



**UNIVERSIDAD NACIONAL ATÓNOMA
DE MÉXICO**

Programa de Doctorado en Ciencias
Biomédicas
Facultad de Medicina



**El efecto de la hormona dispersora del pigmento
sobre el potencial de receptor de las células
retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un
ciclo de 24 horas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CAROLINA BARRIGA MONTOYA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO

COMITÉ TUTORAL:

DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

2011



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.

Para mis maestros.

Para Cris, para Jerónimo y por supuesto, para Paco.

A Héctor.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin todas las personas que me han ayudado en el camino. Todas ellas apostaron a favor de la solidaridad y por ello les dedico el resultado de este esfuerzo.

Muchas gracias a Araceli de la O Martínez, Enrique Moreno Sáenz, Froylán Gómez Lagunas, Juan Carlos Gómora Martínez, Miguel Lara Aparicio y Pablo Padilla Longoria. Además de que respondieron mis preguntas y me guiaron e impulsaron hacia las soluciones y los procedimientos adecuados, tuvieron la paciencia de escucharme cuando las ideas estaban lejos de ser claras.

Junto con Agustín Rodríguez Olivares, Antonio Carrillo Ledesma, Cristina Montoya Vélez, Diana Patricia Cabello Torres, Dolores Ayala Ojeda, Esther Josefina Montoya Vélez, Francisco Barriga Puente, Héctor Díaz Jiménez y su familia, Heriberto Sampson Ávila, Jerónimo Barriga Montoya, Luis Antonio Rincón Solís, Luis Manuel León Rossano y Miguel Tello Maldonado, me animaron constantemente a seguir y finalizar esta obra. Por ello estoy en deuda con todos ustedes.

A mi directora de tesis, Dra. Beatriz Fuentes Pardo, quiero expresarle toda mi gratitud por haber dedicado parte de su tiempo a la creación de este trabajo. Por supuesto los errores son mi responsabilidad. La claridad en sus ideas y exposiciones, su instrucción para generar conocimiento nuevo a partir de la reflexión y de la revisión crítica de las diferentes consideraciones me permitieron llegar a la meta propuesta en las mejores condiciones. Otra vez, gracias.

Igualmente quiero reconocer a mis sinodales Dra. Carolina Escobar Briones, Dr. Rogelio Arellano Ostoa, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero por la revisión de este trabajo y por sus atinadas observaciones.

Quiero aprovechar este espacio para reconocer a todos los que se han indignado y siguen indignándose cada que se intenta convertir a la educación en una mercancía sujeta a las fuerzas del mercado. Gracias a todos ellos adquirí mi formación profesional en una institución pública, gratuita, laica, de calidad e incluyente, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice

1 Resumen	4
2 Antecedentes	
2.1 Los ritmos circadianos	6
2.1.1 Los mecanismos moleculares	9
2.1.2 Los eventos biofísicos y el funcionamiento de la maquinaria circadiana	11
2.2 La organización funcional del ojo compuesto del acocíl	15
2.3 El ritmo de sensibilidad a la luz de los fotorreceptores visuales del acocíl	19
2.4 La hormona dispersora del pigmento y el ritmo de sensibilidad a la luz del acocíl	21
2.5 El factor dispersor del pigmento	25
3 Planteamiento del Problema	
3.1 Objetivo	27
3.2 Hipótesis	27
4 Materiales y Métodos	
4.1 Aprobación por el comité de ética	28
4.2 Material biológico	28
4.3 Soluciones	28
4.4 Registros eléctricos	29
4.5 El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor	30
4.6 El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre las corrientes que subyacen al potencial de receptor	31
4.7 Análisis de datos	32

5 Resultados

5.1 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en el potencial de receptor	36
5.2 Las corrientes que subyacen al potencial de receptor	39
5.2.1 Experimentos control	39
5.2.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en las corrientes que subyacen al potencial de receptor	48
5.3 La adaptación de la membrana revelada por medio del protocolo de dos estímulos luminosos	55
5.3.1 Experimentos control	55
5.3.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en la adaptación de la membrana	57

6 Discusión

6.1 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en el potencial de receptor	61
6.2 Las corrientes que subyacen al potencial de receptor	62
6.2.1 Experimentos control	62
6.2.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en las corrientes que subyacen al potencial de receptor	65
6.3 La adaptación de la membrana revelada por medio del protocolo de dos estímulos luminosos	66
6.3.1 Experimentos control	66
6.3.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en la adaptación de la membrana	68
6.4 Comentarios Finales	68

7 Apéndice

7.1 Los potenciales de equilibrio de los principales iones implicados en la respuesta eléctrica a la luz del acoplamiento	71
7.2 Literatura publicada durante los estudios de doctorado	72
7.3 Oficio de designación de jurado y votos aprobatorios	73
8 Referencias Bibliográficas	79

1 Resumen

La hormona dispersora del pigmento (HDP) desempeña un papel relevante en la organización del sistema circadiano de los invertebrados y en particular del sistema circadiano de sensibilidad a la luz del acocil (electrorretinograma). En este trabajo se estudió la acción periódica de dicha hormona sobre la actividad eléctrica de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* durante el ciclo de 24 horas.

Se demostró que:

1. La HDP afecta la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil *Procambarus clarkii* de una manera dependiente del tiempo circadiano (TC).
2. La cinética de las corrientes que subyacen al potencial de receptor de las células fotorreceptoras visuales del acocil *Procambarus clarkii*, así como la conductancia de las corrientes y la permeabilidad iónica que subyace a la respuesta eléctrica a la luz, varía durante el ciclo de 24 horas.
3. La HDP modifica la cinética, la conductancia y la permeabilidad iónica de las corrientes que subyacen al potencial de receptor de una manera dependiente del TC.
4. La sensibilidad y la efectividad en la adaptación de la membrana de las células fotorreceptoras visuales del acocil *Procambarus clarkii* es dependiente del ciclo circadiano.
5. La HDP modifica la sensibilidad y la efectividad en la adaptación de la membrana de las células fotorreceptoras visuales de una manera dependiente del TC.

Suponemos que los cambios periódicos provocados por la HDP exógena en la respuesta eléctrica a la luz de las células fotorreceptoras

visuales del acocil, son debidos a una variación temporal en las rutas bioquímicas que conectan al receptor de la HDP con las conductancias iónicas que subyacen al potencial de receptor.

2 Antecedentes

2.1 Los ritmos circadianos

El estudio de los ritmos biológicos está enfocado a determinar los mecanismos que inducen la presencia de cambios periódicos en las funciones de los organismos, así como la relación que guardan con las señales externas. Las preguntas dónde y cómo -que dieron origen a las ciencias morfológicas y fisiológicas- ofrecen una visión fragmentaria del proceso vital estudiado debido a que muchas de las variables implicadas son función del tiempo, esto es, cambian de acuerdo con las señales temporales externas, como por ejemplo la hora del día o las estaciones del año.

Dentro del conjunto de los ritmos biológicos se pueden distinguir los que son del tipo *circa* (cercano), designados así debido a que cuando se eliminan las señales periódicas provenientes del medio ambiente, las oscilaciones persisten con un periodo cercano, pero diferente, al del fenómeno externo con el que están relacionados. Por ejemplo, si el ritmo está ligado con el ciclo de las mareas (circamareal), bajo condiciones ambientales constantes se observarán oscilaciones con un periodo cercano a 12 horas; si está relacionado con la alternancia día-noche (circadiano), se medirá un periodo cercano a 24 horas; si lo está con las fases de la luna (circalunar), el periodo será cercano a 28 días o si lo está con las estaciones del año, se detectará un periodo cercano a 365 días (circannual). Vale la pena considerar que los cambios *circa* a los que se alude dependen de la presencia de un reloj biológico.

La investigación sobre los relojes biológicos se ha centrado en los que tienen un periodo entre 20 y 28 horas o circadianos. De aquí que frecuentemente se utilicen como punto de referencia en lo que respecta a los valores de frecuencia. Así, por ejemplo, para aludir a los ritmos que tienen frecuencias menores a los de los circadianos se habla de ritmos infradianos y para referirse a

aquéllos que tienen frecuencias mayores, se habla de ritmos ultradianos.

Los ritmos circadianos poseen una naturaleza eminentemente adaptativa, son ubicuos y tienen como característica común la de ser la expresión de redes de osciladores endógenos. En ellos se puede identificar una estructura, llamada marcapaso circadiano, que presenta como característica básica la capacidad de oscilar con periodos cercanos a 24 horas en condiciones ambientales constantes, cuando forma parte del organismo y cuando ha sido separado del mismo. El marcapaso tiene, además, la capacidad de imponer su ritmo a otras estructuras del organismo llamadas efectoras.

Una de las características más notables de los osciladores circadianos es que si bien sus oscilaciones se generan a partir de mecanismos endógenos, tienen la capacidad de “seguir” las señales temporales externas. Para lograr tal objetivo se ha postulado que el conjunto biocronométrico debe poseer al menos los siguientes dos sistemas: 1) Un sistema de sincronización interna entre las unidades funcionales que conforman el marcapaso circadiano. 2) Un sistema de sincronización por estímulos externos compuesto por los receptores y las vías sensoriales que transmiten al marcapaso la información sobre las señales externas. (Aréchiga, 2003).

Es de esperarse que el ajuste de las dinámicas de las componentes del sistema que constituyen la red interna de osciladores debido a la interacción entre ellas, la interacción intrínseca o interna de los elementos, genere una oscilación circadiana robusta (Pavlidis, 1973).

Es bien conocido que este ritmo emergente tiene la capacidad de ajustar su frecuencia con la de ciertas señales externas periódicas como la alternancia entre el día y la noche. El mecanismo que subyace a esta propiedad, llamada sincronización extrínseca o por estímulo externo, es la fase-dependencia de la

sensibilidad del marcapaso hacia la señal sincronizadora en cuestión. Si consideramos el movimiento a lo largo del ciclo circadiano, es claro que no hay un “valor preferido” en la fase (esta variable está en un estado neutral o indiferente de equilibrio), lo que tiene como consecuencia que pueda ser ajustada fácilmente debido a la acción de algún estímulo externo. El resultado final es la capacidad que tiene el organismo de ajustar sus ritmos para mantenerse en fase con los cambios ambientales (Pikovsky y cols., 2001).

La fase de un ritmo circadiano que se encuentre bajo condiciones ambientales constantes (en oscilación libre), puede verse modificada incluso cuando el agente sincronizador se aplica durante un breve lapso de tiempo (un pulso). Cuando la fase avanza, es decir, cuando el evento ocurre antes, se considera un desplazamiento de fase positivo; si la fase se atrasa, es decir si el evento ocurre después, se considera un desplazamiento de fase negativo. Se observa que la magnitud y la dirección de los desplazamientos de fase es una función del tiempo de aplicación del estímulo. Esto queda gráficamente ilustrado por la llamada “curva respuesta de fase”.

Entre todas las señales sincronizadoras que se conocen, la luz es con mucho el estímulo ambiental con mayor capacidad para sincronizar al oscilador circadiano. Sin embargo hay otros sincronizadores, llamados no fóticos, como las interacciones sociales, ciertas señales químicas (hormonas), el alimento, la actividad física, entre otras.

De acuerdo con la teoría los ritmos son sincronizados por luz debido a las transiciones no paramétricas “luz encendida - luz apagada” en la fase del ritmo. Si se quiere estudiar el papel de la intensidad de la luz, una propiedad paramétrica, en la dinámica de los ritmos circadianos, hay que recordar la “Regla de Aschoff”. En 1960, Jürgen Aschoff dio a conocer una relación entre la dinámica de la oscilación circadiana y la cantidad de luz que

recibe un organismo en cuestión. La propuesta se puede resumir de la siguiente manera: cuando los organismos diurnos reciben una mayor cantidad de luz aumentan la frecuencia de su ritmo, la relación entre el tiempo de actividad y el tiempo de reposo y el nivel de excitación; los organismos nocturnos, ante la misma situación ambiental, reducen estos tres parámetros.

Otra particularidad de los relojes circadianos es su independencia con la temperatura, lo cual se manifiesta al observar que, a pesar de que la temperatura ambiental varíe, el periodo de las oscilaciones circadianas se mantiene dentro de un intervalo estrecho de valores ($Q_{10} \approx 1$).

2.1.1 Los mecanismos moleculares

Los modelos moleculares de los relojes biológicos constituyen una aproximación para entender los mecanismos que subyacen a los ritmos circadianos. Al igual que cualquier otro proceso oscilatorio autosostenido, están basados en asas de retroalimentación negativa. Sin embargo, no deja de sorprender que ocurran a este nivel de organización.

El primer avance significativo fue en 1971 cuando R. J Konopka y S. Benzer identificaron el primer gen reloj (un gen se reconoce como miembro de este grupo si su producto es necesario para la generación y/o el mantenimiento del reloj circadiano), llamado *period* (*per*), en *Drosophila melanogaster*. A partir de ese momento el área progresó rápidamente: se descubrieron (y se están descubriendo) nuevos genes en diversas especies y se empezó a dilucidar la red de interacciones entre los componentes del reloj molecular.

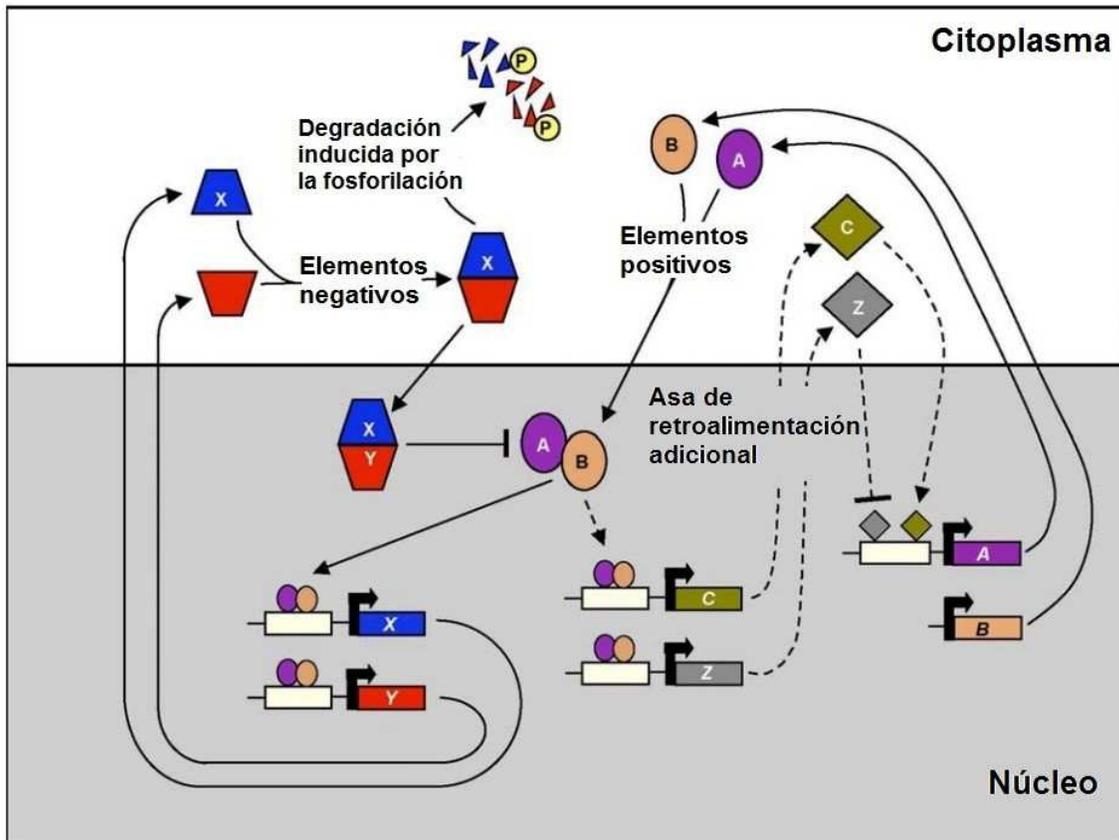


Figura 1: Modelo molecular de la generación de ritmos circadianos en células eucariotas. Los elementos positivos (óvalos) interactúan y se unen a elementos (rectángulos blancos) en las regiones promotoras (flechas dobladas) para activar la expresión de genes que codifican elementos negativos (tetraedros), quienes interactúan para inhibir la actividad de los elementos positivos, lo que finalmente lleva a una disminución en la expresión de los elementos negativos. La fosforilación progresiva (P) de los elementos negativos conduce a su degradación y, en consecuencia a la inhibición de los efectores positivos, lo que permite que el ciclo inicie nuevamente. Puede estar presente un asa adicional de retroalimentación. Ciertos elementos (diamantes) se unen a los promotores de los genes que codifican a los elementos positivos. Las flechas indican regulación positiva y las líneas perpendiculares regulación negativa. Modificado de Kuhlman y cols., 2007.

A pesar de que entre los reinos, los componentes del reloj molecular no se conservan (e incluso cuando están conservados entre especies, pueden ser usados de diferentes maneras), los mecanismos empleados sí lo hacen. La propuesta general es que la base de las oscilaciones del reloj molecular está constituida por asas de retroalimentación positivas y negativas, en donde los genes reloj se activan y se apagan a causa de las proteínas que

codifican, que además de ser sintetizadas, son degradadas (Dunlap, 1999). En la Figura 1 se muestra un esquema del modelo.

Además de deducir las bases genéticas y bioquímicas del funcionamiento del oscilador celular, faltaría entender cómo se lleva a cabo la sincronización del oscilador intracelular con los ciclos geofísicos. Al respecto, ha sido sugerido que la luz induce la degradación de algún componente, cuyos niveles disminuyen durante el día subjetivo, o induce la formación de otro componente, cuyos niveles se incrementan durante este mismo periodo (Harmer y cols., 2001).

En los genes reloj de *Drosophila* se ha estudiado el efecto de un pulso de luz. Los experimentos muestran que bajo la presencia del estímulo fótico, TIMELESS (TIM) se degrada rápidamente debido a que CRYPTOCHROME (CRY) ejerce un efecto negativo en ella. En la Figura 2 se observa un esquema del modelo (Harmer y cols., 2001).

2.1.2 Los eventos biofísicos y el funcionamiento de la maquinaria circadiana

La enorme cantidad de información sobre las oscilaciones moleculares de retroalimentación negativa, minimizó la investigación del papel de las señales iónicas y eléctricas en el funcionamiento de la maquinaria circadiana.

Existe, sin embargo una teoría que conserva la idea de red de retroalimentación pero que está basada en las propiedades de la membrana celular. Los autores (Njus y cols., 1974, 1976) plantean que las oscilaciones circadianas se generan a partir de la relación entre los iones y las estructuras de la membrana celular encargadas de transportarlos (por ejemplo canales, acarreadores y bombas). El modelo supone que la retroalimentación negativa surge del efecto de las concentraciones iónicas en la actividad de los “transportadores” de iones, los cuales a su vez afectan la distribución iónica a través de la membrana. El retraso temporal necesario para que se dé la oscilación del sistema estaría dado

por la cinética de activación e inactivación de la función de las proteínas de la membrana.

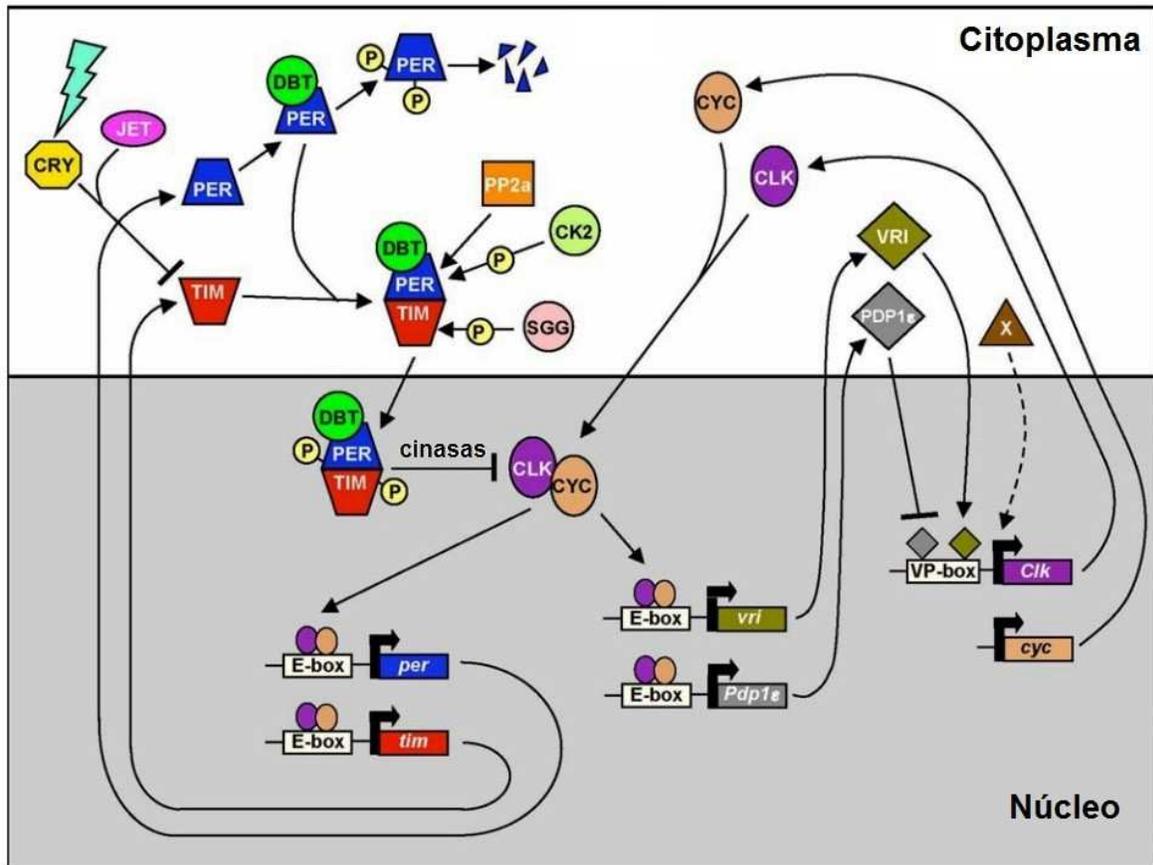


Figura 2: Modelo del reloj circadiano de *Drosophila melanogaster*. Óvalos verticales, elementos positivos CLOCK (CLK) y CYCLE (CYC); rectángulos blancos, E-box; flechas dobladas, promotores; tetraedros, elementos negativos TIMELESS (TIM) y PERIOD (PER); círculos, proteínas cinasas DOUBLE-TIME (DBT), SHAGGY (SGG) y CASEÍNA CINASA 2 (SK2); cuadrado, PROTEÍNA FOSFATASA 2A (PP2a); octágono CRYPTOCHROME (CRY); óvalo horizontal, JETLAG (JET); diamantes, componentes de retroalimentación adicionales VRILLE (VRI) y PAR DOMAIN 1ε (PDP1ε); triángulo, activador putativo de la proteína; P, fosforilación. Las flechas indican regulación positiva y las líneas perpendiculares regulación negativa. Modificado de Kuhlman y cols., 2007.

