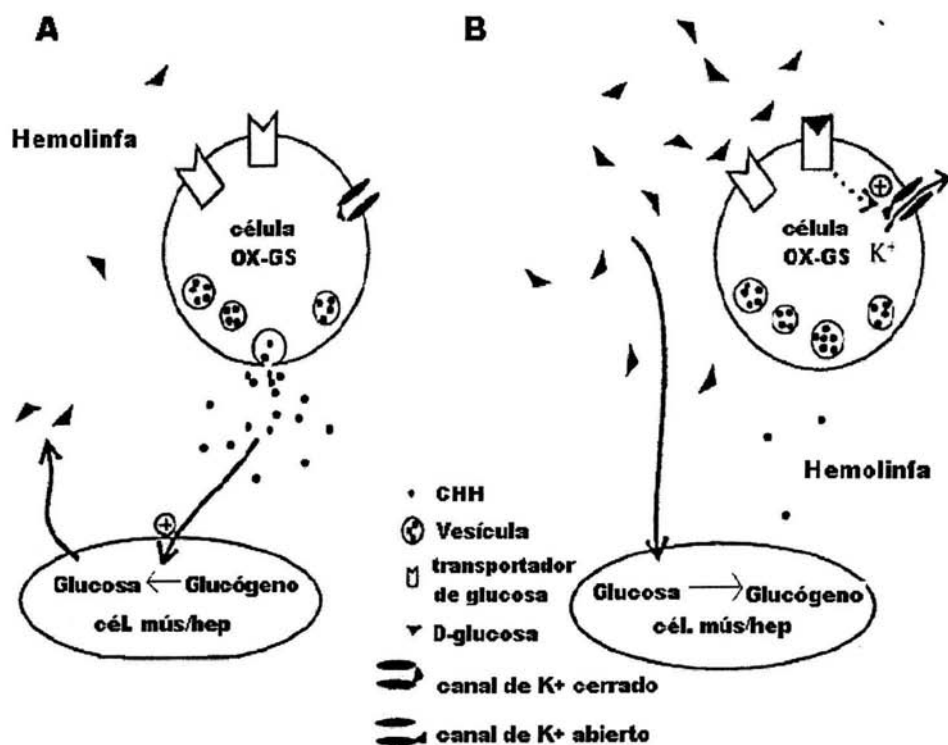


Figura 5: Modelo propuesto para la acción de la D- glucosa sobre las neuronas que contienen CHH del complejo OX-GS. (A) El nivel de D-glucosa es bajo, la corriente de K⁺ decrece, por lo que las células de CHH se despolarizan y liberan la hormona, que al actuar sobre sus células blanco aumentan el nivel de glucosa. (B) El nivel de D-glucosa es alto, los canales de K⁺ se abren, las células se hiperpolarizan y se inhibe la liberación de CHH, disminuyendo los niveles de glucosa. (Redibujado de Glowik *et al.*, 1997).

Control neuroendocrino de la liberación de la CHH

Shivers y colaboradores (1967) sugirieron la presencia de neuromoduladores aminérgicos en los axones presinápticos de las células neurosecretoras de crustáceos. Posteriormente, se hicieron experimentos *in vivo* con el acocil *Procambarus clarkii* para probar el efecto de la inyección de dopamina (DA) y de Leu-encefalina (Leu-enc) y se reportó que estos neurotransmisores provocaban hipoglucemia en los animales, por otro lado, también se hicieron experimentos *in vitro* en tallos oculares del mismo animal y se encontró que ambos, reducen la velocidad de liberación de la CHH, lo cual sugiere dos aspectos, DA y Leu-enc inhiben la liberación de la CHH afectando el complejo neuroendocrino de los tallos oculares y la existencia de una conexión entre las neuronas inhibitorias encefalinérgicas y dopaminérgicas con las células neurosecretoras de CHH (Sarojini *et al.*, 1995).

En el acocil *Orconectes limosus*, existe un efecto inhibitorio de dos encefalinas, Leu-enc y Met-enc, sobre la liberación de las dos isoformas de la CHH sintetizadas en las células neurosecretoras del complejo OXGS. Leu-enc tiene una acción dual, ya que en dosis altas estimula la liberación de la hormona y en dosis bajas la inhibe. Estudios de inmunofluorescencia de tallos oculares revelaron la entrada directa de las neuronas encefalinérgicas a las células del OXGS que sintetizan la CHH, lo que corrobora la existencia del control encefalinérgico de la liberación de la CHH a través de un contacto sináptico directo (Ollivaux *et al.*, 2002).

Por otro lado, estudios sobre la regulación serotoninérgica de la secreción de CHH en el acocil *Procambarus clarkii* (Lee *et al.*, 2001), reportaron que la serotonina (5-HT) incrementa la liberación de la CHH de forma dosis-dependiente en los tallos oculares *in vitro*, sugiriendo que este neurotransmisor activa un mecanismo que estimula la secreción al tener contacto con los receptores de las células neurosecretoras del OX.

Estudios de inmunohistoquímica han demostrado inmunoreactividad a CHH en las células tapetales de la retina, inmunoreactividad a 5-HT en terminales nerviosas del OX y localización *in vitro* de células retinianas secretoras de CHH sensibles a la 5-HT.

Existen coincidencias en los cambios cíclicos en la cantidad de 5-HT y CHH en las células tapetales (Escamilla *et al.*, 2001; 2002), estos autores sugieren que la CHH producida por las células del OX podría pasar a través de la membrana basal y entrar en las células tapetales para contribuir a diferentes funciones metabólicas relacionadas con la sensibilidad del ojo o que dichas células sean las que sintetizan la hormona.

Los estudios realizados por Keller y colaboradores (1994), revelan que la estimulación eléctrica del tracto axonal del complejo OXGS del cangrejo *Cardisoma carnifex* incrementa la secreción de CHH dos o tres veces más de los niveles normales y que la elevación de la concentración de K^+ también aumenta la secreción.

2.3.3 METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN RETINA DE INVERTEBRADOS

Los estudios sobre el metabolismo de la glucosa en la retina de invertebrados se han limitado a la especie de abeja *Apis mellifera*, donde existen dos tipos de células, los fotorreceptores y las células gliales, siendo en estas últimas donde se lleva a cabo la glucólisis. Durante la fotoestimulación, el aumento del metabolismo oxidativo de las neuronas es sostenido por un suplemento de carbohidratos desde las células gliales (Tsacopoulos *et al.*, 1988). La glia contribuye a la homeostasis del potasio y el sodio extracelular, y a su vez fosforila a la glucosa (Coles, 1989). Se ha reportado que las células gliales transforman la glucosa a alanina para que sea consumida por las neuronas fotorreceptoras así como también la prolina exógena, el uso de prolina implica una gran producción de amonio estímulo-dependiente en los fotorreceptores que a su vez contribuye a la biosíntesis de alanina en glia. La señalización que depende de la conversión de amonio y glutamato a alanina y α -cetoglutarato (respectivamente), en las células gliales indica una regulación de la función nutritiva de estas células (Tsacopoulos *et al.*, 1993; 1994; 1997a; 1997b).

2.4 RITMOS BIOLÓGICOS

2.4.1 DEFINICIÓN, CONCEPTOS Y CLASIFICACIÓN

La mayoría de las especies que habitan la Tierra modifican sus mecanismos fisiológicos y conductuales cuando cambian los factores biológicos y físicos del ambiente debido al movimiento de rotación terrestre (Horton, 2001). Esta capacidad de los organismos, se debe a la incorporación de copias aproximadas del programa temporal externo en un programa temporal endógeno denominado reloj biológico (Aschoff, 1984), el cual permite una sincronización temporal entre el organismo y los ciclos ambientales, y una sincronización entre los sistemas bioquímicos y fisiológicos de cada organismo (Pittendrigh, 1993).

Al poder medir el tiempo, los seres vivos presentan ritmos biológicos, es decir, cambios cíclicos en su fisiología, conducta y procesos bioquímicos que se repiten periódicamente.

Tanto los ritmos como sus relojes, dividen el tiempo en unidades para poder regular un ciclo fisiológico. Parecido a un péndulo, el reloj biológico oscila, pasando repetidamente a través de un estado fisiológico en intervalos regulares (Brady, 1979).

En el contexto de ciclos fisiológicos oscilantes, la analogía con una rueda de bicicleta es quizá más apropiada que un péndulo que se balancea. Si marcamos un punto en la rueda y luego la movemos hacia adelante, el punto trazará una onda sinusoidal (Fig. 6). Una revolución de la rueda que se marca desde el punto α hasta el punto α' , corresponde a un ciclo completo de la oscilación. La amplitud resulta ser igual al diámetro de la rueda y es independiente del tiempo, mientras que el período corresponde al tiempo que se toma de ir del punto α al punto α' , es decir, el tiempo que se toma en completar una oscilación. Otro parámetro es la frecuencia, el cual se refiere al número de revoluciones que la rueda hace por unidad de tiempo. La frecuencia es recíproca al período ya que al ser mayor la velocidad de la rueda, el período disminuye y la frecuencia aumenta (Brady, 1979).

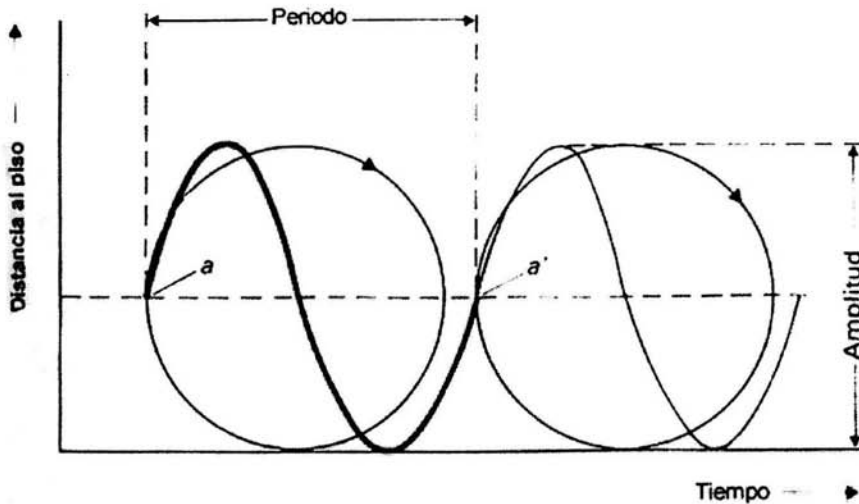


Figura 6: Representación gráfica de los conceptos de oscilación y su ciclo. La línea delgada contra tiempo de la onda sinusoidal desplazados del punto *a* hasta el punto *a'* en la rueda a través de un ciclo completo de rotación. La ordenada es la amplitud de la oscilación y la abscisa representa el tiempo. (Brady, 1979).

La frecuencia de los ritmos es la razón para una subdivisión del espectro en ritmos ultradianos e infradianos. Los ritmos ultradianos se definen como un fenómeno que se presenta recurrentemente en períodos menores a 19 horas, por lo que se presentan con una frecuencia mayor a la de un día. Los ritmos infradianos tiene períodos mayores a 29 horas, por lo que su frecuencia es menor a la de un día.

Existen cuatro ritmos biológicos que se asocian con algunos ciclos geofísicos que presentan diferentes períodos y se denominan circarritmos. Los ritmos circadianos con un período cercano a las 24 horas y asociados al ciclo de luz y oscuridad, los circamareales (período de 12.5 h) asociados a las mareas, los circalunares (período cercano a los 28 días) y los circanuales (período cercano a 365 días) (Aschoff, 1984).

