



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DEL NEUROPEPTIDO Y (NPY) SOBRE CORRIENTES ENTRANTES
DE NEURONAS DEL ÓRGANO X EN CULTIVO DEL LANGOSTINO DE RIO
AZUL (*Cherax quadricarinatus*)**

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:

BRENDA RUBÍ AMARO GARCÍA

TUTOR

DR. JORGE ALEJANDRO CEBADA RUÍZ

MARZO 2014



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias al Dr. Jorge Cebada por haber sido un gran director de tesis, por la oportunidad que me ha dado al realizar este trabajo, por ayudarme en mi formación Profesional y sobre todo por su paciencia y dedicación.

Al Dr. Salvador Galicia por la confianza que me ha brindado, por orientarme, por sus valiosos comentarios y observaciones, que en conjunto han dado forma a la versión final de esta tesis.

A la Mtra. Montserrat Vázquez por su disposición, por sus comentarios y por el tiempo que dedico en la revisión de esta tesis.

A todos mis amigos, por compartir junto a mí los buenos y malos momentos de la carrera y de la vida.

Y dejo para el final a las personas a las que más tengo que agradecer, a toda mi familia.

A mi mamá por brindarme su apoyo diario, por mostrarme su interés (y...cómo va la tesis???), por su paciencia por que siempre me has animado a continuar y terminar.

A mi papá por preocuparse de que todo marche bien y por querer que siempre sea un poco mejor.

A mis hermanos por querer lo mejor para mí, por estar siempre presentes y porque son una parte muy importante en mi vida.

A “mon petit prince” por el amor que me das y por ser la mejor parte de mí.

Gracias a todos

ÍNDICE

RESUMEN	5
Lista de abreviaturas	6
INTRODUCCIÓN	8
Hipotálamo.....	8
a) Sistema magnocelular:	9
b) El sistema parvocelular:.....	8
Sistema órgano x - glándula sinusal (sox-gs)	9
El potencial de membrana y el potencial de acción.....	13
Potencial de membrana	13
Potencial de acción	14
Disparo del potencial de acción y despolarización	15
Repolarización.....	15
Corrientes iónicas.....	16
Corriente de sodio.....	16
Corriente de potasio.....	18
Corrientes de calcio.	18
Potencial de membrana en las células del OX-GS.....	19
Modulación por neurotransmisores	20
Neuropéptido Y (NPY).....	21
Estructura y biosíntesis del NPY.....	23
Hipotálamo y NPY	25
Receptores a NPY.....	26
Receptores Y_1	27
Receptores Y_2	28
Receptores Y_4	29
Receptores Y_5	29
Receptores Y_6	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34

Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
Cultivo celular de neuronas del OX.....	35
Disección del tallo ocular del acocil.....	35
Registros electrofisiológicos.....	36
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSION.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

RESUMEN

El sistema OX-GS es uno de los principales sistemas neurosecretores de los crustáceos decápodos, que se encuentra constituido por al menos 150 células que sintetizan los diversos neuropéptidos que regulan procesos fisiológicos importantes del langostino como son la muda, concentración de glucosa en la hemolinfa, retracción pigmentaria, maduración ovárica entre otros. En este proyecto analizamos el efecto de NPY sobre la excitabilidad de las células del OX del langostino de río azul, empleando técnicas electrofisiológicas para evaluar el potencial de membrana y acción así como corrientes iónicas entrantes. Los resultados obtenidos nos sugieren que NPY es un posible neuromodulador de las células del OX, ya que este péptido provocó la hiperpolarización del potencial de membrana y un incremento en la resistencia de entrada, que generó una disminución de la duración del potencial de acción. Además, al explorar las corrientes dependientes de voltaje de Na^+ y Ca^{2+} observamos que NPY no afecta dichas corrientes ni en la amplitud ni en la inactivación, en cambio al evaluar NPY sobre la corriente de tipo NSR se observó que el péptido disminuye en al menos un 50% de la corriente. Por lo antes mencionado podemos sugerir que NPY participa como neuromodulador de la actividad eléctrica de las células del OX del tallo ocular del langostino de río (*Cherax quadricarinatis*).

Lista de abreviaturas

- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- ARC:** Núcleo arqueado
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- AVP:** Arginina-vasopresina
- BK:** Canales de alta conductancia
- Ca²⁺:** Calcio
- ChTx:** Caribdotoxina
- Cl⁻:** Cloro
- DAG:** Diacilglicerol
- EGTA-K:** Ácido etilén glicol bis (β -aminoetil éter) NNN'N' tetracético.
- EM:** Eminencia media
- FICE:** Factor inhibitorio del crecimiento
- FMRF-amida:** Phe-Met-Arg-Phe-amida
- GABA:** Ácido gamma aminobutírico
- gK⁺:** Conductancia de potasio
- gNa⁺:** Conductancia de sodio
- HCP:** Hormona concentradora de los pigmentos
- HDM:** Hormona dispersora de melanóforos
- HDP:** Hormona dispersora de los pigmentos
- HDPO:** Hormona dispersora de los pigmentos oscuros
- HEPES:** Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina N-[2-etansulfónico]
- HEG:** Hormona estimulante de las gónadas
- HHC:** Hormona hiperglicemiante de los crustáceos
- HIG:** Hormona inhibitoria de las gónadas
- HIM:** Hormona inhibitoria de la muda
- HND:** Hormona neurodepresora
- I_{Ca}:** Corriente de calcio
- I_k:** Corriente de potasio
- I_{Na}:** Corriente de sodio

I_{NSR}: Corriente NSR
IP₃: Inositol trifosfato
K⁺: Potasio
Na⁺: Sodio
NA: Noradrenalina
NPF: Neuropeptido F
NPV: Núcleo paraventricular
NPY: Neuropeptido Y
NSO: Núcleo supraóptico
NSR: Resistencia de pendiente negativa
NVM: Núcleo ventromedial
OX: Órgano X
SOX-GS: Sistema órgano X- glándula sinusal
PA: Potencial de acción
PKA: Proteín kinasa A
PKC: Proteín kinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PP: Polipeptido pancreático.
PYY: Péptido YY.
SK: Canales de baja conductancia.
SNC: Sistema Nervioso Central.
SNP: Sistema Nervioso Periférico.
TAE: Tetraetilamonio
TTX: Tetrodoxina
V_m: Potencial de membrana

INTRODUCCIÓN

El sistema neurosecretor más importante de los vertebrados es el eje hipotálamo-hipófisis, en los insectos, un sistema equivalente es el corpus cardiacum, en los crustáceos, es el sistema órgano X -glándula sinusal (SOX-GS). Estos tres sistemas son considerados como equivalentes debido a su similitud morfológica y funcional; es decir, son un conjunto de neuronas cuya función es la de producir neuropéptidos que se vierten en el torrente circulatorio para ejercer su acción hormonal (Pasano, 1951).

Hipotálamo

El hipotálamo desempeña un papel muy importante en la regulación del sistema nervioso autónomo de los vertebrados, funciona integrando la respuesta autónoma y la función endócrina con las necesidades homeostáticas básicas de la vida diaria.

El hipotálamo está localizado en la base del cerebro anterior, por debajo del tálamo y está dividido en dos partes por el tercer ventrículo, contiene a su vez distintas regiones, cada una de ellas formada por cuerpos celulares situados de forma bilateral en relación al tercer ventrículo (Zaborszky, 1982).

Distintas fibras nerviosas conectan el hipotálamo con la corteza cerebral, el tálamo, otras partes del sistema límbico (como el hipocampo, la amígdala y el septum) y la médula espinal. Las neuronas de estas regiones cerebrales liberan neurotransmisores que regulan las neuronas hipotalámicas (Martin, 1985).

Además de sintetizar hormonas, las principales funciones de los núcleos hipotalámicos son:

- a) Regular el sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático que controla las funciones viscerales.
- b) Intervienen en la regulación de la temperatura corporal del organismo.
- c) Controlan el metabolismo energético regulando la ingesta de alimentos, la digestión y el metabolismo.
- d) Regulan el balance electrolítico.

d) Controlan el comportamiento emocional (enfado, miedo, euforia, ansiedad) y otros tipos de comportamiento como, sed, agresión y comportamiento sexual (Zaborszky, 1982; Martin, 1985).

El hipotálamo contiene además células neurosecretoras encargadas de liberar hormonas. Existen dos grupos de células neurosecretoras hipotalámicas agrupadas en dos sistemas: el sistema magnocelular y el sistema parvocelular.

a) Sistema magnocelular:

Las células neurosecretoras magnocelulares están localizadas en el núcleo paraventricular (NPV) y en el núcleo supraóptico (NSO). El NPV contiene dos tipos de células, un grupo que sintetiza oxitocina y otro grupo que sintetiza arginina-vasopresina (AVP).

Asimismo, el NSO también produce oxitocina y vasopresina. Estas células se proyectan hasta el lóbulo neural de la hipófisis, donde estas hormonas se liberan a partir de las terminaciones nerviosas (Swanson y Sawchenko, 1983).

b) El sistema parvocelular:

Las células neurosecretoras parvocelulares se encuentran en el área preóptica, núcleo ventromedial (NVM), núcleo arqueado (ARC), NPV y NSO, y se proyectan hasta la eminencia media (EM) del hipotálamo. Esta última región contiene venas portales hipofisarias que desembocan en la adenohipófisis. Los axones de las neuronas parvocelulares desembocan en la EM, donde forman terminaciones sobre el espacio pericapilar que rodea los capilares del sistema portal hipofisario (Antoni, 1986). De esta forma, las hormonas hipotalámicas (llamadas hormonas hipofisiotrópicas) se liberan en la EM, desde donde se incorporan a la circulación portal hipofisaria, alcanzando la adenohipófisis, donde a su vez regulan la liberación de distintas hormonas (Sarkar, 1983).

SISTEMA ÓRGANO X - GLÁNDULA SINUSAL

Un par de masas nerviosas, los lóbulos ópticos, se originan lateralmente desde la parte anterior del protocerebro. Particularmente en los decápodos, los lóbulos

ópticos están total o parcialmente localizados en el tallo ocular, dependiendo de la especie. En el tallo ocular, cada lóbulo incluye cuatro ganglios: la médula externa, la médula interna, la médula terminal y la lámina ganglionar (figura 1). Un conjunto de células neurosecretoras, fue descubierto en decápodos por Hänstrom junto con la glándula sinusal (Hänstrom, 1939). Se han encontrado células similares en isópodos y mísidos. En el órgano X (OX) hay diversos tipos de células neurosecretoras que contienen gránulos secretores en sus cuerpos celulares, axones y terminaciones, como se ha comprobado mediante microscopía electrónica. Las células neurosecretoras también han sido localizadas en la médula externa (Charmantier *et al.*, 1997).

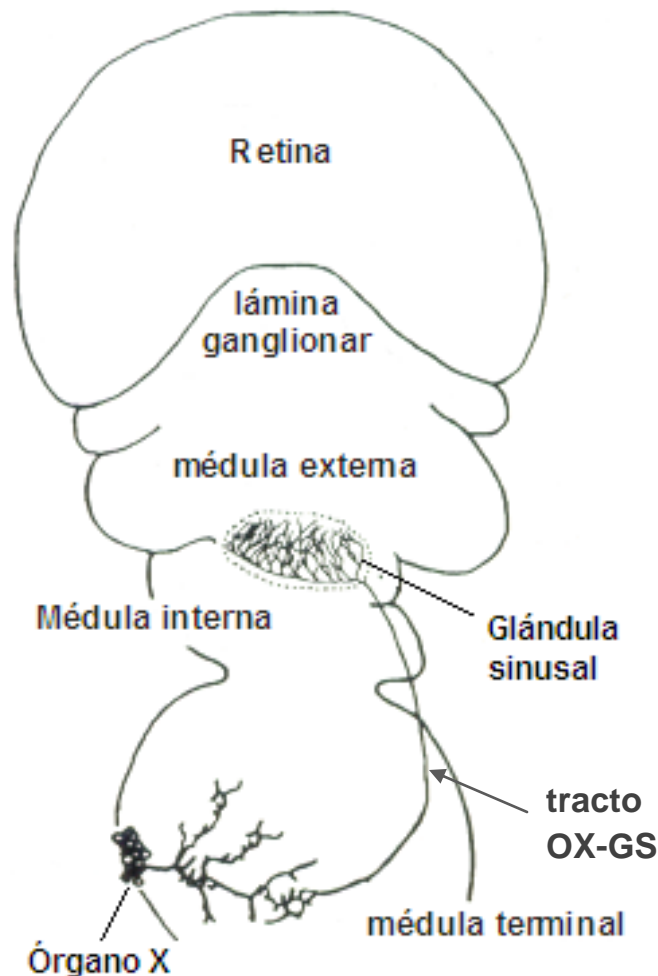


Figura 1. Vista dorso lateral del Tallo ocular derecho (Modificado de Aréchiga *et al.*, 1997).

El sistema órgano X- glándula sinusal (SOX-GS) está constituido por un grupo aproximado de entre 150 a 200 neuronas. Cada soma tiene un axón amielínico que envía colaterales axónicas al neuropilo de la médula terminal; los axones principales forman el tracto SOX-GS que asciende superficialmente en sentido longitudinal al eje del tallo ocular, llegando al nivel del segundo quiasma, entre las médulas interna y externa, para que el conjunto de las terminales y los vasos capilares formen el órgano neurohemal llamado glándula sinusal (figura 1).