Este modelo tiene varias implicaciones que pueden ser probadas de manera experimental: cambios circadianos en los gradientes iónicos transmembranales y en la actividad de las rutas del transporte iónico transmembranal, así como modificaciones en la oscilación del reloj circadiano debidas a la manipulación de los gradientes iónicos a través de la membrana y de la actividad de las proteínas transportadoras. Los intentos para obtener sustento experimental apoyando esta hipótesis, conocida como la hipótesis de Njus-

Sulzman-Hastings, fueron infructuosos. Sin embargo en la actualidad, la combinación de técnicas electrofisiológicas y de manipulación genética ha permitido poner de relevancia la importancia de los procesos biofísicos de la membrana. Con respecto a los invertebrados, se conoce que los eventos eléctricos membranales juegan un papel importante tanto en la generación como en la sincronización de los ritmos circadianos.

En los caracoles *Aplysia* y *Bulla* está bien establecido el ritmo circadiano en la frecuencia de disparos de una pequeña población de neuronas en la base de la retina, consideradas como el marcapaso del ritmo (Block y Wallace, 1982; Jacklet, 1969). Se ha mostrado que estas neuronas tienen un ritmo circadiano en la conductancia de la membrana, quien muestra un valor elevado durante la noche comparado con aquél obtenido durante el día. Michel y cols. en 1999 demostraron que la responsable de este cambio circadiano es una corriente de potasio rectificadora tardía, sensible a tetraetilamonio (TEA).

McMahon y Block en 1987 mostraron que tanto una despolarización continua, inducida elevando la concentración extracelular de potasio, como una hiperpolarización continua, inducida disminuyendo el sodio extracelular, del potencial de la membrana de las células marcapaso responsables de la actividad visual de *Bulla*, tiene como consecuencia un incremento en el periodo de la oscilación libre. Por su parte Khalsa y cols. en 1990 mostraron que la eliminación de una corriente de cloruro en las neuronas marcapaso de *Bulla*, disminuye el periodo de oscilación.

Resultados más recientes han hecho mucho más evidente la importancia de la señalización iónica y eléctrica a nivel celular. Pusieron de manifiesto que las asas transcripcionales de regulación negativa son necesarias mas no suficientes para mantener un ritmo circadiano robusto.

La naturaleza rítmica de las células marcapasos tradicionalmente había sido descrita a partir de las propiedades individuales de las células. Nitabach y cols., en 2002 y 2005 pusieron en crisis esta premisa demostrando que la comunicación interneuronal es necesaria para sostener los ritmos moleculares básicos. Las manipulaciones experimentales que alteraban la excitabilidad de la membrana de las células del marcapaso en *Drosophila* o que interrumpían la transmisión de la señal eléctrica, tuvieron como consecuencia un amortiguamiento considerable de los ritmos moleculares.

Harrisingh y cols., 2007 demostraron que el Ca^{2+} intracelular juega un papel esencial en la regulación *in vivo* del periodo del ritmo de actividad de *Drosophila* en condiciones constantes. También observaron un cambio en el periodo de la oscilación circadiana celular debida a una acumulación nuclear del factor de transcripción.

Con respecto al papel de los eventos eléctricos en la sincronización de los ritmos circadianos, Jacklet y Lotshaw en 1981 mostraron que los pulsos de luz y las inyecciones de potasio en una concentración más alta que la fisiológica, generan curvas de respuesta de fase similares en el ritmo circadiano ocular de *Aplysia*. Concluyeron que la sincronización es debida a una despolarización de la membrana de las células involucradas. Por su parte Colwell y cols. (1994) observaron que los desplazamientos de fase provocados por la luz en el ritmo antes mencionado, provocan un incremento en el flujo de calcio.

El calcio intracelular en las células del marcapaso de *Bulla* genera una curva respuesta de fase del ritmo de frecuencias de disparos similar a la que produce la luz (Geusz y Block, 1994). En contraposición, la hiperpolarización producida por potasio extracelular alto o pulsos intracelulares hiperpolarizantes, producen una curva respuesta de fase similar a la producida por la

luz (o por elementos despolarizantes), pero con un corrimiento de fase de 180° (Khalsa y Block, 1990; McMahon y Block, 1987).

En resumen, la evidencia experimental sugiere que la actividad eléctrica de las células involucradas en la generación y sincronización del ritmo es fundamental para la generación y sincronización de las oscilaciones circadianas. Aunque se conoce bastante con respecto al mecanismo que subyace a las oscilaciones celulares autónomas, la conexión entre éstas y las salidas que controlan los ritmos fisiológicos y de comportamiento, está pobremente entendida. Los resultados indican que los eventos eléctricos juegan un papel crítico (Nitabach y cols., 2006; Cao y Nitabach, 2008).

2.2 La organización funcional del ojo compuesto del acocíl

En la Figura 3 se muestra un esquema de la organización del ojo compuesto del acocíl. Está formado por entre 2000 y 3000 unidades funcionales llamadas omatidios. Cada omatidio, que descansa bajo una faceta hexagonal de la córnea, está equipado con su propio cristalino, ocho células fotorreceptoras y un rabdomo formado por microvellosidades densamente empaquetadas que provienen de la superficie de las células fotorreceptoras (rabdoméricas). El rabdomo se reconoce como el orgánulo especializado en la absorción de la luz. En esta estructura hay una alta concentración del fopigmento rodopsina lo que le permite ser el sitio en donde se lleva a cabo el proceso de la fototransducción (Shaw y Stowe, 1982).

En el acocíl, como en muchos otros invertebrados, la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales a la luz es una despolarización graduada en la cual se puede distinguir una fase transitoria rápida que depende de la intensidad luminosa; inmediatamente después se observa una fase sostenida que se asocia con la duración del estímulo y que precede a la repolarización de la membrana (Picones y Aréchiga, 1990).

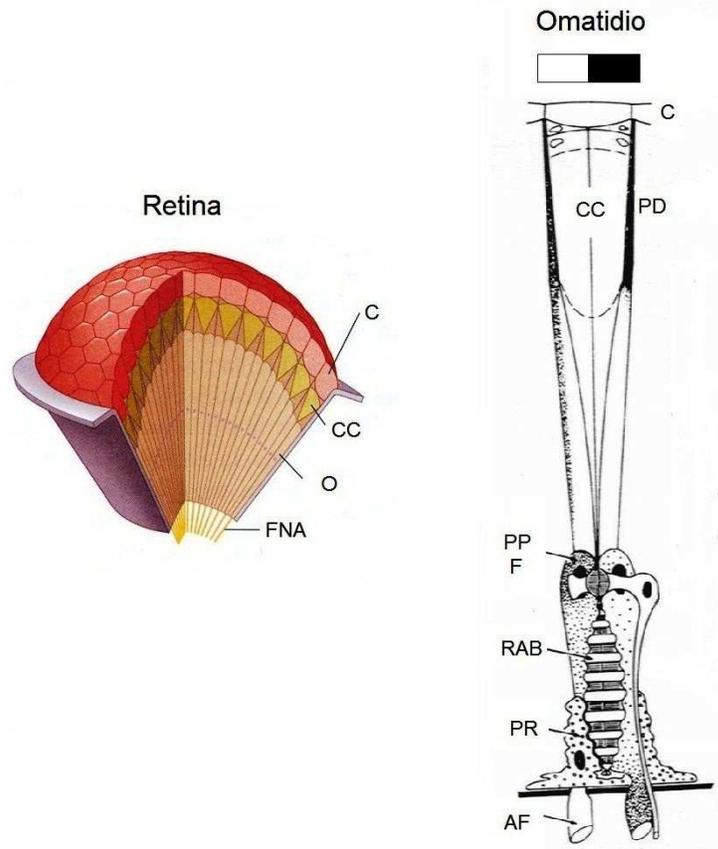


Figura 3: Esquema de la estructura del ojo compuesto del acocil. Se muestra la retina y un omatidio adaptado a la luz (izquierda) y a la oscuridad (derecha). C, córnea; CC, cono cristalino; O, omatidio; FNA, fibra neuronal aferente; F, célula fotorreceptora; RAB, rabdomo; AF, axón de la célula fotorreceptora; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; PR, pigmento reflector. Modificado de Moyes y Schutle, 2007; Shaw y Stowe, 1982.

En los crustáceos la cascada de fenómenos bioquímicos y biofísicos que se desencadenan por la absorción de la luz está lejos de conocerse íntegramente. Se sabe que la transducción inicia cuando la luz es absorbida por el pigmento visual rodopsina que a su vez activa una proteína G; la proteína G implicada en la fototransducción del acocil es del tipo G_q (Terakita y cols., 1993a, 1993b y 1998). En las células fotorreceptoras de los invertebrados se sabe que la absorción de la luz activa la vía de los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y

diacilglicerol (DAG), a través de la estimulación de la fosfolipasa C (Greenspan, 2007).

A partir de este punto los fenómenos subsecuentes varían con la especie. Así, por ejemplo, En *Limulus* el IP_3 libera calcio de almacenes intracelulares; el calcio activa una guanilato ciclasa que produce GMP cíclico (GMP_c); el GMP_c se une a un canal permeable a sodio activado por nucleótido cíclico y esto produce una despolarización de la membrana celular. Se cree que el DAG, el otro producto de la reacción, activa otro tipo de conductancias de sodio y/o calcio que también participan en la despolarización de la membrana. Por otra parte, en los fotorreceptores de *Drosophila*, el papel de IP_3 no parece ser relevante debido a que la mutante nula al gen del receptor a IP_3 presenta respuestas normales a la luz. Esto sugiere que un incremento en la concentración de DAG o en la hidrólisis de sus productos es lo que activa los canales implicados en esta fase; probablemente canales tipo TRP y TRPL (por las siglas de los nombres en inglés, transient receptor potential y transient receptor potential like) (Acharya y cols., 1997; Ukhanov y cols., 1998; Raghu y cols., 2000; Fein, 2003; Garger y cols., 2004; Minke y Parnas, 2006).

En lo que respecta a la repolarización de la membrana de los fotorreceptores de los invertebrados, la evidencia experimental sugiere que están implicadas corrientes de potasio sujetas a mecanismos regulatorios. Por ejemplo, en *Drosophila*, *Limulus* y *Hermisenda* la corriente de potasio disminuye cuando se incrementa el calcio intracelular (Lisman y Brown, 1972; Lisman y cols., 1982; Coles y Orkand, 1985; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Nassi, 1991; Baumann, 2000; Miller y Glantz, 2000).

Debido a la presencia de pigmentos accesorios en cada omatidio, el acocil tiene la posibilidad de regular la cantidad de luz que llega a las células fotorreceptoras. El ojo compuesto del acocil es del tipo superpuesto (típico de los animales nocturnos). Cuando

está adaptado a la oscuridad tiene la capacidad de coleccionar la luz proveniente de muchas facetas a un solo rabadomo, aumentando así la potencia detectora del estímulo luminoso. Esto es debido a que los rabadomos a la altura del cristalino están separados por una zona ópticamente clara. En condiciones luminosas, los pigmentos accesorios distales localizados dentro de las células pigmentarias distales del omatidio, evitan el paso de luz entre omatidios causando así una conversión hacia un ojo por aposición en donde cada omatidio permanece ópticamente aislado (Shaw y Stowe, 1982) (Figura 3).

Además de los pigmentos accesorios distales, los pigmentos accesorios proximales localizados dentro de las células fotorreceptoras, también participan en la regulación de la cantidad de luz que pueda llegar al rabadomo. En el estado de adaptación a la oscuridad, al igual que los pigmentos accesorios distales, se encuentran en posición polar y en el estado de adaptación a la luz, a lo largo del eje principal de las células fotorreceptoras (Shaw y Stowe, 1982) (Figura 3).

La respuesta eléctrica a la luz de un fotorreceptor, además de depender de la cantidad de fotones que lleguen al rabadómero, depende de las condiciones previas de iluminación debido a que éstas modifican el estado fisiológico de la célula. Cuando el fotorreceptor está adaptado a la oscuridad, la amplitud y la duración de su potencial de receptor son grandes si se las compara con las de uno adaptado a la luz.

La adaptación se define como un cambio en la sensibilidad de la célula fotorreceptora y la sensibilidad como el recíproco del número de fotones que se necesitan para producir una respuesta estándar (por ejemplo una amplitud arbitraria del potencial de receptor) (Hildebrand y cols., 1974). La adaptación luminosa de las células fotorreceptoras puede ser el resultado de dos procesos diferentes: 1) "La adaptación del pigmento" causada por el blanqueamiento del fotopigmento y su subsecuente regeneración en

la oscuridad. 2) “La adaptación de la membrana” debida a cambios en la inactivación de los canales implicados en la respuesta, de los gradientes iónicos a través de la membrana, de las permeabilidades iónicas, etcétera (Hildebrand y cols., 1974).

Hoy en día los mecanismos biofísicos y bioquímicos que subyacen a la adaptación de la membrana de las células fotorreceptoras están lejos de conocerse íntegramente, sin embargo se sabe que la concentración de calcio intracelular es un factor clave (Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991): es mayor en el estado de adaptación a la luz que en el estado de adaptación a la oscuridad (Brown y Blinks, 1974).

2.3 El ritmo de sensibilidad a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil

El acocil es un crustáceo nocturno dulceacuícola que pertenece a la orden decápoda. Ha sido utilizado para estudiar algunos mecanismos que regulan el funcionamiento de los seres vivos. Entre ellos se incluyen la bases neuronales del comportamiento reflejo, los mecanismos de liberación hormonal y la relación entre los sistemas nervioso y endocrino. En lo que respecta al estudio de los ritmos circadianos, se ha probado que es un excelente modelo debido a su capacidad de sobrevivir en las condiciones no naturales que se requieren para los registros a largo plazo.

En este animal se ha detectado una gran variedad de ritmos circadianos tanto en el comportamiento como en la actividad fisiológica. Algunos ejemplos son los ritmos de actividad locomotora, de la frecuencia cardíaca, de respuesta sensorial y de la posición en los pigmentos accesorios retinianos (Aréchiga y cols., 1993).

En este trabajo se estudiará la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil. Por tanto se prestará especial atención al ritmo de sensibilidad a la luz de los

fotorreceptores visuales el cual se vuelve aparente mediante cambios en la amplitud del electrorretinograma (ERG) durante el ciclo de 24 horas (Figura 4). En el acocil el ERG es la expresión de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales, sin que haya participación de otras células del sistema visual (Naka y Kuwabara, 1959) y su amplitud depende tanto de la probabilidad de que un fotón alcance la retina, como de la excitabilidad de la célula fotorreceptora.

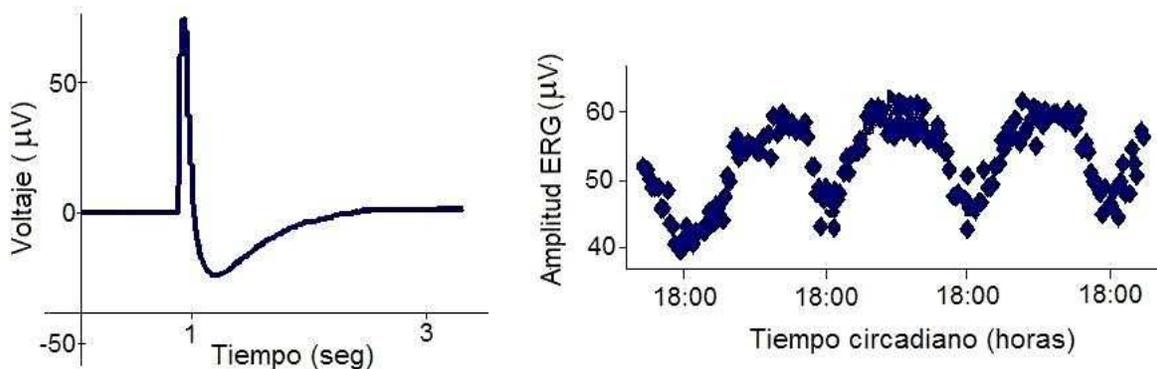


Figura 4: Electrorretinograma (ERG) del acocil *Procambarus clarkii* (izquierda). Ritmo de la amplitud del ERG (derecha).

Desde hace al menos tres décadas, el ritmo del ERG ha sido estudiado siendo hasta este momento materia de debate el establecimiento y la organización de los principales elementos que participan en su generación y expresión, así como los mecanismos implicados en el proceso de sincronización.

Se ha propuesto que en animales íntegros el marcapaso circadiano se localizaría en el protocerebro, en el ganglio cerebroide, y que por medio de vías axonales se comunica con la retina. Sin embargo, también se ha mostrado que el ritmo del ERG persiste en tallos oculares aislados, lo que sugiere un origen local de la ritmicidad en el que estaría fuertemente implicado el sistema neurosecretor órgano-X-glándula sinusal. Incluso se ha planteado que la retina por sí sola es un generador circadiano debido a que su actividad

eléctrica varía en el ciclo de 24 horas cuando se aísla del tallo ocular (Figura 5).

Con respecto al proceso de sincronización por luz se ha propuesto que participan los fotorreceptores retinulares y no-retinulares, en el ganglio cerebroide y en el 6° ganglio abdominal (Sánchez y Fuentes Pardo, 1977; Fuentes Pardo e Inclán Rubio, 1987; Aréchiga y cols., 1993; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 1998; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 2002; Hernández y Fuentes Pardo, 2001; Fanjul Moles y Prieto Sagredo, 2003).

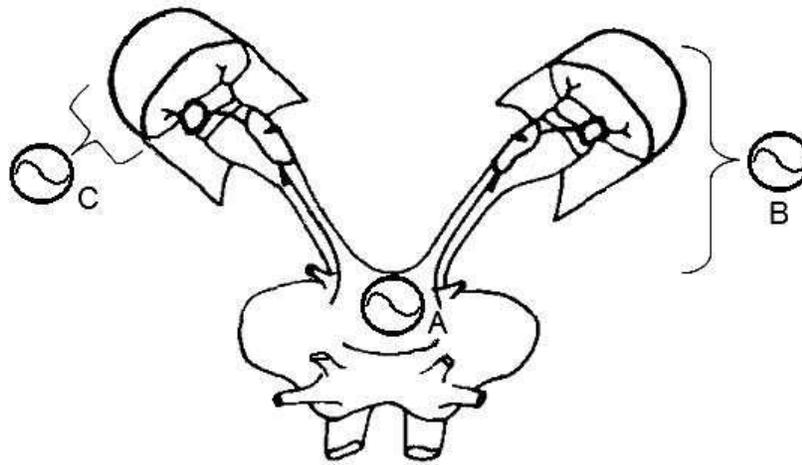


Figura 5: Representación esquemática del ganglio cerebroide y los tallos oculares del acocil. Se muestran los sitios en los que se ha propuesto la existencia de osciladores autosostenidos. A) protocerebro en el ganglio cerebroide, B) tallo ocular y C) retina. Modificado de Aréchiga y cols., 1993.

2.4 La hormona dispersora del pigmento y el ritmo de sensibilidad a la luz del acocil

Para entender la organización funcional de los ritmos circadianos, no se puede dejar de lado la importante participación de los sistemas endocrinos. En el acocil, el complejo órgano-X-glándula sinusal representa la estructura neuroendocrina más importante. Se trata de un conglomerado de entre 100 y 150 neuronas cuyos cuerpos celulares se localizan en el llamado órgano-X, en la parte ventral del tallo ocular a la altura de la médula terminal, y cuyos axones

corren distalmente para terminar en la glándula sinusal, que se localiza en el lado dorsal del tallo ocular, entre la médula interna y la externa (Figura 6). En los somas de este sistema se sintetizan las neurohormonas que serán conducidas por vía axonal a la glándula sinusal, el sitio en donde se almacenan y liberan hacia la hemolinfa. Las evidencias histoquímicas y de microscopía electrónica sugieren que en la glándula sinusal no hay más de 6 tipos de células neurosecretoras. La activación de un tipo particular resulta en la liberación de una familia específica de hormonas. Por el momento se conocen 5 clases diferentes: la hormona liberadora de la gónada, la hormona inhibitoria de la muda, la hormona hiperglicemiante, la hormona concentradora del pigmento y la hormona dispersora del pigmento (Welsh, 1961; Fingerman, 1992;). En lo que sigue hablaremos del papel que desempeña esta última hormona en el ritmo de sensibilidad a la luz del acocil.