Los ritmos circadianos son fluctuaciones en las actividades conductuales y en los procesos fisiológicos de los organismos en un período cercano a las 24 horas (Hardin, 2000), por lo que el ciclo de luz y oscuridad es el principal agente sincronizador del reloj circadiano de muchas especies (Turek y Takahashi, 2001). Aunque estos ritmos sean paralelos a dicho ciclo geofísico, son generados por mecanismos endógenos dirigidos por el reloj circadiano, lo cual les da la característica de ser endógenos. Persisten en ausencia de señales ambientales y en condiciones constantes de luz y temperatura, son susceptibles a ser sincronizados por los cambios cíclicos externos y compensan los cambios de temperatura (Hardin, 2000).

A nivel molecular los relojes circadianos están constituidos por asas de retroalimentación negativa integradas por los denominados genes del reloj y sus productos proteicos (Hardin, 2000), en los cuales ocurren las vías de salida del reloj (revisión en Roenneberg y Mellow, 2003).

La asa de retroalimentación se lleva a cabo de la siguiente forma: un gen es transcrito y traducido en una proteína. Dicha proteína inhibe su propia transcripción de forma directa o indirecta, reiniciando el ciclo cuando es degradada. El resultado es una oscilación cercana a 24 h de RNA y proteína, como se observa en algunos genes del reloj y sus productos (revisión en Roenneberg y Mellow, 2003)

En invertebrados, la mosca de la fruta ha sido un modelo para el estudio de los genes y las proteínas del reloj circadiano. En este organismo el mecanismo molecular se lleva a cabo en las neuronas laterales del cerebro y consiste en dos asas de retroalimentación de genes que oscilan de manera circadiana y se entrelazan. Los genes que participan en este mecanismo son: *period (per)*, *timeless (tim)*, *clock (clk)*, *cycle (cyc)* y *cryptochrome (cry)*.

La primera asa se inicia cuando se acumulan las proteínas PER y TIM en el citoplasma, donde forman dímeros que se translocan al núcleo para regular de forma negativa su propia transcripción al inhibir al activador transcripcional constituido por el dímero dCLK/CYC. En la segunda asa, CLK reprime su propia transcripción al formar un dímero con CYC y el complejo PER/TIM funciona como un antirepresor que activa su síntesis y hace oscilar los niveles de CLK. Todos los elementos tienen su pico y son activos

en la noche, la luz activa a la proteína CRY que causa una rápida degradación de TIM (revisión en Ashmore y Sehgal, 2003).

A diferencia de la mosca de la fruta, en mamíferos, los componentes moleculares que constituyen al reloj son tres genes *per*, dos genes *cry*, *clock* y proteínas Bmal. Dichos elementos se encuentran en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y los niveles más altos se presentan durante el día, el mecanismo del reloj también se realiza a través de asas de retroalimentación negativa (revisión en Duffield, 2003).

En los acociles, solo se ha identificado la presencia de la proteína CRY en el protocerebro y en el complejo médula terminalis - cuerpo hemielipsoidal de los lóbulos ópticos (Fanjul-Moles *et al.*, 2004), sin embargo aún no se estudian las bases genéticas del reloj de estos organismos.

2.4.2 RITMOS CIRCADIANOS EN EL ACOCIL

Investigaciones sobre fenómenos periódicos en distintos invertebrados proponen que el sistema neuroendocrino es el responsable de la generación y coordinación de la ritmicidad circadiana de algunas funciones fisiológicas y conductuales (Page, 1984). Los acociles adultos exhiben una gran variedad de ritmos circadianos, sin embargo los mecanismos fisiológicos subyacentes de estos ritmos aún son controversiales. Las investigaciones sobre los mecanismos del reloj se han centrado en dos ritmos; el ritmo de actividad locomotora y el ritmo de sensibilidad visual (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). En la especie *Procambarus clarkii*, se ha demostrado la persistencia del ritmo de actividad locomotora después de la ablación de los tallos oculares, aunque el aislamiento neural de los centros motores torácicos del ganglio supraesofágico resulta en una conducta arrítmica. Por lo anterior, se ha propuesto a dicho ganglio como el origen del ritmo de actividad locomotora. En esta misma investigación se reportó que el ritmo de migración de los pigmentos desaparece cuando se aíslan los tallos oculares del ganglio supraesofágico cortando el tracto óptico (Page y Larimer, 1975a). Estudios ontogenéticos en este animal revelan que el ritmo de actividad es dirigido por un oscilador funcional capaz de sincronizarse desde la etapa post embrionaria. Los estudios de sincronización, de ablación y

lesión indican que las respuestas circadianas a la luz blanca y monocromática en acociles juveniles es mediada por fotorreceptores extraretinianos (Fanjul-Moles, 1998). Con respecto al ritmo de amplitud del ERG en *Procambarus clarkii* se ha reportado una variación cíclica con un período de 23 a 25 horas aproximadamente cuando el animal está bajo oscuridad constante (Page y Larimer, 1975b). En esta misma especie se han hecho estudios del ritmo de la sensibilidad visual durante la ontogenia a través de los cambios de amplitud del ERG, algunos autores han propuesto que el ritmo circadiano expresado en animales adultos parece ser el producto de la maduración y acoplamiento de ritmos ultradianos durante la ontogenia (Fanjul-Moles *et al.*, 1987).

Otro ritmo circadiano que se ha estudiado en los acociles y que resulta importante en este trabajo es el ritmo de secreción de la CHH y su relación con los niveles de glucosa en la hemolinfa. En dos especies de acociles, *Astacus leptodactylus* y *Orconectes limosus* se ha reportado que los niveles máximos de CHH y glucosa en la hemolinfa se presentan durante la noche y que el ciclo de luz y oscuridad es el sincronizador más importante de ambos ritmos (Kallen *et al.*, 1988; Kallen *et al.*, 1990). En *Orconectes limosus* el nivel máximo de CHH es de 10 ng por 100 μ l de hemolinfa. En *Procambarus clarkii*, los niveles de glucosa en la hemolinfa varían en un rango de 10 a 30 mg por 100 ml de hemolinfa dependiendo la hora del día (Tilden, *et al.*, 2003).

2.4.3 RITMO DE AMPLITUD DEL ERG

El ritmo circadiano de amplitud del ERG es el resultado de las variaciones en la amplitud de la respuesta de los fotorreceptores a pulsos de luz durante el ciclo de 24 horas. Se ha propuesto que dicha variación depende de tres elementos celulares (Aréchiga *et al.*, 1993a), de la sensibilidad del fotorreceptor, de la posición de los gránulos del pigmento proximal (PP) dentro de las células fotorreceptoras y la posición del pigmento distal (PD). Como se mencionó anteriormente, estos pigmentos son efectores que responden a la luz con movimientos dentro de las células de cada omatidia. Durante el período de luz el PP se dispersa hacia los rabdómeros cubriendo a las células fotorreceptoras, mientras que en la oscuridad se retrae hacia los axones terminales de las

células retinulares. Como resultado de lo anterior, el flujo de luz transmitido a través de los rabdómeros decrece durante la adaptación a la luz y aumenta durante la adaptación a la oscuridad. El PD, de igual forma que el PP, se retrae en oscuridad constante y se dispersa bajo iluminación. Esta distribución de los pigmentos controla la apertura y el campo de visión de las omatidias. La apertura efectiva y el ángulo de admisión del flujo de luz es estrecho durante el estado de adaptación a la luz y amplio durante la adaptación a la oscuridad (Rao, 1985). Parece claro que bajo oscuridad constante el contribuyente principal a la ritmicidad circadiana en la retina es el mecanismo que controla la actividad del fotorreceptor y la migración del PP, y bajo luz es la migración del PD (Aréchiga *et al.*, 1993b).

El control de los movimientos fotomecánicos rítmicos de los pigmentos se encuentra bajo influencia hormonal regulada por luz (Kleinholz, 1961; Rao, 1985). El movimiento del PP se presenta en respuesta directa al ciclo de luz y oscuridad (Olivo y Larsen, 1978; Frixione y Aréchiga, 1979). Por otro lado, se ha reportado que existe una modulación serotoninérgica de la posición de los pigmentos en las células fotorreceptoras (Frixione y Hernández, 1989). La migración rítmica del pigmento distal está controlada por la hormona dispersora del pigmento (PDH) (Kleinholz, 1961; Aréchiga *et al.*, 1993) y estudios recientes sugieren que la hormona concentradora del pigmento rojo también está involucrada en el control de migración de este pigmento (Garfias *et al.*, 1995).

Los elementos reguladores de la ritmicidad circadiana de los movimientos de los pigmentos y los cambios de sensibilidad visual se han estudiado en dos especies de acociles *Procambarus bouvieri* (Barrera-Mera, 1976) y *Procambarus clarkii* (Page y Larimer, 1975b; Larimer y Smith, 1980). En estos acociles, ambos pigmentos presentan un ritmo circadiano de migración, mientras que el pigmento reflector no presenta movimiento. La ritmicidad de distribución de los pigmentos se relaciona con la variación circadiana de sensibilidad visual medida a través de los cambios en la amplitud del ERG (Rao, 1985). Los resultados de diferentes trabajos integrados en un modelo propuesto por Larimer y Smith (1980) sugieren que el ritmo circadiano de sensibilidad visual es regulado por un complejo mecanismo que involucra dos sincronizadores (fotorreceptores retinianos y

extraretinianos) y tres osciladores (las células retinulares, el sistema neuroendocrino de los tallos oculares y los centros del cerebro que se localizan en la línea media).

En el ritmo circadiano de la respuesta eléctrica a la luz, se observa un aumento en la amplitud cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad y este disminuye durante la adaptación a la luz, los movimientos de los pigmentos resultan en diferencias de la cantidad de fotones absorbidos por los fotorreceptores, modulando de esta forma la respuesta de dichas estructuras (Aréchiga y Wiersma, 1969; Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982). Es importante enfatizar que este ritmo circadiano solo se ha relacionado con el ritmo de migración de los pigmentos y con el cambio de conductancia en la retina (Fanjul-Moles y Prieto, 2003).

En la búsqueda del marcapasos y vías sincronizadoras que dirigen el ritmo circadiano del ERG, se han hecho experimentos de ablación y lesión de órganos en dos especies de acocil, *Procambarus clarkii* y *Procambarus bouvieri*. Estos estudios sugieren que el ritmo está controlado por mecanismos neurales y endocrinos que dependen del cerebro y estructuras neurosecretoras del lóbulo óptico (Fanjul-Moles y Prieto, 2003). Estudios sobre la liberación periódica de neurosecreciones de la GS y su papel en la generación y persistencia del ritmo circadiano del ERG en tallos oculares aislados y animales sin GS sugieren que esta estructura es un oscilador circadiano que participa en el sistema multioscilar que genera y mantiene el ritmo del ERG (Moreno-Sáenz *et al.*, 1987). Aréchiga (1973) (citado en Fanjul-Moles y Prieto, 2003) reportó la supresión de la amplitud del ERG y los ritmos de migración pigmentarios al remover el cerebro en el acocil. Page y Larimer (1975b) también reportaron que el ritmo de ERG desaparece después de lesionar el tracto protocerebral. Por otra parte, Barrera-Mera (1976) demostró que en preparaciones descerebradas o con destrucción del proto y deutero cerebro el ritmo del ERG se modifica, en esta misma investigación se sugiere que el cambio ultraestructural encontrado en la GS de los tallos oculares después de la lesión del ganglio cerebroides indica una regulación neurohumoral de la actividad retinal probablemente reflejada en cambios en la posición de los pigmentos accesorios.