Aunque la glándula sinusal fue reportada por Hänstrom en 1939 en el tallo ocular de diversos decápodos, su naturaleza neurohemal fue reconocida inicialmente por Bliss y Passano en 1951, quienes observaron axones entre el OX y la glándula sinusal. Estos caen en la superficie dorsolateral del ganglio óptico, generalmente entre las médulas interna y externa. La glándula sinusal está formada por terminaciones nerviosas y células gliales revestidas de senos de hemolinfa. Las terminaciones nerviosas, que se originan principalmente en las células neuroendócrinas del OX, contienen gránulos secretores. Se han descrito más de 70 tipos de gránulos y cada terminación puede ser distinguida por la presencia de uno de ellos. La principal forma de liberar los gránulos hacia la hemolinfa es la exocitosis (Bliss, 1951; Pasano, 1951; Cooke y Stuenkel, 1985).

A través de experimentos de ablación y reimplante o inyección, se ha encontrado que el tallo ocular está involucrado en el control de la pigmentación, muda, reproducción y procesos metabólicos (Andrew *et al.*, 1978; Bean *et al.*, 1984; Bliss, 1951; Charmantier *et al.*, 1997; Meade y Watts, 2001). Todos estos procesos son regulados por distintas hormonas, todas de naturaleza peptídica, algunas parecen ser exclusivas de los crustáceos, mientras que otras se encuentran en diferentes grupos zoológicos como la FMRF-amida, encefalinas y otros péptidos (Keller, 1992; Fingerman *et al.*, 1992; Price y Greenberg, 1989; Mancillas *et al.*, 1981).

El SOX-GS ha sido reconocido como el sitio de producción y liberación de varias hormonas como la hormona inhibidora de la muda (MIH), que inhibe el efecto promotor de la muda del órgano Y (conjunto de células neurosecretoras situado en los segmentos de la cabeza). La MIH ha sido aislada, caracterizada,

purificada y secuenciada. También se han presentado las secuencias de la hormona hiperglicemiante de los crustáceos (HHC) y la hormona inhibitoria de gónadas (HIG) (Huberman *et al.*, 1993; Deklijn *et al.*, 1992). Entre las hormonas que se han identificado en el SOX-GS también se encuentra la hormona dispersora de melanóforos (HDM), entre otras. En la tabla 1 se presentan las hormonas identificadas en el tallo ocular de los crustáceos.

Péptidos	Efectores
Hormona concentradora de los pigmentos (HCP)	Pigmentos
Hormona dispersora de los pigmentos (HDP)	Pigmentos
Hormona hiperglicemiante de los crustáceos (HHC)	Carbohidratos
Hormona neurodepresora (HND)	Sistema nervioso
Hormona estimulante de las gónadas (HEG)	Gónadas
Hormona inhibitoria de las gónadas (HIG)	Gónadas
Hormona inhibitoria de la muda (HIM)	Exoesqueleto
Hormona dispersora de los pigmentos oscuros (HDPO)	Pigmentos
Hormona dispersora de melanóforos (HDM)	Pigmentos
Factor inhibitorio del crecimiento (FICE)	Quelas

Tabla 1: Péptidos extraídos del tallo ocular de los crustáceos. (Modificada de Quackenbush, 1986).

La liberación de hormonas y la actividad eléctrica de las neuronas del OX son reguladas por factores ambientales y endógenos, como la luz y oscuridad, el estrés y los ritmos circadianos. Estos factores parecen estar mediados por neurotransmisores moduladores como ácido γ -aminobutírico (GABA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y encefalinas. Cada uno de estos neurotransmisores actúan sobre un sustrato iónico y ejerce efectos reguladores específicos sobre la actividad de las células del OX. Una neurona puede estar bajo el control de más de un neurotransmisor, y un neurotransmisor puede mediar efectos diferentes e incluso opuestos en diferentes neuronas (García y Aréchiga, 1998).

Como ejemplo de la relación entre el fotoperíodo y la actividad secretora del SOX-GS está el hecho de que los niveles circulantes de la hormona dispersora de melanóforos (HDM) tienen su pico máximo en la transición de la noche al día (Kallen *et al.*, 1990). Dado que los crustáceos tienen capacidad mimética, el cambio de fondo blanco a negro provoca la dispersión de la matriz pigmentaria de melanóforos tegumentarios, lo que resulta en un cambio de apariencia. Este fenómeno se encuentra regulado hormonalmente por el SOX-GS a través de la secreción de la HDM. Hanumante y Fingerman (1982), aprovechando la capacidad mimética del cangrejo *Uca pugilator* observaron que la inyección sistémica de histamina inhibe la dispersión de los melanóforos, siendo este efecto dependiente de la concentración, sugiriendo que la histamina inhibe la liberación de la HDM. Sin embargo, hasta la fecha no existen evidencias de la presencia de receptores histaminérgicos en las células del SOX-GS.

EL POTENCIAL DE MEMBRANA Y EL POTENCIAL DE ACCIÓN

Potencial de membrana

En las células excitables existe una diferencia de potencial transmembrana debido a que los iones están distribuidos de manera desigual en ambos lados de la membrana, cuando estas células se encuentran en reposo, mantienen un potencial de membrana (V_m) que es de alrededor de -70 mV (Delgado *et al.*, 1998).

El ion encargado de mantener dicho potencial de reposo es el potasio (K^+), ya que la membrana es más permeable para él que para el resto de iones. Así, el K^+ fluye al exterior o al interior de la célula compensando las cargas a un lado y a otro de la membrana, de tal forma que la diferencia de potencial sea siempre, prácticamente, la misma (Zigmond *et al.*, 1999).

Este gradiente de concentraciones se mantiene gracias a la actividad de bombas, principalmente la bomba Na^+/K^+ presente en la membrana. Los iones de sodio (Na^+) tenderán a penetrar al interior celular mientras que los iones de K^+ tenderán a salir, siguiendo su gradiente de concentraciones.

A niveles negativos de potencial de membrana (potencial de reposo normal de las células excitables), los canales de Na^+ están cerrados y no permiten el paso de Na^+ al interior celular. La bomba Na^+/K^+ está activa, de manera que saca Na^+ fuera de la célula a favor de la entrada de K^+ , en contra de su gradiente de concentración, en razón 3:2, respectivamente.

Además, existen canales voltaje-dependientes de K^+ cuya activación genera una corriente de K^+ (I_K), esta corriente está parcialmente activada durante el potencial de reposo y se activa aun más por la despolarización de la célula y se desactiva cuando el potencial de membrana se hiperpolariza. Como consecuencia, el interior celular es un medio rico en K^+ y bajo en Na^+ , todo lo contrario que el exterior (Delgado *et al.*, 1998).

Potencial de acción

Las células excitables están especializadas, ya que tienen vías de selección iónica que permiten cambiar transitoriamente el voltaje de la membrana desde valores negativos de reposo (el interior negativo con respecto al exterior) hasta valores positivos. Este proceso es llamado el potencial de acción (PA) (Delgado *et al.*, 1998).

El potencial de acción se construye a partir de la activación de diferentes corrientes iónicas, que se encuentran inactivadas cuando la célula está en reposo, pero que se activan cuando una excitación eléctrica, que es mayor o igual a un valor umbral, varía el potencial de la célula (Delgado *et al.*, 1998).

Cuando la membrana de una célula excitable es estimulada, las propiedades de selectividad cambian y experimentan un proceso cíclico. La membrana pasa de ser muy selectiva al K^+ a ser muy selectiva al Na^+ y vuelve a ser muy selectiva al K^+ (Delgado *et al.*, 1998).

Disparo del potencial de acción y despolarización.

Como se mencionó previamente, los canales de K^+ son los encargados de mantener el potencial de membrana. Sin embargo, una vez que se alcanza un umbral los canales de Na^+ se abren rápidamente. Por tanto, en el potencial umbral, la membrana varía su preferencia por el K^+ y se hace mucho más permeable para el Na^+ . Durante un breve espacio de tiempo, pero de forma muy rápida y eficaz, entra mucho Na^+ al interior de la célula. Así, la membrana se hace menos negativa (se despolariza), y puede alcanzar valores aproximados de entre +10 mV y +50 mV, aunque en algunas fibras pequeñas solo se aproxima a 0. Sin embargo, el aumento de la conductancia de Na^+ es muy breve y después de unos milisegundos los canales de Na^+ se inactivan y comienza la repolarización (Delgado *et al.*, 1998).

Repolarización.

Después de que la membrana se hace muy permeable a los iones Na^+ se lleva a cabo la inactivación de los canales de Na^+ . Así, sólo las corrientes repolarizadoras continúan activadas y por ello, la restauración del potencial de membrana será rápida. Gracias a los canales de K^+ sensibles al voltaje que todavía permanecen abiertos se lleva a cabo la hiperpolarización de la membrana. Cuando el potencial se hace más negativo, los canales dependientes de voltaje de K^+ se inactivan

provocando que la conductancia de K^+ vuelva a condiciones de reposo, la corriente I_K se inactiva y sólo permanecen abiertos los canales de K^+ pasivos de la membrana en reposo haciendo que el potencial de membrana se estabilice (Delgado *et al.*, 1998).

Corrientes iónicas.

En las células excitables, el movimiento de iones a través de la membrana resulta en cambios del potencial eléctrico de la membrana. Este comportamiento electrofisiológico está determinado por el tipo de canales iónicos y su distribución en la célula.

La mayoría de los canales presentes en el axón producen una corriente rápida entrante de Na^+ que genera la despolarización del potencial de acción, y una corriente de salida tardía debido a la apertura de canales de K^+ de activación tardía. La repolarización del potencial de acción ocurre cuando se inactivan los canales de Na^+ y fluye una corriente a través de los canales de K^+ . En el soma, la cantidad de tipos de canales iónicos es mayor. En esta región de la neurona, se han medido corrientes de K^+ , corrientes de Na^+ , corrientes de Ca^{2+} y corrientes de Cl^- , que son generadas por diferentes poblaciones de canales iónicos. Hodgkin y Huxley identificaron las diferentes especies iónicas que originan la corriente total de la membrana (Latorre *et al.*, 1996).

Corriente de sodio.

La corriente entrante de sodio es originada por despolarizaciones que abren los canales de Na^+ . La corriente de Na^+ producida por un pulso despolarizante tiene una fase sigmoidal rápida, llamada activación, y después una fase que decrece exponencialmente, llamada inactivación, mientras se mantiene la despolarización (Fig. 2) La cinética de la activación y la inactivación es dependiente del voltaje y por lo tanto el potencial de la membrana tiene una doble acción en la corriente de Na^+ . La inactivación de la corriente de Na^+ durante una despolarización sostenida puede prevenirse perfundiendo a la célula con la enzima pronasa. Bajo estas

circunstancias, la corriente de Na^+ sólo se activa y puede observarse una corriente entrante sostenida por varios milisegundos. Si la despolarización se mantiene durante cientos de milisegundos, la corriente de Na^+ se inactiva por un proceso diferente llamado inactivación lenta de Na^+ . Este proceso no es bloqueado por la pronasa Hodgkin y Huxley expresaron la corriente de Na^+ como:

$$I_{\text{Na}^+} = \bar{g}_{\text{Na}^+} m^3 h (V_m - V_{\text{Na}^+})$$

donde \bar{g}_{Na^+} es la conductancia total máxima al Na^+ , m^3 es una función adimensional del tiempo y el voltaje, y representa la fracción de los canales que se encuentran en estado activado; h representa la fracción de los canales que no se encuentran en estado de inactivación.

Cuando se analizan los resultados de experimentos con fijación de voltaje, se ha encontrado que la máxima conductancia de Na^+ es una función sigmoideal del voltaje que satura a voltajes muy positivos (Latorre *et al.*, 1996).

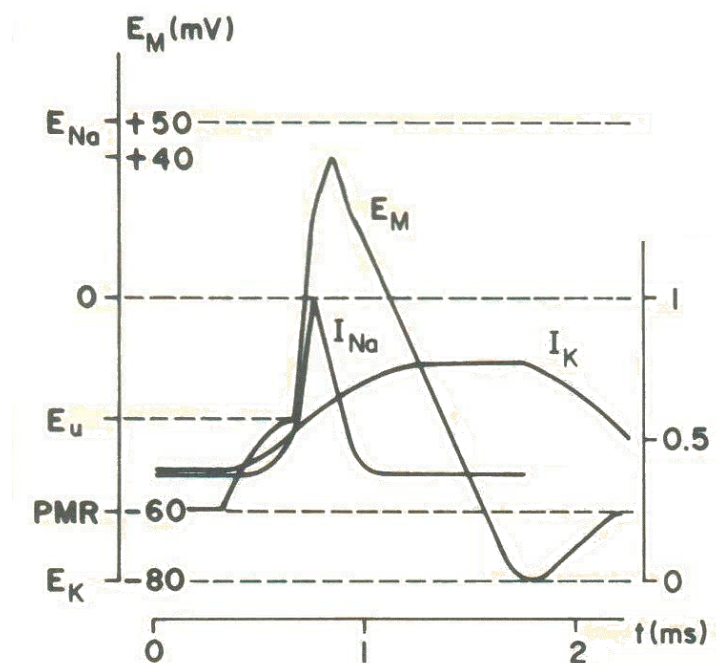


Figura 2. Bases iónicas del potencial de acción. Representación simultánea del curso temporal de la variación del potencial de membrana E_m y de las corrientes de Na^+ (I_{Na}) y de K^+ (I_{K}) Durante el desarrollo de un potencial de acción. (Modificado de Coro, 1996).

Corriente de potasio.

Hasta ahora no se ha encontrado una droga que bloquee la corriente de K^+ , el tetraetilamonio (TEA) sustancia química que bloquea los canales de K^+ , no tiene efecto cuando es aplicado fuera de la célula, pero puede bloquear la corriente de K^+ cuando es aplicado en el interior, afectando su cinética al tapar un canal de K^+ abierto. El mismo mecanismo fue propuesto para algunos derivados del TEA, los cuales producen bloqueo e inducen un proceso parecido a la inactivación de corriente de K^+ . Los efectos de los compuestos derivados de TEA han sido demostrados también en el nodo de Ranvier.