La hormona dispersora del pigmento que se encuentra en los tallos oculares del acocil *Procambarus clarkii* es una de las diferentes formas que se han encontrado en las distintas clases de crustáceos e insectos. Los miembros de la familia peptídica a la que pertenece, conocida como PDH/PDF, conservan el número de aminoácidos en la cadena (18 residuos), el amino terminal Asn, el carboxilo terminal Ala-amida y, al menos, 50% de la secuencia. La primera de estas hormonas en ser caracterizada provino de los tallos oculares de *Pandalus borealis* y es referida como α -PDH (por sus siglas en inglés). Después se identificó un octadecapéptido en los tallos oculares de *Uca pugilator* que difería en 6 posiciones y se le llamó β -PDH. A partir de ahí se han caracterizado 14 formas de hormona dispersora del pigmento. La que se encontró en *Procambarus clarkii* se conoce como [Glu¹⁷]- β -PDH y su secuencia es: NSELINSILGLPKVMNEA-NH₂ (Rao y Riehm, 1989; Rao, 2001). En lo que resta del texto se identificará a esta hormona en particular como hormona dispersora del pigmento o HDP.

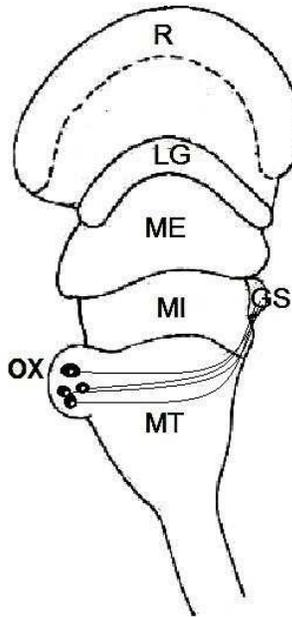


Figura 6: Vista lateral del tallo ocular del acocil. R, retina; LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminal; GS, glándula sinusal; OX, órgano-X. Modificado de Aréchiga, 1993.

Es bien sabido que la HDP desempeña un papel fundamental en los ritmos de los crustáceos. Inicialmente se la relacionó con los cambios periódicos en el color de la epidermis (Köller, 1925 y 1927) y después se observó su participación en la migración periódica del pigmento distal de los ojos compuestos (Welsh, 1930).

Como se vio en la sección “La organización funcional del ojo compuesto del acocil” de este capítulo, los pigmentos retinales accesorios, proximales y distales, actúan como parareceptores: regulan la entrada de luz a las células fotorreceptoras visuales. Se sabe que los pigmentos proximales migran como una respuesta directa a la luz y la oscuridad, y que los pigmentos distales lo hacen por la influencia de la hormona dispersora del pigmento (HDP), la cual se libera desde la glándula sinusal como resultado

de un reflejo neuroendocrino iniciado por el estímulo luminoso (Kleinholz y cols., 1962a y 1962b).

El reflejo neuroendocrino inicia cuando los fotorreceptores visuales activan las fibras aferentes visuales, las cuales mandan su señal hacia el ganglio óptico en el protocerebro. Por medio de una vía eferente se activa el complejo órgano-X-glándula sinusal lo que da como resultado la liberación de la HDP a la circulación general. Esta acción tiene como consecuencia que los pigmentos distales se dispongan a lo largo de los omatidios. Como bajo estas condiciones los pigmentos proximales también se dispersan, da como resultado que en la superficie del ojo se pueda detectar la reducción de un área clara o pseudopupila. La pseudopupila es el resultado de la reflexión de la luz en la superficie del ojo y está a cargo de los llamados pigmentos reflectores que se localizan en la membrana basal del omatidio (Figura 3).

En el animal intacto, la posición de los pigmentos proximales muestra un ritmo circadiano bajo oscuridad continua y la posición de los pigmentos distales un ritmo circadiano bajo luz u oscuridad continua. De esto último resulta una variación circadiana en el tamaño de la pseudopupila y en la sensibilidad a la luz de la retina.

En el acocil ha sido demostrado que una inyección de la hormona dispersora del pigmento produce cambios de fase en el ritmo del ERG que dependen del tiempo circadiano de aplicación. La curva de respuesta de fase correspondiente mostró que la HDP es un sincronizador no luminoso del ritmo del ERG (Verde y cols., 2007). Adicionalmente la HDP es capaz de reducir la amplitud de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales a la luz en preparaciones como el tallo ocular aislado, donde los pigmentos accesorios son incapaces de cambiar su posición (Gaus y Stieve, 1992; Verde y cols., 2007).

2.5 El factor dispersor del pigmento

En los insectos, la hormona dispersora del pigmento está fuertemente implicada en la generación y sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotora, sin embargo sus tareas son tan complejas que están lejos de entenderse en su totalidad. Se le ha nombrado factor dispersor del pigmento, FDP, debido a que no hay un sitio en donde se acumule la sustancia.

La localización del FDP en un subconjunto de neuronas que forman parte del marcapaso en *Drosophila melanogaster* (Homberg y cols, 1991; Helfrich-Förster, 1995) y en *Leucophaea maderae* (Petri y Stengl, 1999; Reischig y Stengl, 2003), así como la clonación del gen *pdf* (por sus siglas en inglés) (Park y Hall, 1998), dieron inicio a las manipulaciones genéticas que involucran a este péptido y que sirvieron para mostrar el papel que éste juega dentro de la maquinaria circadiana de los insectos (Renn y cols., 1999).

Los resultados experimentales sugieren que el FDP es una molécula “señalizadora” dentro del reloj circadiano. Además de reforzar y sincronizar las oscilaciones de los relojes individuales, transfiere las señales circadianas hacia otros grupos de neuronas de diferentes áreas del cerebro (Helfrich-Förster, 2005; Schneider y Stengl, 2005).

En el marcapaso de los insectos (*Drosophila melanogaster*), el FDP es crucial para ajustar la amplitud, el periodo y la fase de la oscilación de los diferentes jugadores que lo componen. Las observaciones experimentales dejan ver que en el funcionamiento de la circuitería del marcapaso circadiano del cerebro de la *Drosophila* está implicada una jerarquización en los elementos que lo componen.

Con respecto al papel del FDP como sincronizador no fótico del reloj de los insectos, en 1997 Petri y Stengl demostraron que una

inyección de este péptido en la cucaracha *Leucophaea maderae*, tiene como consecuencia un cambio en la fase, dependiente del tiempo circadiano de aplicación, del ritmo circadiano de la actividad locomotora; Singarevel y cols. en 2003 encontraron que el FDP también induce un cambio de fase dependiente del tiempo circadiano de aplicación, en el ritmo locomotor del grillo *Gryllus bimaculatus*. Recientemente, en 2009, Zhang y cols., así como Cusumano y cols., demostraron que el FDP tiene un papel fundamental en la sincronización mediada por la luz del ritmo motor de *Drosophila*. Los resultados sugieren que CRYPTOCHROME desencadena la señalización a través del FDP, quien determina la fase del ritmo motor.

Es claro que se puede decir muy poco de las rutas de señalización del FDP sin conocer su receptor (Helfrich-Förster, 2005). La identificación de los blancos del péptido, así como la determinación de los mecanismos de señalización, representan metas importantes para entender la red neuronal y molecular que subyace al reloj biológico de los insectos. En 2005 se encontró que en la *Drosophila* una proteína G (CG13758) de la clase II o B (de la familia secretina) es el receptor específico para el FDP (Mertens y cols., 2005; Hyun y cols., 2005; Lear y cols., 2005). Después, Janssen y cols. en 2008, identificaron tres receptores para este péptido pero en *Caenorhabditis elegans*. El receptor a FDP, PDFR, *in vitro* señala predominantemente a través de AMPc y débilmente a través del Ca²⁺.

Hasta este momento no se ha formado un modelo que dé cuenta de las acciones del factor dispersor del pigmento en la maquinaria circadiana de los insectos. Las evidencias experimentales disponibles sugieren que el FDP es fundamental para que la maquinaria circadiana trabaje adecuadamente. Las tareas que lleva a cabo recaen en la generación y la sincronización del ritmo, sin embargo son tan complejas, que en realidad están lejos de entenderse en su totalidad.

3 Planteamiento del Problema

3.1 Objetivo

El propósito principal de este trabajo es establecer la influencia que ejerce la hormona dispersora del pigmento (HDP) en la respuesta de los fotorreceptores visuales, dado el papel determinante que la hormona en cuestión y estas estructuras desempeñan en la actividad circadiana de respuesta a la luz.

Es por ello que se pretende:

1. Establecer el efecto de la HDP exógena sobre las características del potencial de receptor (PR) de las células fotorreceptoras visuales del acocil *Procambarus clarkii* en el ciclo de 24 horas.
2. Establecer las principales corrientes iónicas que subyacen al potencial de receptor en el ciclo de 24 horas.
3. Establecer el efecto de la HDP exógena sobre las principales corrientes iónicas que subyacen al PR en el ciclo de 24 horas.

3.2 Hipótesis

“La hormona dispersora del pigmento ejerce una acción periódica en las características del potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii*”.

4 Materiales y Métodos

4.1 Aprobación por el comité de ética

Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (26 de noviembre de 2008, proyecto IN200208).

4.2 Material biológico

Se emplearon acociles adultos de sexo indistinto de la especie *Procambarus clarkii* en etapa de intermuda. Los acociles se mantuvieron en acuarios oxigenados a una temperatura de 15°C y fueron alimentados tres veces por semana con alimento comercial para camarones (Camaronina).

Con el fin de conocer el tiempo circadiano de los animales, por lo menos un mes previo a los experimentos se mantuvieron bajo fotoperiodos en los que se alternaban 12 horas de luz con 12 horas de oscuridad (se sincronizaron con un fotoperiodo luz-oscuridad 12:12). Para verificar el tiempo circadiano de la población, se escogía una muestra aleatoria de cinco acociles y se registraba el ritmo del electrorretinograma (ERG) de cada uno. Definimos las 0 horas tiempo circadiano (TC) como el punto del ciclo en el que el nivel de actividad alcanza el 50% de amplitud. Debido a que el acocil *Procambarus clarkii* es un animal nocturno, las 0 horas TC coinciden con el inicio de su noche subjetiva (Pittendrigh, 1965; Pittendrigh, 1981). TC=24 horas ocurre un ciclo después.

4.3 Soluciones

Se utilizó solución salina van Harrevelde modificada (VH) (van Harrevelde, 1936). Su composición en mM es: NaCl 205, KCl 5, MgSO₄ 2, CaCl₂ 13, Hepes 5; pH 7.3-7.4. La solución con hormona dispersora del pigmento (HDP) se obtuvo disolviendo la cantidad adecuada de hormona (secuencia NSELINSILGLPKVMNEA, sintetizada por

Genemed Synthesis, Inc) en solución VH. Se eligió que la concentración de HDP en los experimentos fuera de 1nM a partir de una curva dosis-respuesta (de 1×10^{-12} M a 1×10^{-6} M) que previamente se construyó probando el efecto de este fármaco en el área de la pseudopupila del acocil. Se corroboró que la dosis elegida era adecuada utilizando el efecto de diferentes concentraciones (de 1×10^{-11} M a 1×10^{-8} M) de solución de HDP en la amplitud del potencial de receptor de las células retinulares del acocil (datos no publicados del laboratorio de Cronobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México).

4.4 Registros eléctricos

Los registros eléctricos fueron hechos en tallos oculares aislados. Las réplicas son independientes, esto es, fueron hechas en tallos oculares diferentes. El protocolo que se siguió para medir tanto el potencial de receptor (PR) de las células retinulares del acocil, como las corrientes que subyacen a dicha respuesta eléctrica, se describe a continuación:

1. Después de que el acocil hubo sido anestesiado por baja temperatura, se cortó el tallo ocular desde su base. Con el fin de tener acceso a la retina se abrió una ventana de aproximadamente 3 mm² sobre la capa de quitina del ojo en la córnea dorsal. El tallo ocular extirpado se sumergió en una cámara de perfusión continua (2 ml de capacidad, 0.5 ml/s tasa de flujo) dentro de una jaula de Faraday y se mantuvo en oscuridad constante.
2. Las respuestas eléctricas intracelulares se registraron con un amplificador Axoclamp 2A (Axon Instruments). El potencial de receptor se registró usando la configuración *Bridge* del amplificador y las corrientes que subyacen a esta respuesta eléctrica usando la configuración "*discontinuous single electrode-switched voltage-clamp*"; en este caso el *switch* se ajustó de acuerdo con la velocidad del electrodo (entre

500 y 1,000 Hz). Todas las respuestas se digitalizaron a una velocidad de 100 μ s/punto con la interfaz Digidata 1200 Interface (Axon Instruments).

3. Se utilizaron electrodos de vidrio de borosilicato (Kimax-51) que fueron pulidos hasta obtener una resistencia de 50-70 M Ω una vez que fueron llenados con 2.7 M KCl. El microelectrodo se introdujo por la ventana hecha en la capa de quitina del ojo con la ayuda de un micromanipulador. El criterio para considerar que el electrodo ha penetrado la membrana de una célula retinular es la detección de una baja súbita en el voltaje, correspondiente al potencial de la membrana en reposo (PMR), y una despolarización que se presenta cuando la preparación es estimulada con una luz de prueba (1,800 lux de intensidad, 10 μ s de duración) que se genera con un fotoestimulador Grass (PS33) y se aplica paralelo al eje longitudinal del tallo ocular.
4. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en obscuridad, bajo temperatura constante (15°C) y en diferentes momentos del ciclo circadiano.

4.5 El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor

Una vez que la forma del potencial de receptor (PR) permaneció sin cambio, el PR se registró cada 2 minutos. Durante los primeros 10 minutos el tallo ocular se perfundió con solución van Harrevelde (VH) la que inmediatamente después fue substituida por la solución con hormona dispersora del pigmento (HDP). Con el fin de analizar la posible reversibilidad de los efectos producidos por la hormona, a partir del minuto 30 del experimento la solución del baño fue substituida nuevamente por solución VH en la cual permaneció el tallo ocular por 30 minutos más. Es importante resaltar que 20 minutos de perfusión con la solución experimental

es un tiempo suficiente para alcanzar el máximo efecto producido por la hormona.

Para llevar a cabo el control del experimento se siguieron los pasos que se marcaron anteriormente, excepto que el primer cambio de solución (VH a VH conteniendo HDP) es de VH por VH.

4.6 El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre las corrientes que subyacen al potencial de receptor

Las corrientes generadas por la luz fueron obtenidas estimulando el tallo ocular con la luz de prueba y fijando el voltaje (durante todo el tiempo) al valor del potencial de membrana en reposo, PMR.

Para observar los efectos del voltaje, durante el pico de la corriente generada por la luz se fijó el voltaje a diferentes valores: con respecto al valor del PMR, desde valores hiperpolarizados hasta valores despolarizados. Para permitir la recuperación total de la corriente fue necesario dejar que transcurrieran 2 minutos entre cada pulso.

Es decir: 1) el voltaje se fija al valor del PMR; 2) se manda el estímulo luminoso; 3) durante el pico de la corriente generada por la luz el voltaje se fija a -65 mV; 4) después del pico el voltaje nuevamente se fija al valor del PMR y se deja que transcurran dos minutos. A partir de este momento los pasos 2) a 4) se repiten, pero en vez de fijar el voltaje a -65 mV se fija a -55 mV. Esta secuencia se repite hasta que el voltaje de fijación durante el pico de corriente alcance los 115 mV.

Para comparar el efecto del voltaje en la corriente generada por la luz con aquella obtenida en obscuridad total (únicamente activada por el voltaje), se siguió un protocolo similar al descrito en el párrafo anterior. La diferencia fundamental fue que no se envió el estímulo luminoso.

Es decir: 1) se fija el voltaje al valor del PMR; 2) después de 60 ms se fija el voltaje a un valor hiperpolarizado (-120 mV); 3) después de 120 ms se hace una fijación al valor del PMR y se mantiene durante 10 ms. Inmediatamente después se repite la secuencia de pasos pero en vez de fijar el voltaje a -120 mV se fija a -100 mV. La secuencia se repite hasta que la fijación de voltaje alcanza los 120 mV.

Cabe resaltar que no fue necesario esperar 2 minutos entre los pulsos debido a que como no se envía el estímulo luminoso no hay que esperar a que la membrana del fotorreceptor se adapte (ver sección "La adaptación de la membrana revelada por medio del protocolo de dos estímulos luminosos" de "Resultados").

Para describir algunas propiedades electrofisiológicas de la membrana de los fotorreceptores del acocil que contribuyen al fenómeno de adaptación a la luz, se aplicó una secuencia de dos estímulos luminosos mientras se mantuvo fijo el voltaje al valor del PMR; el tiempo entre los estímulos luminosos varió ya que fue desde 300 milisegundos hasta 2 minutos.

En todos los casos el potencial de *holding* fue el valor del PMR. El tallo ocular fue perfundido con solución control (VH) y solución con HDP.

4.7 Análisis de datos

De cada potencial de receptor se midieron dos parámetros: la amplitud y la duración (Figura 7). La diferencia de potencial desde el PMR hasta el pico se consideró como la amplitud del PR; el tiempo transcurrido desde que el PR hubo crecido el 20% de su valor máximo hasta el momento en el que hubo disminuido al 20% de su valor, se tomó como la duración del PR.

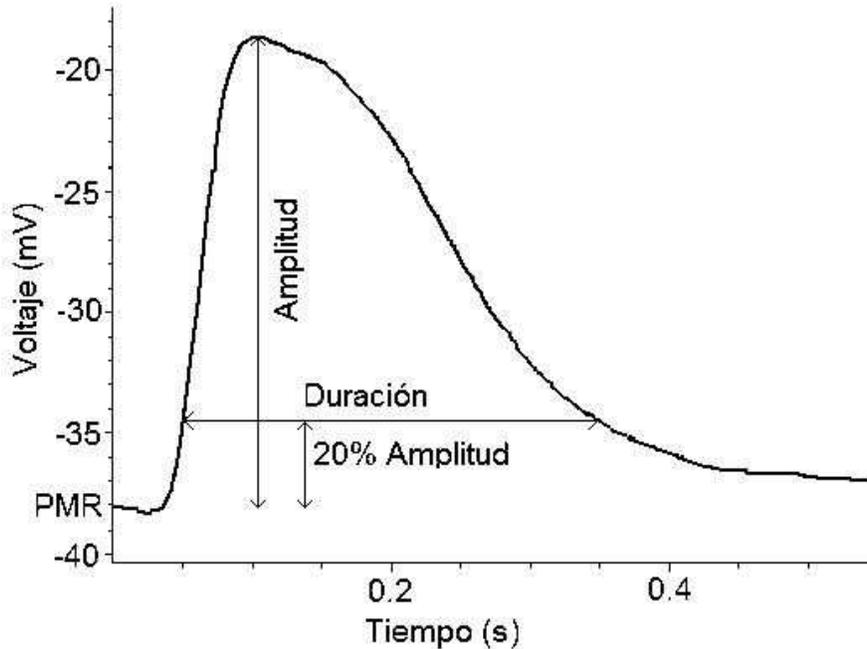


Figura 7: Potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* ante un estímulo luminoso de 1800 lux y 10 μ s de duración.

Para cuantificar la cinética de la corriente generada por la luz (Figura 8), se midió el tiempo transcurrido desde la aplicación del estímulo luminoso hasta el momento en el que el valor de la corriente alcanzó el 10% de su valor máximo (latencia, L) y el tiempo transcurrido desde que la corriente alcanzó el 10% hasta que alcanzó el 50% de su valor máximo (tiempo medio de activación, $t_{1/2}$). La fase de decaimiento de la corriente se ajustó con el programa de análisis Clampfit 9.2 de Axon Instruments, Inc a $Ae^{-t/\tau_{corriente}}+C$, donde $\tau_{corriente}$ es la constante de tiempo de decaimiento, la cual representa el tiempo en el que el valor de la corriente alcanza $1/e \approx 36.8\%$ de su valor original. En el caso del protocolo de los dos pulsos se midió el valor de la corriente al pico (pico de corriente, I_{pico}); debido a que este valor tiene una gran variación (desde 0.7 hasta 1.5 nA) se reportaron los datos normalizados del segundo pulso con respecto al primer pulso (I_{pico2}/I_{pico1}).