También se ha investigado la existencia de un posible acoplamiento neural y una adaptación de ambos ojos a las condiciones lumínicas. En *Procambarus bouvieri* se expresan ambos mecanismos cuando sólo se estimula un ojo en animales intactos, lo cual sugiere la existencia de procesos sincronizadores que dirigen cambios circadianos del ERG de cada ojo (Barrera-Mera, 1978; Barrera-Mera y Berdeja, 1978). El acoplamiento neural puede ser provisto por fibras eferentes en el lóbulo óptico, en donde algunos axones contienen serotonina (Aréchiga *et al.*, 1990). La señal cerebral que llega a las estructuras neurosecretoras del lóbulo óptico es necesaria para la adaptación bilateral a la luz y a la estimulación retinal unilateral (Barrera-Mera y Berdeja, 1979), aunque la vía neurosecretora de hormonas también influye en el acoplamiento y sincronización del ritmo ya que el pigmento distal responde a hormonas como la DPH Y RPCH, las cuales presentan un ritmo circadiano tanto en animales intactos como en tallos oculares aislados (Aréchiga y Mena, 1975; Rodríguez-Sosa *et al.*, 1994).

La investigación sobre los cambios de sensibilidad visual se han centrado fundamentalmente en la migración de los pigmentos, parte de la ritmicidad del ERG ocurre de forma independiente a esta migración y constituye una oscilación intrínseca expresada por las células retinulares (Rao, 1985). Este fundamento se basa en las observaciones de una baja amplitud del ritmo del ERG en tallos oculares aislados, en los cuales los pigmentos no demuestran movimientos rítmicos (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1976), lo cual sugiere que es necesaria una conexión entre el cerebro y el lóbulo óptico para que el PP presente un ritmo. Aréchiga y colaboradores (1998) reportaron la persistencia del ritmo del ERG en preparaciones aisladas de retina y lamina ganglionaris (R-LG), el ritmo expresado es similar al que se encuentra en los tallos oculares aislados, lo que propone la idea de que los elementos celulares intrínsecos en esta región (R-LG) son capaces de generar ritmicidad.

El estudio del efecto de algunos neuropéptidos sobre el ritmo del ERG de crustáceos ha demostrado que la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH) aumenta la amplitud y la hormona dispersora del pigmento distal (PDH) y el péptido cardioactivo (CCAP) la disminuyen en el acócil *Orconectes limosus*, mientras que en *Limulus* los neuropéptidos denominados LP1-LP4 disminuyen la amplitud del ERG durante la noche (Gaus y Stieve, 1991; Gaus *et al.*, 1997).

3 PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En *Procambarus clarkii*, las secreciones diarias de diferentes neurohormonas en el complejo órgano X- glándula sinusal, afectan la sensibilidad circadiana del ojo (Aréchiga, 1993). La CHH se sintetiza y se libera desde el complejo OXGS (Keller, 1992), su ritmo circadiano está relacionado con el ritmo de glucosa en la hemolinfa (Gorgels-Kallen y Voorter, 1985; Kallen y Van Herp, 1990). Escamilla y colaboradores (2001) reportaron los cambios diarios en la expresión de la inmunoreactividad a CHH en las células tapetales de la retina, así como la secreción de esta hormona en células retinulares disociadas en cultivo (Escamilla *et al.*, 2002). Esta población celular parece corresponder a las células tapetales y es sensible a la serotonina, una neurohormona asociada a la sincronización de los ritmos circadianos, tanto en el acocil como en otras especies. Lo anterior ha llevado a proponer a estos autores que la retina sea un locus secretor de CHH, y que esta secreción, relacionada con la hora del día, contribuyen a los cambios en el metabolismo de la glucosa en la misma retina relacionados con la sensibilidad de los fotorreceptores, estructuras cuyo sustrato metabólico se desconoce.

Todo lo anterior sugiere las siguientes preguntas: ¿es la glucosa un sustrato metabólico utilizado por los fotorreceptores del acocil?. Puesto que la CHH actúa sobre las vías metabólicas glucogenolíticas y en la retina del acocil existen depósitos de glucógeno como reservas energéticas ¿la CHH actúa incrementando la respuesta de los fotorreceptores a la luz?. Estos mecanismos ¿dependen de las variaciones circadianas?.

En otros organismos, el ERG es un parámetro útil para estudiar de que forma la disponibilidad de glucosa influye en la electrofisiología de la retina (Lopez y Sannita, 1997; Macaluso *et al.*, 1992; Niemeyer, 1997), por lo tanto, para poder responder las preguntas anteriores, en este trabajo se considerarán los cambios en la magnitud del ERG como un marcador indirecto del metabolismo de la retina, asumiendo que si la glucosa es utilizada por los fotorreceptores como un sustrato metabólico y la CHH actúa favoreciendo las vías glucogenolíticas en la retina entonces la magnitud de la respuesta retiniana a la luz aumentará.

4 HIPÓTESIS

- Puesto que la glucosa es un sustrato metabólico de los fotorreceptores retinianos, su aplicación a la retina *in vitro* producirá un aumento en la amplitud del ERG.
- Al ser la CHH una hormona glucogenolítica, su aplicación sobre la retina *in vitro* producirá un aumento en la amplitud del ERG.
- La sensibilidad de la retina a la luz varía del día a la noche, por lo que esperamos que estas respuestas difieran con la hora del día.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la CHH y la glucosa sobre la actividad eléctrica de la retina *in vitro* de a dos diferentes horas del día, utilizando la amplitud del ERG como un marcador de los cambios del metabolismo de la retina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los cambios de la magnitud del ERG en la retina *in vitro* a una concentración elevada dentro de los límites fisiológicos de glucosa en la noche subjetiva y el día subjetivo de *P. clarkii*.
- Comprobar si existe una la relación dosis respuesta entre la CHH y la magnitud del ERG en la retina *in vitro* en la noche subjetiva y el día subjetivo del acocil *P. clarkii*.

6 MATERIAL Y MÉTODO

6.1 ANIMALES

Se utilizaron 50 acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii* colectados en el Río Conchos en Saucillo, Chihuahua, se colocaron en acuarios de aproximadamente 60 litros con filtros biológicos y se oxigenaron constantemente con una bomba. La temperatura se mantuvo a 20°C. Cada tercer día se alimentaron con verduras (chayote, calabaza y zanahoria).

6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.2.1 Condiciones lumínicas

Se formaron dos grupos experimentales y cada uno se sometió a un fotoperiodo distinto: 1) LO 12:12, encendido de la luz a las 07:00 y apagado a las 19:00, 2) LO 12:12, encendido a las 15:00 y apagado a las 03:00. Se establecieron estos fotoperiodos para que los registros del primer grupo experimental iniciaran a las 10:00 y los registros del segundo grupo experimental iniciaran a las 03:00.

6.2.2 Disección de la retina y registro del ERG

Para realizar la disección de la retina los acociles se inmovilizaron con hielo durante treinta minutos, inmediatamente se disectó el ojo derecho del animal perforando la superficie de la córnea para la inserción posterior del electrodo de registro. La retina se separó del lóbulo óptico y se colocó fija "*in vitro*" en una caja de petri en el interior de una cámara de registro aislada mediante una jaula de Faraday y conectada a un sistema de perfusión a través del cual se mantenía en un baño constante de solución Van Harreveld + HEPES (197.77 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 13.51 mM CaCl₂, 2.63 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.55) a una temperatura de 14° C. Una vez aislada y con el objeto de obtener la

respuesta extracelular a la luz (ERG), se insertó un semi-microelectrodo de tungsteno, conectado a un amplificador Grass P511, mediante una sonda de alta impedancia HIP511GA. La señal amplificada era enviada a un osciloscopio HAMEG HM205-3. El sistema de perfusión se inició una vez que el microelectrodo entró a la retina y que se obtuvo la respuesta eléctrica ante un pulso de luz blanca de 10 μ seg, procedente de un fotoestimulador Grass PS33 plus (ERG de prueba). Después de haber obtenido el ERG de prueba, la retina se mantuvo con el sistema de perfusión bajo condiciones de oscuridad durante dos horas, tiempo necesario para la recuperación fisiológica de las diferentes estructuras retinianas (Figura 8).

Una vez alcanzado el tiempo de recuperación se iniciaron los diferentes experimentos. Para todos los diseños experimentales el procedimiento fue el siguiente: la retina se estimuló con cuatro pulsos de luz cada siete segundos con el fotoestimulador programado con el estimulador Grass S48. Posteriormente se interrumpió el sistema de perfusión durante una hora en la cual la retina en cultivo fue estimulada con el mismo tren de estímulos luminosos cada diez minutos. En el minuto sesenta, y después del último tren de estimulación, el sistema de perfusión se reinició para estimular cada 10 minutos en esta segunda hora y cada 30 minutos en una tercera hora.

Los registros se digitalizaron por medio de un digitalizador Instrutech VR10 y grabados en una videograbadora SHARP VC-A206. Al mismo tiempo se capturaban en una computadora PC-XT conectada al VR10 a través de una tarjeta D/I y el programa VR-111 Versión 1.0.

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos: 1) control; el sistema de perfusión consistió en solución (Van-Harreveld+HEPES). 2) Experimentales, el procedimiento fue el mismo pero durante la primera hora de estimulación se aplicaban las diferentes concentraciones de CHH o 1.6 mM de glucosa. Cada una de los experimentos se llevaron cabo a las dos horas del día antes descritas.

Se realizaron 5 experimentos para cada condición (control, CHH 100 pM, CHH 1 nM, CHH 10 nM y glucosa 1.6mM) con los dos grupos experimentales.

6.3 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos en microvoltios fueron procesados en una hoja del cálculo del programa Corel Quatro Pro. Se hicieron las gráficas de amplitud del ERG con los datos promediados y los datos porcentualizados en el programa Sigma Plot para analizar las tendencias de los datos y posteriormente se hicieron curvas dosis-respuesta utilizando los promedios porcentualizados de los minutos -10, 20, 40, y 60 para cada condición experimental. El análisis estadístico que se aplicó para los experimentos fue la prueba no paramétrica Kolmogorov-Smirnov.

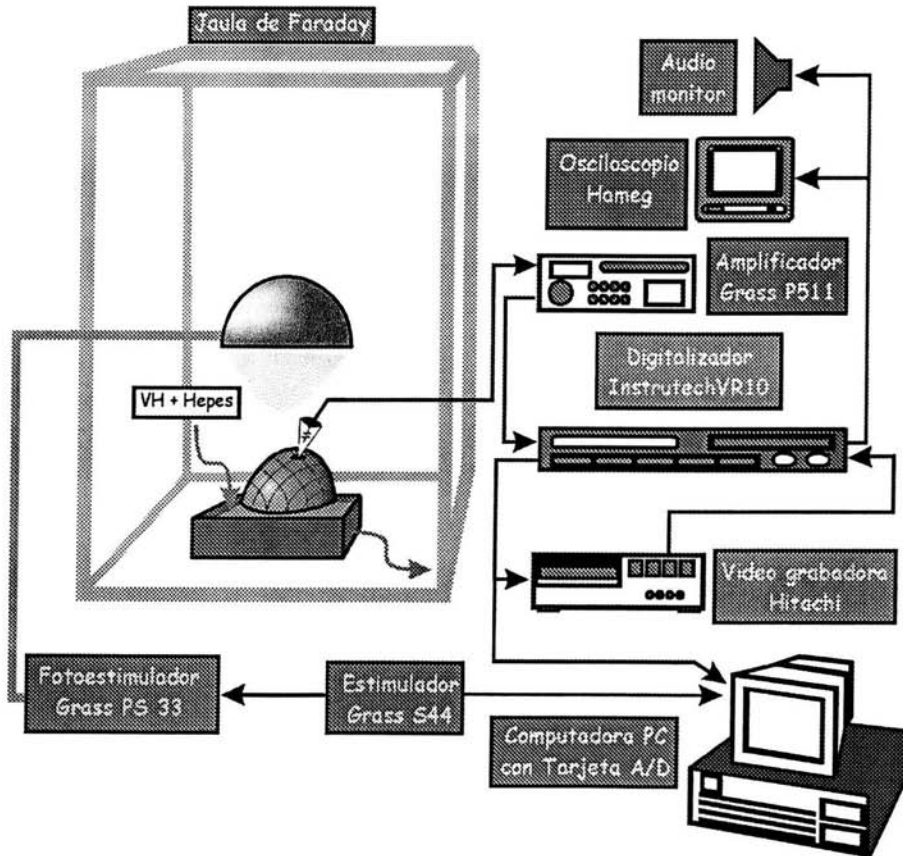


Figura 8. Diagrama de la retina durante el registro del ERG.