Esta corriente de K^+ tiene un retardo más largo y una subida más lenta que en la corriente de Na^+ debido a la activación tardía de los canales de K^+ . Para el caso de las fibras nerviosas, la corriente de K^+ no presenta inactivación. Sin embargo, en fibras musculares se ha encontrado la existencia de una fase de inactivación para esta corriente (Latorre *et al.*, 1996).

La expresión para esta corriente está dada por:

$$I_{K^+} = g_{K^+} n^4 (V_m - V_{K^+})$$

Corrientes de calcio.

Las corrientes de Ca^{2+} tienen similitudes y diferencias con las corrientes de Na^+ . Son similares en que ambas son activadas por despolarización, ambas son corrientes entrantes a potenciales de membrana normales y ambas tienen el mismo grado de inactivación. Además, el modelo eléctrico usado para describir las corrientes de Na^+ y K^+ no es aplicable a la corriente de Ca^{2+} .

La corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) de estado estable puede representarse con una ecuación del tipo Goldman-Hodgkin-Katz, la cual predice la rectificación de la curva I-V (corriente-voltaje) para potenciales despolarizantes.

$$I_{Ca} = P_{Ca} \frac{4F^2}{RT} V \frac{[Ca^{2+}]_i \exp(2V F/RT) - [Ca^{2+}]_e}{\exp(2V F/RT) - 1}$$

Donde P_{Ca} es la permeabilidad al Ca^{2+} , mientras que $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_e$ son las concentraciones intra y extracelular de Ca^{2+} , respectivamente. La concentración de Ca^{2+} intracelular en neuronas es del orden de 10^{-8} . Este dato es importante, ya que el calcio intracelular actúa como segundo mensajero, y cualquier incremento en la concentración del Ca^{2+} intracelular, afecta diversas funciones celulares (Brown *et al.*, 1982).

Potencial de membrana en las células del OX-GS

A partir de registros intracelulares de neuronas del OX en el tallo ocular aislado del langostino de río, se han determinado las siguientes características electrofisiológicas: potencial de membrana en reposo -50 a -65 mV; resistencia de entrada 60 a 100 M Ω ; amplitud pico a pico del potencial de acción de 60 a 85 mV; duración del potencial de acción a -20 mV de 8 a 10 ms; sobretiro de 10 a 35 mV y pospotencial de 5 a 20 mV, dependiendo del potencial en reposo; y velocidad de conducción 1 a 3 m s⁻¹ (Iwasaki y Satow, 1971; Nagano y Cooke, 1987; Onetti *et al.*, 1990). Dependiendo del patrón de actividad las células del OX se han agrupado en: silentes (56%), las cuales generan trenes de potenciales de acción en respuesta a la inyección de corriente despolarizante; con actividad tónica (35%); y con actividad en trenes (9%) (Onetti *et al.*, 1990). Sin embargo, en registros de larga duración (72hrs.) se ha observado que una misma célula es capaz de cambiar su patrón de actividad en un ciclo de 24 horas (García y Aréchiga, 1998). La actividad eléctrica espontánea de las células del OX se genera en el segmento inicial del axón y es dependiente de Na^+ ; la axotomía a 150 μ m del cuerpo celular elimina dicha actividad (Iwasaki y Satow, 1971). En cambio, los cuerpos neuronales son capaces de generar potenciales de acción dependientes de Ca^{2+} en respuesta a inyección de corriente despolarizante (Onetti *et al.*, 1990). En condiciones de fijación de voltaje en neuronas del OX en cultivo, se han descrito al menos seis tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, tres que generan corrientes entrantes: una de Ca^{2+} a través de canales del tipo P

sensible a ω -agatoxina Ω IV-A, otra de Na^+ sensible a tetrodotoxina (TTX) y una debida a Na^+ del tipo NSR (negative slope resistance) insensible a TTX y dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Cuatro corrientes salientes debidas a potasio: una del tipo rectificador retardado sensible a tetraetilamonio (TEA), otra de tipo transitorio I_A sensible a 4-aminopiridina (4-AP), y dos dependientes de Ca^{2+} del tipo BK (canales de alta conductancia) sensible a caribdotoxina (ChTx) y del tipo SK (canales de baja conductancia) sensible a apamina (Onetti *et al.*, 1990; Murbartián *et al.*, 2000; García-Colunga *et al.*, 1999; Lara *et al.*, 1999; Cebada, 2006).

MODULACIÓN POR NEUROTRANSMISORES

En registros de larga duración de al menos 72hrs de registro se ha observado que las células del OX cambian su patrón de actividad eléctrica, estos cambios son modulados tanto por factores externos provenientes de fluctuaciones medio ambientales como temperatura, intensidad luminosa, salinidad del agua, saturación de oxígeno; como por influencias endógenas tales como la respiración, los niveles de glucosa circulante y la excreción urinaria. Dichas influencias se ejercen en una amplia gama temporal, desde fracciones de segundo hasta días, pueden ser de tipo tónico, fásico o cíclico y son mediadas por interacciones sinápticas o por vía humoral (García y Aréchiga, 1998). A partir de las observaciones de Fingerman y cols. (1985), una amplia variedad de sustancias neuroactivas se han relacionado a los mecanismos de control del SOX-GS, entre otras: GABA, glutamato, serotonina, dopamina, histamina, acetilcolina, epinefrina, norepinefrina, encefalinas, octopamina, FMRFamida, etc. Sin embargo, los datos que así lo sugirieron fueron de tipo indirecto ya que se obtuvieron en preparaciones de animal íntegro o de tallo ocular aislado, donde las sustancias se inyectaron a la circulación general o mediante la aplicación tópica del tejido (Quackenbush y Fingerman, 1984; Fingerman *et al.*, 1985; Fingerman y Nagabhushanam, 1992).

Las células del SOX-GS, son las encargadas de realizar una serie de integraciones entre las condiciones exteriores y las interiores y con esta información, estimular el proceso de crecimiento somático mediante la actividad denominada muda, o los procesos de maduración de las gónadas (vitelogénesis) para llevar a cabo la reproducción.

Se reconoce para los crustáceos, que los neuropéptidos producidos principalmente en el tallo ocular, tienen la función de integrar una respuesta coordinada entre las terminaciones nerviosas y las glándulas endócrinas, durante los procesos metabólicos del organismo. En años recientes ha crecido el interés en el conocimiento y determinación de las condiciones óptimas requeridas por los organismos para llevar a cabo los procesos de muda, crecimiento y reproducción.

En el SOX-GS de los crustáceos, se han realizado muchos trabajos para describir el comportamiento de este sistema de regulación, entre los neuropéptidos involucrados en este sistema de regulación se ha identificado al neuropéptido Y (NPY) y se ha sugerido su participación como neuromodulador de la actividad eléctrica y la actividad secretora de las células del SOX-GS.

NEUROPEPTIDO Y

El neuropéptido Y (NPY) fue aislado por primera vez en cerebro porcino por Tatemoto y col. en 1982. El término neuropéptido Y (Y = TIROSINA en la nomenclatura para aminoácidos) se debe a que en su estructura molecular, compuesta de 36 aminoácidos, contiene una gran proporción de grupos tirosina (5 grupos), incluyendo un residuo tirosina en posición N-terminal y una tirosina-amida en posición C-terminal (Tatemoto *et al.*, 1982).

El NPY pertenece a la familia del Polipéptido Pancreático (PP), y comparte una región común C-terminal con el Péptido Intestinal YY (PYY) (Tatemoto, 1982). Los tres péptidos comparten un alto nivel de homología, el NPY tiene un 92% de conservación en estructura entre invertebrados y vertebrados (Colmers y Wahlestedt, 1993), lo que indica que su estructura se ha mantenido casi completamente conservada dentro del genoma por más de 400 millones de años. Este alto nivel de conservación sugiere que NPY tiene una gran importancia

fisiológica, en vertebrados como el pez cebrá y en invertebrados como *C. elegans* y *Drosophila melanogaster* se han encontrado funciones similares en la regulación del comportamiento y adaptación del organismo durante los desafíos medioambientales como el hambre, infección o ataque de depredadores (Cohen *et al.*, 2009; Sokolowski, 2003).

Se ha revelado una amplia distribución del NPY y sus receptores en estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC) como el hipotálamo, núcleo accumbens, amígdala y en la médula espinal. También se encuentra distribuido en el sistema Nervioso Periférico (SNP). Ha sido identificado por medio de inmunoreactividad en tejidos derivados de la cresta neural en varias especies de vertebrados como: cobaya, gato, rata, conejo, pollo, rana y hombre. También ha sido identificado en invertebrados como: la langosta migratoria *Locusta migratoria*, los moluscos gasterópodos *Aplysia* y *Lymnaea* y en *Leptinotarsa decemlineata* (Gray y Morley, 1986; Allen, 1990; Schoofs *et al.*, 1988; Rajpara *et al.*, 1992; Hoek *et al.*, 1997; Spittaels *et al.*, 1996).

El NPY y sus receptores desempeñan diversas funciones en el sistema nervioso de vertebrados como la regulación de la saciedad, potenciador de la memoria, regulador del ritmo circadiano, y en procesos mediadores de analgesia e hiperalgesia, también se le atribuyen acciones en la regulación del SNP, como vasoconstricción, inhibición de la liberación de insulina, regulación de la motilidad intestinal y de la secreción gastrointestinal y renal (Tatemoto, 1982; Wettstein *et al.*, 1995; Thorsell *et al.*, 2000; Yannielli y Harrington, 2001; Wang *et al.*, 2000; Michel y Rascher, 1995; Wang *et al.*, 1994; Sheikh, 1991; Playford y Cox, 1996). También se sabe que actúa como orexígeno (sustancia inductora del apetito) tanto en vertebrados como en invertebrados, en *Lymnaea* se sabe que el NPY desempeña un papel clave en la regulación de la glucosa en la hemolinfa (Colmers y Bleakman, 1994; Kiris *et al.*, 2004). Sin embargo, poco se sabe sobre las funciones del NPY en invertebrados.

A los péptidos activos presentes en el organismo se les atribuyen acciones como neurotransmisores, debido a que se almacenan en vesículas presinápticas simpáticas, son liberados gracias a la estimulación eléctrica y actúan sobre

receptores específicos (Potter y Ulman, 1994). Se ha observado que el NPY coexiste con otros neurotransmisores, en neuronas de la corteza cerebral y de los ganglios basales el NPY coexiste con la somatostatina, en el tronco encefálico con la noradrenalina y en otras regiones con las catecolaminas y neurotransmisores catecolaminérgicos (Dawbarn *et al.*, 1984; Heilig y Widerlöv, 1990).

ESTRUCTURA Y BIOSÍNTESIS DEL NPY

El NPY contiene dos extremos α -hélice terminales en paralelo una con respecto a la otra y se estabiliza por interacciones hidrofóbicas y por prolina en las posiciones 2, 5 y 8. Los residuos aminoácidos 15-31 crean la secuencia hidrofóbica principal denominada del inglés PP-wrinkle (Fig. 3). La parte amino terminal de la molécula esta representado por una hélice de poliprolina del tipo II izquierda (residuos 1-13) pasando hacia una lámina β (residuos 14-18) conectando con una α -hélice (residuos 19-32). El C-terminal esta representado por la cadena hidrófila o el extremo helicoidal (residuos 33-36). El C-terminal es importante para la unión a los receptores y proporcionar los efectos biológicos del NPY. Al mismo tiempo el tetrapéptido con la misma secuencia de aminoácidos, con el C-terminal idéntico no puede unirse al receptor. La estabilidad conformacional de la molécula de NPY depende de N-terminal, el C-terminal del NPY puede imitar los efectos del péptido entero, como la inhibición presináptica de la liberación del transmisor, pero no induce la vasoconstricción (Nozdrachev, 1996; Michel *et al.*, 1998).

El NPY, como todos los péptidos reguladores, mediante un proceso postraducciona de precursores de proteínas, es sintetizado en el retículo endoplásmico de neuronas de los ganglios simpáticos como un precursor, cuando el NPY se ha sintetizado se mueve al aparato de Golgi, seguido de su translocación en la red trans-Golgi en donde el péptido se almacena hasta su activación. La mayoría del NPY se almacena en grandes vesículas de núcleo denso (Michel, 2004).