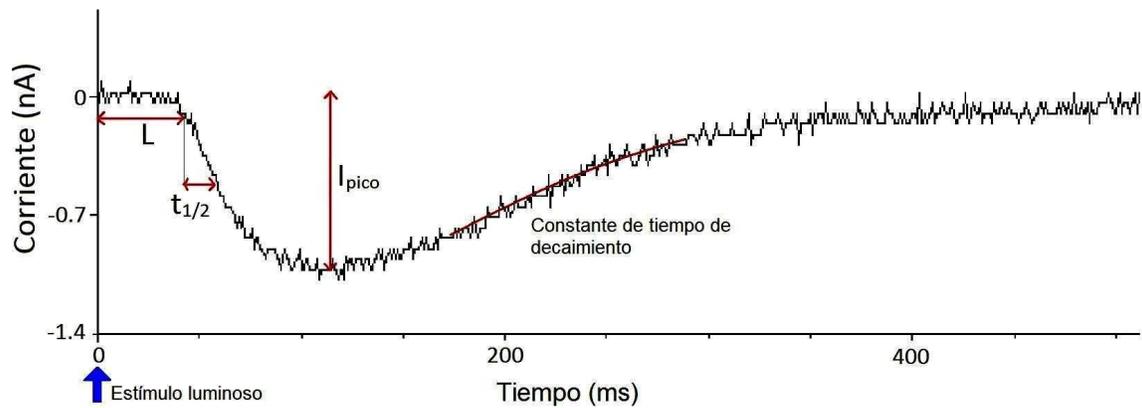


Figura 8: Ejemplo típico de la corriente generada por la luz en las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* ante un estímulo luminoso de 1800 lux y 10 μ s de duración.

Cuando se fijó el voltaje, las corrientes fueron medidas al final de los pulsos de voltaje.

En todos los casos los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar del número indicado de experimentos. Para probar si dos o más poblaciones son significativamente diferentes se usó el análisis de varianza de una vía (ANOVA-1 vía). Se usó la hipótesis nula (el promedio de todos los conjuntos de datos es igual) o la hipótesis alternativa (el promedio de uno o más de los conjuntos de datos seleccionados es diferente) para decidir si el promedio del conjunto de datos era significativamente diferente. El nivel de significancia utilizado fue de 0.05.

Debido a que las pruebas estadísticas asumen que los conjuntos de datos provienen de poblaciones que siguen una distribución normal con una varianza constante, se aplicaron pruebas de normalidad y de constancia en la varianza. En el primer caso se usó la Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk y la Prueba Kolmogorov-Smirnov; en el segundo caso se usó la Prueba de Levene y se calculó la correlación del intervalo de Spearman. Todos los datos pasaron las pruebas de normalidad y de varianza constante. Los cálculos estadísticos fueron hechos con los programas SigmaPlot 10.0 y OriginPro 7.0 Scientific Graphing and Analysis software.

Las cantidades calculadas se presentan como el dato calculado \pm la propagación de su incertidumbre. Para ajustar los datos experimentales a alguna ecuación algebraica se utilizó el método de mínimos cuadrados (OriginPro 7.0 Scientific Graphing and Analysis software).

5 Resultados

5.1 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en el potencial de receptor

En la Figura 9A se muestran dos registros representativos del potencial de receptor (PR), antes y después de 30 minutos de haber perfundido el tallo ocular en una solución de hormona dispersora del pigmento (HDP). La diferencia entre ambos experimentos es el tiempo circadiano (TC) en el que se llevaron a cabo: a las 6 horas TC y a las 18 horas TC. Se puede observar que dependiendo de la fase del ciclo circadiano en el que se realicen los experimentos, la hormona produce diferentes efectos en la amplitud y la cinética del PR. Las señales se superpusieron para facilitar la comparación.

En las Figuras 9B y -C se muestra el efecto de la HDP sobre la amplitud del PR, de tallos oculares obtenidos cada 2 horas a lo largo del ciclo de 24 horas ($n=7$). Con el fin de poder comparar la dinámica de la respuesta a distintas horas circadianas, los valores fueron normalizados: la amplitud promedio durante los primeros 10 minutos de registro en solución salina control (VH) se consideró el 100%.

Puede observarse que una vez que la preparación se perfunde con solución de HDP, la amplitud del PR disminuye en forma dependiente del TC. El máximo efecto de la hormona se observa a las 6 horas TC (Figura 9B): la amplitud del PR decrece 25% de su valor original. A las 18 horas TC (Figura 9C), 12 horas después, la HDP ejerce su efecto mínimo: la amplitud del PR conserva el 95% de su valor original.

Independientemente del TC, el efecto de la HDP en las características del PR es irreversible. Cuando la solución de HDP se sustituye por solución control, no se detecta una recuperación

del PR e incluso en algunos tiempos circadianos, el efecto del fármaco continúa hasta que alcanza un valor estable.

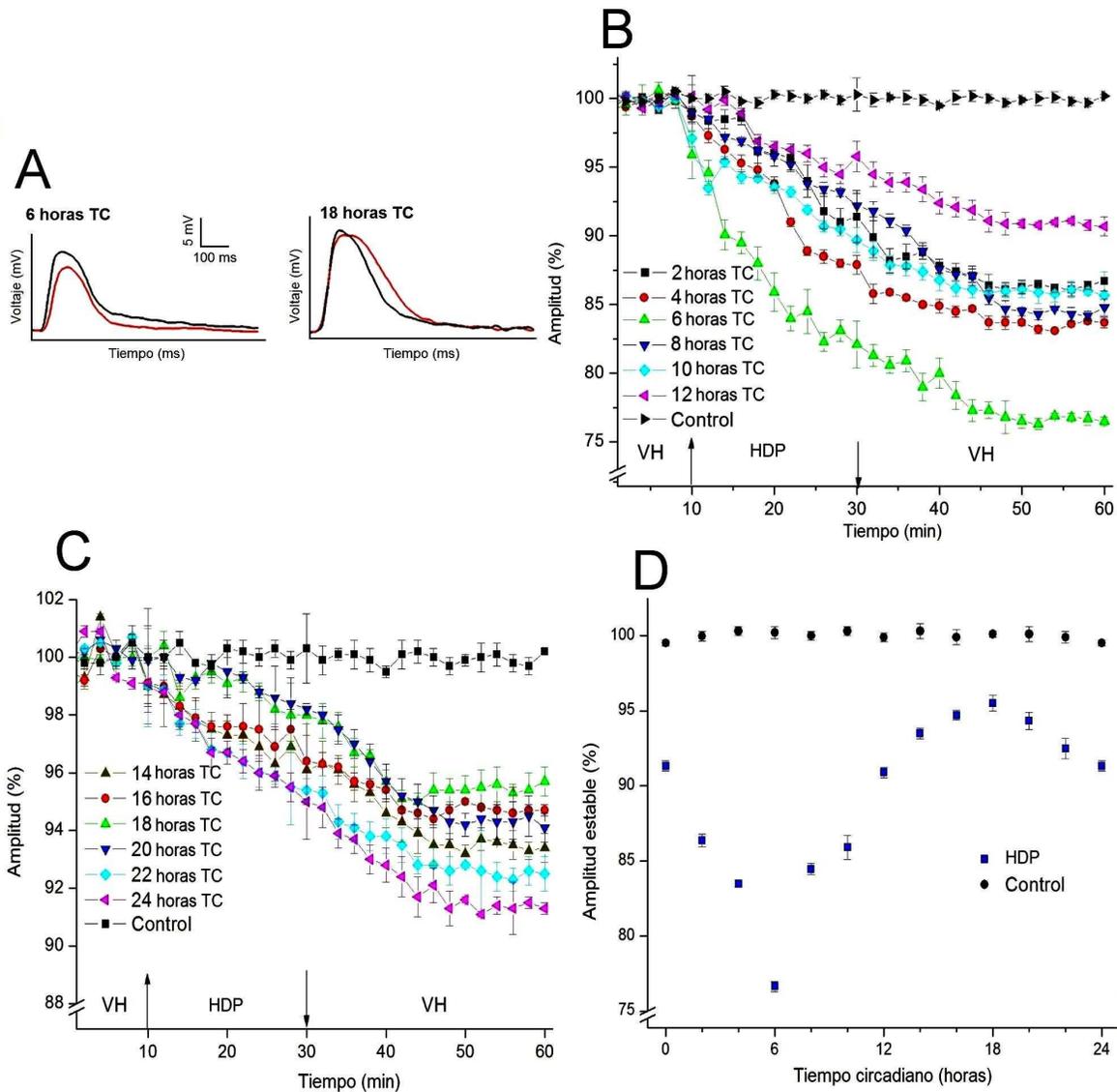


Figura 9: Efecto de la hormona dispersora del pigmento (HDP) en la amplitud del potencial de receptor (PR) durante diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=7$). (A) Respuestas típicas de una célula retinular de acocil a un estímulo luminoso antes (en negro) y después de 30 minutos de perfusión con HDP (en rojo) en dos momentos del ciclo circadiano: 6 y 18 horas TC. (B) y (C) Acción de la HDP en la amplitud del PR como función del tiempo durante 12 momentos del ciclo circadiano. Las flechas indican los momentos de aplicación y reemplazo de las soluciones de HDP y van Harrevelde (solución control). Los experimentos control fueron hechos para cada hora circadiana (datos no mostrados) aunque sólo se presenta el correspondiente a la hora circadiana 0 debido a que no hay diferencias significativas entre los controles durante los diferentes TC. (D) Curva respuesta de la amplitud (ver explicación en el texto).

En la Figura 9D se grafica el promedio de los últimos 5 puntos del curso temporal de la amplitud normalizada del PR, bajo condiciones control (círculos negros) y experimental (cuadrados azules), como función del tiempo circadiano. Esta curva se nombró “curva respuesta de la amplitud”. En todos los tiempos circadianos se encontraron diferencias significativas entre la condición control y la experimental (ANOVA-1 vía con nivel de significancia de 0.05).

Con respecto a la duración del PR, se puede observar que la HDP también produce cambios dependientes del TC. En la Figura 10A se presentan dos registros representativos del PR a las 12 y 14 horas TC, antes y después de 30 minutos de haber perfundido el tallo ocular con solución de HDP. A las 12 horas TC la hormona produce una reducción del 33% en la duración del PR, mientras que a las 14 horas TC induce un incremento del 135% con respecto a su valor original.

Las Figuras 10B y -C muestran el curso temporal de la duración normalizada del PR, de tallos oculares extirpados cada dos horas a lo largo del ciclo circadiano ($n=7$). Entre las 2 y las 12 horas TC (Figura 10B) la duración del PR disminuye, mientras que entre las 14 y las 24 horas TC (Figura 10C), se incrementa.

Como en el caso de la amplitud, la solución de HDP produce efectos irreversibles en la duración del PR.

La Figura 10D describe la gráfica de la “curva respuesta de duración”, que muestra el promedio de los últimos 5 puntos del curso temporal de la duración del PR como función del TC, en condiciones control (círculos negros) y experimental (cuadrados azules). Cabe resaltar que entre las 12 y las 14 horas TC se puede observar un punto de quiebre: antes de este punto se presenta la mayor reducción de su valor original (77%), y después de este punto, el máximo crecimiento de su valor original (135%). Para todos los TC se encontraron diferencias significativas entre las

condiciones control y experimental (ANOVA-1 vía con un nivel de significancia de 0.05).

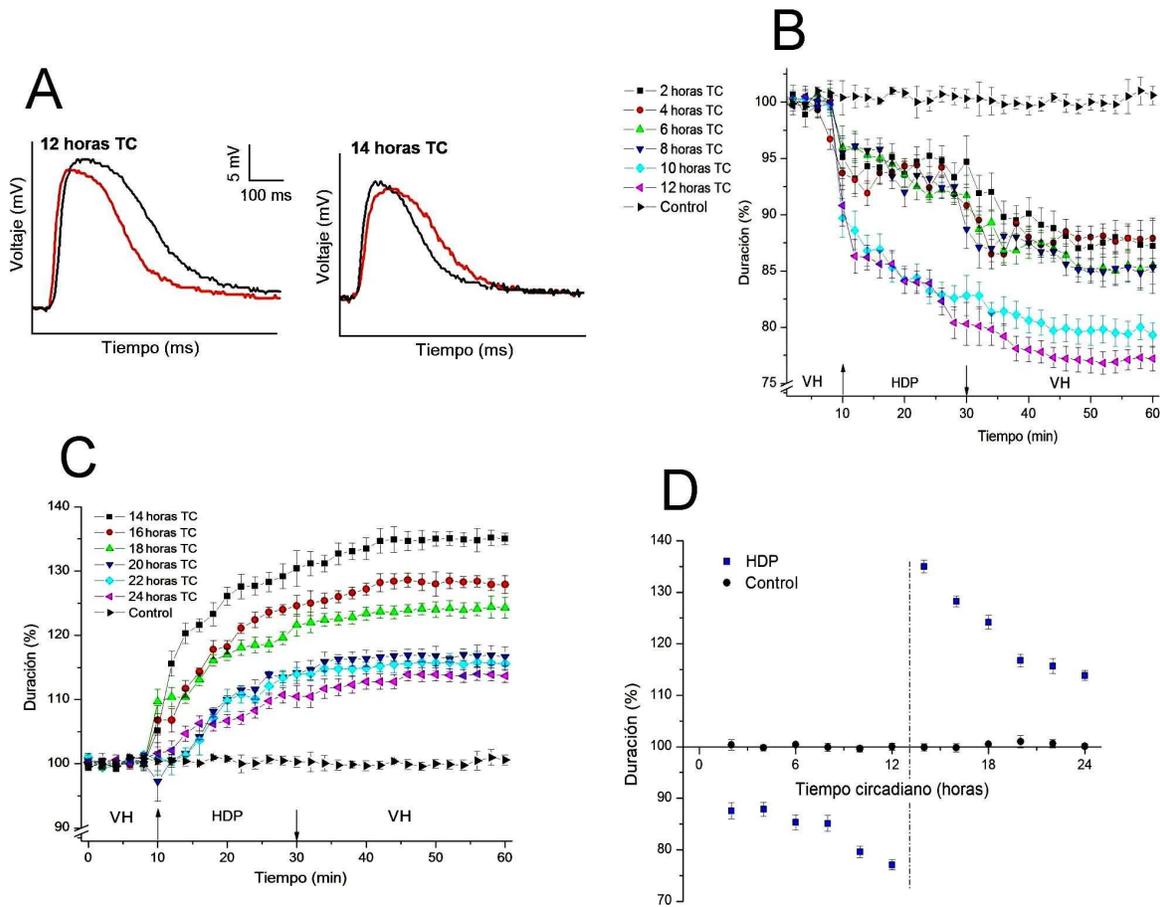


Figura 10: Efecto de la hormona dispersora del pigmento (HDP) en la duración del potencial de receptor (PR) durante diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=7$). (A) Respuesta típica de una célula retinular de acil a un estímulo luminoso antes (en negro) y después de 30 minutos de haber perfundido el tallo ocular con solución de HDP (en rojo), durante dos momentos del ciclo circadiano: 12 y 14 horas TC. (B) y (C) Acción de la HDP en la duración del PR como función del tiempo, durante 12 momentos del ciclo circadiano. Las flechas indican el momento de aplicación y el reemplazo de las soluciones de HDP y van Harreveld (control). Los experimentos control fueron hechos durante distintos momentos del ciclo circadiano (datos no mostrados) aunque sólo se muestra el correspondiente a la hora circadiana 0 debido a que no hay diferencias significativas entre los controles a los diferentes TC. (D) Curva respuesta de la duración (ver explicación en el texto).

5.2 Las corrientes que subyacen al potencial de receptor

5.2.1 Experimentos control

En la Figura 11A se muestra una corriente representativa generada por un estímulo de luz cuando el voltaje de las células se fija al

valor del potencial de membrana en reposo (PMR). Es importante hacer notar que la luz activa una corriente entrante transitoria.

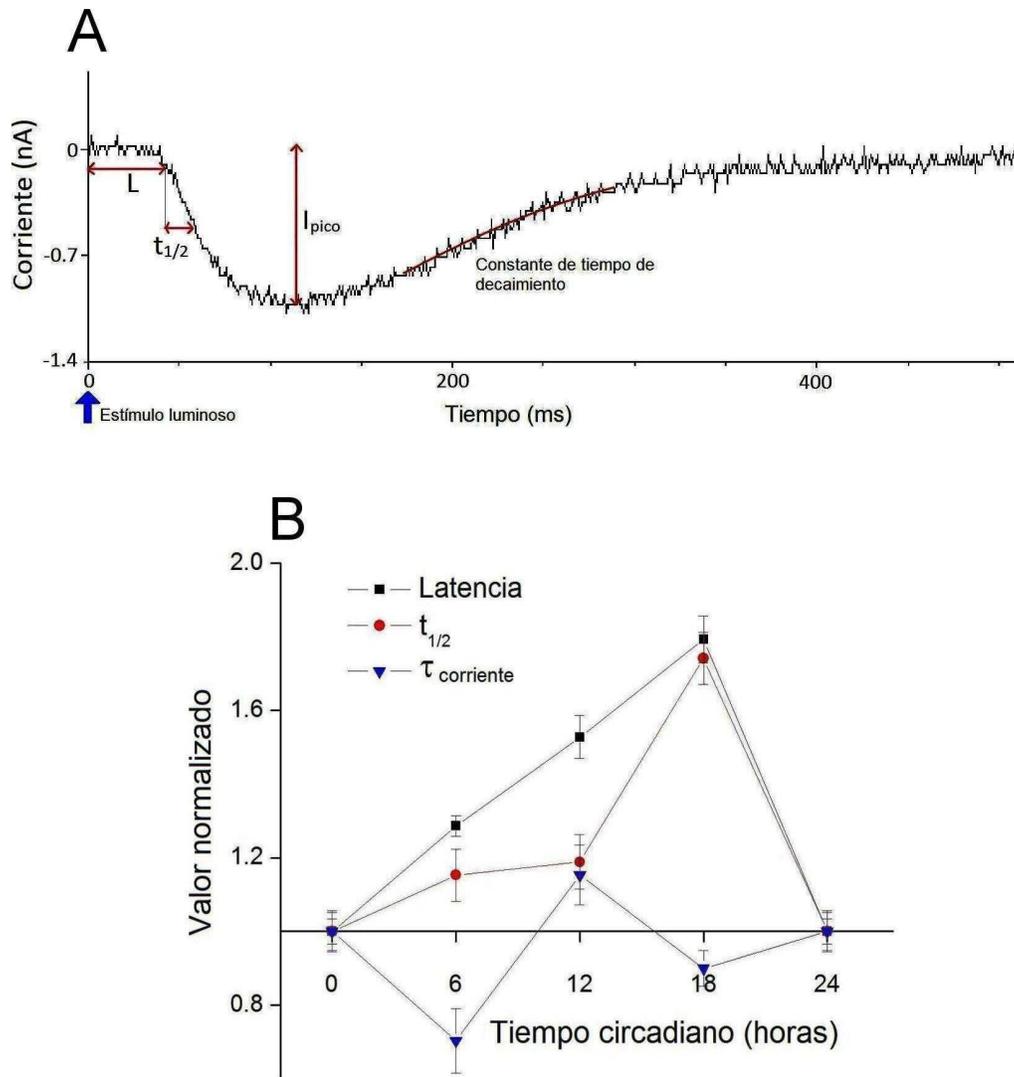


Figura 11: Corriente generada por la luz en solución control (solución van Harreveld). (A) Trazo típico de la corriente generada por la luz en las células retinulares del acocil cuando el potencial se fija al valor del potencial de membrana en reposo. (B) Cinética de la corriente generada por la luz como función del tiempo circadiano (TC) ($n=10$). Se muestra la latencia, L , el tiempo medio de activación, $t_{1/2}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$, como función del TC. Estos parámetros se normalizan con respecto a los correspondientes valores encontrados a las 0 horas TC.

A efecto de describir su cinética, se midieron la latencia (L), el tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) y la constante de tiempo de

decaimiento ($\tau_{corriente}$). Para una definición ver la sección “Análisis de datos” de “Materiales y Métodos”. En la Figura 11B se presentan los valores de L , $t_{1/2}$ y $\tau_{corriente}$ de experimentos realizados a las 6, 12 y 18 horas tiempo circadiano (TC), normalizados con respecto a los correspondientes valores encontrados a las 0 horas TC ($n=10$). Es interesante señalar que los datos dependen del tiempo circadiano durante el cual se llevó a cabo el registro eléctrico (ver Tabla 1).

	L (ms)	$t_{1/2}$ (ms)	$\tau_{corriente}$ (ms)
0 horas TC	38.1±1.3	17.0±0.9	109.1±6.2
6 horas TC	49.0±1.4	19.6±1.4	76.7±7.7
12 horas TC	58.2±2.8	20.2±3.5	125.8±10.2
18 horas TC	68.3±4.4	29.6±4.1	98.1±4.8

Tabla 1: Cinética de la corriente entrante dependiente del tiempo, generada por la luz como función del tiempo circadiano (TC) cuando el tallo ocular se perfunde con solución control. Se muestran los valores de latencia, L , tiempo medio de activación, $t_{1/2}$, y constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$ ($n=10$).

Tanto la latencia como el tiempo medio de activación, se incrementan durante el ciclo de 24 horas hasta que alcanzan sus valores máximos a las 18 horas TC: 179 y 174% más grandes que los encontrados a las 0 horas TC. Es importante notar que el máximo incremento de $\tau_{corriente}$ (45%) ocurre entre las 6 y las 12 horas TC.

Con el fin de dilucidar si la conductancia activada por la luz depende del potencial de membrana, se aplicó un protocolo de pulsos I-V estándar en el pico de la corriente. Si quisiéramos obtener la curva I-V generada exclusivamente por la luz habría que excluir la corriente, que llamaremos corriente de la obscuridad, generada por un protocolo de pulsos I-V sin estímulo luminoso. Sólo si ambas corrientes fueran independientes se podría restar la generada en la obscuridad a la generada por el estímulo luminoso.