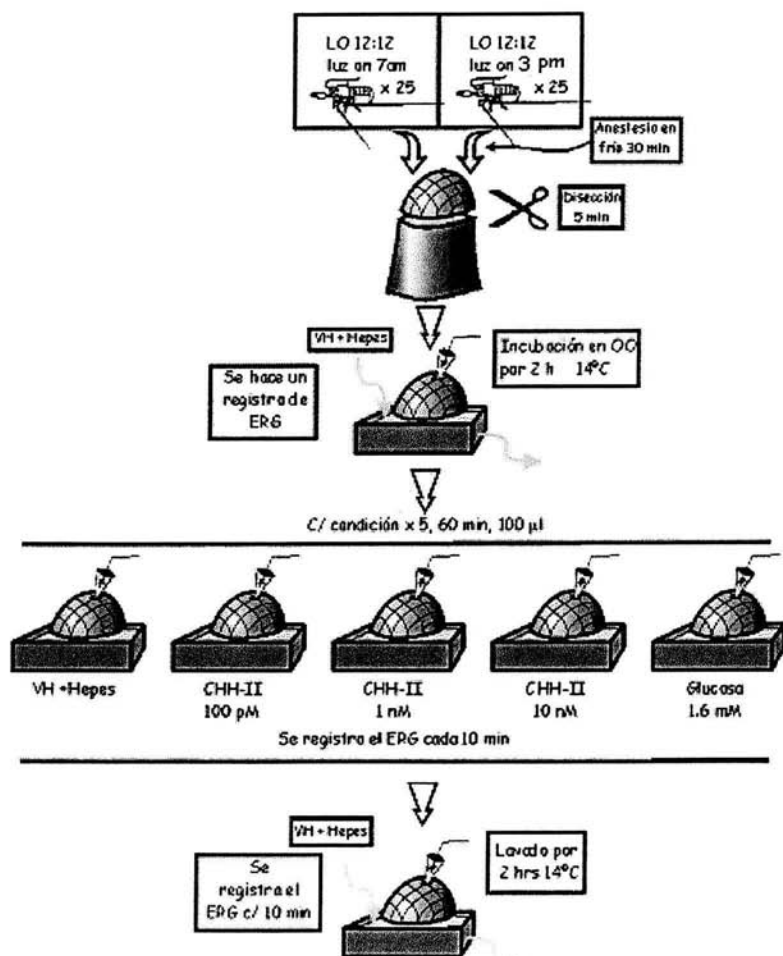


Figura 9. Protocolo experimental. Se utilizaron 25 acociles *P. clarkii* para cada hora analizada (10 00 y 03 00). Se diseccionó la retina y se colocó bajo un sistema de perfusión (VH+H) a 14°C. Después de dos horas se interrumpió el sistema de perfusión y se aplicó el VH+H (grupos control), CHH 100 pM, 1 nM, 10 nM y glucosa 1.6 mM (grupos experimentales). Después de una hora se reinició el sistema de perfusión para lavar la preparación.

7 RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO

La figura 10 muestra los cambios de voltaje en la retina a la estimulación lumínica de registros típicos control y experimentales al minuto -10 y al minuto 60 de las 10 00 y las 03 00. Al comparar los trazos del minuto -10 con los trazos del minuto 60 correspondientes a los experimentos control de las dos horas registradas (Fig. 9A y 9F), se puede observar que no hay cambios en la amplitud. Al comparar los trazos de los experimentos bajo las diferentes concentraciones de CHH de las 10 00 (Fig. 9B, 9C y 9D) el voltaje del ERG no cambia de manera significativa. Sin embargo, los trazos que corresponden a los experimentos de CHH registrados a las 03 00 (Fig. 9G, 9H y 9I) presentan un decremento significativo al minuto 60, siendo muy claro en los experimentos donde de CHH 1 nM y CHH 10 nM (Fig. 9H y 9I).

El efecto de la glucosa sobre el ERG en el día y la noche subjetivas del acocil, muestra un claro aumento de la amplitud del ERG al minuto 60 en experimentos realizados a las 10 00 (Fig. 9E), mientras que en experimentos realizados a las 03 00 no se observan cambios en la amplitud de los trazos (Fig. 9J)

7.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA CHH Y LA GLUCOSA

En la figura 10 se muestra el curso-temporal del ERG en las condiciones control y experimentales realizados a las 10 00 (cada punto es el promedio porcentualizado de cinco retinas). La figura 10A muestra un comportamiento estable de la respuesta en el grupo control. El porcentaje de amplitud del ERG durante los primeros 60 minutos de exposición a las diferentes concentraciones de CHH se mantiene cercano al 100% (Fig. 10B, 10C y 10D). En la figura 10B se puede observar una ligera caída de la amplitud al minuto 0, recuperándose al minuto 10 y manteniéndose cercano al 100% durante los siguientes 50 minutos, después del minuto 70 el porcentaje tiende a disminuir. Las figuras 10C y 10D, representan los experimentos a concentraciones 1 nM y 10 nM de CHH y no se observan cambios significativos en el porcentaje de amplitud del ERG durante la exposición a la hormona, ya que los valores de los primeros sesenta minutos se mantienen cercanos al 100%. Sin embargo en la figura 10C se observa una caída de la respuesta después del

lavado y hasta el minuto 180 del registro, mientras que en la figura 10D hay una gran variación de la respuesta entre el minuto 70 y el minuto 180.

El curso-temporal de los registros control y los experimentales a las 03 00 se muestra en la figura 11 (cada punto es el promedio porcentualizado de cinco retinas). El porcentaje de la respuesta permanece constante durante las tres horas del registro en el grupo control y el grupo correspondiente a la concentración 100 pM de la hormona (Fig. 11A y 11B), aunque en este último grupo, la respuesta parece incrementar después del lavado. En los grupos donde se aplicó CHH 1 nM y 10 nM, se observa que durante la exposición a la hormona hay un decremento de la amplitud y un aumento o recuperación de la respuesta después del lavado (las últimas dos horas del registro) (Fig. 11C y 11D).

La figura 12 resume los experimentos anteriores y presenta una relación dosis-respuesta de las 10 00 y las 03 00, donde las barras corresponden al promedio porcentualizado de los minutos -10, 20, 40 y 60 del grupo control y los grupos donde se aplicaron las diferentes concentraciones de CHH. Al analizar los valores del minuto-10 que corresponden al 100% de la amplitud con los minutos 20, 40 y 60 en cada grupo de los registros obtenidos a las 10 00 mediante la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.10$) (Fig. 12A). Cuando comparamos el minuto -10 con los minutos 20, 40 y 60 de los registros obtenidos a las 03 00, el grupo control y el grupo de CHH 100 pM no presenta diferencias significativas ($p > 0.10$), mientras que en los experimentos donde se aplicó CHH 1 nM y CHH 10 nM sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) y ($p < 0.025$) respectivamente (Fig. 12B).

El efecto de la glucosa sobre la amplitud del ERG produce por un claro aumento del porcentaje de amplitud en registros realizados a las 10 00 (Fig. 13A). Se puede observar un incremento inmediato de la respuesta después de la aplicación de la glucosa y durante los sesenta minutos de exposición a dicho monosacárido, aunque es importante hacer notar que la respuesta sigue aumentando después del lavado y hasta finalizar el registro. En los experimentos realizados a las 03 00 no se observan cambios durante la exposición a la glucosa, ya que los valores de la amplitud se mantienen cercanos al 100% los primeros sesenta minutos y tienden a disminuir las últimas dos horas del registro (Fig. 13B).

El efecto de la glucosa a las 10 00, fue analizado por la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov que se aplicó para comparar el minuto -10 con el minuto 20, 40 y 60 y se encontraron diferencias significativas $p < 0.025$. El efecto de la glucosa sobre el ERG durante la noche no produjo cambios significativos (Fig. 14).

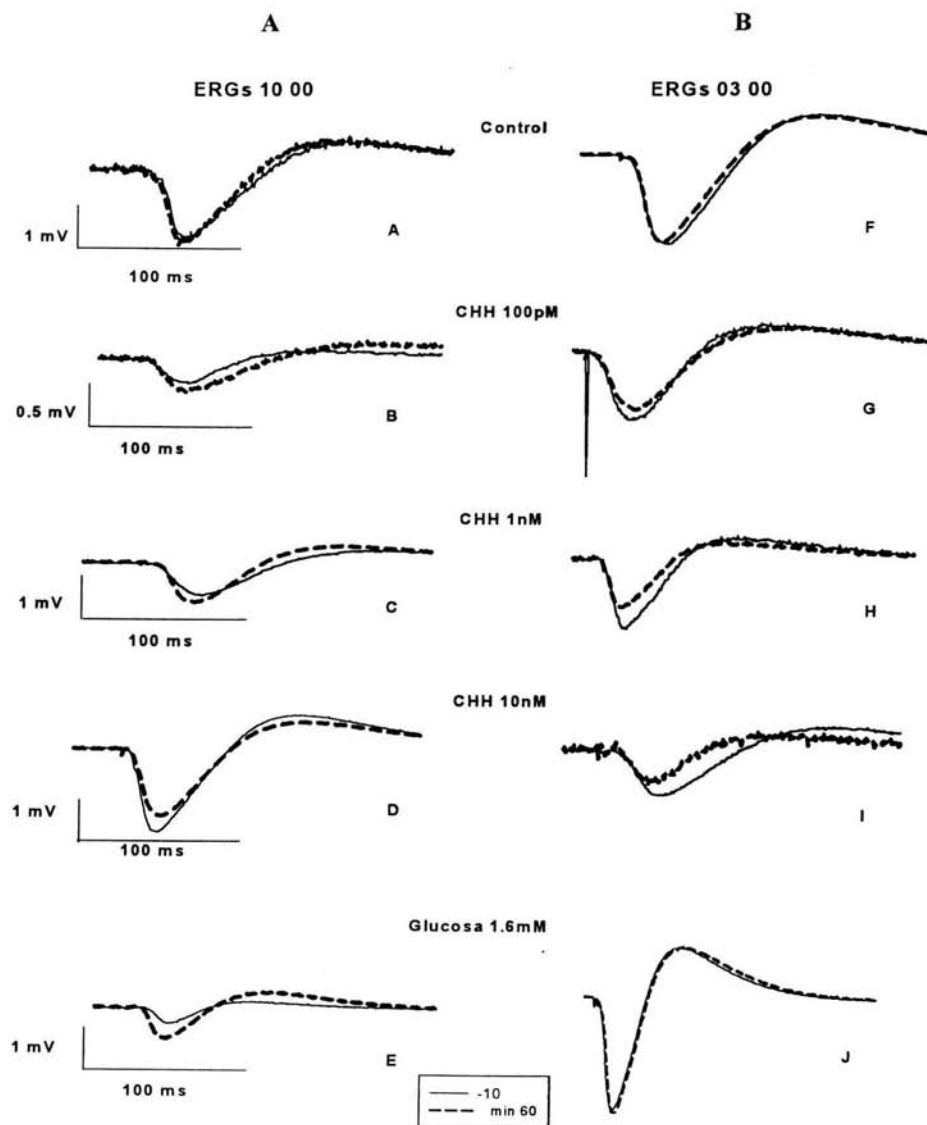


Figura 9: Trazos del ERG en los minutos -10 y 60 de los experimentos control, bajo diferentes dosis de CHH y glucosa 1.6 mM. A) Día subjetivo (10 00). B) Noche subjetiva (03 00).