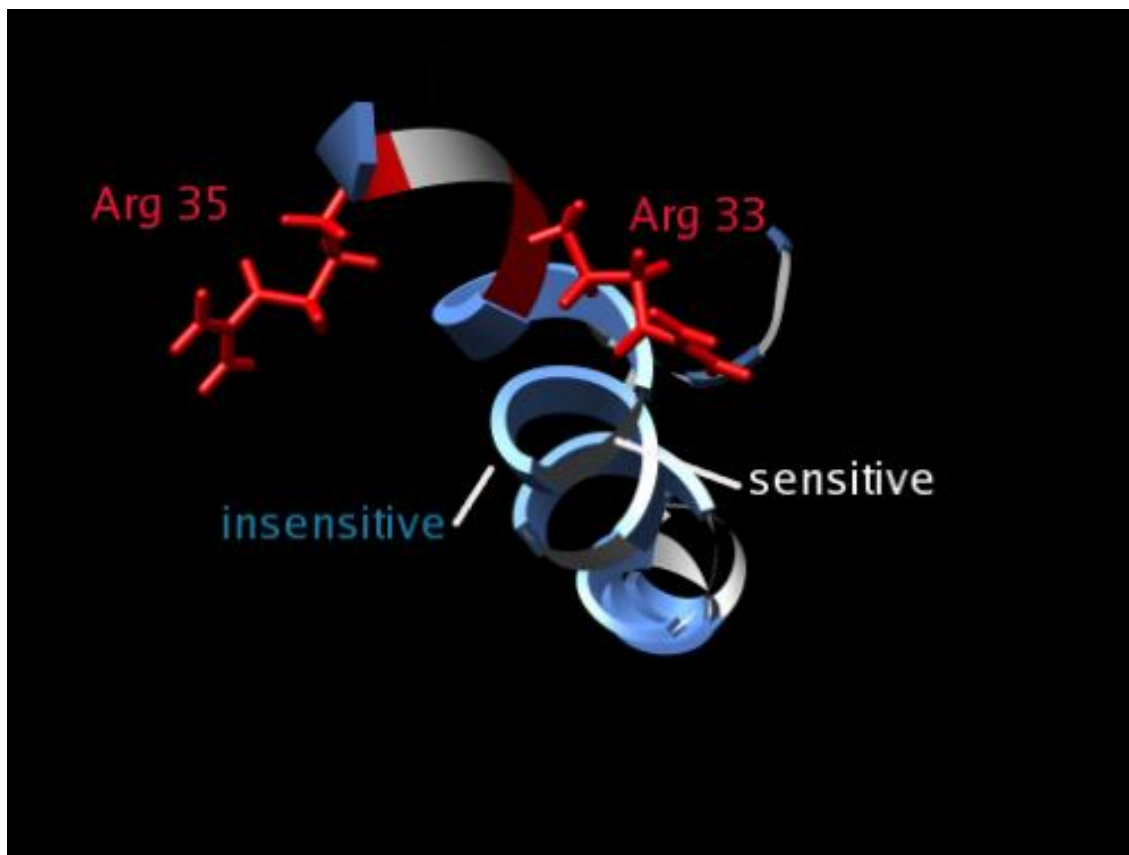


Figura 3. Esquema de la estructura del NPY (Modificado de Sokolowski , 2003)

Debido a la existencia de un conjunto de aminoácidos hidrófobos en el amino-terminal del neuropéptido preformado, la secuencia señal del precursor se transloca a través de la membrana de retículo endoplásmico. En el interior del retículo endoplásmico, la secuencia señal es liberada de la cadena del polipéptido por la peptidasa. Después de eso, la proteína adquiere su estructura terciaria característica. El procesamiento de neuropéptidos en el interior de los gránulos secretores incluye reacciones endo y exoproteolíticas, así como la glucosilación, sulfatación, amidación, y la fosforilación de los residuos amino y carboxilo terminal de los aminoácidos (Ashmarin y Stukalova, 1996).

El NPY biológicamente activo procede de un preproneuropéptido Y que contiene 97 y 98 aminoácidos en rata y humano, respectivamente. El NPY es formado durante el curso de cuatro reacciones enzimáticas post-traduccionales

consecutivas, el resultado es la disminución de residuos aminoácidos a 36. Durante la primera reacción el péptido señal es liberado y la molécula precursora del péptido queda compuesta por 60 aminoácidos, después las proenzimas convertidas PC2 y PC1 3 / degradan el 30-aminoácido terminal, el péptido resultante queda con 39 aminoácidos. La carboxipeptidasa E degrada dos aminoácidos más de este péptido. La peptidil-glicina- α -amida monooxigenasa finalmente termina la formación de la molécula de 36 aminoácidos (Ashmarin y Stukalova, 1996; Balasubramaniam, 1997).

Una gran variedad de moléculas y cascadas intracelulares son capaces de modular la biosíntesis del NPY. Así, se han descrito agentes que estimulan o inhiben el proceso. Como agentes estimuladores cabe destacar los esteroides, algunos neurotransmisores, ciertos factores de crecimiento o activadores de los mediadores PKA (Proteína cinasa A) y PKC (Proteína cinasa C), entre otros (Higuchi *et al.*, 1988; Sahu *et al.*, 1992; Magni y Barnea, 1993; Minth-Worby, 1994; Chan *et al.*, 1996; Sabol e Higuchi, 1990). Sin embargo, como agentes inhibidores de la biosíntesis destaca la leptina (hormona secretada por el tejido adiposo) (Zhang *et al.*, 1994).

Hipotálamo y NPY

El sistema hipotalámico de regulación de la alimentación se centra en dos grupos neuronales conocidos como centro de la saciedad y centro del hambre. El centro de la saciedad se ha localizado en el núcleo ventromedial, y sus neuronas a diferencia de otras del sistema nervioso central poseen receptores para la insulina. El centro del hambre se encuentra localizado en el hipotálamo lateral (Bernardis y Bellinger, 1993).

Las neuronas del hipotálamo lateral pertenecen al área parasimpática del hipotálamo, y regulan la ingesta de alimentos (Bernardis y Bellinger, 1993), mientras que el hipotálamo lateral promueve la utilización de glucosa y la liberación de insulina.

El centro de la saciedad es regulada por la glucosa intracelular. Al aumentar la glucosa intracelular se activa el centro y se inhibe el hambre. En los últimos

años se han estudiado diversas sustancias que tienen una función en la regulación del consumo de los carbohidratos y de las grasas, entre estas tenemos a la serotonina (5-HT), galanina y el NPY.

El NPY es un potenciador de la ingesta de alimentos y es sintetizado en interneuronas del núcleo arqueado (ARC) (Bluet Pajot, 1998). La inyección de este neuropéptido en los ventrículos cerebrales o en el hipotálamo de la rata estimula la ingesta de alimentos, disminuye el gasto energético e incrementa la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado y del tejido adiposo produciendo obesidad.

Por medio de ensayos de inmunocitoquímica y radioinmunoensayo con anticuerpos para el NPY se ha detectado que los cuerpos celulares y fibras inmunoreactivas se encuentran principalmente en las regiones corticales, límbicas e hipotalámicas de mamíferos (Allen *et al.*, 1983).

Receptores a NPY

Los receptores del NPY se encuentran diseminados en el sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y en los órganos diana, existiendo evidencias de que pertenecen a la superfamilia de receptores unidos a la proteína G. Existen diferentes receptores conocidos denominados: postsináptico (Y_1), presinápticos (Y_2), un tercer receptor llamado Y_4 , un receptor del apetito o saciedad situado en el hipotálamo (Y_5) y un receptor que ligue los tres péptidos denominados "PP-fold" (Y_6) (Gehlert, 1994; Larhammar, 1996a; Nata *et al.*, 1990).

Los efectos de los receptores están mediados por proteínas G acopladas a los receptores inhibiendo la acumulación de AMPc (Grunder y Hakanson 1994; Larhammar 1996b). El efecto de la interacción con los receptores Y_1 puede estar mediado por un doble mecanismo, la inhibición de la síntesis del AMPc y un aumento del calcio intracelular. La interacción del NPY con los receptores Y_2 sólo da lugar a la disminución de los valores intracelulares de AMPc, y en ciertas células neuronales produce una alteración de la permeabilidad de los canales de sodio y potasio (Waeber, 1990; Wahlestedt *et al.*, 1986; Wahlestedt *et al.*, 1990; Wahlestedt *et al.*, 1992; Beck-Sickinger y Jung, 1995). El NPY también puede

activar la fosfolipasa C (PLC) estimulando, por tanto, la producción de diacilglicerol (DAG) e IP₃ (Inositol 1,4,5-trifosfato) (Bell *et al.*, 1997). Este último podría, a su vez, regular la señalización intracelular de Ca²⁺ y el DAG activaría la PKC (Motulsky y Michel, 1988; Mihara *et al.*, 1989; Goldberg *et al.*, 1998).

La respectiva relación estructura-actividad de los receptores se ha establecido usando análogos o fragmentos de NPY, PYY y PP (Michel *et al.*, 1998). Sin embargo, posteriormente se ha visto que la mayoría de las moléculas consideradas como agonistas Y₂ (NPY(13-36), NPY(18-36)) y Y₁ ([Leu31,Pro34]NPY) tienen afinidad por otros receptores clonados más recientemente, como el Y₄ o el Y₅. Por ello, actualmente, se opta por el uso de antagonistas selectivos para su clasificación, para el estudio de los mecanismos endógenos del NPY así como para evaluar qué acciones de NPY pueden representar fenómenos fisiológicos importantes (Pheng y Regoli, 2000).

Receptores Y₁

El receptor Y₁ ha sido detectado, mediante pruebas de ARNm en diversos tejidos humanos (hipotálamo, corazón, riñón y tracto intestinal), de rata, de ratón y recientemente se ha identificado en invertebrados, en el sistema nervioso central de *Triatoma infestans* y en crustáceos en la cadena ganglionar abdominal de *Cherax quadricarinatus* (Larsen *et al.*, 1993; Wharton *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1995; Settembrini *et al.*, 2003; Romero, 2011).

En general, el NPY se une al receptor Y₁ con mayor afinidad que el PYY y que el PP (Gerald *et al.*, 1996). Además, existen fragmentos de C-terminal que pueden actuar como agonistas parciales del receptor y en algunas líneas celulares actúan, incluso, como antagonistas (Michel *et al.*, 1991). Actualmente, se conocen varios antagonistas del receptor Y₁ (Tabla 2) entre los que destacan el J-115814, el GR 264879A, y el BIBP3226 (Kanatani *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2001; Rudolf *et al.*, 1994; Wieland *et al.*, 1995; Doods *et al.*, 1996).

Por otro lado, al receptor Y₁ se le asocia con: vasoconstricción de la mayoría de los lechos vasculares actúa sobre los receptores adrenérgicos α₁, el

NPY induce la constricción de los vasos debido a la activación de la PKC (Edvinsson *et al.*, 1987; Wahlestedt y Reis, 1993).

Receptores Y₂

El receptor Y₂ se localiza presinápticamente en las neuronas que contienen NPY, (King *et al.*, 1999), muestra una alta afinidad con NPY o PYY y una baja afinidad con PP (Keire *et al.*, 2002).

Los receptores Y₂ han sido detectados mediante ensayos de ARNm en varias zonas del SNC, se han encontrado niveles bajos de ARNm en tejidos periféricos humanos como el corazón; sin embargo en invertebrados han sido detectados en el tallo ocular, en el ganglio cerebroide y en la cadena ganglionar abdominal de *Cherax quadricarinatus* (Zhang *et al.*, 1997; Velázquez, 2011; Romero, 2011).

Se han desarrollado algunos antagonistas selectivos que permitieran el estudio de las posibles implicaciones biológicas y terapéuticas del mismo, primero se sintetizó el T4-[NPY33-36] y posteriormente se comercializó un antagonista de carácter no peptídico, BIIE0246, más selectivo que el anterior (Grouzmann *et al.*, 1997; Doods *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2000).

La acción que se ha atribuido al receptor Y₂ tiene lugar a nivel presináptico, inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Wahlestedt *et al.*, 1986; Smith-White *et al.*, 2001). Los receptores Y₂ también se localizan en terminaciones nerviosas noradrenérgicas alrededor del hipotálamo, ejerciendo una acción inhibitoria sobre NA (Noradrenalina) (Martire *et al.*, 1993). En otros estudios se ha reportado que los receptores Y₂ participan en la regulación endócrina, como la liberación de prolactina, o la potenciación de la secreción de vasopresina del lóbulo neurointermedio de la rata (Wang *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1994). Investigaciones recientes, implican a este receptor en el efecto orexígeno, en la motilidad intestinal, en el ciclo circadiano, en la memoria, en la epilepsia y en el dolor (Kaga *et al.*, 2001).

Receptores Y₄

Una característica única del receptor Y₄ es su alta afinidad por el PP. Por lo tanto, el receptor Y₄ es probablemente un receptor de PP. El receptor Y₄ humano clonado tiene una secuencia de 43% de homología con el receptor Y₁ humano (Lundell *et al.*, 1995; Bard *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1996). Tanto NPY y PYY tiene afinidades bajas para este receptor.

En humanos el receptor Y₄ está presente en el intestino, la próstata y el páncreas (Lundell *et al.*, 1995). El ARNm del receptor Y₄ es escasamente expresado en el cerebro, excepto en el tronco cerebral (Parker y Herzog, 1999). En la rata, el receptor se encuentra principalmente en el pulmón (Lundell *et al.*, 1995; Lundell *et al.*, 1996).

En estudios recientes se ha demostrado la existencia del receptor Y₄ en el tallo ocular, ganglio cerebroide y cadena ganglionar abdominal del langostino (Velázquez, 2011; Romero, 2011)

Receptores Y₅

En 1996 se reportó la clonación de un nuevo receptor de NPY designado receptor Y₅ (Gerald *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996). El ARNm del receptor ha sido identificado mediante hibridación *in situ* en varias áreas del sistema nervioso periférico y central, así como en testículo, bazo, páncreas y áreas importantes para la regulación de la ingesta de alimentos (Statnick *et al.*, 1998; Gerald *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996). En invertebrados se ha reportado la expresión del receptor Y₅ en la cadena ganglionar torácica del langostino de río (Romero, 2011).

La mayor afinidad por este receptor la tienen el NPY y el PYY, presentando afinidad intermedia algunos análogos como el NPY2-36, el PYY3-36 y el NPY13-36. El péptido PP tiene una muy baja afinidad por el receptor de la rata y del hombre. [D-Trp³²] NPY tenía una alta afinidad por el receptor Y₅, mientras que para los otros receptores conocidos de NPY reportó baja afinidad.