Sin embargo no tenemos evidencias que nos permitan suponer este hecho. A lo largo de este trabajo hablaremos de las características de la curva I-V generada por la luz considerando que se está ante una mezcla de fenómenos: el generado exclusivamente por el estímulo luminoso y el generado en oscuridad.

En el protocolo de pulsos I-V el potencial se varió de los -65 a +115 mV en incrementos de 20 mV con pulsos de 50 ms de duración (Figura 12A). Los pulsos se aplicaron cada 2 minutos para permitir la recuperación total de la corriente. Antes del pulso de luz el voltaje se fijó al valor del PMR y por tanto la corriente medida fue cero. En la Figura 12B se presenta el promedio de las relaciones I-V obtenidas con el protocolo descrito en A ($n=7$).

Debe hacerse notar que la corriente varía linealmente con el voltaje, lo cual demuestra que, dentro del intervalo de voltajes considerados, la conductancia que subyace, g , no depende del voltaje. El valor negativo del potencial de inversión, E_{rev} , demuestra que la corriente no proviene de una conductancia fuga.

Es interesante hacer notar que durante el ciclo circadiano (0, 6, 12 y 18 horas TC) las relaciones I-V son siempre lineales, pero que los parámetros g y E_{rev} dependen del TC (Tabla 2). Más aún, las Figuras 12C y -D muestran que cuando estos parámetros se normalizan con respecto a los valores correspondientes encontrados a las 0 horas TC ($n=7$), se revela una variación periódica en la que la máxima conductancia ocurre durante la noche subjetiva (0-12 horas TC), lo cual corresponde al momento en el que se obtiene la máxima amplitud en el ritmo del electroretinograma (ERG). También se hace notar la sorprendente variación en E_{rev} como función del tiempo circadiano. Estos hechos implican que tanto la probabilidad de la apertura de los canales iónicos implicados en la respuesta eléctrica a la luz de las células fotorreceptoras, como la permeabilidad a los iones implicados en la respuesta eléctrica a

la luz no son uniformes, varían periódicamente a lo largo del ciclo de 24 horas.

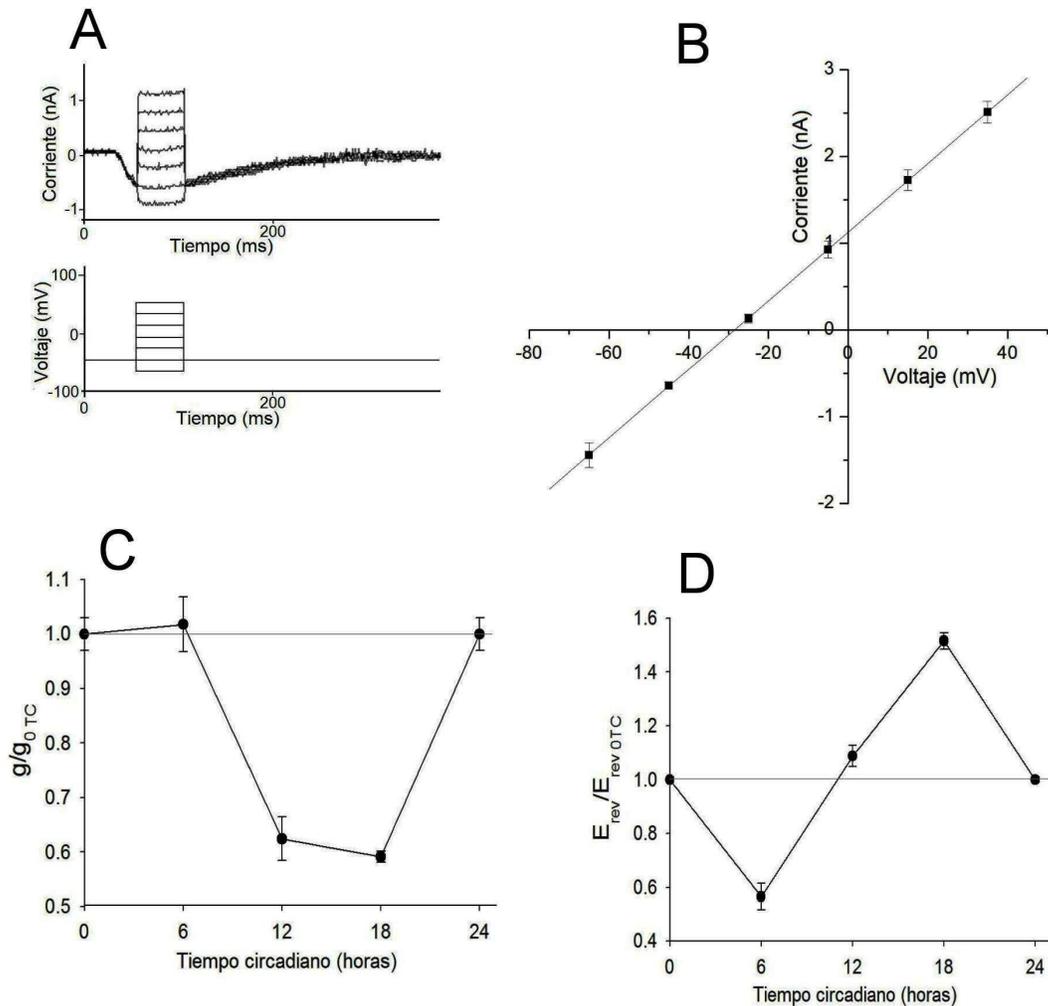


Figura 12: (A) Protocolo de pulsos I-V aplicados en el pico de la corriente activada por la luz cuando el tallo ocular se perfunde con solución VH. El procedimiento experimental fue hecho a las 0 horas tiempo circadiano (TC). (B) Relación lineal entre el voltaje y la corriente. La gráfica corriente-voltaje fue hecha a las 0 horas TC. La conductancia, g , (C) y el potencial de inversión, E_{rev} , (D) fueron normalizados con respecto a los valores encontrados a las 0 horas TC ($n=7$).

	0 horas TC	6 horas TC	12 horas TC	18 horas TC
g	39.4±1.2 nS	40.1±0.2 nS	24.6±0.2 nS	23.3±0.3 nS
E_{rev}	-28.5±0.3 mV	-16.1±0.8 mV	-31.0±1.2 mV	-43.2±1.2 mV

Tabla 2: Conductancia, g , y potencial de inversión, E_{rev} , del protocolo de pulsos I-V aplicado en el pico de la corriente activada por la luz cuando el tallo ocular es perfundido con solución control en diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=7$).

Para comparar el efecto del voltaje en las corrientes generadas por la luz con las corrientes generadas en la oscuridad, se siguió un protocolo de pulsos despolarizantes en oscuridad total. En la Figura 13A se muestra una familia representativa de trazos de corriente provocados por pulsos de voltaje despolarizantes de 120 ms aplicados desde un potencial hiperpolarizante de -120 mV en incrementos de 20 mV, obtenidos a las 0 horas TC.

En la Figura 13B se muestra la relación I-V obtenida durante las 0 horas TC. Como puede observarse, se trata de una relación lineal, lo que demuestra que las conductancias que subyacen a la corriente no dependen del voltaje. El ajuste por mínimos cuadrados indica que el valor de la conductancia de la célula fotorreceptora en la oscuridad, g_{obs} , es de 19.1±0.6 nS y que su potencial de inversión, E_{revobs} , es de -40.7±1.4 mV ($n=7$). Este valor negativo señala que la corriente registrada no proviene de una conductancia de fuga inespecífica.

La conductancia de la corriente obtenida en la oscuridad de la célula fotorreceptora, es función del tiempo circadiano (Tabla 3). En la Figuras 13C se muestra que cuando este parámetro se normaliza con respecto a su valor encontrado a las 0 horas TC, hay una variación periódica ($n=7$). Al igual que para las corrientes generadas por la luz, la máxima conductancia ocurre durante la noche subjetiva.

	0 horas TC	6 horas TC	12 horas TC	18 horas TC
g_{obs}	19.1±0.6 nS	35.7±1.3 nS	16.8±0.9 nS	13.7±0.4 nS
E_{revobs}	-40.7±1.4 mV	-40.1±1.5 mV	-46.2±1.9 mV	-49.6±1.2 mV

Tabla 3: Conductancia, g_{obs} , y potencial de inversión, E_{revobs} , del protocolo de pulsos I-V aplicado en oscuridad total y cuando el tallo ocular es perfundido con solución control en diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=7$).

En lo que respecta al potencial de inversión, se encuentra que es uniforme a lo largo del ciclo circadiano (Tabla 3). En la Figura 13D ($n=7$) se muestra que cuando este parámetro se normaliza con respecto al valor encontrado a las 0 horas TC, no hay una variación periódica (no hay una diferencia significativa, ANOVA-1 vía, nivel de significancia 0.05). Esto implica que la permeabilidad a los iones involucrados en la corriente en la oscuridad, no varía a lo largo del ciclo de 24 horas.

Si se comparan (a la misma hora circadiana) las relaciones I-V obtenidas en la oscuridad con las que se obtienen al aplicar un pulso de luz, se comprueba que el estímulo luminoso provoca un incremento significativo en la conductancia, excepto a las 6 horas TC, (ANOVA-1 vía, nivel de significancia 0.05) y un desplazamiento también significativo en el potencial de inversión (ANOVA-1 vía, nivel de significancia 0.05) hacia potenciales más positivos (Figura 14, $n=7$).

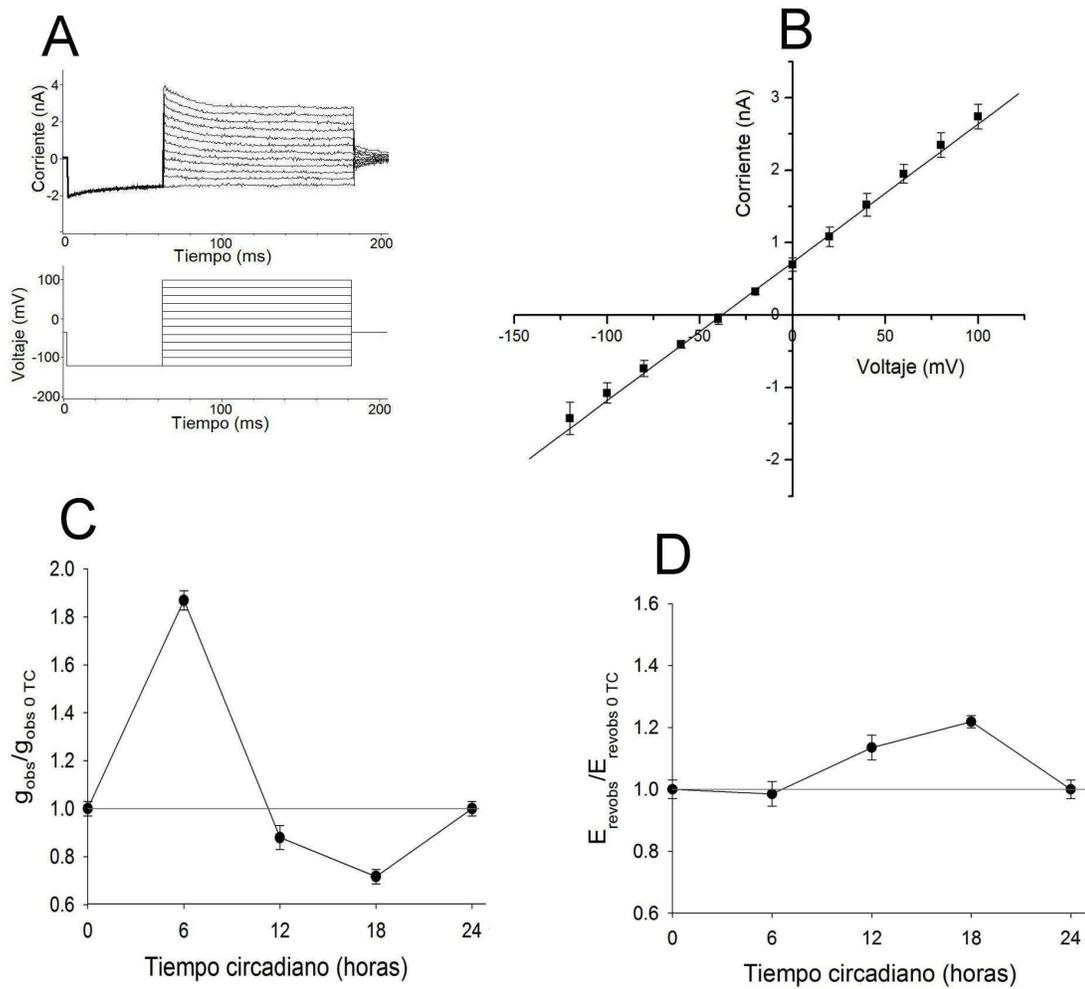


Figura 13: (A) Trazos de la corriente generada por pulsos de voltaje despolarizantes aplicados a una célula fotorreceptora en solución control a las 0 horas tiempo circadiano (TC) en oscuridad total. (B) Relación lineal I-V obtenida a partir del protocolo mostrado en A. (C) Conductancia, g_{obs} , y (D) potencial de inversión, E_{revobs} de las corrientes obtenidas en oscuridad como función del TC, en condiciones control ($n=7$).

Los cambios en la conductancia y el potencial de inversión debidos al estímulo luminoso dependen de la fase del ciclo circadiano. En la Tabla 4 se comparan la conductancia y el potencial de inversión de las corrientes obtenidas cuando se estimula con un pulso de luz, con aquéllos obtenidos en oscuridad, como función del tiempo circadiano ($n=7$).

	0 horas TC	6 horas TC	12 horas TC	18 horas TC
g/g_{obs}	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1
$E_{rev} - E_{revobs}$	12.2 ± 1.7	24 ± 2.3	15.2 ± 3.1	6.4 ± 2.4

Tabla 4: Cambios en los valores de la conductancia, g , y el potencial de inversión, E_{rev} , de las corrientes generadas por la luz de las células fotorreceptoras de acocil cuando se comparan con los experimentos en los que el tallo ocular se mantiene en obscuridad continua (g_{obs} y E_{revobs}). Los registros se realizaron en diferentes tiempos circadianos (TC) mientras el tallo ocular se perfundía con solución control ($n=7$).

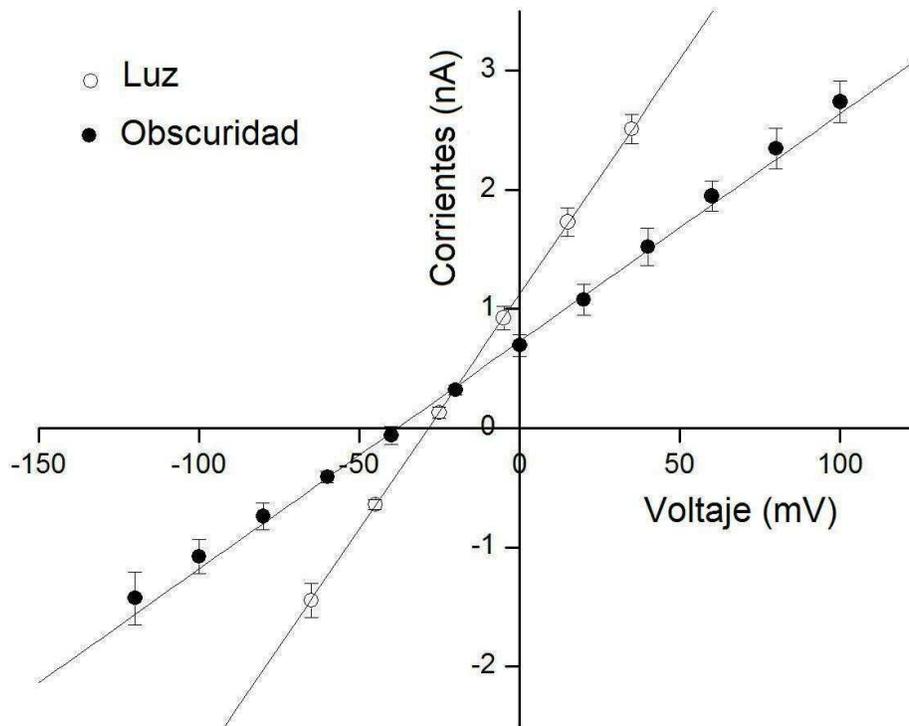


Figura 14: Relación I-V correspondiente a pulsos de voltaje despolarizantes en obscuridad (círculos oscuros) y durante la aplicación de un estímulo luminoso de prueba (círculos claros). Note los cambios en la conductancia y en el potencial de inversión.

5.2.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en las corrientes que subyacen al potencial de receptor

De acuerdo con el tiempo circadiano (TC), la hormona dispersora del pigmento (HDP) afecta la cinética de la corriente generada por la luz. En la Tabla 5 se presentan los valores de latencia, $L_{(HDP)}$, tiempo medio de activación, $t_{1/2(HDP)}$ y constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente(HDP)}$, como función del TC cuando el tallo ocular es bañado con solución de HDP ($n=10$).

	$L_{(HDP)}$ (ms)	$t_{1/2(HDP)}$ (ms)	$\tau_{corriente(HDP)}$ (ms)
0 horas TC	45.4±1.6	13.0±1.4	89.1±3.4
6 horas TC	60.4±1.9	35.4±0.8	105.6±6.6
12 horas TC	47.6±2.1	14.0±1.6	56.2±2.5
18 horas TC	48.3±3.0	20.0±1.9	93.8±4.1

Tabla 5: Cinética de la corriente entrante dependiente del tiempo, generada por la luz, como función del tiempo circadiano (TC) cuando el tallo ocular se perfunde con solución con hormona dispersora del pigmento (HDP). Se muestra la latencia, $L_{(HDP)}$, el tiempo medio de activación, $t_{1/2(HDP)}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente(HDP)}$ ($n=10$).

En la Figura 15 se grafican estos parámetros normalizados con respecto a los correspondientes valores obtenidos en su experimento control ($n=10$). Puede observarse que el máximo efecto se obtiene durante la noche subjetiva.

La modificación provocada por la HDP en la cinética de la corriente generada por la luz, sugiere la existencia de una variación temporal regulatoria en algún(os) punto(s) de la cascada de señalización que conecta al receptor de la HDP con la conductancia de la membrana.

Al aplicar el protocolo I-V en el momento en el que la corriente generada por la luz alcanza su pico en presencia de la HDP, se encuentra, al igual que en los experimentos control, que la corriente activada por la luz varía linealmente con el voltaje. Al comparar con los experimentos control se observa que la hormona modifica los valores en la conductancia y en el potencial de inversión de dicha corriente y que lo hace de una manera dependiente del tiempo circadiano (Tabla 6, $n=10$).

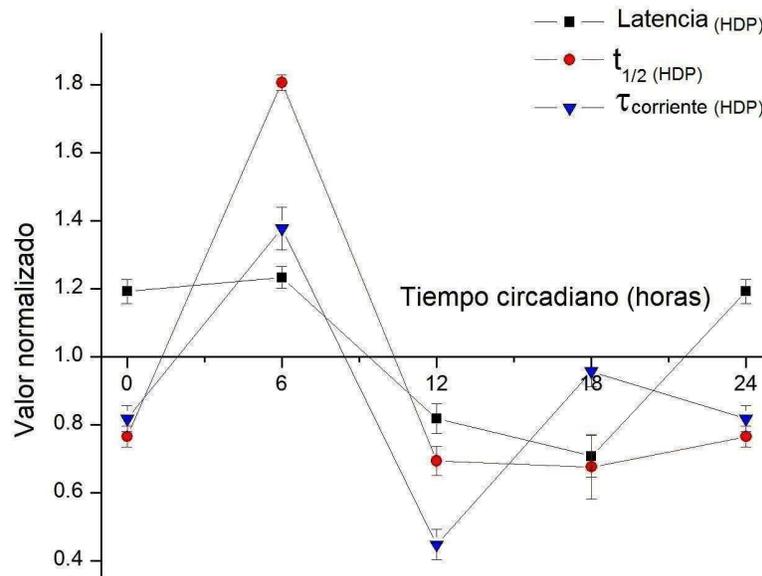


Figura 15: Efecto de la hormona dispersora del pigmento (HDP) en la cinética de la corriente generada por la luz. La latencia, $L_{(HDP)}$, el tiempo medio de activación, $t_{1/2(HDP)}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $T_{corriente(HDP)}$, fueron normalizadas con respecto a los valores obtenidos en el correspondiente experimento control. Es importante hacer notar que los efectos de la HDP dependen del tiempo circadiano.

En la Figura 16A se grafica la conductancia, $g_{(HDP)}$, normalizada con respecto a sus correspondiente valor control, g , como función del tiempo circadiano ($n=7$). Durante la noche subjetiva (0-12 horas TC) la HDP provoca una disminución significativa en este parámetro (ANOVA-1 vía, nivel de significancia 0.05), coincidiendo con el momento durante el cual este péptido ejerce su máximo efecto inhibitorio en la amplitud del potencial de receptor (Figura 9).