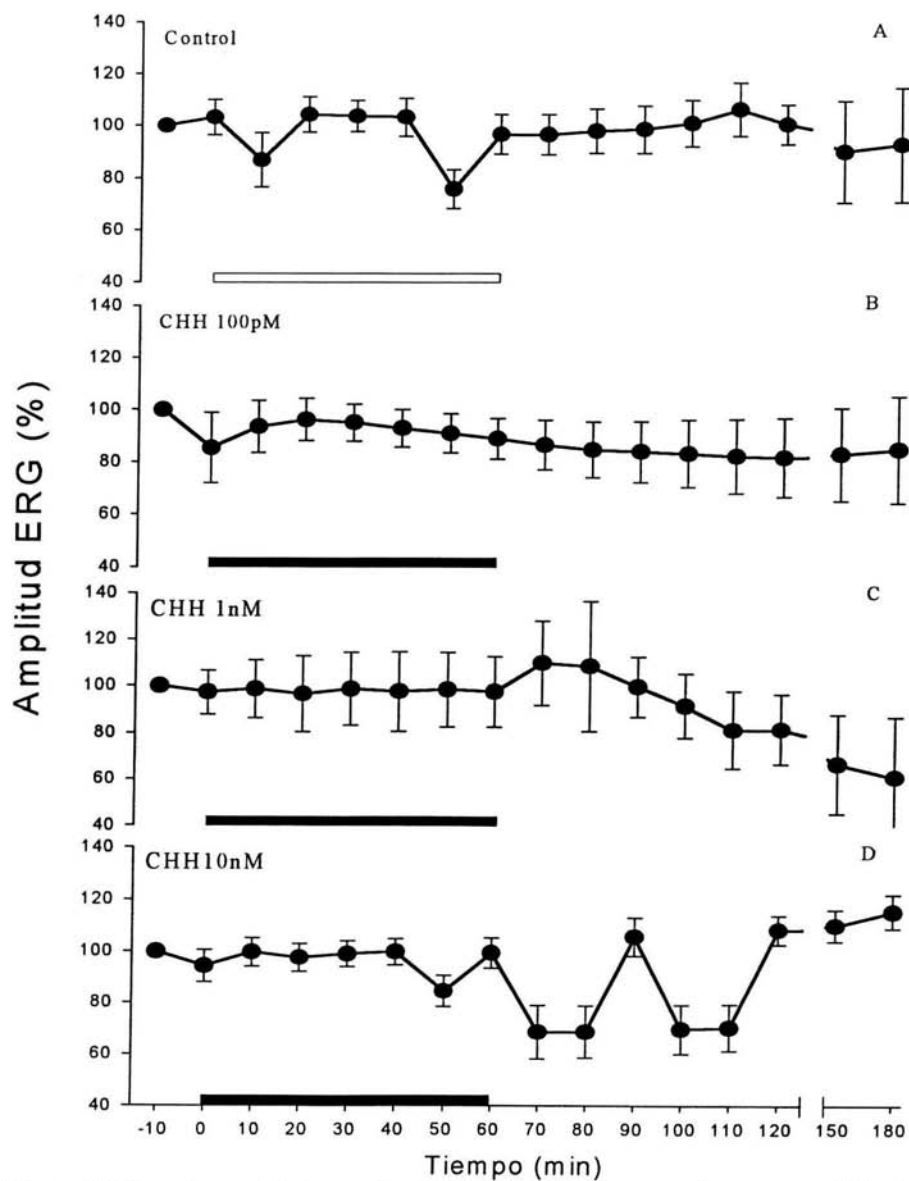


Figura. 10: Curso temporal de los cambios de amplitud del ERG en experimentos control (□) y ante diferentes dosis (■) de CHH durante el día subjetivo (10:00).

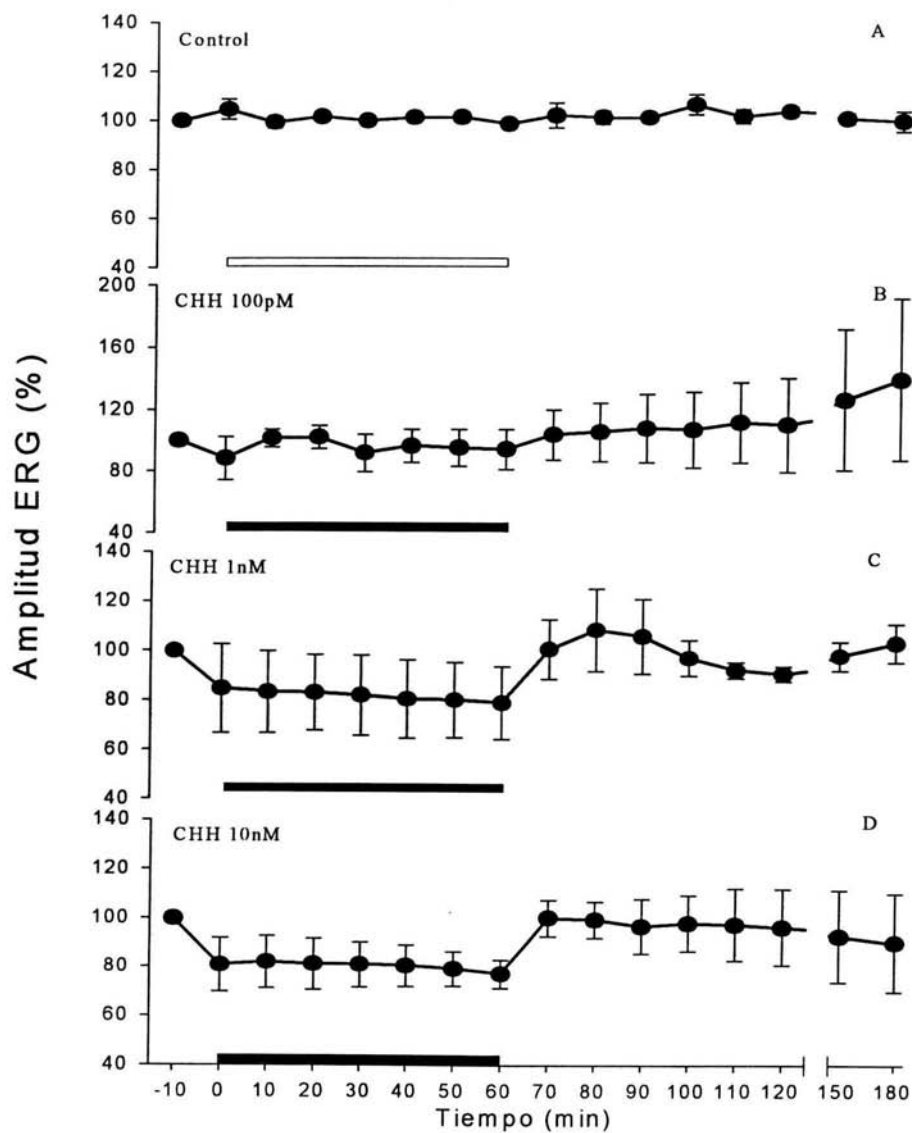


Figura. 11: Curso-temporal de los cambios de amplitud del ERG en experimentos control (□) y ante diferentes dosis (■) de CHH durante la noche subjetiva (03 00 am)

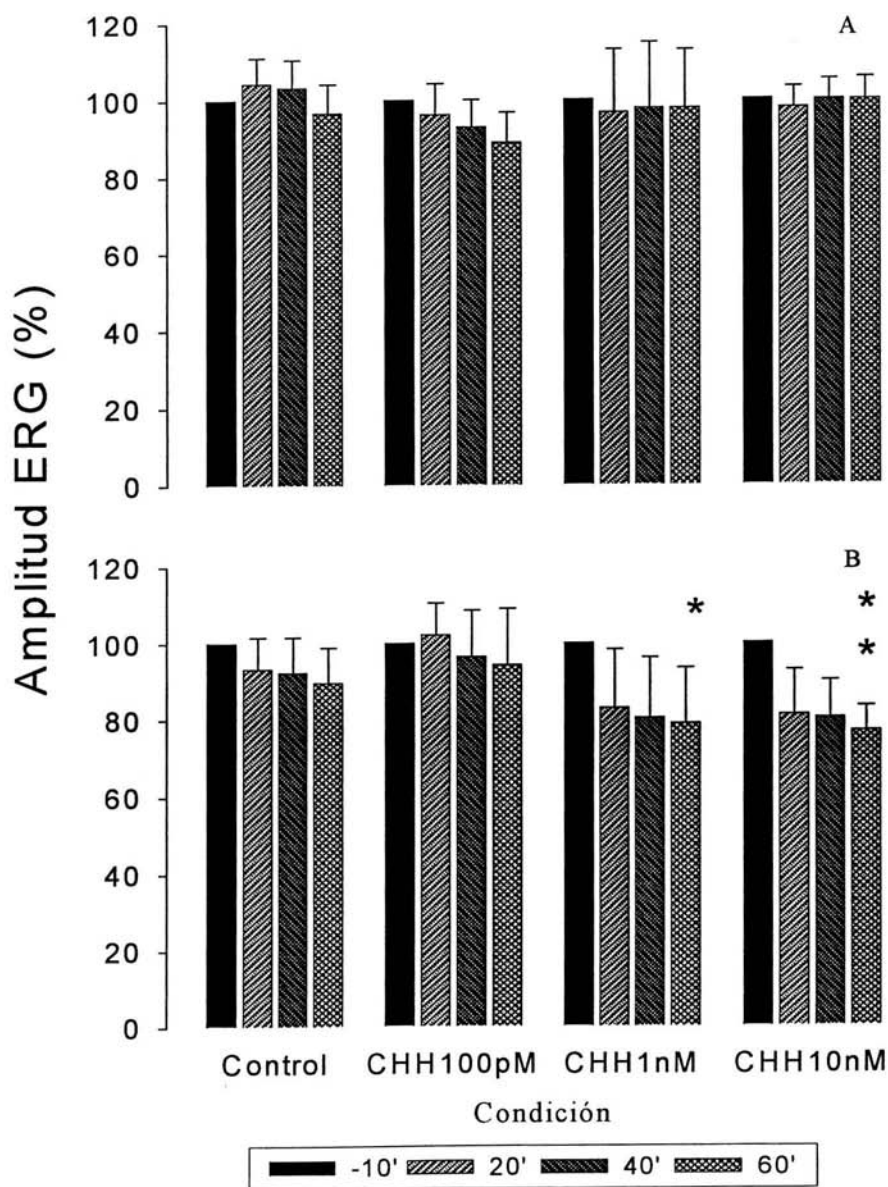


Figura 12: Relación dosis-respuesta entre la concentración de CHH y el porcentaje de amplitud del ERG durante el día (A) y la noche (B) subjetiva. * Diferencias significativas con respecto a la condición -10 ($p < 0.05$). ** ($p < 0.025$).