Actualmente, se conocen agonistas selectivos como: [Ala³¹, Aib³²]NPY y [D-Trp³⁴]NPY; así como también antagonistas selectivos de este receptor [D-TRP³²]NPY, L-152,804 y CGP71683A, que facilitan en gran medida el estudio de

las respuestas fisiológicas mediadas por la familia de los polipéptidos pancreáticos (Cabrele *et al.*, 2000; Parker *et al.*, 2000; Balasubramaniam *et al.*, 1994; Kanatani *et al.*, 2000a; Yokosuka *et al.*, 2001).

A este receptor se le atribuyen efectos reguladores de la ingesta de alimentos y juega un papel importante en la modulación de la transmisión excitatoria del hipotálamo (Gerald *et al.*, 1996; Kanatani *et al.*, 2000; Yokosuka *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002).

Receptores Y₆

La clonación de un nuevo receptor de NPY en ratón de 371 aminoácidos fue propuesto en ese momento para ser “Y₅” (Weinberg *et al.*, 1996). Sin embargo, otros investigadores informaron de un mismo clon como un Receptor de PP o receptor de Y2b (Gregor *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1996). Para evitar confusión, se cambió el nombre del receptor a Y₆.

El gen del receptor Y₆ está presente en pollo, conejo, vaca, perro, ratón, y humano, pero está completamente ausente en la rata (Burkhoff *et al.*, 1998). Los datos de secuenciación revelaron que el gen Y₆ es ortólogo del gen Y₅ de ratón. Los receptores Y₆ de los primates son funcionalmente inactivos debido a una mutación ocurrida durante la evolución temprana de los primates (Matsumoto *et al.*, 1996).

	Agonista en orden de potencia	Agonista selectivo	Antagonista selectivo	Señal de transducción
Y₁	NPY (0.2 nM) PYY (0.7nM) PP (>100 nM)	[Leu ³¹ ,Pro ³⁴]NPY [Pro ³⁴]NPY [Leu ³¹ ,Pro ³⁴]PYY [Pro ³⁴]PYY	BIBP 3226 GR23118 J-115814 SR120819A GR264879A H394/84 BIBO3304	G _{i/o} , inhibición de adenil-ciclase
Y₂	NPY (0.7 nM) PYY (0.7nM) PP (>1000 nM)	NPY ₁₃₋₃₆ NPY ₃₋₃₆ PYY ₁₃₋₃₆ PYY ₃₋₃₆	T4-[NPY33-36] BIIE0246	G _{i/o} , inhibición de adenil-ciclase
Y₄	PP (0.05 nM) NPY PYY	PP		G _{i/o} , inhibición de adenil-ciclase
Y₅	NPY (0.6 nM) PYY (1 nM) PP	[Ala ³¹ ,Aib ³²]NPY [D-Trp ³⁴]NPY	[D-TRP32]NPY L-152,804 CGP71683A	G _{i/o} , inhibición de adenil-ciclase
Y₆	NPY PYY PP			inhibición de adenil-ciclase

Tabla 2. Principales agonistas y antagonistas de los receptores del NPY (Modificada de Michel, *et al.*,1998).

JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de regulación del sistema neurosecretor de los crustáceos son de gran importancia al participar directamente en la regulación de procesos fisiológicos relevantes tales como: crecimiento, muda, niveles de glucosa hemolinfática, entre otros. Esto ha generado un sin-número de estudios relacionados con la modulación de dichos procesos por factores tanto internos como externos (ambientales), ya que esto podría permitir identificar mecanismos y moléculas participantes, que permitan un mejor control en la reproducción y velocidad de crecimiento de los crustáceos, entre otras.

Una parte importante de estos mecanismos de regulación están determinados por las propiedades eléctricas de las células nerviosas. En el SOX-GS de los crustáceos se han realizado algunos trabajos para describir el comportamiento de este sistema de regulación, entre los neuropeptidos que participan en este sistema se ha identificado al NPY.

El NPY se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso, tanto a nivel central como periférico y ha sido implicado de forma relevante en muchas funciones por lo que ha adquirido gran importancia y su estudio se ha ampliado de vertebrados a invertebrados en los últimos años, ya que además se han identificado miembros de la familia NPY en invertebrados como moluscos, dípteros, heterópteros, turbelarios, platelmintos y crustáceos.

Aunque poco se sabe sobre las funciones del NPY en invertebrados, recientemente se ha demostrado que está implicado en el aumento de la ingesta de alimentos y el aumento de peso en crustáceos, es bien sabido que estos procesos son controlados por el sistema endócrino, sin embargo, aún se desconoce el mecanismo de los efectores sobre la ingestión de alimentos en crustáceos.

En trabajos previos se ha logrado demostrar mediante inmunoensayos la existencia de NPY y sus cinco tipos de receptores en tallo ocular del langostino de

río, también se han identificado los receptores Y_1 , Y_2 , Y_4 , y Y_5 así como del neuropéptido F (NPF), péptido considerado homólogo al NPY en invertebrados, en el SNC del langostino de río, sin embargo, existen pocos estudios electrofisiológicos, por lo que poco se sabe sobre el efecto que tiene el NPY en la actividad eléctrica de las neuronas del órgano X. Por tal motivo, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar las propiedades eléctricas de las neuronas del órgano X para establecer la participación del NPY como neuromodulador de la actividad eléctrica y secretora de estas células.

HIPÓTESIS

El neuropéptido Y (NPY) modula la actividad eléctrica de las células del órgano X (OX) del langostino de río azul, modificando su resistencia de entrada.

OBJETIVO GENERAL

- Establecer la participación de NPY como neuromodulador y el posible mecanismo que media los cambios en la actividad eléctrica de las células secretoras del sistema OX-GS del langostino de río.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos de NPY sobre la morfología del Potencial de acción de las células del OX del langostino de río.
- Analizar el efecto del NPY sobre la corriente de sodio dependiente de voltaje en células de OX en cultivo.
- Analizar el efecto del NPY sobre la corriente de calcio tipo N dependiente de voltaje en células de OX en cultivo.
- Estimar el efecto del NPY sobre la corriente tipo NSR en células de OX en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo de cada uno de los experimentos fueron utilizados langostinos de río adultos de la especie *Cherax quadricarinatus* que fueron proporcionados por el centro acuícola “El compartidor” de Jojutla Morelos y trasladados al laboratorio de neurobiología de la Escuela de Biología. Donde fueron colocados en contenedores de polietileno con un nivel de agua aproximadamente de 15 centímetros con burbujeo constante para su buena oxigenación. Los langostinos fueron adaptados por dos semanas a un ciclo de luz oscuridad 12:12 y comida *ad libitum*.

Disección del tallo ocular del acocil

En todos los experimentos se utilizó la misma técnica de disección que a continuación se describe. Después de la ablación de los pedúnculos oculares, éstos fueron colocados en solución salina para crustáceo (en mM: 205 NaCl, 5.4 KCl, 2.6MgCl₂, 13.5 CaCl₂, y 10 HEPES-Na ajustado a pH 7.4 con NaOH). El exoesqueleto, músculo y tejido conectivo que envuelven a las estructuras nerviosas, fueron removidos bajo observación microscópica para exponer a las neuronas del SOX-GS. La preparación fue fijada en la cámara de registro (de 250 µl) con alfileres entomológicos finos (No 0) y se perfundió durante una hora con solución salina para crustáceo a un flujo de 1 ml por minuto antes de iniciar los registros electrofisiológicos.

Cultivo celular de neuronas del OX

El procedimiento para obtener células en cultivo fue el siguiente: una vez disectados los tallos oculares, se aislaron de 2 a 4 OX y se incubaron durante una hora con agitación constante en 1 ml de medio de cultivo no condicionado Leibovitz L-15 adicionado con 2.5 mg ml⁻¹ de colagenasa-dispasa (Boehringer Mannheim). A continuación, los OX fueron lavados con medio de cultivo libre de enzimas y se incubaron durante 30 minutos con agitación suave. La dispersión de las células se hizo directamente con una pipeta de vidrio de punta roma de

aproximadamente 150 μm de diámetro interno. La ventaja de esta pipeta es que permite desprender por aspiración suave, célula por célula del acúmulo neuronal. Las cámaras de registro fueron previamente tratadas con Concanavalina A (Sigma) a una concentración de 2 mg por mililitro (diluída en agua desionizada estéril). Los cultivos celulares fueron mantenidos a temperatura ambiente (14 a 22 $^{\circ}\text{C}$) y en condiciones de baja iluminación durante 24 horas. Las cámaras de registro consistieron de una placa rectangular de lucita con fondo de vidrio (cubreobjetos) de 3 X 5 cm, que en la región central tenían un carril de 3.5 mm de ancho por 30 mm de largo y con un volumen aproximado de 200 μl .

El medio de cultivo se preparó disolviendo en un litro de agua desionizada un paquete de medio en polvo (Gibco BRL, Leibovitz L-15) y se le adicionaron sales, glucosa, glutamina y antibióticos, para que su composición final fuera (en mM): 205 NaCl, 5.4 KCl, 2.6 MgCl_2 , 13.5 CaCl_2 , 10 HEPES, 5.5 glucosa, 2 L-glutamina, más 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de gentamicina, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de estreptomicina y 5 U ml^{-1} de penicilina.

Registros electrofisiológicos

En la preparación de tallo ocular aislado se realizaron registros intracelulares de neuronas del OX con microelectrodos de borosilicato (WPI, 1.0 mm diámetro externo), construidos en un estirador vertical (David Kopf modelo 730). Los microelectrodos se llenaron con acetato de potasio 2.6 M y su resistencia fluctuó de 90-120 $\text{M}\Omega$. Para el registro intracelular de neuronas utilizamos un amplificador DC Axoclamp-2A (Axon) en el modo de fijación de corriente y mediante un convertidor analógico-digital (DMA TL-1, Axon) las señales se almacenaron en el disco duro de una computadora.

En las células en cultivo realizamos registros de fijación de voltaje en la modalidad estándar de célula completa con un amplificador Axopatch 200A (Axon) cuya salida analógica se conectó a un convertidor analógico-digital (Digidata 1200, Axon). Utilizamos pipetas de vidrio de borosilicato de pared gruesa (1.5 mm diámetro externo y 0.86 diámetro interno, Sutter) construidas en un estirador horizontal Sutter modelo P-87. Las pipetas para este tipo de registro fueron

llenadas con la siguiente solución (en mM): 207 KCH_3SO_4 , 12 KCl , 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 5 EGTA-K y 10 HEPES, ajustado a pH 7.4 con KOH , y su resistencia fluctuó entre 2 y 3 $\text{M}\Omega$. Para el procesamiento de los datos empleamos el software Axotape 2.0.2.

El NPY empleado fue aplicado con un sistema rápido de microperfusión conocido como “tubo en Y” (Akaike *et al.*, 1994), el cual permite modificar dinámicamente las soluciones extracelulares y la aplicación de diversas soluciones de prueba (Fig. 4).

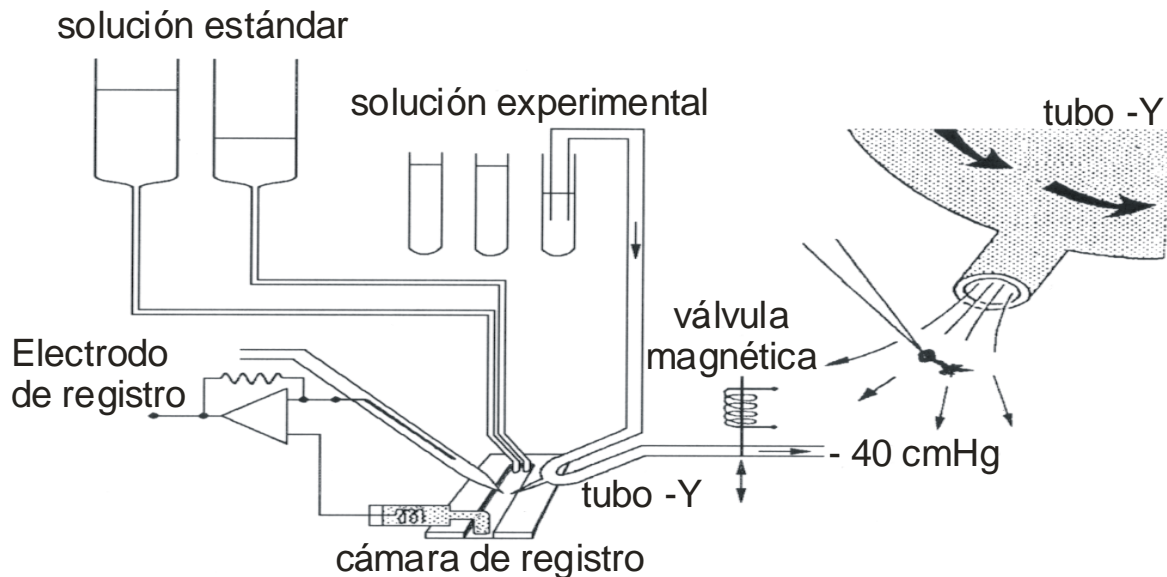


Figura 4. Dispositivo experimental del sistema de perfusión del tubo en Y. Donde se observan las células del OX directamente cultivada en la cámara de registro, en donde la salida del tubo en Y se colocó de 100 a 150 μm de la célula en registro. Nótese que las soluciones de prueba aplicadas con este sistema permiten mantener la perfusión en el baño de manera constante y de esta manera realizar cambios en tiempos cortos (μs).

RESULTADOS

En el presente trabajo analizamos el efecto del NPY sobre el potencial de membrana, la morfología del potencial de acción, así como de las corrientes de Na^+ , Ca^{2+} y tipo NSR de células del OX del crustáceo. Para ello se realizaron series experimentales que permitieran evaluar los cambios en la resistencia de entrada de la célula y de la morfología del potencial de acción.