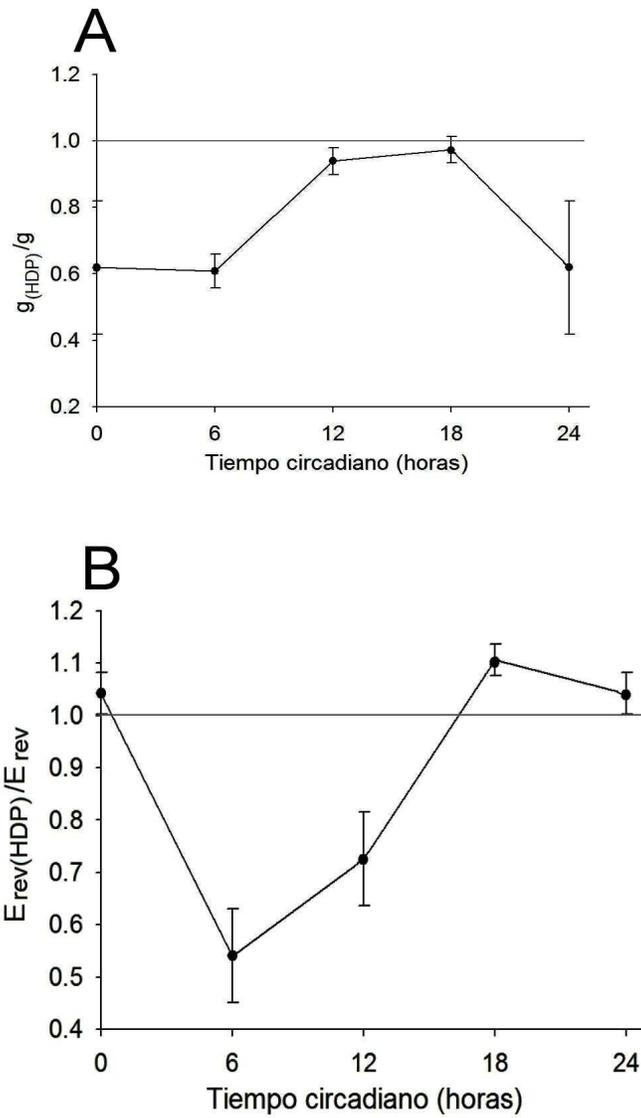


Figura 16: Efecto de la hormona dispersora del pigmento (HDP) en la conductancia, $g_{(HDP)}$ (A), y en potencial de inversión, $E_{rev(HDP)}$ (B), del protocolo de pulsos I-V aplicado en el pico de la corriente activada por la luz como función del tiempo circadiano (TC). Todos los valores se normalizaron con respecto a su experimento control (g y E_{rev}). Es importante hacer notar que la HDP tiene un efecto dependiente del TC ($n=7$).

	0 horas TC	6 horas TC	12 horas TC	18 horas TC
$g_{(HDP)}$	24.4±0.2 nS	24.4±0.5 nS	23.1±1.0 nS	22.7±0.7 nS
$E_{rev(HDP)}$	-29.7±0.4 mV	-8.7±0.9 mV	-22.5±0.9 mV	-47.8±1.1 mV

Tabla 6: Conductancia, $g_{(HDP)}$ y potencial de inversión, $E_{rev(HDP)}$ obtenidos a partir del protocolo de pulsos I-V aplicados en el pico de la corriente generada por la luz cuando, el tallo ocular se perfunde con solución de hormona dispersora del pigmento (HDP) en diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=10$).

Con respecto al potencial de inversión, $E_{rev(HDP)}$ (Figura 16B, $n=7$), es claro que el efecto de la HDP también ocurre durante la noche subjetiva: hay un desplazamiento de $E_{rev(HDP)}$ hacia valores menos negativos.

Con el fin de establecer el efecto de la HDP en las corrientes generadas en la oscuridad por pulsos de voltaje, se siguió un protocolo de aplicación de pulsos despolarizantes a la célula en oscuridad total, mientras el tallo ocular era perfundido con la solución experimental. En la Figura 17A se muestra una familia representativa de trazos de corriente de un experimento realizado a las 0 horas TC. Con respecto a la misma corriente, pero obtenida en solución fisiológica, se observa una disminución en la conductancia con un mayor efecto en las corrientes entrantes comparado con las salientes (Figura 17B, $n=12$).

El ajuste por mínimos cuadrados usando los cinco datos más despolarizados indican que $g_{obs(HDP)out} = 17.4 \pm 0.2 \text{ nS} = 0.9g_{obs}$; usando los cuatro datos más hiperpolarizados se obtiene $g_{obs(HDP)in} = 10.6 \pm 0.2 \text{ nS} = 0.5g_{obs}$. Con respecto al potencial de inversión, $E_{revobs(HDP)}$ se encontró que la hormona produce un desplazamiento de -7.5 mV comparado con el experimento control, E_{revobs} : $E_{revobs(HDP)} = -48.2 \pm 0.8 \text{ mV}$.

Tanto la conductancia de la corriente de la célula fotorreceptora obtenida en la oscuridad mientras el tallo ocular es perfundido con solución de HDP, como su potencial de inversión, son funciones

del tiempo circadiano (Tabla 7, $n=12$). Es importante hacer notar que en estas condiciones experimentales todas las relaciones I-V son “lineales a pedazos”. Por tanto se muestran la conductancia correspondiente a la corriente entrante, $g_{obs(HDP)in}$, y a la corriente saliente, $g_{obs(HDP)out}$.

En las Figuras 18A y -B se muestra que cuando las conductancias de entrada y salida y el potencial de inversión se normalizan con respecto a sus correspondientes experimentos control, hay una variación periódica ($n=7$). Al igual que en los registros en los que se aplicó un estímulo luminoso, el máximo efecto de la HDP en la conductancia y en el potencial de inversión ocurre durante la noche subjetiva.

	0 horas TC	6 horas TC	12 horas TC	18 horas TC
$g_{obs(HDP)in}$	10.6±0.2 nS	9.7±0.3 nS	9.6±0.3 nS	11.0±0.5 nS
$g_{obs(HDP)out}$	17.4±0.2 nS	16.4±0.3 nS	16.9±0.4 nS	14.4±0.4 nS
$E_{revobs(HDP)}$	-48.2±0.8 mV	-59.3±0.7 mV	-52.2±1.4 mV	-56.3±1.3 mV

Tabla 7: Conductancia de la corriente entrante y saliente, $g_{obs(HDP)in}$ y $g_{obs(HDP)out}$, y potencial de inversión, $E_{revobs(HDP)}$ del protocolo de pulsos I-V aplicado en obscuridad total cuando el tallo ocular es perfundido con solución de hormona dispersora del pigmento (HDP) como función del tiempo circadiano (TC) ($n=12$).

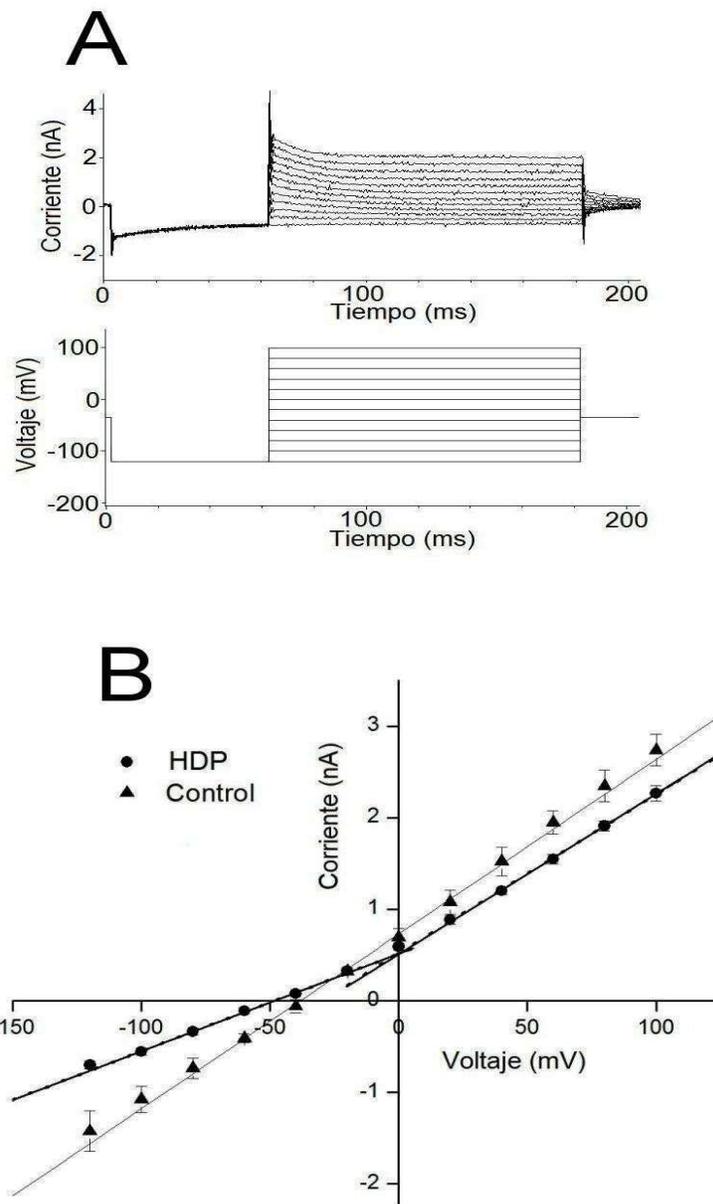


Figura 17: (A) Familia de trazos de corriente generada por pulsos de voltaje aplicados a una célula fotorreceptora bañada con solución de hormona dispersora del pigmento (HDP) a las 0 horas tiempo circadiano. (B) Relación I-V obtenida del protocolo mostrado en A (triángulos, solución control; círculos, solución experimental) ($n=12$).

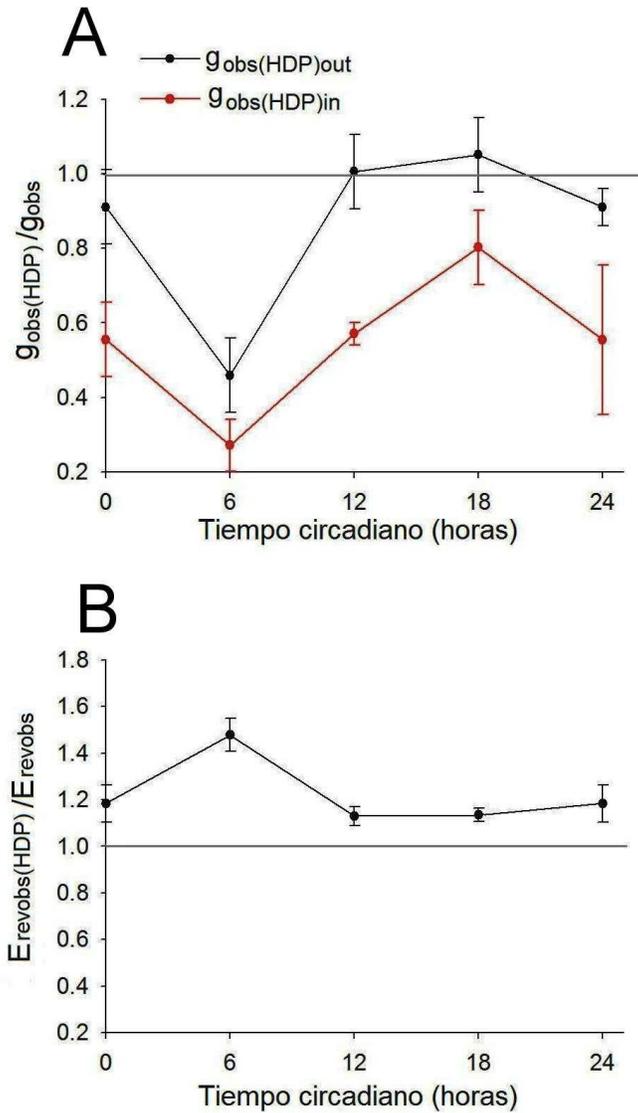


Figura 18: (A) Efecto de la hormona dispersora del pigmento (HDP) en las conductancias de las corrientes entrante, $g_{obs(HDP)in}$, y saliente, $g_{obs(HDP)out}$, y (B) en el potencial de inversión, $E_{revobs(HDP)}$, del protocolo de pulsos-I-V aplicado en oscuridad total cuando como función del tiempo circadiano (TC). Todos los valores se normalizaron con respecto a su experimento control. Es importante hacer notar que la HDP tiene un efecto dependiente del TC ($n=7$).

5.3 La adaptación de la membrana revelada por medio del protocolo de dos estímulos luminosos

5.3.1 Experimentos control

En la Figura 19A se muestran los trazos típicos de la corriente generada por la luz cuando se fija el potencial al valor del potencial de membrana en reposo y la célula fotorreceptora es estimulada por una secuencia de dos estímulos luminosos, mientras el tallo ocular se perfunde con solución control. Las señales se sobrepusieron para facilitar su comparación.

Puede observarse que la cinética de la corriente generada por el segundo estímulo luminoso, cambia con respecto a la cinética de la corriente generada por el primer estímulo. Estos cambios dependen tanto del intervalo entre estímulos, como de la hora circadiana en la que se realiza el experimento. En las Figuras 19B-E ($n=7$) se grafican los parámetros que caracterizan a la cinética de la corriente generada con el segundo estímulo luminoso, normalizados con los parámetros encontrados con el primer estímulo, como función del tiempo entre estímulos. Se muestra la corriente al pico, I_{pico} , la latencia, L , el tiempo medio de activación, $t_{1/2}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$ (para una definición ver la sección “Análisis de datos” de “Materiales y Métodos”). Sólo se presentan los experimentos realizados en los distintos tiempos circadianos que fueron significativamente diferentes.

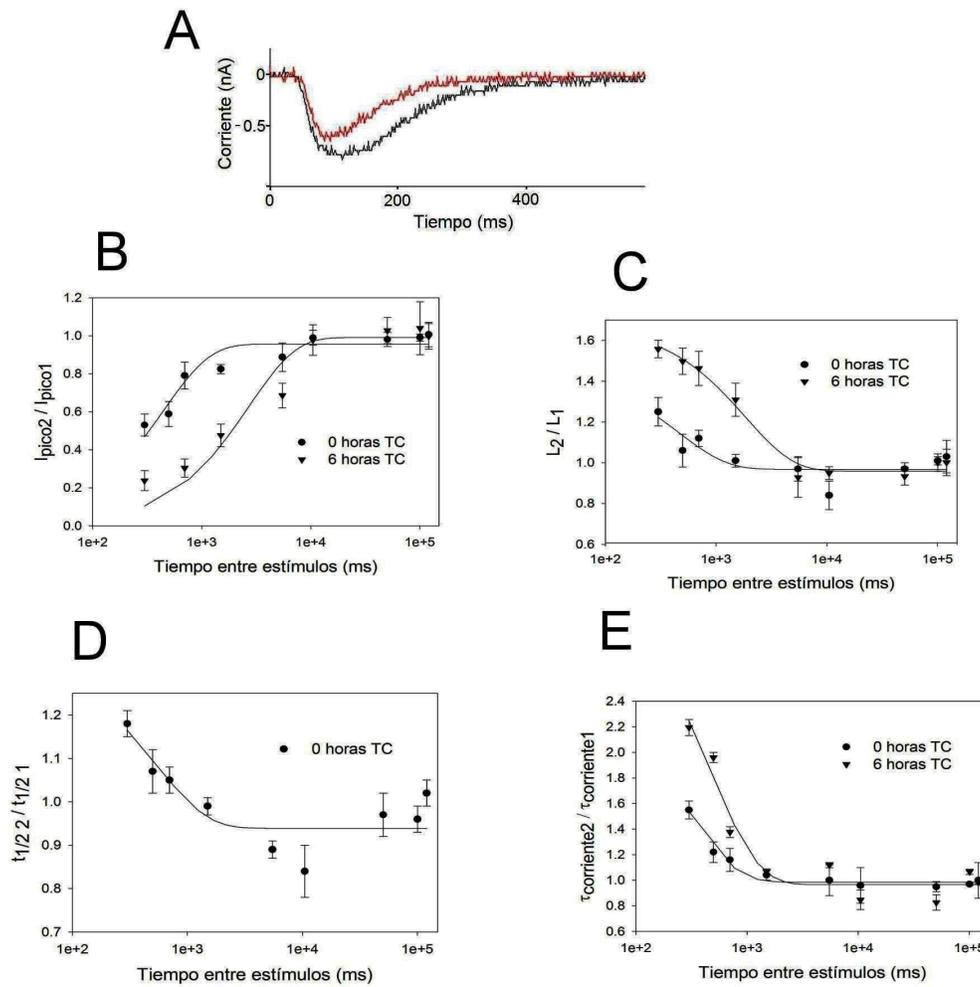


Figura 19: Respuesta de la célula fotorreceptora a un par de estímulos luminosos en solución control. (A) Corrientes típicas (subrepuestas) que se obtienen a partir del protocolo de dos estímulos luminosos.

En este caso el tiempo entre estímulos es de 700 ms y el registro se realizó a las 0 horas tiempo circadiano (TC). En negro se muestra la corriente generada por el primer estímulo luminoso y en rojo la generada por el segundo estímulo. Se muestran los cambios en la cinética de la corriente generada por el segundo estímulo, normalizados con respecto a los parámetros de la corriente generada por el primer estímulo, como función del tiempo entre estímulos. (B) Corriente al pico, I_{pico2} , (C) latencia, L , (D) tiempo medio de activación, $t_{1/2}$, y (E) constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$. En cada caso se muestran los cursos temporales para distintos TC (ver texto para más detalles)($n=7$).

Los cursos temporales de la corriente al pico a las 6, 12 y 18 horas tiempo circadiano (TC) no son significativamente diferentes entre ellos, pero sí con respecto al curso temporal obtenido a las 0 horas TC. En lo que respecta a la latencia, se encontró que no

hay una diferencia significativa entre los cursos temporales obtenidos a las 0, 12 y 18 horas TC, pero sí con respecto al curso temporal obtenido a las 6 horas TC. En el curso temporal del tiempo medio de activación no se encontró una dependencia con la fase del ciclo circadiano. Finalmente, entre los cursos temporales de la constante de tiempo de decaimiento de las 6, 12 y 18 horas TC no se encontró una diferencia significativa entre ellos, pero sí con respecto al curso temporal obtenido a las 0 horas TC.

En general la efectividad en la adaptación de la membrana al segundo estímulo se incrementa con el tiempo entre estímulos hasta que alcanza su valor máximo a los 2 minutos. A partir de este tiempo no hay diferencia entre la cinética de la corriente generada por el primer estímulo y la generada por el segundo estímulo.

Para caracterizar los cursos temporales se ajustaron a una función del tipo $f(t)=1-e^{-t/\tau}$ en el caso de la corriente pico, o una del tipo $f(t)=1+Ae^{-t/\tau}$ en los demás casos; τ es la constante del tiempo de recuperación y $A+1$ el valor de la función en el tiempo 0. En la Tabla 8 se indican los valores de τ y de A como función del tiempo circadiano.

5.3.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en la adaptación de la membrana

En las Figuras 20A-C se muestra el efecto de la hormona dispersora del pigmento, HDP, en la capacidad de adaptación de la membrana de la célula fotorreceptora, revelada a través del protocolo de dos estímulos luminosos ($n=7$). Los registros experimentales se llevaron a cabo a lo largo de todo el ciclo circadiano (0, 6, 12 y 18 horas tiempo circadiano, TC) y sólo se encontraron diferencias significativas en la cinética de la corriente transitoria generada por la luz con respecto a los experimentos control, a las 6 horas TC. Incluso a esta hora no hay una diferencia significativa en el parámetro tiempo medio de activación.