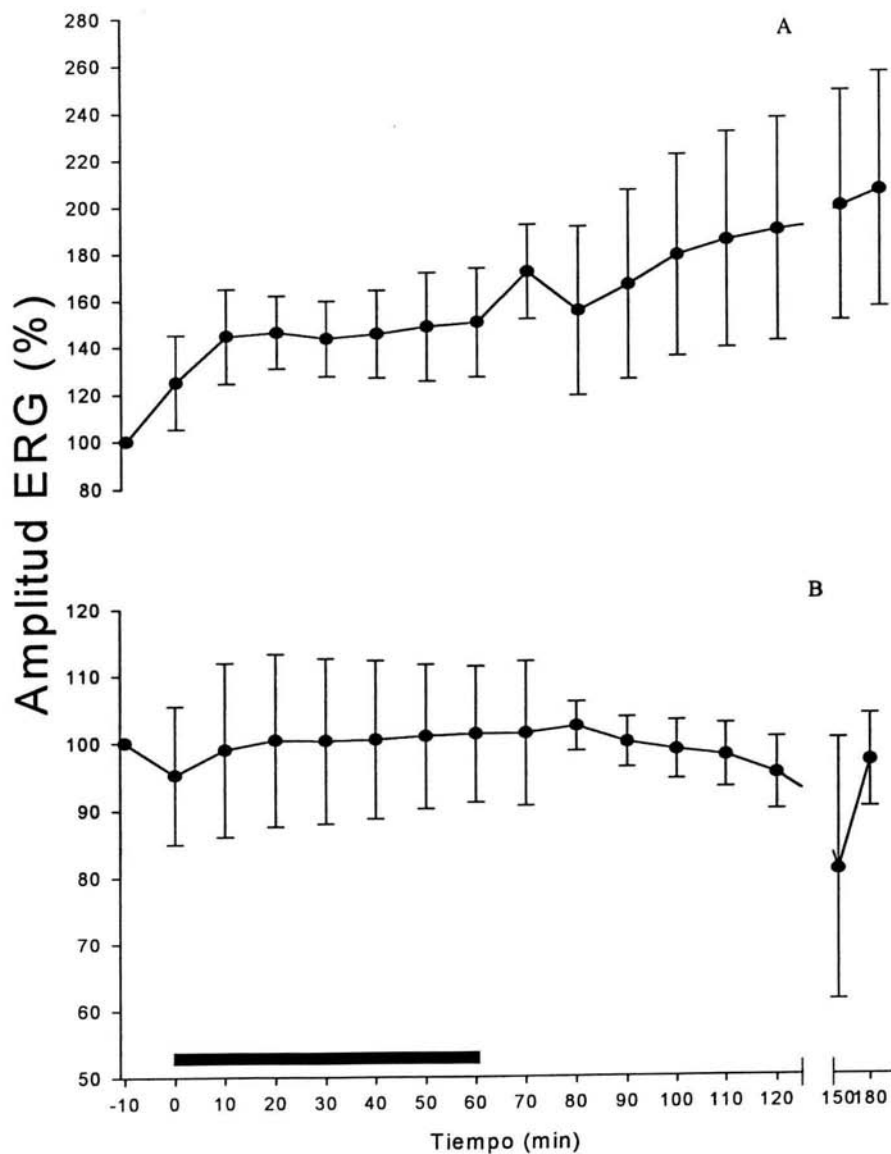


Figura 13: Curso-temporal de los cambios de amplitud del ERG en experimentos con glucosa 1.6mM A) 10 00 B) 03 00. Intervalo de aplicación de la glucosa 1.6 mM (■)

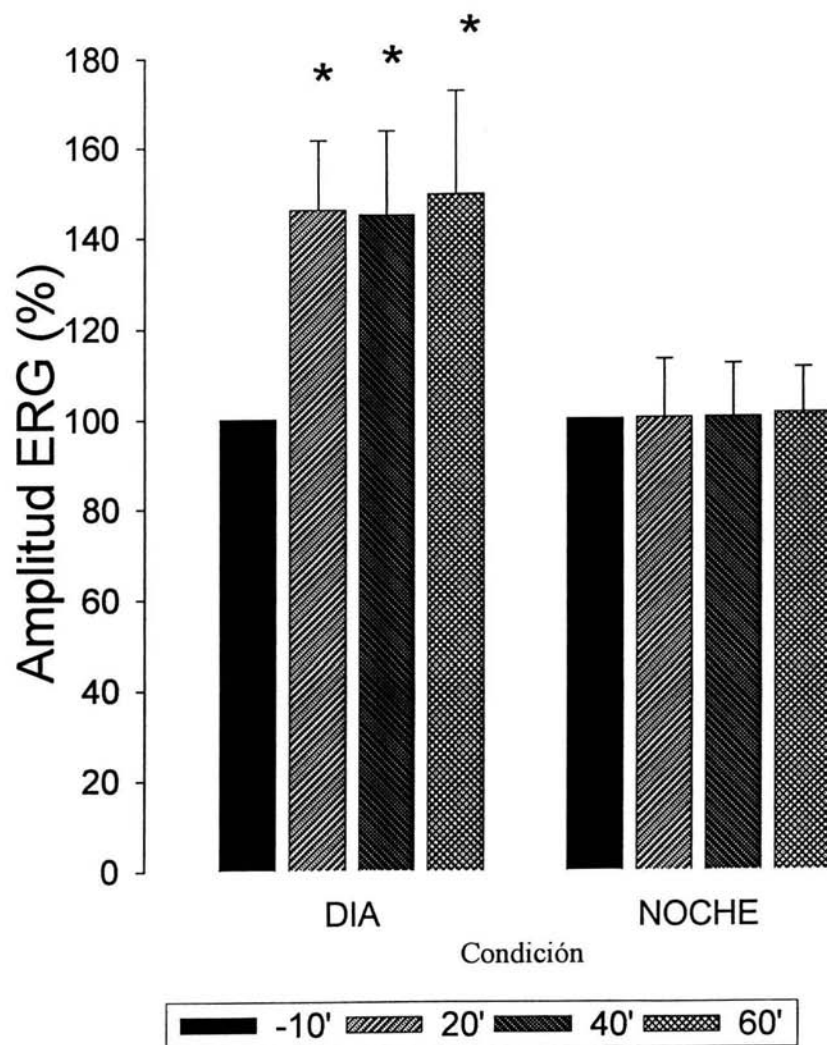


Figura 14: Cambios en la amplitud del ERG a la aplicación de glucosa 1.6 mM en el día y la noche subjetivos. * diferencias significativas con respecto a la condición -10 ($p < 0.025$).

8 DISCUSIÓN

Los registros electrofisiológicos realizados en este trabajo se basan en el protocolo de Naka y Kuwabara (1959) mediante el cual se determinan los componentes de la respuesta eléctrica de la retina del acocil a la luz (ERG). Esta es una respuesta extracelular que detecta el cambio de voltaje o actividad eléctrica de grupos de fotorreceptores visuales en respuesta a un estímulo luminoso, medida como la diferencia de potencial entre un electrodo activo colocado en la córnea del ojo y un electrodo de referencia colocado en el líquido extracelular.

De acuerdo con estos autores el ERG del acocil *Procambarus clarkii*, se debe únicamente a la actividad eléctrica de las células retinulares y de los rbdomos de las mismas, por lo tanto refleja los cambios en el metabolismo de la retina. Lo anterior es crucial para este estudio ya que la amplitud de este parámetro resulta ser una respuesta confiable en la condiciones de experimentación que se llevó a cabo (retina "in vitro"). Con el objeto de que la amplitud del ERG durante el experimento no sufriera variaciones como consecuencia de la manipulación quirúrgica, la retina se colocó en la cámara de registro a 14°C bajo oscuridad constante dos horas antes de comenzar el registro, tiempo necesario tanto para la recuperación de la ablación como para obtener una respuesta cercana o igual a un milivoltio (valor criterio). Por otra parte se trató de evitar posibles variaciones circadianas llevando a cabo los experimentos a las dos horas del día correspondientes al cenit y al nadir del ritmo de amplitud de ERG, horas de máxima constancia de este parámetro. Por lo anterior consideramos que el análisis electrofisiológico es confiable y refleja con certeza cambios reales en la amplitud del ERG debido a los efectos de la CHH y la glucosa en el día y la noche subjetiva del acocil. Lo anterior se ve reforzado por la constancia de este parámetro en los experimentos control.

Los experimentos de esta tesis confirman que el ERG es un parámetro sensible que permite medir la actividad eléctrica del ojo en el acocil bajo diferentes condiciones experimentales, como se demuestra en la Figura 9. En esta figura se pueden observar las variaciones en la amplitud del ERG entre el trazo del minuto -10 y el trazo del minuto 60 de el día y la noche subjetivas del acocil bajo el efecto de las tres concentraciones de CHH y los cambios de amplitud bajo la acción de la glucosa.

El incremento del porcentaje de amplitud del ERG inmediatamente después de la aplicación de glucosa y durante el lavado (representado en las figuras 13 y 14), sugiere que este monosacárido es un sustrato metabólico para la retina del acocil, la cual es capaz de utilizarlo para incrementar la respuesta de los fotorreceptores a la luz. La glucosa podría ser utilizada por la retina del acocil en forma directa, como lo hace la retina de los vertebrados, grupo en el que este monosacárido es el sustrato primario utilizado en el metabolismo de diferentes células retinianas y los fotorreceptores (Cohen y Noell, 1965; citado en Winkler, 2003). Pero también existe la posibilidad de que este carbohidrato sea un sustrato indirecto en el metabolismo de los fotorreceptores a través de la alanina, como sucede en otros invertebrados. Se ha reportado que en la retina de la abeja *Apis mellifera*, la glucosa se cataboliza en las células gliales para después ser enviada como sustrato metabólico a las células fotorreceptoras. (Tsacopoulos *et al.*, 1994).

El incremento de la amplitud del ERG durante la exposición a la glucosa en el día subjetivo (Fig. 13A) y su invariabilidad en la noche subjetiva del acocil (Fig. 13B), sugiere que la glucosa exógena aumenta la respuesta de los fotorreceptores durante el día, período en el cual los niveles de glucosa en la hemolinfa y la amplitud del ERG son bajos (Kallen *et al.*, 1988; Page y Larimer 1975b). Al aplicar glucosa exógena, a esta hora, parecería que el incremento del sustrato metabólico a los fotorreceptores sea la causa del aumento en la amplitud del ERG como lo muestra la Figura 13A. En el intervalo de tiempo en el que se aplicó la glucosa (Fig. 14) y aún después del minuto 70, al reanudar la perfusión con solución salina (Fig. 14A), se puede observar un post efecto de este monosacárido sobre el ERG.

En cambio, durante la noche tanto los niveles de glucosa en la hemolinfa como la amplitud del ERG están en el cenit del ritmo (Kallen *et al.*, 1988; Page y Larimer, 1975b), y la aplicación de glucosa exógena a esta hora del día no afecta la amplitud del ERG. Lo anterior podría ser debido a un mecanismo de retroalimentación negativa, como sucede en el modelo propuesto por Glowik y colaboradores en 1997, en las células secretoras de CHH. Los resultados de este trabajo demuestran que la aplicación de glucosa a la retina *in vitro* aumenta su respuesta eléctrica durante el día subjetivo del animal, lo que nos indica

monosacárido está siendo utilizado por la retina, lo cual se ve reflejado en el aumento de la amplitud del ERG.