Se realizaron experimentos de fijación de corriente en células aisladas del OX en 24 horas de cultivo para evaluar el efecto de NPY sobre la resistencia de entrada, mediante pulsos de corriente hiperpolarizante y despolarizante.

El efecto sobre el potencial de membrana se ve reflejado en la magnitud de la corriente necesaria para generar potenciales de acción. En la figura 5 se muestra uno de una serie de 20 experimentos ($n=20$) del efecto del NPY sobre el potencial de membrana, al perfundir 300nM de NPY mediante el sistema en U (figura 3) en la solución extracelular.

En la parte superior de la figura 5 se presenta el registro de cambios del voltaje con respecto al tiempo, donde se observan trazos de voltaje del RC de la membrana ante pulsos de corriente hiperpolarizantes y potenciales de acción ante pulsos de corriente despolarizante, en el centro de la figura se muestra el registro del potencial de membrana en presencia de 300 nM de NPY. Cabe señalar que se aplicaron los mismos pulsos de corriente y puede observarse que en presencia de NPY hay un incremento en la resistencia de entrada, así como una disminución en la excitabilidad de la célula.

Como se puede observar en la figura 5 se muestra un ejemplo en el que se observa la respuesta típica provocada por 300nM de NPY sobre la resistencia de entrada, el NPY es capaz de provocar una hiperpolarización del potencial de membrana de al menos 9 mV.

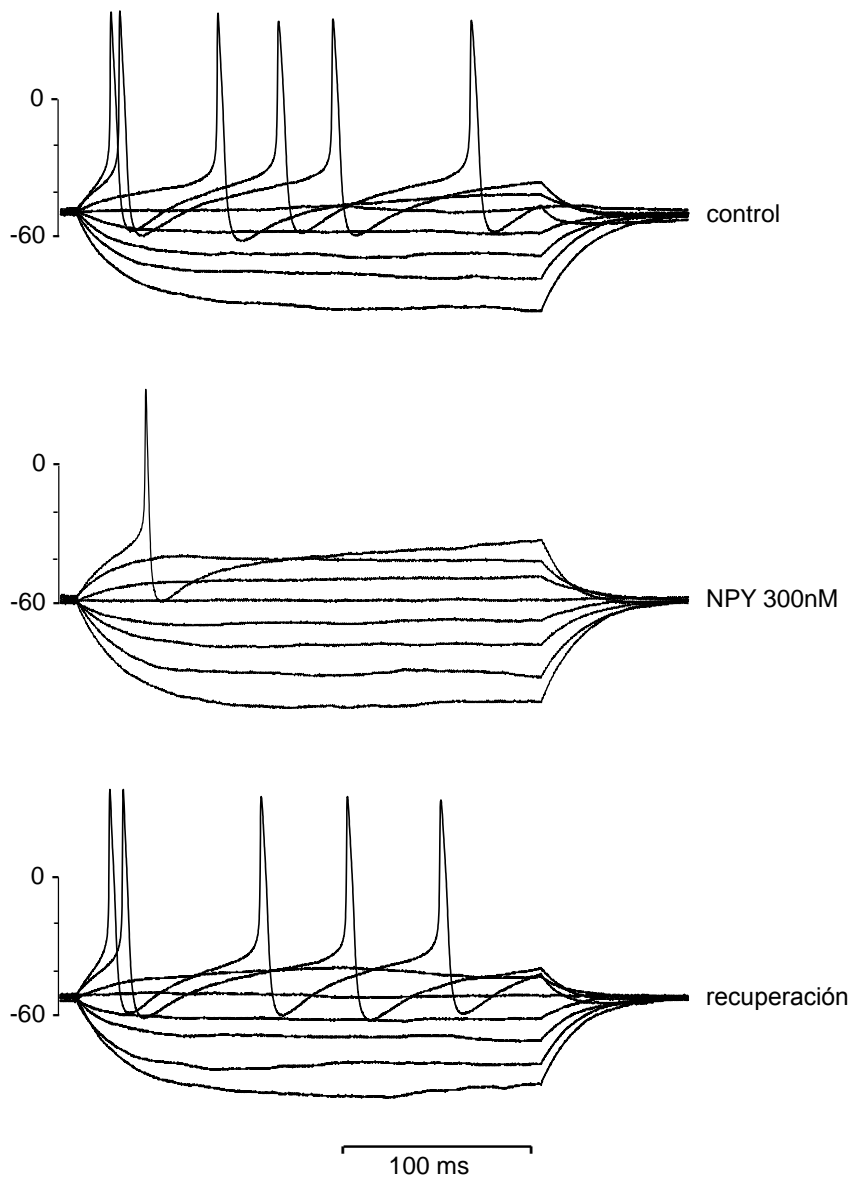


Figura 5. Incremento de la resistencia de entrada por NPY en neuronas del OX. Se muestra la respuesta a pulsos cuadrados de corriente variables en condiciones control (superior), durante la perfusión de 300nM de NPY (medio) y la recuperación al lavado (inferior). Este es un ejemplo de 20 experimentos realizados. Note que NPY incrementa la resistencia de entrada y disminuye la excitabilidad de la célula en los pulsos despolarizantes, que puede estar asociado a la hiperpolarización del potencial de membrana. Nota el protocolo de pulsos consiste en pulsos cuadrados de corriente que parten de -0.8 a +0.6 con pulsos variables de 0.2, con una duración de 150ms.

En la segunda serie experimental se estudiaron los cambios generados por NPY sobre el potencial de membrana y de acción en neuronas del OX empleando la técnica de fijación de corriente.

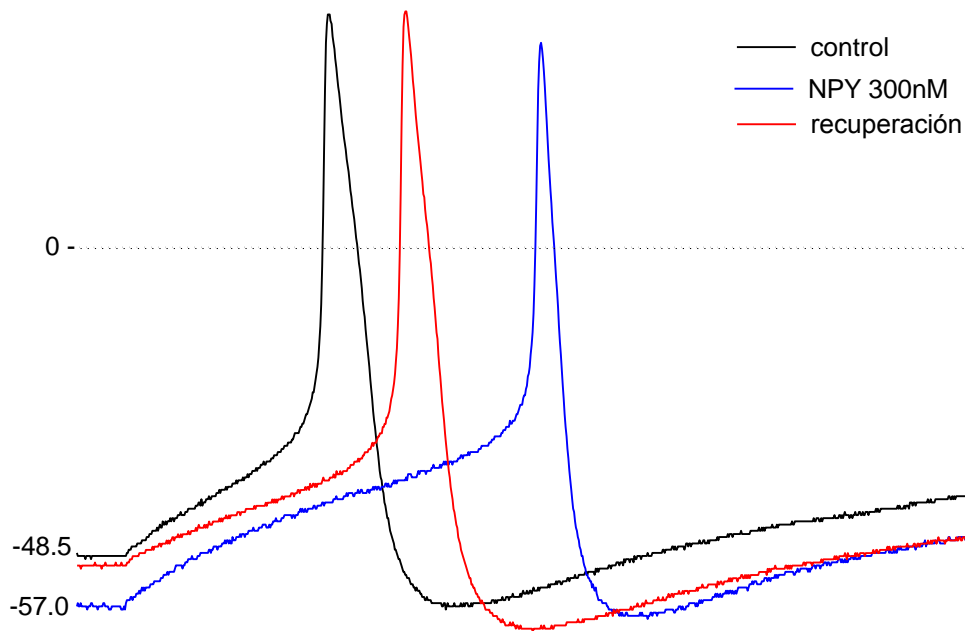


Figura 6. Efecto de NPY sobre el potencial de acción de las neuronas aisladas del OX en cultivo. En esta figura podemos observar la relación del voltaje respecto al tiempo, en donde cada trazo representa un potencial de acción en condiciones control y cuando se perfundió 300nM de NPY. Note que el NPY incrementa el potencial de membrana de -48.5 a -57mV, además de que la duración del potencial de acción disminuye al menos en un 50%, y que el efecto mostrado es reversible.

El NPY causó un cambio en la morfología del potencial de acción de las neuronas del OX. Como podemos observar en la figura 6, el potencial de acción disminuye su duración al menos un $50 \pm 7.8\%$ y la amplitud del potencial de acción, así como una hiperpolarización del potencial de membrana de las neuronas del OX.

Los resultados antes mencionados nos sugieren que podrían estar implicada la corriente entrante de Na^+ y/o de Ca^{2+} . En cambio las corrientes de potasio no, debido a que el incremento de la resistencia de entrada indica el cierre de conductancias de la célula, por lo que el cierre de los canales de potasio provocarían una despolarización de la membrana y es una respuesta contraria a la observada por NPY en las células del OX.

Para determinar la naturaleza iónica de la respuesta a NPY se llevaron a cabo registros de corrientes de Na^+ y de Ca^{2+} en células de OX durante la perfusión de NPY y en condiciones control.

En la figura 7 se muestra uno de una serie de ocho experimentos de registro de corriente de Na^+ en células aisladas del OX en 48 horas de cultivo. En la parte superior de la figura se observan dos trazos de corriente de Na^+ , generada por un pulso cuadrado que parte de un potencial de sostenimiento de -60mV a cambia a un valor de $+10\text{mV}$ con una duración de 30ms (ver figura 7). Los trazos de corriente fueron obtenidos en condiciones control y a la obtenida durante la perfusión de 300nM de NPY. Es importante señalar que no se ven afectados el pico de la corriente ni la inactivación por la perfusión del péptido. En la parte inferior de la figura 7 se muestra la gráfica que representa el curso temporal del efecto del péptido sobre el pico de la I_{Na} normalizada y la corriente al final del pulso, en condiciones control y durante la perfusión de 300nM de NPY. Donde podemos observar que el NPY no provocó cambios significativos en la corriente de Na^+ .

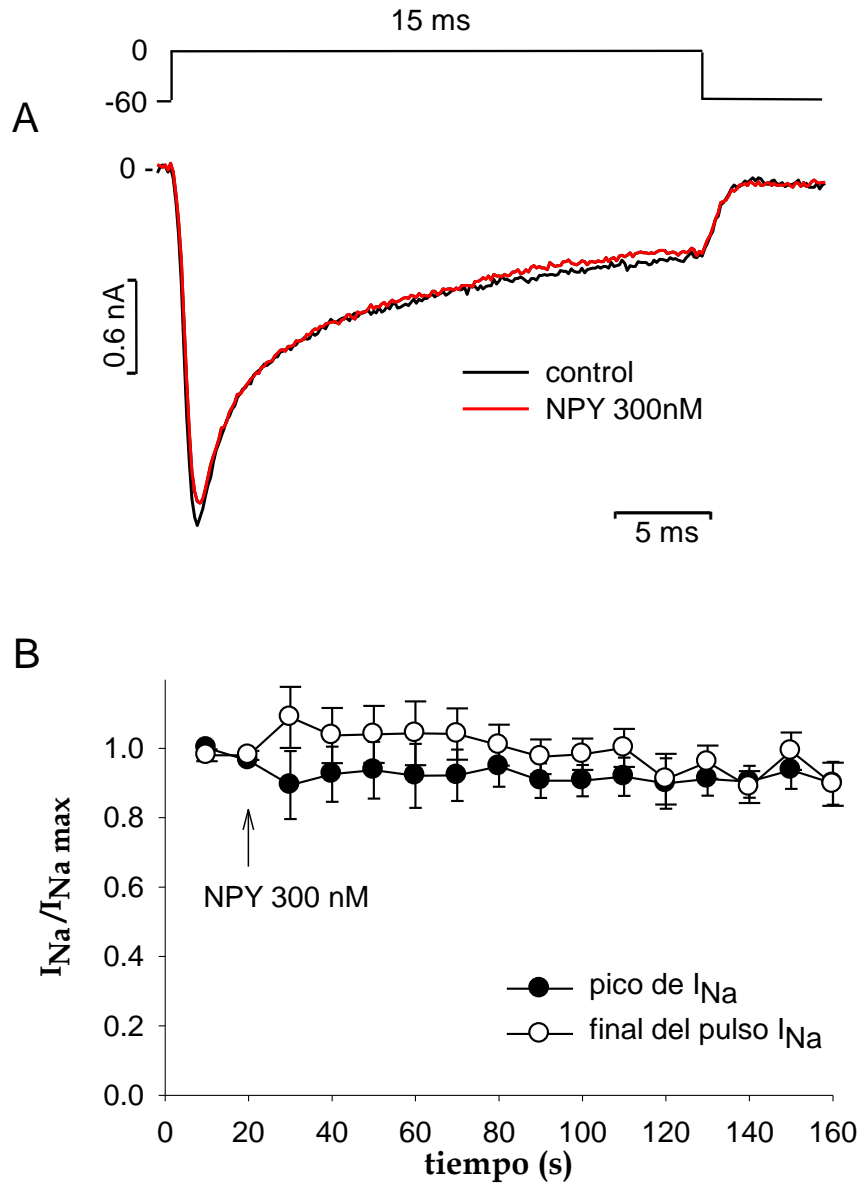


Figura 7. Corriente de Na^+ obtenida de neurona del OX aislada de 48hrs en cultivo. En **A** se muestran dos trazos de la I_{Na} obtenida con un potencial de sostenimiento de -60mV y un pulso cuadrado de +10mV y 30 ms de duración (parte superior de la figura), aplicados con intervalos de 10s en condiciones control y durante la perfusión de 300nM de NPY. En **B** se muestran la gráfica del valor normalizado \pm ESM del pico de la I_{Na} y del valor de la corriente al final del pulso, que muestra el curso temporal de la I_{Na} al aplicar 16 pulsos del estímulo antes mencionado en intervalos de 10ms en condiciones control (círculos vacíos) y durante la perfusión de NPY. Note que no hay cambios significativos en la amplitud e inactivación de la corriente por NPY. Este experimento es representativo de 8 más. La flecha indica el inicio de la aplicación del péptido.