6 horas TC

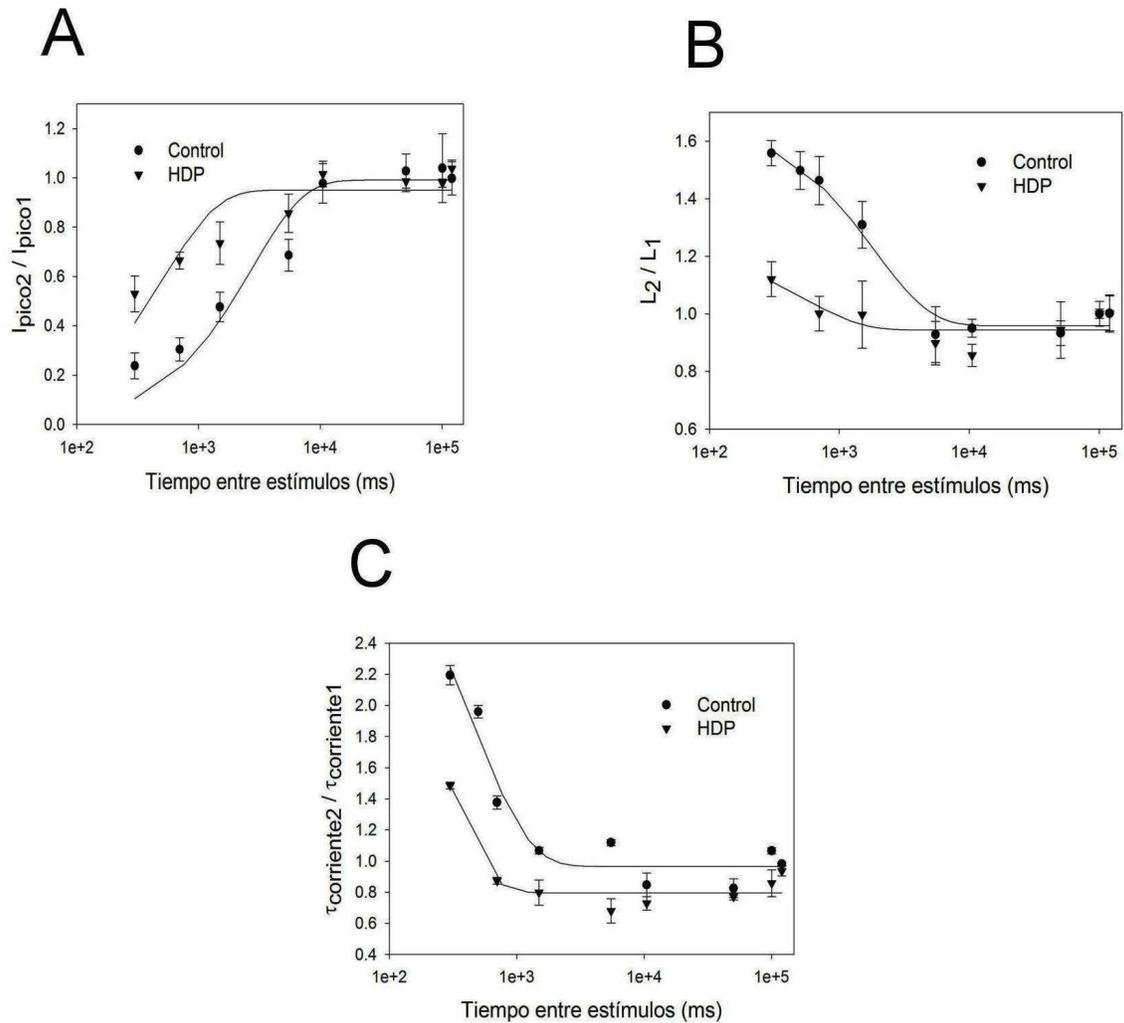


Figura 20: Respuesta de la célula fotorreceptora a un par de estímulos luminosos en solución control (círculos) y con hormona dispersora del pigmento (HDP) (triángulos) a las 6 horas tiempo circadiano (TC). Se muestran los cambios en la cinética de la corriente generada por el segundo estímulo, normalizados con respecto a los parámetros de la corriente generada por el primer estímulo, como función del tiempo entre estímulos. (A) Corriente al pico, I_{pico} , (B) latencia, L , y (C) constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$. Sólo a esta hora y para estos parámetros se encontraron diferencias significativas con los experimentos control ($n=7$).

TC (horas)		0	6	12	18
I_{pico2}/I_{pico1}	τ (ms)	464.5±25.2	250.0±10.7	247.4±12.9	253.9±9.3
L_2/L_1	τ (ms)	456.5±15.7	200.1±10.3	437.4±13.4	463.2±20.1
	A	0.49±0.03	0.72±0.05	0.46±0.05	0.43±0.04
$t_{1/22}/t_{1/21}$	τ (ms)	555.5±21.3	534.8±14.2	570.8±19.9	546.9±23.8
	A	0.39±0.07	0.43±0.09	0.33±0.1	0.35±0.08
$\tau_{corriente2}/\tau_{corriente1}$	τ (ms)	294.1±15.6	454.5±16.7	465.3±12.9	478.4±19.0
	A	1.54±0.30	2.45±0.59	2.37±0.34	2.21±0.29

Tabla 8: Constante de tiempo de recuperación, τ , y valor de la función en el tiempo cero menos una unidad, A, para los cursos temporales de la corriente al pico, I_{pico} , la latencia, L, el tiempo medio de activación, $t_{1/2}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente}$, obtenidos con el protocolo de los dos estímulos luminosos en solución control en diferentes tiempos circadianos (TC) ($n=7$).

Al igual que en los experimentos control, los cursos temporales de los parámetros que caracterizan la cinética de la corriente generada por la luz, se ajustaron a una función del tipo $f(t)=1-e^{-t/\tau(HDP)}$ en el caso de la corriente pico, o una del tipo $f(t)=1+A_{(HDP)}e^{-t/\tau(HDP)}$ en los demás casos. En la Tabla 9 ($n=7$) se indican los valores de $\tau_{(HDP)}$ y $A_{(HDP)}$ del curso temporal de los parámetros que tienen un comportamiento significativamente diferente al experimento control, así como el porcentaje de cambio de $\tau_{(HDP)}$ y $A_{(HDP)}$ con respecto a τ y A (de los experimentos control).

Puede observarse que a las 6 horas TC la HDP provoca que, para los parámetros corriente al pico y latencia, la efectividad en la adaptación de la membrana sea mucho más lenta: las constantes del tiempo de recuperación son 10.0 y 2.8 veces más grandes. Sin embargo, también se debe tomar en cuenta que la diferencia entre estos parámetros de la corriente generada con el primer y segundo

estímulos, es mucho menor comparado con la situación control: en el caso de la latencia el valor de $A_{(HDP)}$ es 0.4 veces menor. Con respecto a la constante de tiempo de decaimiento la situación se invierte. La HDP incrementa la efectividad en la adaptación de este parámetro: la constante del tiempo de recuperación disminuye 0.41 veces con respecto a los experimentos control; para el valor de $A_{(HDP)}$ no se encontró una diferencia significativa.

6 horas TC		
	$T_{(HDP)}$	
$I_{pico(HDP)}$	2.5±0.4 s	
$I_{pico(HDP)}/I_{pico}$	10.0±2.0	
	$T_{(HDP)}$	$A_{(HDP)}$
$L_{(HDP)}$	555.5±7.3 ms	0.29±0.02
$L_{(HDP)}/L$	2.8±0.2	0.40±0.06
	$T_{(HDP)}$	$A_{(HDP)}$
$T_{corriente(HDP)}$	185.2±10.3 ms	3.57±0.12
$T_{corriente(HDP)}/T_{corriente}$	0.41±0.04	1.45±0.40

Tabla 9: Constante de tiempo de recuperación, $\tau_{(HDP)}$, y valor de la función en el tiempo cero menos una unidad, $A_{(HDP)}$, para los cursos temporales de la corriente al pico, $I_{pico(HDP)}$, la latencia, $L_{(HDP)}$, y la constante de tiempo de decaimiento, $\tau_{corriente(HDP)}$, obtenidos con el protocolo de los dos estímulos luminosos en solución con hormona dispersora del pigmento (HDP) a las 6 horas tiempo circadiano (TC). Se compara el valor de $\tau_{(HDP)}$ y $A_{(HDP)}$ con los mismos parámetros pero obtenidos en el experimento control ($n=7$).

6 Discusión

6.1 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en el potencial de receptor

La respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores depende de la disponibilidad iónica de la célula. La concentración de calcio en el citoplasma, la cual es función de la condición luminosa previa, es también un factor determinante (Fuentes-Pardo y cols., 1984; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991). Cuando las células retinulares están adaptadas a la oscuridad, la amplitud y la duración de la respuesta eléctrica a un estímulo luminoso breve, son grandes comparadas con las obtenidas cuando las células están adaptadas a la luz. Los datos experimentales sugieren que la concentración de calcio intracelular es mayor en el estado de adaptación a la luz que en el estado de adaptación a la oscuridad (Brown y Blinks, 1974).

Por otra parte, la hormona dispersora del pigmento (HDP) modifica la excitabilidad de la célula fotorreceptora de una manera dependiente del tiempo circadiano. Cuando se aplica, la amplitud y la duración del potencial de receptor (PR) varían de acuerdo con la fase del ciclo de 24 horas (Figuras 9A y 10A). Estos cambios (Figuras 1B-C y 2B-C) sugieren que hay una variación temporal en las rutas bioquímicas que conectan al receptor de HDP con las conductancias iónicas que subyacen al PR.

Con respecto a la amplitud del PR, se encontró que durante las 0 y las 12 horas tiempo circadiano (TC), la HDP produce efectos mayores a los obtenidos entre las 12 y las 24 horas TC (Figuras 9B-D). Los efectos más pequeños producidos por el péptido probablemente se deben a una desensibilización de su receptor (Sibley y cols., 1987), ya que coinciden con el máximo nivel endógeno de HDP (Hernández-Falcón y cols., 1987).

Otro de los efectos se presentan sobre la duración del PR. Quedó demostrado que durante la noche subjetiva, entre las 0 y las 12 horas TC, el péptido provoca una disminución en este parámetro, mimetizando la respuesta en el estado de adaptación a la luz (Figuras 10B y -D). En contraste, durante el día subjetivo (entre las 12 y las 24 horas TC), la hormona incrementa la duración del PR (Figuras 10C-D) mimetizando la respuesta en el estado de adaptación a la oscuridad.

Debido a que el calcio intracelular es un factor clave que modula la duración del PR (Lisman y Brown, 1975; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991) y que el receptor a HDP (ver la sección “El factor dispersor del pigmento” de “Antecedentes”) predominantemente señala por medio de AMPc, es plausible proponer que la HDP actúa mediante el AMPc en la modificación de la concentración de calcio intracelular.

La acción irreversible de la HDP sobre el PR (Figuras 9B-C, 10B-C) sugiere que la HDP inicia una cascada de señalización cuyos efectos no desaparecen al menos durante el tiempo en el que se realiza el experimento. Las diferencias entre las curvas de respuesta de amplitud y de duración (Figuras 9D y 10D) son una muestra de la complejidad de la acción de la HDP, y refuerzan la idea de que ésta actúa por medio de una cascada de señalización.

6.2 Las corrientes que subyacen al potencial de receptor

6.2.1 Experimentos control

La cinética de la corriente entrante transitoria generada por la luz (Figura 11A) varía a lo largo del ciclo circadiano (Figura 11B y Tabla 1). Esto implica que el estado fisiológico de los fotorreceptores del acocil también varía durante el ciclo de 24 horas.

En la Figura 11B se puede observar que durante el día subjetivo, (12-24 horas tiempo circadiano, TC), los valores de latencia y

tiempo medio de activación son grandes comparados con los de la noche subjetiva. Debido a ello se puede afirmar que durante el día subjetivo, la activación de la corriente generada por la luz es lenta comparada con la activación de la corriente durante la noche subjetiva, lo que indica que la velocidad en la respuesta a la luz de las células fotorreceptoras del acocil cambia a lo largo del ciclo circadiano, y es mayor durante la noche subjetiva.

Por otra parte, el hallazgo que la constante de tiempo de decaimiento de la corriente varía independientemente de la latencia y el tiempo medio de activación (Figura 11B y Tabla 1), sugiere que los mecanismos que modulan la amplitud y la duración del potencial de receptor son independientes.

También se encontró que la corriente generada por la luz (en el entendido de que se está ante una mezcla de fenómenos: el generado exclusivamente por el estímulo luminoso y el generado en la obscuridad; ver “Experimentos control” de la sección “Las corrientes que subyacen al potencial de receptor” de “Resultados”) presenta una relación lineal I-V con un potencial de inversión E_{rev} negativo (Figuras 12A y -B y Tabla 2). Este potencial difiere del potencial de equilibrio estimado para los principales iones (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) implicados en la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores del acocil (ver Apéndice “Los potenciales de equilibrio de los principales iones implicados en la respuesta eléctrica a la luz del acocil”), lo que muestra que la corriente activada por la luz no es selectiva a una especie iónica en particular, lo que nos lleva a proponer que el valor de E_{rev} está dado por el promedio de los potenciales de equilibrio individuales ponderados por sus respectivas conductancias relativas (Nicholls y cols. 2001; Hille, 2001).

Se encontró también que hay una variación circadiana en la conductancia (g) y en el potencial de inversión de la corriente generada por la luz (Figuras 12C-D y Tabla 2). Esto sugiere que la probabilidad de apertura de los canales implicados en la respuesta

eléctrica, y la permeabilidad a los iones implicados dependen de la fase del ciclo circadiano. Se encontró que la mayor conductancia y el potencial de inversión más despolarizado ocurren durante la noche subjetiva, lo que haría suponer un incremento en tanto en la probabilidad de apertura de los canales implicados como en la permeabilidad a los iones de Na^+ y/o Ca^{2+} .

Se encontró que, en la obscuridad, se establece una relación lineal entre la corriente y el voltaje (Figuras 13A y -B), con un potencial de inversión E_{revobs} negativo diferente del potencial de equilibrio de los principales iones (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) implicados en la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil (ver Apéndice “Los potenciales de equilibrio de los principales iones implicados en la respuesta eléctrica a la luz del acocil”). De aquí se infiere que la corriente en la obscuridad no es selectiva a alguna especie iónica particular. Al igual que el caso en el que se aplica un estímulo de luz, es posible que el valor de E_{revobs} esté dado por el promedio de los potenciales de equilibrio individuales ponderados por sus conductancias relativas (Nicholls y cols., 2001).

A diferencia del caso en el que se aplicó un estímulo de luz, no hay variaciones circadianas en el valor de E_{revobs} (Figura 13D y Tabla 3), aunque sí en el valor de la conductancia, g_{obs} , (Figura 13C y Tabla 3). Al igual que cuando se aplica un estímulo de luz, la mayor conductancia se presenta durante la noche subjetiva, lo que sugiere un cambio circadiano en la probabilidad de apertura de los canales implicados en la respuesta eléctrica, pero no en la permeabilidad a los iones implicados.

Al comparar las relaciones I-V obtenidas en la obscuridad con las que se presentan al aplicar un pulso de luz (Figura 14 y Tabla 4), se observa un incremento significativo en la conductancia, excepto a las 6 horas TC. En lo que respecta al potencial de inversión, la luz, a lo largo de todo el ciclo circadiano, induce un desplazamiento significativo del potencial de inversión hacia

valores menos negativos. Esto hace suponer que la luz induce la apertura de canales que tienen una permeabilidad alta al Na^+ y/o Ca^{2+} .

Los cambios que muestran el incremento en la conductancia y el desplazamiento en el potencial de inversión hacia valores menos negativos provocados por la luz durante el ciclo de 24 horas, parecen ser la expresión de cambios circadianos de la sensibilidad de los fotorreceptores visuales. Se hace notar que a las 6 horas TC, la luz no provoca un incremento significativo en la conductancia aunque sí un desplazamiento positivo en el potencial de inversión. Es posible que la conductancia de las corrientes encontradas en la obscuridad y la de las corrientes generadas por un estímulo luminoso no sean independientes y más bien guarden una relación no lineal entre ellas.

6.2.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en las corrientes que subyacen al potencial de receptor

La hormona dispersora del pigmento (HDP) modifica la cinética de la corriente entrante generada por la luz de manera dependiente del tiempo circadiano (TC) (Figura 15 y Tabla 5). Así, durante la noche subjetiva la HDP produce un incremento en la latencia y en el tiempo medio de activación, mimetizando la cinética que se observa en la condición control durante el día subjetivo (Figura 11B).

Con respecto al efecto de la HDP en la conductancia y el potencial de inversión de la corriente generada por la luz, los resultados (Figuras 16A-B y Tabla 6) indican que la hormona disminuye la conductancia de la membrana y mueve el potencial de inversión hacia voltajes menos negativos, lo que lleva a suponer que la hormona provoca una disminución en la permeabilidad a los iones de K^+ y/o Cl^- , que depende de la fase del ciclo circadiano, con un máximo efecto durante la noche subjetiva, tiempo durante el cual los niveles endógenos de la hormona son los más bajos.

En lo que respecta a la acción de la HDP sobre la corriente generada por pulsos de voltaje y en la oscuridad (Figuras 17A-B), se advierte una disminución en la conductancia, con un mayor efecto en las corrientes entrantes que en las salientes. Se observa, además, que el potencial de inversión se desplaza hacia valores más negativos. Estos dos hechos permiten proponer que, bajo estas condiciones experimentales, la HDP inhibe corrientes de Na^+ y/o Ca^{2+} .

Al igual que en el caso en el que se aplica un estímulo de luz, se puede observar que la acción de la HDP depende del tiempo circadiano y que su máximo efecto ocurre entre las 0 y las 6 horas tiempo circadiano, tiempo en el que los niveles endógenos de HDP son los más bajos (Figuras 18A-B y Tabla 7).

6.3 La adaptación de la membrana revelada por medio del protocolo de dos estímulos luminosos

6.3.1 Experimentos control

La adaptación a la luz se define como la disminución en la sensibilidad de la célula fotorreceptora; a su vez, la sensibilidad es el inverso del número de fotones que se requieren para producir una respuesta estándar. Cuando se usa el protocolo de los dos estímulos luminosos, el primero de ellos hace que la célula se “adapte a la luz”, lo que significa que la sensibilidad de la preparación disminuye (Figura 19A). Durante la adaptación a la oscuridad que sigue después de que se aplicó el estímulo 1, la sensibilidad a la luz se incrementa en forma proporcional al tiempo entre el primero y el segundo estímulos. Estos cambios de sensibilidad a la luz se muestran en las Figuras 19B-E y en la Tabla 8.

Los resultados experimentales expresan que tanto la sensibilidad como la efectividad en la adaptación de la célula fotorreceptora son funciones del tiempo circadiano (TC).

La corriente al pico y la latencia muestran dos comportamientos: el de las 0 horas TC en el cual la constante del tiempo de recuperación τ es grande y el valor de la función en el tiempo cero, $A+1$, es pequeño (comparado con lo que se obtiene a las 6 horas TC). Estos resultados sugieren que la recuperación es lenta y que la cinética de la corriente transitoria generada por el segundo estímulo luminoso no difiere demasiado de la asociada con el primero: la efectividad de la adaptación es baja, pero la sensibilidad es grande. Por otra parte a las 6 horas TC la constante de recuperación τ es pequeña pero el valor de la función en el tiempo cero, $A+1$, es grande (comparado con lo que se obtiene a las 0 horas TC). Es decir, la efectividad en la adaptación de la membrana es grande y la sensibilidad de la célula es bajo.

Con respecto al tiempo medio de activación, se encontró que el comportamiento del sistema es uniforme a lo largo del ciclo circadiano.

La constante de tiempo de decaimiento, $T_{corriente}$, es independiente del de la corriente al pico y la latencia: al comparar los valores de las 6 horas TC con los de las 0 horas TC, se comprueba que la efectividad en la adaptación es buena y la sensibilidad es grande. Esto refuerza la idea que se había mencionado acerca de que los mecanismos que modulan la amplitud y duración del potencial de receptor son independientes, que se muestra en la sección “Las corrientes que subyacen al potencial de receptor” de “Discusión”.

Es poco probable que los resultados reflejen cambios en la concentración del fotorpigmento debido a que en este tipo de experimentos la probabilidad de que una molécula de rodopsina sea excitada por un fotón es menor al 1% (Hildebran y cols., 1974). Lo que no se puede descartar es que uno de los productos implicados en la fototransducción sea el que controle la efectividad de la adaptación y la sensibilidad de la célula fotorreceptora, y que sea la variación en su concentración sea lo que le confiera al sistema su dependencia circadiana.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que los cambios se deban a diferencias en los procesos iónicos (conductividad, gradientes iónicos, transporte activo) presentes a lo largo del ciclo circadiano.

6.3.2 El efecto de la hormona dispersora del pigmento en la adaptación de la membrana

A las 6 horas tiempo circadiano (TC), y solamente durante ese tiempo, la hormona dispersora del pigmento (HDP) modifica la sensibilidad de las células fotorreceptoras y su capacidad de adaptación. La hormona incrementa la sensibilidad y disminuye la efectividad durante la adaptación para la corriente al pico y la latencia; en la constante de tiempo de decaimiento no produce cambios significativos en la sensibilidad, pero incrementa la efectividad en la adaptación: prácticamente mimetiza el comportamiento que se observa a las 0 horas TC en condiciones control.

Estos resultados indican que el efecto de la HDP sobre los fotorreceptores depende del TC. Al igual que con los protocolos anteriores, se puede afirmar que debe haber una variación temporal en las rutas bioquímicas que conectan al receptor de HDP con las conductancias iónicas que subyacen al potencial de receptor.

6.4 Comentarios Finales

En este trabajo se demostró que la respuesta eléctrica de las células fotorreceptoras del acocil *Procambarus clarkii* varía a lo largo del ciclo de 24 horas. Se observaron cambios circadianos en la cinética, la conductancia y la permeabilidad iónica que subyace a la respuesta eléctrica a la luz, así como en la sensibilidad y la capacidad de adaptación de la membrana. También se demostró que a lo largo del ciclo circadiano la hormona dispersora del pigmento (HDP), modifica el estado de todas estas variables, apoyando la

idea de la ubicuidad de las acciones de la HDP en la actividad circadiana de los invertebrados y particularmente del acocil.

La información obtenida permitirá dar un paso más rumbo a la comprensión de la organización del sistema circadiano del acocil cuyos elementos y mecanismos son controversiales en la actualidad (ver sección “El ritmo de sensibilidad a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil” de “Antecedentes”).

Las propuestas de los modelos de la organización del sistema circadiano que podrían ser aplicados al caso del acocil a continuación se mencionan (Gruart y cols., 2002; Aréchiga, 2003):

- El primer modelo consiste en una red de sistemas periféricos que oscilan debido al forzamiento de un oscilador autosostenido (endógeno) o marcapaso. En este caso el sistema sincronizaría con las señales externas debido a las vías aferentes sensoriales hacia el generador central. La destrucción de este debería provocar la desaparición de los ritmos.
- El segundo modelo considera una red de osciladores periféricos que tienen la capacidad de oscilar en ausencia de entradas periódicas (autosostenidos) y un oscilador central o marcapaso que ajusta la fase de la red. La destrucción del oscilador central debería provocar la pérdida del ajuste de la fase entre los diferentes osciladores periféricos.
- El tercer y último modelo considera un sistema multioscilar no jerárquico. Las vías aferentes sensoriales sincronizan a los diferentes osciladores con las señales externas. La sincronización interna se mantiene a través de asas de retroalimentación positivas y negativas.