A pesar de que este es el primer trabajo en crustáceos acerca del efecto de la glucosa sobre el ERG, en los mamíferos existen investigaciones en las que se ha reportado que en preparaciones *in vitro* el metabolismo de la glucosa en la retina se ve reflejado en la magnitud del ERG, ya que varía dependiendo las concentraciones de glucosa (López y Sanita, 1997; Macaluso *et al.*, 1992; Niemeyer, 1997).

Por otro parte, al administrar CHH en el día subjetivo (10 00), no hay cambios significativos en ninguna de las condiciones experimentales (Fig. 10 y 12A). Sin embargo, los registros de la noche subjetiva (03 00) mostraron un decremento significativo en la amplitud del ERG a concentraciones 1 nM y 10 nM de CHH ($p < 0.05$ y $p < 0.025$) y una recuperación en el minuto 70 (Fig. 11C, 11D, 12B). El compartimiento de la respuesta ante diferentes dosis de la hormona, sugieren una relación dosis-respuesta, por lo que sería interesante probar concentraciones más altas.

Estos resultados no están relacionados con la variación del ERG ante la glucosa exógena, ya que durante el día la CHH no modificó la magnitud de la respuesta como lo hizo la glucosa, y por la noche disminuyó la amplitud del ERG, por lo que no se puede proponer que la CHH está implicada en la provisión de glucosa en la retina. Sin embargo, se propone que la disminución de la amplitud del ERG presentado a las 03 00 con las dosis más altas de CHH se deba a una posible acción neuromoduladora de este péptido relacionada con la sensibilidad visual de *P. clarkii*. Esta hormona podría estar relacionada con la modulación serotoninérgica o peptidérgica del ojo del acócil como se ha reportado en otros trabajos (Aréchiga *et al.*, 1990; Escamilla *et al.*, 2001; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003; Frixione y Hernández, 1989, Rodríguez-Sosa *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que la serotonina tiene un doble efecto en el ojo de *P. clarkii*, ya que por un lado induce la retracción del pigmento proximal (Aréchiga *et al.*, 1990; Frixione y Hernández, 1989) favoreciendo la entrada de la luz a la retina, y por otro, tiene un efecto directo sobre la membrana fotosensible incrementando su conductancia y mediando la generación del potencial de receptor (Aréchiga *et al.*, 1990). La CHH podría modular el efecto excitatorio de la 5-HT, mediante una acción presináptica a nivel de la lámina

ganglionaris, neurópilo en el que se ha reportado la inmunorreactividad a esta monoamina (Aréchiga *et al* ,1990 ; Escamilla-Chimal *et al* ,2001).

Aunque en crustáceos no se ha reportado el efecto de la CHH sobre la serotonina, en vertebrados existen investigaciones que demuestran interacción entre el glucagon y la serotonina (Tachibana *et al.*,2002; Owji *et al.*, 2002). En el hipotálamo de rata se produce una reducción del 50% en los niveles de serotonina después de la inyección de glucagon (Owji *et al.*, 2002).

Mediante el protocolo realizado en este trabajo, es imposible concluir acerca del papel de la CHH sobre la provisión de glucosa en la retina ya que unicamente se llevaron a cabo experimentos electrofisiológicos. Se tendría que investigar la acción de esta hormona mediante otras técnicas como la biología molecular y la bioquímica que permitan obtener resultados precisos sobre la relación de la CHH y el metabolismo de la glucosa en la retina.

9 BIBLIOGRAFÍA

ARÉCHIGA H. (1993). Circadian Rhythms. *Cu. Op. Neu.* 3: 1005-1010.

ARÉCHIGA H, BAÑUELOS E, FRIXIONE E, PICONES A, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1990). Modulation of Crayfish Retinal Sensitivity by 5-Hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150:123-143.

ARÉCHIGA H, FERNÁNDEZ-QUIROZ F, FERNÁNDEZ DE MIGUEL F, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1993). The Circadian System of Crustaceans. *Chronobiol.Int.* 10(1):1-19.

ARÉCHIGA H, MENA F. (1975). Circadian Variations of Hormonal Content in the Nervous System of the Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:581-584.

ARÉCHIGA H, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1998). Circadian Clock Function in Isolated Eyestalk Tissue of Crayfish. *Proc. R. Soc. Lond.* 365B:1819-1823.

ARÉCHIGA H, WIERSMA CAG. (1969). Circadian Rhythm of Responsiveness in Crayfish Visual Units. *J. Neur.* 1:71-85.

ASCHOFF J. (1984). A Survey in Biological Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Aschoff J. Vol 4. Biological Rhythms. New York . Plenum Press. pp. 3-8.

ASHMORE LJ, SEHGAL A. (2003). A Fly's Eye View of Circadian Entrainment. *J. Biol. Rhy.* 18 (3): 206-216.

BARRERA-MERA B. (1976). Effects of the Cerebroid Lesions on ERG Circadian Rhythm of the Crayfish. *Physiol. Beh.* 17: 59-64.

BARRERA-MERA B. (1978). Neural Coupling between Left and Right Electroretinographic Circadian Oscillations in the Crayfish *P. bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 61: 427-432.

BARRERA-MERA B, BERDEJA GY. (1979). Bilateral Effects on Retinal Shielding Pigments During Monocular Photic Stimulation in the Crayfish *Procambarus*. *J. Exp. Biol.* 79:163-168.

BRADY J. (1979). Biological Clocks. London, Edward Arnold. pp 60.

CHANG ES, CHANG SA, BELTZ BS, KRAVITZ EA. (1999). Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Lobster Nervous System: Localization and Release From Cells in the Subesophageal Ganglion and Thoracic Second Roots. *J. Comp. Neur.* 414:50-56

- COLES JA. (1989). Functions of glial cells in the retina of the honeybee drone. *Glia*. 2(1):1-9.
- COOKE IM, SULLIVAN RE.(1982). Hormones and Neurosecretion. En: *The Biology of Crustacea*. Vol 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, New York. pp.205-290.
- DUFFFIELD GE. (2003). DNA Microarray Analyses of Circadian Timing: The Genomic Basis of Biological Time. *J. Neuroendocrinol.* 15: 991-1002.
- ESCAMILLA-CHIMAL EG, HIRIART M, SÁNCHEZ-SOTO MC, FANJUL-MOLES ML. (2002). Serotonin Modulation of CHH Secretion by Isolated Cells of the Crayfish Retina and Optic Lobe. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125:283-290.
- ESCAMILLA-CHIMAL EG, VAN HERP F, FANJUL-MOLES ML. (2001). Daily Variations in Crustacean Hyperglycemic Hormone and Serotonin (5-HT) Immunoreactivity during the Development of Crayfish. *J. Exp. Biol* 204:1073-1081.
- FANJUL-MOLES ML. (1998). Ontogenic Study of a Circadian Rhythm in Crayfish: Clock Pacemaker and Entrainment. *Comp. Biochem. Physiol.* 5: 153-159.
- FANJUL-MOLES ML, ESCAMILLA-CHIMAL EG, GLORIA-SORIA A, HERNÁNDEZ-HERRERA G. (2004). The Crayfish *Procambarus clarkii* Cry Shows Daily and Circadian Variation. *J. Exp. Biol.* 207: 1453-1460.
- FANJUL-MOLES ML, MORENO-SÁENZ E, VILLALOBOS-HIRIART N, FUENTES-PARDO B. (1987). ERG Circadian Rhythm in the Course of Ontogeny in Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A (2): 213-219.
- FANJUL-MOLES ML, PRIETO-SAGREDO J. (2003). The Circadian System of Crayfish: A Developmental Approach. *Micr. Res. Tech.* 60:291-301.
- FRIXIONE E, ARÉCHIGA H. (1979). Photomechanical Migrations of Pigment Granules along the Retinula Cells of the Crayfish. *J. Neur.* 10(6):573-590.
- FRIXIONE E, HERNÁNDEZ J. (1989). Modulation of Screening-Pigment Position in Crayfish Photoreceptors by Serotonin: Possible Involvement of Na⁺/K⁺-ATPase Activity. *J. Exp. Biol.* 143:459-473.
- GARFIAS A, RODRÍGUEZ-SOSA L, ARÉCHIGA H. (1995). Modulation of Crayfish Retinal Function by Red Pigment Concentrating Hormone. *J. Exp. Biol.* 198:1447-1454.
- GAUS G, CASARETTO M, KASS L. (1997). The Effect of Neuropeptides from *Limulus* on its Circadian Rhythm in Retinal Sensitivity. *J. Comp. Physiol.* 180:137-142.

- GAUS G, STIEVE H. (1992). The Effect of Neuropeptides on the ERG of the Crayfish *Orconectes limosus*. *Z. Naturforsch.* 47c:300-303.
- GHERARDI F. (2002). Behaviour. En: *Biology of Freshwater Crayfish*. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp. 258-281.
- GLOWIK RM, GOLOWASCH J, KELLER R, MARDER E. (1997). D-Glucose-Sensitive Neurosecretory Cells of the Crab *Cancer borealis* and Negative Feedback Regulation Of Blood Glucose Level. *J. Exp. Biol.* 200: 1421-1431.
- GORGELS-KALLEN JL, MEIJ JTA. (1985). Immunocytochemical Study of the Hyperglycemic Hormone (CHH)-Producing System in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus* During Larval and Postlarval Development. *J. Morph.* 183: 155-163.
- GORGELS-KALLEN JL, VAN HERP F. (1981). Localization of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the X-Organ Sinus Gland Complex in the Eyestalk of the Crayfish, *Astacus leptodactylus*. *J. Morph.* 170: 347-355.
- GORGELS-KALLEN JL, VOORTER CHEM. (1984). Secretory Stages of Individual CHH- Producing Cells in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus*, Determined by Means of Immunocytochemistry. *Cell. Tissue. Res.* 237:291-298.
- GORGELS-KALLEN JL, VOORTER CHEM. (1985). The Secretory Dynamics of the CHH-Producing Cell Group in the Eyestalk of the Crayfish, *Astacus leptodactylus*, in the Course of the Day/ Night Cycle. *Cell. Tissue. Res.* 241: 361-366.
- GHIDALIA W. (1985). Structural and Biological Aspects of Pigments. En: *The biology of Crustacea*. Vol 9. Integument, Pigments and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, New York. pp. 301-394.
- HALBERG E, ELOFSSON R. (1989). Construction of the Pigment Shield of the Crustacean Compound Eye: A Review. *J. Crust. Biol.* 9(3): 359-372.
- HARDIN P. (2000). From Biological Clock to Biological Rhythms. *Gen. Biol.* 1(4): 1023.1-1023.5.
- HOLDICH DM. (2002). Background and Functional Morphology. En: *Biology of Freshwater Crayfish*. (ed. Holdich DM). Blackwell Science. Pp. 3-27.
- HORTON HT. (2002). Conceptual Issues in the Ecology and Evolution of Circadian Rhythms. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi J. S., W. Turek y R. Moore eds). Plenum Publishers. NY. Pp. 45-57.
- HUBERMAN A. (2000). Shrimp Endocrinology. A Review. *Aquaculture*. 191:191-208.