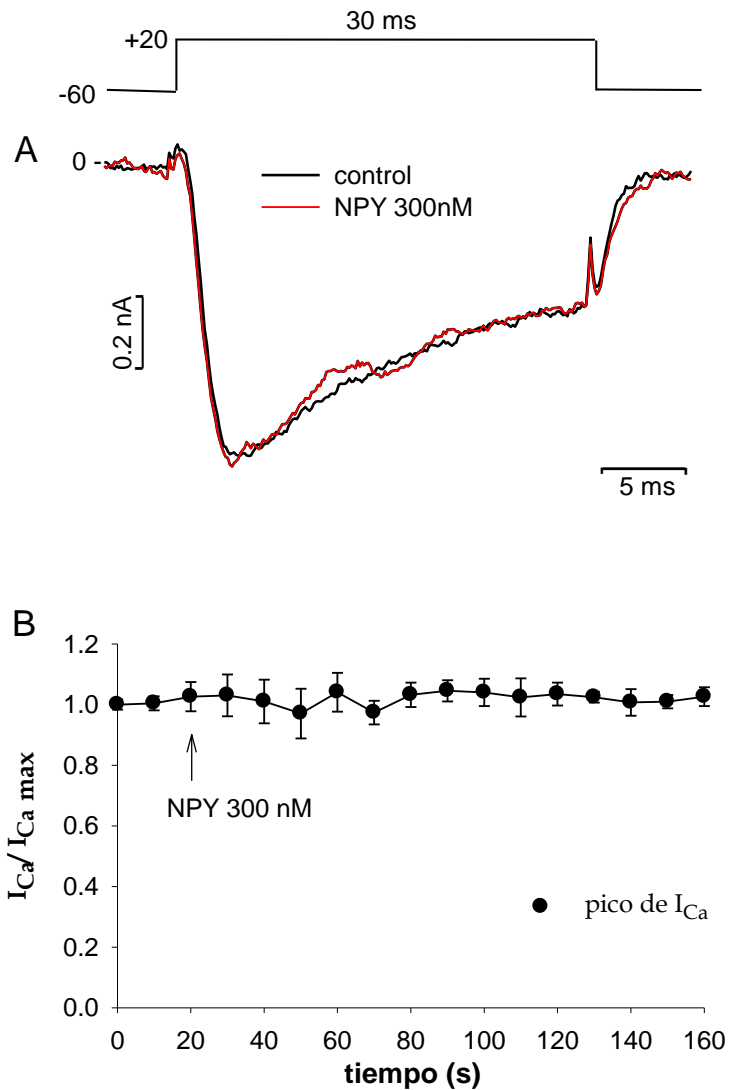


Figura 8. Corriente de Ca^{2+} obtenida de neurona del OX aislada de 48hrs en cultivo. En **A** se muestran dos trazos de $I_{Ca^{2+}}$ obtenida con un potencial de sostenimiento de -60mV y un pulso cuadrado de +20mV (ver protocolo en la parte superior de la figura) en condiciones control y durante la perfusión de 300nM de NPY. En **B** se muestran la gráfica de la corriente al pico normalizado de Ca^{2+} , con respecto al tiempo durante la perfusión de NPY. Note que no hay cambios significativos en la corriente por NPY. Este experimento es representativo de 10 más. La flecha indica el inicio de la aplicación del péptido.

Posteriormente realizamos una serie experimental para evaluar el posible efecto del NPY sobre la corriente de Ca^{2+} tipo N de las células del OX. En la parte superior de la figura 8 se muestran los trazos correspondientes a la corriente de Ca^{2+} durante la perfusión de 300nM de NPY y en condiciones control, obtenidas de una neurona del OX aislada de 48 horas en cultivo, y generada con un potencial de sostenimiento de -60 mV y un pulso cuadrado de +10mV de 30ms de duración. En la parte inferior de la figura 8 se muestra la gráfica del pico de la corriente de Ca^{2+} al pico normalizado con respecto al tiempo, durante la perfusión de 300nM de NPY. Se muestra uno de 10 experimentos realizados.

Realizamos una serie experimental para evaluar el efecto de la corriente NSR que se realizaron en neuronas del OX aisladas con 48 horas de cultivo, en condiciones control, durante la perfusión de 300nM de NPY y en recuperación al lavado. En la figura 9 se observan los trazos de corriente obtenidos de un pulso triangular cuyas características se indican en la parte superior de la figura, el trazo negro corresponde al obtenido en condiciones control y el rojo corresponde al aplicar 300nM de NPY. Como se puede apreciar los cambios en la corriente por NPY, es una clara disminución de la amplitud de la corriente.

Por último realizamos una serie experimental para evaluar el efecto de Cadmio (Cd^{2+}) sobre la corriente NSR en neuronas del OX aisladas con 48 horas de cultivo, en condiciones control, durante la perfusión de 1Nm y en recuperación al lavado. En la figura 10 se observan los trazos de corriente obtenidos de un pulso triangular cuyas características se indican en la parte superior de la figura. Como se puede apreciar los cambios en la corriente por Cd^{2+} , es un claro que el Cd^{2+} bloquea la I_{NSR} y que el efecto es reversible.

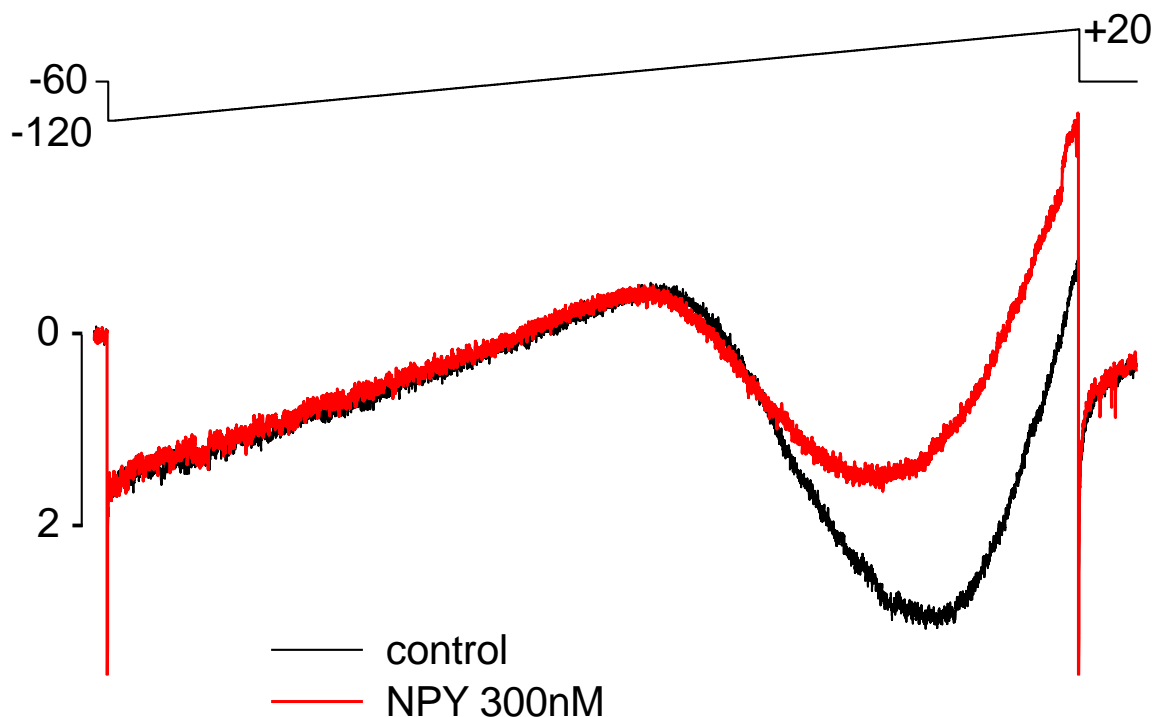


Figura 9. Cambios de la corriente NSR provocados por NPY. En esta figura observamos las corrientes iónicas obtenidas de una célula del OX aislada de 48 hrs de cultivo, provocadas por un pulso de rampa caracterizado en la parte superior de la figura. La corriente tipo NSR fué obtenida en condiciones control (trazo negro) y durante la perfusión del NPY 300nM (trazo rojo). Note que la corriente iónica obtenida posterior a la aplicación de NPY disminuye la corriente en la región de pendiente negativa exclusivamente. Cabe señalar que esta respuesta fue observada en 10 experimentos más.

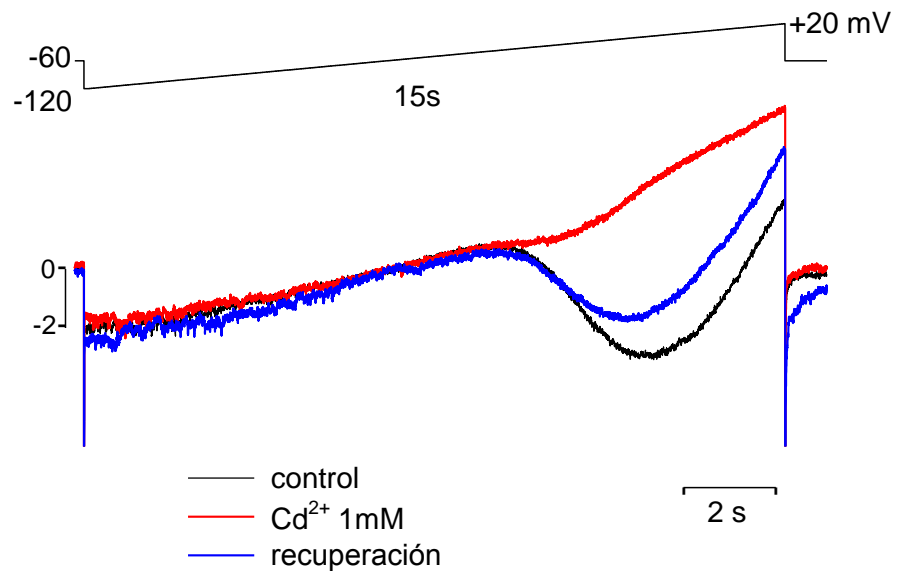


Figura 10. Cambios de la corriente NSR provocados por Cd²⁺. En esta figura observamos las corrientes iónicas obtenidas de una célula del OX aislada de 48 hrs de cultivo, provocadas por un pulso de rampa caracterizado en la parte superior de la figura. La corriente tipo NSR fué obtenida en condiciones control (trazo negro), durante la perfusión de Cd²⁺1mM (trazo rojo) y durante la recuperación (trazo azul).

DISCUSIÓN

En general se ha aceptado que las células neurosecretoras son neuronas, que en su diferenciación adquirieron características de células glandulares (Scharrer y Scharrer, 1945). Las características neuronales de células neurosecretoras han sido investigadas con especial atención en su excitabilidad eléctrica (Ishikawa *et al.*, 1966). Desde estos trabajos pioneros, ha quedado claro que las neuronas neurosecretoras pueden generar potenciales de acción de la misma manera en que lo hacen el resto de las neuronas. Además, se ha reportado que los potenciales de acción pueden estar asociados con el transporte y liberación de hormonas (Fridberg *et al.*, 1966).

Las características eléctricas de células de sistemas neurosecretores han sido ampliamente estudiadas en vertebrados, sin embargo, también existen trabajos en invertebrados como moluscos (*Aplysia*), insectos (*Drosophilla*) y crustáceos (*Cherax*), en donde han reportado que las células neuroendócrinas de estos sistemas tienen propiedades eléctricas de membrana similares a las de neuronas del sistema nervioso central (Frazier *et al.*, 1967 y Cooke, 1964).

En el trabajo que presentamos analizamos el efecto del NPY sobre la excitabilidad de las células del OX de 48 horas de cultivo, en donde se consideraron los cambios del potencial de membrana, el potencial de acción, las corrientes de sodio, calcio y NSR generados por el péptido.

Nuestros resultados indican que el NPY ejerce un efecto sobre las neuronas del OX del langostino azul (*Cherax quadricarinatus*), ya que la microperfusión de NPY sobre neuronas del OX produjo variaciones en el potencial de membrana, como se mostró en la figura 5, el NPY incrementa la resistencia de entrada de las células del OX, lo que sugiere una disminución en la conductancia de la membrana celular y por tal motivo el efecto provocado por NPY podría estar asociado al cierre de canales dependientes de voltaje, provocando así una hiperpolarización del potencial de membrana como se observa en la figura 6, por lo que dichos cambios pueden estar asociados a una disminución de la conductancia de membrana de las células del OX (Hille, 1992).

La función primaria de los canales dependientes de voltaje de Na^+ en la mayoría de las células es despolarizar la membrana y generar la carrera ascendente del potencial de acción en el nervio, células neurosecretoras, músculo esquelético y cardíaco (Catterall, 1992).

El canal de Na^+ es un canal activado de manera dependiente por cambios de voltaje y tiempo, generando así la corriente de Na^+ que es la principal responsable de la fase de despolarización del potencial de acción. Se han registrado dos corrientes de Na^+ funcionalmente distintas. Ambas corrientes son sensibles a TTX pero difieren en sus propiedades de inactivación. Estas corrientes son conocidas como $I_{\text{Na}f}$ (rápida) y $I_{\text{Na}s}$ (lenta). La primera corriente de Na^+ es esencialmente la corriente responsable de la generación de la fase despolarizante del potencial de acción. Dicha corriente de Na^+ está dada por la expresión:

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} m^3 h (V_m - V_{\text{Na}})$$

Cuando la membrana es despolarizada por un estímulo de tipo umbral (inicio del pulso), m se incrementa exponencialmente y h decrece también exponencialmente, pero con una constante de tiempo mayor. Si el pulso de voltaje se termina abruptamente (final del pulso) y se repolariza al potencial de membrana antes de que la inactivación de los canales de sodio haya reducido la corriente de Na^+ , puede observarse una corriente entrante que decrece rápidamente (corriente de cola). Esta corriente fue interpretada como una corriente de Na^+ que se presenta por el aumento del factor $V_m - V_{\text{Na}}$ y no cierra instantáneamente los canales al repolarizar. Esta corriente posteriormente decrece, porque el parámetro de activación m regresa a su condición de reposo (Latorre *et al.*, 1996).