Las evidencias experimentales en animales pluricelulares y en particular en el acocil, apuntan hacia los modelos de

multiosciladores (Stoynev e Ikonov, 1990; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003). Si este es el caso podríamos considerar que el tallo ocular es un oscilador autosostenido que puede ser ajustado (sincronizado) mediante HDP por el marcapaso central, presumiblemente el protocerebro en el ganglio cerebroide, o por las señales externas y otros osciladores autosostenidos. En el primer caso se está suponiendo que la relación es jerárquica y en el segundo que no.

Sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que el tallo ocular sea simplemente un efector del sistema circadiano. No contamos con los elementos para decidir cuál es el modelo adecuado.

7 Apéndices

7.1 Los potenciales de equilibrio de los principales iones implicados en la respuesta eléctrica a la luz del acocíl

El potencial de equilibrio de un ion x , E_x , puede calcularse a partir de la ecuación de Nernst:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{[x]_o}{[x]_i}\right),$$

en donde

$R=8.3145 \frac{J}{mol K}$ es la constante de los gases ideales, T la

temperatura absoluta, z la valencia, $F=9.6485 \times 10^4 \frac{C}{mol}$ la

constante de Faraday y $[x]_o$, $[x]_i$ las concentraciones exterior e interior, respectivamente, del ion x .

Según Strikholm y Wallin, 1967 y Ramirez-Dominguez, 2002, en el acocíl *Procambarus clarkii*:

$$[Na]_o = 205 \text{ mM}; [Na]_i = 20 \text{ mM}.$$

$$[Ca]_o = 13 \text{ mM}; [Ca]_i = 2 \text{ mM}.$$

$$[K]_o = 5.4 \text{ mM}; [K]_i = 233 \text{ mM}.$$

Sustituyendo los valores correspondientes en la ecuación de Nernst y considerando $T = 15^\circ\text{C}$ (la temperatura a la que se llevaron a cabo los experimentos), se encuentra que:

$$E_{Na} = 57.8 \text{ mV};$$

$$E_{Ca} = 46.5 \text{ mV};$$

$$E_K = -93.5 \text{ mV}.$$

7.2 Literatura publicada durante los estudios de doctorado

- Lara-Aparicio M., Barriga-Montoya C., Fuentes-Pardo B (2006). A brief biomathematical history of circadian rhythms: from Wigglesworth to Winfree. *Scientiae Mathematicae Japonicae*, 64(2):357-70.
- Verde M. A., Barriga-Montoya C., Fuentes-Pardo B (2007). Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemical and Physiology. Part A*, 147:983-92.
- Lara-Aparicio M., López de Medrano S., Barriga-Montoya C., Fuentes-Pardo B. (2008). A mathematical model of the circadian activity induced by the presence of sexual hormones in male crayfish. *Scientiae Mathematicae Japonicae*, 67(2): 135-46.
- Fuentes-Pardo B., Barriga-Montoya C., Lara-Aparicio M., López de Medrano S. (2008). Ultradian and Circadian Rhythms: Experiments and Models en *Ultradian Rhythms from Molecules to Mind* (editores E. Rossi y D. Lloyd), Springer-Verlag, 147-61.
- Barriga-Montoya C., Gómez-Lagunas F., Fuentes-Pardo B. (2010). Effect of pigment dispersing hormone on the electrical activity of crayfish visual photoreceptors during the 24-h cycle. *Comparative Biochemical and Physiology. Part A*, 157: 338-45.
- Arias-Olguin I. I., Carrillo E., Meza-Torres B., Barriga-Montoya C., Balleza D., Gomez-Lagunas F. (2011). Induction of a fast inactivation gating on delayed rectifier Shab K⁺ channels by the anti-inflammatory drug celecoxib. *Channels*, 5(1): -.

7.3 Oficio de designación de jurado y votos aprobatorios



FACULTAD DE MEDICINA



PDCB/grad/ 041Jur/2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 265ª del 18 de agosto de 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **CAROLINA BARRIGA MONTOYA**, con número de cuenta **9650497-0**, con la tesis titulada **"EL EFECTO DE LA HORMONA DISPERSORA DEL PIGMENTO SOBRE EL POTENCIAL DE RECEPTOR DE LAS CÉLULAS RETINULARES DEL ACOCIL PROCAMBARUS CLARKII EN UN CICLO DE 24 HORAS"**, dirigida por el Dra. Beatriz Fuentes Pardo.

Presidente: Dra. Carolina Escobar Briones
Secretario: Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Vocal: Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Vocal: Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Vocal: Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero

Atentamente,

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 20 de octubre de 2010.


DR. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA


DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dra. Beatriz Fuentes Pardo.
Coordinación de PDCB

MMF/YLV/evb

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdc.unam.mx> E-mail: pdc@servidor.unam.mx

Voto Aprobatorio

10 de noviembre de 2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas**" de la alumna **Carolina Barriga Montoya** con número de cuenta **9650497-0**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dra. Carolina Escobar Briones
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México

Voto Aprobatorio

03 de noviembre de 2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas**" de la alumna **Carolina Barriga Montoya** con número de cuenta **9650497-0**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

Voto Aprobatorio

08 de noviembre de 2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas**" de la alumna **Carolina Barriga Montoya** con número de cuenta **9650497-0**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Voto Aprobatorio

08 de noviembre de 2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

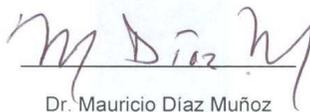
Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas**" de la alumna **Carolina Barriga Montoya** con número de cuenta **9650497-0**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Instituto de Neurobiología

Universidad Nacional Autónoma de México

Voto Aprobatorio

12 de noviembre de 2010

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar,
UNAM
P R E S E N T E

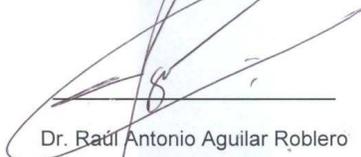
Estimado Dr. Ávila,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "**El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas**" de la alumna **Carolina Barriga Montoya** con número de cuenta **9650497-0**, inscrita en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de **Doctora en Ciencias**, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado.

Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,



Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

8 Referencias Bibliográficas

- Acharya J.K., Jalink K., Hardie R.W., Hartenstein V., Zuker C.S. (1997). *InsP₃ receptor is essential for growth and differentiation but not for vision in *Drosophila**. *Neuron*, 18(6):881-7.
- Aréchiga H. (2003). Sustrato neural de los ritmos biológicos. *Revista de Neurología*, 36(1):49-60.
- Aréchiga H., Fernández-Quiroz F., Fernández de Miguel F., Rodríguez-Sosa L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiology International*, 10:1-19.
- Aréchiga H., Rodríguez-Sosa L. (1998). Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of the crayfish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265: 1819-23.
- Aréchiga H., Rodríguez-Sosa L. (2002). Distributed circadian rhythmicity, en *The Crustacean Nervous System* (ed K. Wise), Springer-Verlag, Berlin, pp 113-22.
- Baumann O. (2000). Distribution of ryanodine receptor Ca²⁺ channels in insect photoreceptor cells. *The Journal of Comparative Neurology*, 421:347-61.
- Block G. D., Wallace S. F. (1982). Localization of a circadian pacemaker in the eye of a mollusk, *Bulla*. *Science*, 217(9): 155-7.
- Brown J. E., Blinks J. R. (1974). Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin. *The Journal of General Physiology*, 64:643-65.
- Cao G., Nitabach M. N. (2008). Circadian control of membrane excitability in *Drosophila melanogaster* lateral ventral clock neurons. *The Journal of Neuroscience*, 28(25):6493- 501.
- Coles J.A., Orkand R.K. (1985). Changes in sodium activity during light stimulation in photoreceptors, glia and extracellular space in drone retina. *The Journal of Physiology*, 362:415-25.
- Colwell C. S., Whitmore D., Michel S., Block G. D. (1994). Calcium plays a central role in phase shifting the ocular circadian pacemaker of *Aplysia*. *Journal of Comparative Physiology A*, 175(4), 415-23.
- Cusumano P., Klarsfeld A., Chélot E., Picot M., Richier B., Rouyer F. (2009). PDF-modulated visual inputs and cryptochrome define diurnal behavior in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 12(11):1427-34.
- Dunlap J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96:271-90.
- Fanjul-Moles M.L., Prieto-Sagredo J. (2003). The circadian system of crayfish: a developmental approach. *Microscopy Research and Technique*, 60:291-301.
- Fein A. (2003). Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release is necessary for generating the entire light response of *Limulus* ventral photoreceptors. *The Journal of General Physiology*, 121:441-9.
- Fingerman M (1992). Glands and secretion, en *Microscopy Anatomy of Invertebrates*, Volumen 10: Decapod Crustacea (eds F. W. Harrison y A. G. Humes), Willey-Liss, New York, pp 345-94.
- Fuentes-Pardo B., Hernández-Falcón J., Noguerón I. (1984). Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of

- crayfish along the twenty-four hour cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78A(4):723-7.
- Fuentes-Pardo B., Inclán-Rubio V. (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86A: 523-7.
- Garger A., Richard E.A., Lisman J. (2004). The excitation cascade of *Limulus* ventral photoreceptors: guanylate cyclase as the link between InsP_3 -mediated Ca^{2+} release and the opening of cGMP-gated channels. *BMC Neuroscience*, 5:1-11.
- Gaus, G., Stieve H. (1992). The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 47c:300-3.
- Geusz M. E., Block G. D. (1994). Intracellular calcium in the entrainment pathway of molluscan circadian pacemakers. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18(4):555-61.
- Greenspan R. J. (2007). *An introduction to Nervous Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Gruart A., Delgado J. M., Escobar C., Aguilar Roblero R. (2002). *Los relojes que gobiernan la vida*. Fondo de Cultura Económica, La Ciencia para Todos, 188, México.
- Harmer S. L., Panda S., Kay S. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17:215-53.
- Harrisingh M. C., Wu Y., Lnenicka G. A. , Nitabach M. N. (2007). Intracellular Ca^{2+} regulates free-running circadian clock oscillation *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*, 27(46):12489-99.
- Helfrich-Förster C. (1995). The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 92: 612-6.
- Helfrich-Förster C. (2005). PDH has found its receptor. *Neuron*, 48:161-9.
- Hernández O. H., Fuentes-Pardo B., (2001). Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of the electrical response to light in the crayfish. *Biological Rhythm Research*, 32(2):125-44.
- Hernández-Falcón J., Fuentes-Pardo B. (1991). Crayfish reticular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A(4):823-32.
- Hernández-Falcón J., Fuentes-Pardo B. (1991). Crayfish reticular cells: influence of extracellular sodium and calcium upon receptor potential. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A(4):823-32.
- Hernández-Falcón J., Moreno-Sáenz E., Farías J. M., Fuentes-Pardo B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity-I. Pseudopupil circadian rhythm. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87A(1):111-8.
- Hildebrand, E., Stieve H., Hanowsky G., Gaube H. (1974). Membrane adaptation in crustacean photoreceptors as revealed by a flash sequence technique. *Vision Research*, 14: 1399-1407.
- Hille B. (2001). *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts.

- Homberg, U., Würden S., Dircksen H., Rao K.R. (1991). Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cell and Tissue Research*, 266: 343-57.
- Hyun S., Lee Y., Hong S.T., Bang S., Paik D., Kang J., Shin J., Lee J., Jeon K., Hwang S., Bae E., Kim J. (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron*. 48:267-78.
- Jacklet J. W. (1969). Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of *Aplysia*. *Science*, 164: 562-3.
- Jacklet J. W., Lotshaw D. P. (1981). Light and high potassium cause similar phase shifts of the *Aplysia* eye circadian rhythm. *Journal of Experimental Biology*, 94:345-49.
- Janssen T., Husson S. J., Lindemans M., Mertens I., Rademakers S., Ver Donck K., Geysen J., Jansen G., Schoofs L. (2008). Functional characterization of three G-protein-coupled receptors for pigment dispersing factors in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22): 15241-9.
- Khalsa S. B., Ralph M. R., Block G. D. (1990). Chloride conductance contributes to period determination of a neural circadian pacemaker. *Brain research*, 520:166-9.
- Kuhlman S. J., Mackey S. R., Duffy J. R. (2007). Introductory workshop: chronobiology & nomenclature. 72nd Cold Spring Harbor Laboratories Symposium: Clocks & Rhythms.
- Kleinholz L. H., Esper H., Johnson C., Kimball F. (1962a). Neurosecretion and crustacean retinal pigment hormone: assay and properties of the light-adapting hormone. *Biological Bulletin*, 123(2):317-29.
- Kleinholz L. H., Burgess P. R., Carlisle D. B., Pflueger O. (1962b). Neurosecretion and crustacean retinal pigment hormone: distribution of the light-adapting hormone. *Biological Bulletin*, 122(1):73-85.
- Kölller, G. (1925) Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (Stuttgart)*, 30:128-32.
- Kölller, G. (1927) Über Chromatophorensystem, Farbensinn und Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*, *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 5(2):191-246.
- Lear B. C., Merrill E., Lin J.M., Schroeder A., Zhang L., Allada R. (2005). A G protein-coupled receptor, *groom-of-PDF*, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron*. 48:221-7.
- Lisman J.E., Brown J. E. (1972). The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of *Limulus* ventral photoreceptors. *The Journal of General Physiology*. 59:701-19.
- Lisman J. E., Brown J. E. (1975). Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *The Journal of General Physiology*. 66: 489-506.
- Lisman J.E., Fain G. L., O'Day P.M. (1982). Voltage-dependent conductances in *Limulus* ventral photoreceptors. *The Journal of General Physiology*. 79:187-209.
- McMahon D. G., Block G. D. (1987). The *Bulla* ocular circadian pacemaker. II. Chronic changes in membrane potential lengthen free running period. *Journal of Comparative Physiology A*, 161:347-54.

- Mertens I., Vandingenen A., Johnson E. C., Shafer O. T., Li W., Trigg J. S., De Loof A., Schoofs L., Taghert P. H. (2005). PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron*, 48:213-9.
- Michel S., Manivannan K., Zaritsky J. J., Block G. (1999). A delayed rectifier current is modulated by the circadian pacemaker in *Bufo*. *Journal of Biological Rhythms*, 14(2):141-50.
- Miller, C. S., Glantz R. M. (2000). Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish. *Visual Neuroscience*, 17:353-68.
- Minke B., Parnas M. (2006). Insights on TRP channels from in vivo studies in *Drosophila*. *Annual Review of Physiology*, 68:649-84.
- Moyes C. D., Schutle P. M. (2007). *Principios de Fisiología Animal*. Pearson Educación, Madrid.
- Naka K.I., Kuwabara M. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *Journal of Experimental Biology*. 36:51-61.
- Nassi E (1991) Whole-cell clamp of dissociated photoreceptors from the eye of *Lima scabra* *The Journal of General Physiology*, 97:35-54.
- Nicholls, J. G., Martin R. A., Wallace B. G., Fuchs P. A. (2001). *From Neuron to Brain*. Sinauer Associates, Inc, Massachusetts.
- Nitabach M. N., Blau J., Holmes T. C. (2002). Electrical silencing of *Drosophila* pacemaker neurons stops the free-running circadian clock. *Cell*, 109:485-95.
- Nitabach M. N., Blau J., Holmes T. C., Blau J. (2005). Membranes, ions, and clocks: testing de Njus-Sulzman-Hastings model of the circadian oscillator. *Methods in enzymology*, 393:682-92.
- Nitabach M. N., Wu Y., Sheeba V., Lemon W. C., Strumbos J., Zelensky P. K., White B. H., Holmes T. C. (2006). Electrical hyperexcitation of lateral ventral pacemaker neurons desynchronizes downstream circadian oscillators in the fly circadian circuit and induces multiple behavioral periods. *The Journal of Neuroscience*, 26(2):479-89.
- Njus D., Sulzman F. M., Hastings J. W. (1974). Membrane model for the circadian clock. *Nature*, 248: 116-20.
- Njus D., Gooch V. D., Mergenhagen D., Sulzman F., Hastings J. W. (1976). Membranes and molecules in circadian systems. *Federation Proceedings*, 35(12): 2353-7.
- Park J. H., Hall J. C. (1998). Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms*, 13(3):219-28.
- Pavlidis T. (1973). *Biological Oscillators: Their Mathematical Analysis*. Academic Press, New York.
- Petri, B., Stengl M. (1997). Pigment-dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *Society for Neuroscience*, 17(11):4087-93.
- Petri, B., Stengl M. (1999). Presumptive insect circadian pacemakers in vitro: immunocytochemical characterization of cultured pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons of *Leucophaea maderae*. *Cell and Tissue Research*, 296:635-43.
- Picones A., Aréchiga H. (1990). Electrophysiological properties of crayfish retinal photoreceptors. *The Journal of Experimental Biology*. 150:111-22.

- Pikovsky A., Rosenblum M., Kurths J. (2001). Synchronization. A Universal Concept in Nonlinear Sciences. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pittendrigh C. S. (1965). On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In *Circadian clocks*, pp 277-97. North Holland, Amsterdam.
- Pittendrigh C. S. (1981). Circadian systems: entrainment. In *Handbook Behavioral Neurobiology*, Vol 4 Biological Rhythms, J. Aschoff ed., pp 94-124, Plenum, New York.
- Raghu P., Colley N.J., Weibel R., James T., Hasan G., Danin M., Selinger Z., Hardie R.C. (2000). Normal phototransduction in *Drosophila* photoreceptors lacking an InsP_3 receptor gene. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 15:429-45.
- Ramirez-Dominguez M. E., Olamendi-Portugal T., Garcia U., Garcia C., Arechiga H., Possani L. D. (2002). Cn11, the first example of a scorpion toxin that is a true blocker of a Na^+ currents in crayfish neurons. *The Journal of Experimental Biology*, 205:869-76.
- Rao K. R. (2001). Crustacean pigmentary-effector hormones: chemistry and functions of RPCH, PDH and related peptides. *American Zoologist*, 41:364-79.
- Rao K. R., Riehm J. P. (1989). The pigment-dispersing hormone family: chemistry, structure-activity relations, and distribution. *The Biological Bulletin*, 177:225-29.
- Reischig T., Stengl M. (2003). Ectopic transplantation of accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *The Journal of Experimental Biology*, 206:1877-86.
- Renn S. C. P., Park J. H., Rosbash M., Hall J. C., Taghert P. H. (1999). A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, 99:791-802.
- Sánchez J.A., Fuentes-Pardo B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 56A:601-5.
- Schneider N. L., Stengl M. (2005). Pigment-dispersing factor and GABA synchronize cells of the isolated circadian clock of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of Neuroscience*, 25(21):5138-47.
- Shaw, S. R., Stowe S. (1982) Photoreception, en *The Biology of Crustacea*, Vol 3 (eds D. C. Sandeman y H. L. Atwood), Academic Press, New York, pp 292-362.
- Singaravel M., Fujisawa Y., Hisada M., Saifullah A., Tomioka K. (2003). Phase shifts of the circadian locomotor rhythm induced by pigment-dispersing factor in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science*, 20:1347-54.
- Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. (1987). Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell*, 48(6):913-22.
- Stoynev G. A., Ikononov O. C. (1990). Los núcleos supraquiasmáticos en la regulación de ritmos circadianos, en *Avances en la investigación del sueño y sus trastornos* (eds G. Buéla-Casal y J. F. Navarro Humanes), Siglo XXI de España Editores, Madrid, 129-38.
- Strikholm A., Wallin B. G. (1967). Relative ion permeabilities in the crayfish giant axon determined from rapid external ion changes. *The Journal of General Physiology*, 50:1929-53.

- Terakita A, Hariyama T, Tsukahara Y, Katsukura Y, Tashiro H. (1993a). Interaction of GTP-binding protein G_q with photoactivated rhodopsin in the photoreceptor membranes of crayfish. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 330(2):197-200.
- Terakita A., Takahama H., Hariyama T., Suzuki T., Tsukahara Y. (1998). Light regulated localization of the beta-subunit of G_q-type G-protein in the crayfish photoreceptors. *Journal of Comparative Physiology A*, 183:411-7.
- Terakita A, Takahama H, Tamotsu S, Suzuki T, Hariyama T, Tsukahara Y. (1993b). Light-modulated subcellular localization of the alpha-subunit of GTP-binding protein G_q in crayfish photoreceptors. *Visual Neuroscience*, 13(3):539-47.
- Ukhanov K., Ukhanova M., Taylor C.W., Payne R. (1998). Putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmatic reticulum in *Limulus* photoreceptors. *Neuroscience*, 36(1):23-28.
- Van Harreveld A. (1936). A physiological solution for freshwater crustacea. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 34:428-32.
- Verde M. A., Barriga-Montoya C., Fuentes-Pardo B (2007). Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemical and Physiology. Part A*, 147:983-92.
- Welsh J. H. (1930). Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 16:386-95.
- Welsh J. H. (1961). Neurohumors and neurosecretion, en *The Physiology of crustacea*, Vol II: Sense Organs, Integration, and Behavior (ed T. H. Waterman), Academic Press, New York, pp 281-311.
- Zhang L., Lear B. C., Seluzicki A., Allada R. (2009). The CRYPTOCHROME photoreceptor gates PDF neuropeptide signaling to set circadian network hierarchy in *Drosophila*. *Current Biology*, 19:2050-55.