- HUBERMAN A, AGUILAR MB. (1988). A Neurosecretory Hyperglycemic Hormone from the Sinus Gland of the Mexican Crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). II. Structural Comparison of Two Isoforms of the Hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 29B(2): 345-349.
- KALLEN JL, ABRAHAMSE SL, VAN HERP F. (1990). Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.* 179: 351-357.
- KALLEN JL, RIGIANI NR, TROMPENAARS HJAJ. (1988). Aspects of Entrainment of CHH Cell Activity and Hemolymph Glucose Levels in Crayfish. *Biol. Bull.* 175:137-143.
- KELLER R. (1992). Crustacean Neuropeptides: Structures, Functions and Comparative Aspects. *Experientia.* 48:439-448.
- KELLER R, HAYLETT B, COOKE I. (1994). Neurosecretion of Crustacean Hyperglycemic Hormone Evoked by Axonal Stimulation or Elevation of Saline K^+ Concentration Quantified by a Sensitive Immunoassay Method. *J. Exp. Biol.* 188: 293-316.
- KELLER R, JAROS PP, KEGEL G. (1985). Crustacean Hyperglycemic Neuropeptides. *Am. Zool.* 25: 207-221.
- KLEINHOLZ LH. (1961). Pigmentary Effectors. En: *The Physiology of Crustacean.* Vol 2. (ed. Waterman TH). Academic Press, New York. pp. 133-169.
- KLEINHOLZ LH, KELLER R. (1973). Comparative Studies in Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormones. I. The Initial Survey. *Gen. Comp. End.* 21: 554-564.
- KUMMER G, KELLER R. (1993). High-Affinity Binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to Hepatopancreas Plasma Membranes of the Crab *Carcinus maenas* and the Crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides.* 14: 103-108.
- LARIMER JL, SMITH JTF. (1980). Circadian Rhythm of Retinal Sensitivity in Crayfish: Modulation by Cerebral and Optic Ganglia. *Comp. Physiol.* 136:313-326.
- LEE CY, YANG PF, ZOU HS. (2001). Serotonergic Regulation of Crustacean Hyperglycemic Hormone Secretion in the Crayfish, *Procambarus clarkii*. *Physiol. Biochem. Zool.* 74(3): 376-382.
- LÓPEZ L, SANNITA WG. (1997). Glucose Availability and the Electrophysiology of the Human Visual System. *Clin. Neurosci.* 4(6); 336-340.
- MACALUSO C, ONOE S, NIEMEYER G. (1992). Changes in Glucose Level Affect Rod Function more than Cone Function in the Isolated, Perfused Cat Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33(10); 2798-2808.

- MORENO-SÁENZ E, HERNÁNDEZ-FALCÓN J, FUENTES-PARDO B. (1987). Role of the Sinus Gland in Crayfish Circadian Rhythmicity. II. ERG Circadian Rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A:119-125.
- NAKA K, KUWABARA M. (1959). Two components from the Compound Eye of the Crayfish. *J. Exp. Biol.* 36:51-61.
- NASSEL DR. (1992). The Retina and Retinal Projection on the Lamina Ganglionaris of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Neurol.* 167:341-360.
- NIEMEYER G. (1997). Glucose Concentration and Retinal Function. *Clin. Neurosci.* 4(6); 321-335.
- NYSTRÖM P. (2002). Ecology. En: *Biology of Freshwater Crayfish.* (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp. 192-224.
- OLIVO RF, LARSEN ME. (1978). Brief Exposure to Light Initiates Screening Pigment Migration in Retinula Cells of the Crayfish, *Procambarus*. *J. Comp. Physiol.* 125:91-96.
- OLLIVAUX C, SOYEZ D. (2000). Dynamics of Biosynthesis and Release of Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms in the X-Organ-Sinus Gland complex of the Crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 260: 5106-5114.
- OLLIVAUX C, DIRCKSEN H, TOULLEC JY, SOYEZ D. (2002). Enkephalinergic Control of the Secretory Activity of Neurons Producing Stereoisomers of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Eyestalk of the Crayfish *Orconectes limosus*. *J. Comp. Neurol.* 444: 1-9.
- OWJI AA, KHOSHDEL Z, SANEA F, PANJEHSHAHIN MR, SHOJAEI-FARD M, SMITH DM, COPPOCK HA, GHATEI MA, BLOOM SR. Effects of Intracerebroventricular Injection of Glucagon Like Peptide-1 and its Related Peptides on Serotonin Metabolism and on Levels of Amino Acids in the Rat Hypothalamus. (2002). *Br. Res.* 929: 70-75.
- PAGE TL. (1984). Neural and Endocrine Control of Circadian Rhythmicity in Invertebrates. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Aschoff J. Vol 4. Biological Rhythms. New York . Plenum Press. pp 145-172.
- PAGE TL, LARIMER JL. (1975a). Neural control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. I. The Locomotor Activity Rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:59-80.
- PAGE TL, LARIMER JL. (1975b). Neural control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. II. The ERG Amplitude Rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97: 81-96.
- RAMAMURTHI R, MUMBACH MW, SCHEER BT. (1968). Endocrine Control of Glycogen Synthesis in Crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 26: 311-319.

- RANDALL D, BURGGREN W, FRENCH K. (1998). *Fisiología Animal*. MacGraw-Hill, España. pp 276-293.
- RAO R. (1985). Pigmentary Effectors. En: *The Biology of Crustacea*. Vol 9. Integument, Pigments and Hormonal Processes. (eds. Bliss DE, Mantel LH). Academic Press, New York. pp. 395-463.
- RODRÍGUEZ-SOSA, ARÉCHIGA H. (1982). Range of Modulation of the Light Sensitivity by Accessory Pigments in the Crayfish Compound Eye. *Vision. Res.* 22:1515-1524.
- RODRÍGUEZ-SOSA L, DE LA VEGA MT, ARÉCHIGA H. (1994). Circadian Rhythm of Content of Red Pigment-Concentrating Hormone in the Crayfish Eyestalk. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C:101-108.
- RODRÍGUEZ-SOSA L, PICONES A, CALDERÓN-ROSETE G, ISLAS S, ARÉCHIGA H. (1997). Localization and Release of 5-Hydroxytryptamine in the Crayfish Eyestalk. *J. Exp. Biol.* 200; 3067-3077.
- ROENNEBERG T, MERROW M. (2003). The Network of Time: Understanding the Molecular Circadian System. *Curr. Biol.* 13: 198-207.
- SÁNCHEZ JA, FUENTES-PARDO B. (1977). Circadian Rhythm in the Amplitude of the Electroretinogram in the Isolated Eyestalk of the Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A:601-605.
- SANDEMAN DC. (1982). Organization of the Central Nervous System. En: *The Biology of Crustacea*. Vol 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, New York. pp.1-62.
- SANTOS EA, KELLER R. (1993a). Regulation of Circulating Levels of the Crustacean Hyperglycemic Hormone: Evidence for a Dual Feedback Control System. *J. Comp. Physiol.* 163: 374-379.
- SANTOS EA, KELLER R. (1993b). Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) and the Regulation of Carbohydrate Metabolism: Current Perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 405-411.
- SAROJINI R, NAGABHUSHANAM R, FINGERMAN M. (1995). Dopaminergic and Encefalinergetic Involvement in the Regulation of Blood Glucose in the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 160-170.
- SEDLMEIER D. (1982). The Mode of Action of the Crustacean Neurosecretory Hyperglycemic Hormone (CHH). Involvement of Glycogen Synthase. *Gen. Comp. End.* 47:426-432.

- SEDLMEIER D. (1985). Mode of Action of the Crustacean Hyperglycemic Hormone. *Am. Zool.* 25: 223-232.
- SEDLMEIER D. (1987). The Role of Hepatopancreatic Glycogen in the Action of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 423-425.
- SHAW SR, STOWE S. (1982). Photoreception. En: *The Biology of Crustacea*. Vol 3. Neurobiology: Structure and Function. (eds. Bliss DE, Atwood HL, Sandeman DC). Academic Press, New York. pp. 292-356.
- SHIVERS RR. (1967). Fine Structure of Crayfish Optic Ganglia. *The University of Kansas Science Bulletin*. XLVII (10):677-733.
- SMULLEN RP, DAVID JA, PITMAN RM. (1996). Endocrine Regulation of the Phosphatidylinositol Pathway in the Norway Lobster, *Nephrops norvegicus* and the Shore Crab, *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. End.* 104: 84-91.
- TACHIBANA T, TANAKA S, FURUSE M, HASEGAWA S, KATO H, SUGAHARA K. (2002). Intracerebroventricular Injection of Glucagon-Like Peptide-1 Decreases Monoamine Concentrations in the Hypothalamus of Chicks. *Br. Poult. Sci.* 43 (1):122-126.
- TILDEN AR, BRAUCH R, BALL R, JANZE AM, GHAFFARI AH, SWEENEY C, YUREK JC, COOPER RL. (2003). Modulatory Effects of Melatonin on Behavior, Hemolymph Metabolites and Neurotransmitter Release in Crayfish. *Brain. Res.* 992: 252-262.
- TUREK FW y TAKAHASHI JS. (2002). Introduction to Circadian Rhythms. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. 12. Circadian Clocks. (Takahashi J. S., W. Turek y R. Moore eds). Plenum Publishers. NY. pp. 3-6
- TSACOPOULOS M, CAROL L, POITRY-YAMATE, POITRY S, PERROTTET P, VEUTHEY AL. (1997a). The Nutritive Function of Glia is Regulated by Signals Released by Neurons. *Glia*. 21:84-91.
- TSACOPOULOS M, CAROL L, POITRY-YAMATE, POITRY S, PERROTTET P. (1997b). Ammonium and Glutamate Released by Neurons are Signals Regulating the Nutritive Function of a Glial Cell. *J. Neurosci.* 17(7): 2383-2390.
- TSACOPOULOS M, EVEQUOZ-MERCIER V, PERROTTET P, BUCHNER E. (1988). Honeybee Retinal Glial Cells Transform Glucose and Supply the Neurons with Metabolic Substrate. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 85(22):8727-31.
- TSACOPUOLOS M, VEUTHEY AL. (1993). The Nutritive Function of Glia in a Crystal-like Nervous Tissue: The Retina of the Honeybee drone. *Dev Neurosci.* 15(3-5):336-42.

TSACOPOULOS M, VEUTHEY AL, SARAVELOS SG, PERROTTET P, TSOUPRAS G. (1994). Glial Cells Transform Glucose to Alanine, which Fuels the Neurons in the Honeybee Retina. *J Neurosci.* 14(3 Pt 1):1339-51.

VAN HARREVELD A. (1936). A Physiological Solutions for Fresh-Water Crustacean. *Pro. Soc. Exp. Biol.* 34: 428-432.

VAN HERP F. (1998). Molecular, Cytological and Physiological Aspects of the Crustacean Hyperglycemic Hormone Family. En: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* (eds. Coast GM, Webster GC). Cambridge University Press, U.K. pp. 53-70.

VOGT G. (2002). Functional Anatomy. En: *Biology of Freshwater Crayfish.* (ed. Holdich DM). Blackwell Science. pp. 53-143.

WINKLER SB, POURCHO GR, STARNES C, SLOCUM J, SLOCUM N. (2003). Metabolic Mapping in Mammalian retina: a Biochemical and H-2-Deoxyglucose Autoradiographic Study. *Exp. Eye. Res.* 77; 321-337.

YASUDA A, YASUDA Y, FUJITA T, NAYA Y. (1994). Characterization of Crustacean Hyperglycemic Hormone from the Crayfish (*Procambarus clarkii*): Multiplicity of Molecular Forms by Stereo-inversion and Diverse Functions. *Gen. Comp. End.* 95:387-398.