Las neuronas del OX son capaces de disparar potenciales de acción complejos con un rápido potencial de despolarización dependiente de sodio inicial seguido por un potencial de despolarización lento dependiente de calcio. Los picos de sodio en el soma pueden actuar como un refuerzo potencial para activar la acción dependiente de calcio en el potencial del soma que conduce a un aumento

en Ca^{2+} interno con el fin de regular la secreción. En el soma de neuronas del OX de langostinos de río se han registrado potenciales de acción en medios libres de Na^+ y TTX en el cual la electrogénesis del pico de Na^+ puede ser abolido y modificado por la concentración de iones de Ca^{2+} en el medio, lo que indica el aumento de la permeabilidad de los iones de Ca^{2+} . Este sistema que es sensible a la concentración de iones de Ca^{2+} puede existir junto con el sistema de Na^+ en la misma célula; estos dos componentes del pico del potencial de acción no sólo han sido encontrados en vertebrados (Koketsu y Nishi, 1969) y se han caracterizado en invertebrados (Geduldig y Junge, 1968).

Se ha observado que en células neurosecretoras de anélidos, moluscos, anfibios y mamíferos, el potencial de acción es mediado principalmente por corrientes de Na^+ y Ca^{2+} . En trabajos previos de Iwasaki y Satow en 1971, se mostró que en células del OX de crustáceos, el potencial de acción en el soma y en el axón son dependientes Na^+ y Ca^{2+} , siendo el primero el principal mediador del potencial de acción. En experimentos realizados en diversas especies de cangrejos, se ha sugerido que los potenciales de acción en la glándula sinusal son potenciales de Ca^{2+} (Cook *et al.*, 1977) por lo que en el presente trabajo se analizó el papel de las corrientes entrantes de Na^+ y Ca^{2+} en la hiperpolarización del potencial de membrana obtenido durante la perfusión de NPY, debido a que al disminuirse estas pueden provocar un retardo en la generación del potencial de acción, su amplitud y duración (como se observa en la figura 6) por cambios en la inactivación de estos canales, sin embargo en nuestros resultados no se reporta algún cambio significativo en las I_{Na} y I_{Ca} comparado con el registro en condiciones control.

El NPY no cambia las amplitudes e inactivaciones de la corriente de Na^+ y Ca^{2+} , por lo que asumimos que el cambio en la amplitud así como la hiperpolarización del potencial de membrana se deben al decremento de la corriente tipo NSR. Onetti y cols. en 1990 mostraron que la corriente de tipo NSR participa en el establecimiento del potencial de membrana, por tal motivo

consideramos que el efecto hiperpolarizante observado durante la aplicación del NPY puede afectar la corriente tipo NSR por lo que decidimos explorar esta posibilidad.

En este trabajo cabe señalar que no fueron analizadas las corrientes de K^+ debido al interés que plasmamos con anterioridad y dejar para trabajos futuros establecer el vínculo de estas corrientes con el cambio en la duración del potencial de acción.

Una de las principales características de la membrana de una neurona es su curva voltaje-corriente (V-I), que usualmente tiene la forma de una función creciente monótona, sin embargo, en algunos casos esta se altera debido a la aparición de una región de pendiente negativa (NSR) en la curva (fig. 9). Las curvas no-monotónicas con NSR, pueden ser obtenidas en membranas que contienen canales dependientes de voltaje de Na^+ y K^+ , los cambios en los parámetros membranales como g_K , g_{Na} , E_K y E_{Na} , pueden determinar cambios en la curva corriente-voltaje. Se ha propuesto que la región NSR juega un papel esencial en el mantenimiento de las oscilaciones lentas de la membrana durante la explosión de actividad del potencial de acción (Wilson y Wachtel, 1978).

La I_{NSR} oscila en el orden de 1 a 3 nA en neuronas del OX, sin embargo, incrementa la resistencia de entrada por lo que es posible que la corriente pueda llevar al potencial de membrana al valor umbral. La naturaleza iónica de la I_{NSR} varía, por ejemplo en neuronas R15 de *Aplysia* han sido implicados para su generación tanto el Na^+ como el Ca^{2+} (Adams y Benson, 1985), mientras que en células tipo 11 de *Otala*, ha sido implicada como una corriente exclusivamente de Na^+ (Smith *et al.*, 1975).

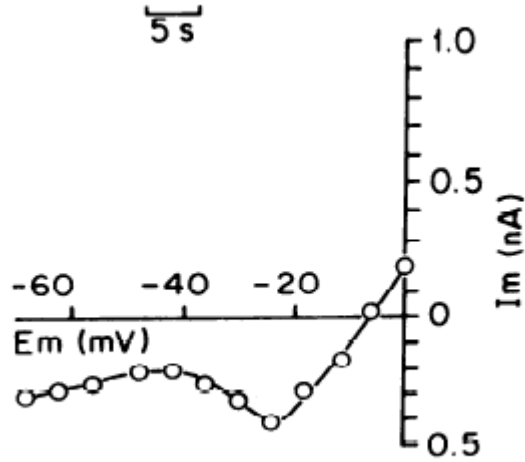


Figura 11. Curva (I-V) obtenida de neuronas del OX en una solución 1.7×10^{-6} M de Ca^{2+} (Onetti, *et al.*, 1990)

En neuronas de moluscos se ha observado que la I_{NSR} es activada después de la aplicación de pentilentetrazol, y de varios péptidos o neurotransmisores como oxitocina y vasopresina en *Lymnaea stagnalis*, FMRFamida y la hormona de la puesta de huevos (ELH) en *Aplysia* (Ichinose y Mc Adoo, 1988, Kirk y Scheller, 1986).

En neuronas de *Aplysia* se ha descrito una corriente lenta entrante inducida por el neuropéptido FMRFamida. Esta corriente, aumenta la curva I-V de la I_{NSR} de neuronas del ganglio abdominal R14, posiblemente con ello aumenta la excitabilidad de la neurona. Por lo que a pesar de que la corriente parece estar mediada por Na^+ , se ve afectada por las concentraciones de Ca^{2+} y Cl^- intracelulares (Ichinose y Mc Adoo, 1988).

Los cambios de la I_{NSR} provocados por el NPY muestran una clara disminución de la amplitud de corriente, como se puede ver en la fig. 8 la I_{NSR} oscila en el orden de 1 a 2 nA, lo que es consistente con las corrientes descritas por Onetti y cols. 1990.

En cuanto a la naturaleza iónica que genera la I_{NSR} , en células del OX se ha reportado que el aumento en la concentración de Ca^{2+} no provoca algún decremento en la I_{NSR} (Onetti *et al.*, 1990), lo que coincide con nuestros resultados ya que no encontramos ningún cambio significativo en la I_{Ca} durante la aplicación de NPY.

El Cd^{2+} y el Ca^{2+} tienen un radio iónico similar, por lo que el Cd^{2+} es capaz de bloquear la I_{Ca} , en la figura 10 se muestra el efecto del cadmio sobre la corriente I_{NSR} , se puede observar que hay un bloqueo de la corriente y que el efecto es reversible, lo que sugiere la participación de Ca^{2+} en dicha corriente en células del OX como lo ha reportado Onetti y colaboradores.

Tomando en cuenta que el estudio que presentamos es considerado como exploratorio y por este motivo mencionamos que es necesario realizar una mejor caracterización del posible mecanismo de acción del NPY sobre los canales que generan la corriente NSR. Para nosotros, ha llamado la atención el blanco del NPY ya que a la fecha en las células estudiadas no se han observado neuromoduladores o neurotransmisores que actúen sobre esta corriente en neuronas del órgano X del langostino de río. Además tomando en cuenta las referencias mencionadas anteriormente existe la posibilidad de que otros péptidos puedan tener como sitios de acción moduladora la I_{NSR} .

Un aspecto importante a resaltar es que nuestros resultados nos permiten sugerir que los cambios en el potencial de membrana y de acción de las neuronas del OX del langostino de río, están mediados por la I_{NSR} , generada por iones de Na^+ y Ca^{2+} . Por primera ocasión en esta preparación se sugiere la participación de NPY como neuromodulador de las neuronas secretoras del OX del langostino y que pueden derivarse trabajos posteriores en búsqueda de explicar los cambios de peso y talla en camarones cuando son sometido a una dieta rica en NPY o cuando este es administrado intramuscularmente, ya que se ha mostrado que al suministrar NPY provoca un incremento significativo en la ingesta de alimentos en *Marsupenaeus japonicus* y *Penaeus semisulcatus* (Kiris *et al.*, 2004). Cabe señalar

que en el sistema OX-GS participa en la regulación de la ingesta a través de las hormona que libera al torrente hemolinfático.

CONCLUSIONES

El NPY provoca:

Un incremento en la resistencia de entrada de las células del OX de 48 horas de cultivo.

Disminución de la duración del potencial de acción e hiperpolarización del potencial de membrana de las células del OX.

Disminuye la amplitud de la corriente de pendiente negativa (NSR), lo cual nos permite sugerir que este cambio en la corriente es la causa que provoca el cambio en el potencial de membrana y el potencial de acción observados. Sin afectar las corrientes dependientes de voltaje Na^+ o Ca^{2+} características de las neuronas del OX.

BIBLIOGRAFÍA

Allen JM (1990) Molecular structure of neuropeptide Y. *Ann New York Acad Sci* 611:86–98.

Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221, 877-879.

Akaike N y Harata N (1994) GABA_A receptor-chloride channel complex. *Method Neurosci.* 19:148-165.

Andrew RD, Orchard I, Saleudin ASM (1978) Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cells and Tissue Research.* 190:235-243.

Antoni FA (1986) Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion advances since the discovery of 41-residue corticotrophin releasing factor. *Endocrine Rev.* 7: 351-378.

Aréchiga U. Sáenz F, García U (1997) Modulation of electrical activity by 5-hydroxytryptamine in crayfish neurosecretory cells. *J Exp Biol. Dec;* 200 (Pt 23):3079-90.

Ashmarin IP y Stukalova (1996) *Neirokhimiya (Neurochemistry)*, P.B., Eds., Moscow.

Balasubramaniam A, Sheriff S, Johnson ME, Prabhakaran M, Huang Y, Fischer JE, Chance WT (1994) [D-TRP32]NPY: a competitive antagonist of NPY in rat hypothalamus. *J. Med. Chem.* 37: 811-815.

Balasubramaniam A (1997) Neuropeptide Y Family of Hormones: Receptor Subtypes and Antagonist, *Peptides*, vol. 18, pp. 445–457.

Bard JA, Walker MW, Branchek TA, Weinshank RL (1995) Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. *J Biol Chem* 270:26762–26765

Bean AJ, Zhang X, Hokfelt T (1984) Peptide secretion: What do we know? *FASEB Journal.* 8(9):367-373.

Beck-Sickinger A, Jung G (1995) Structure-activity relationships of neuropeptide Y analogues with respect to Y1 and Y2 receptores. *Biopolymers* 37: 123-142.

Bell D, Millar BC, Mc Dermott BJ (1997) Use of D-myo inositol 1,2,6 trisphosphate to inhibit contractile activity in rat ventricular cardiomyocytes induced by

neuropeptide Y and other cardioactive peptides through phospholipase C". Br. J. *Pharmacol* 122: 1655-1660.

Berglund MM, Lundell I, Eriksson H, Söll R, Beck-Sickinger AG, Larhammar D (2001) Studies of the human, rat, and guinea pig Y4 receptors using neuropeptide Y analogues and two distinct radioligands. *Peptides*. 22: 351-356.

Bernardis LL y Bellinger LL (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, Neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(2):141-193.

Bluet-Pajot M-T, Epelbaum J, Gourdji D, Hammond C, Kordon C (1998) Hypothalamic and Hypophyseal Regulation of Growth Hormone Secretion Cell. *Mol. Neurobiol.* 18: 101–123.

Bliss DE (1951) Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Anatomical Record*, 111:502.

Brown AM, Camerer H, Kunze DL, y Lux HD (1982) Similarity of unitary Ca²⁺ currents in three different species. *Nature*, 299:156-158.

Burkhoff A, Linemeyer DL, Salon JA (1998) Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and its absence in rat. *Brain Res Mol. Brain Res.* 53: 311-316.

Cabrele C, Langer M, Bader R, Wieland HA, Doods HN, Zerbe O, Beck-Sickinger AG (2000) The first selective agonist at the neuropeptide Y Y5 receptor increases food intake in rats. *J. Biol. Chem.* 275 (46): 36043-36048.

Cebada JA (2006) Regulación histaminérgica del sistema Órgano X-glándula sinusal del acócil a través de canales de cloro activados por ligando. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias CINVESTAV. 82 pp.

Chan YY, Steiner RA, Clifton DK (1996) Regulation of hypothalamic neuropeptide Y neurons by growth hormone in the rat. *Endocrinology*. 137: 1319-1325.

Charmantier G, Charmantier-Daures M, Herp FV (1997) Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In M. Fingerman, R.Nagabhushanam, and M.-F. Thompson, editors, *Recent Advances in Marine Biotechnology*. 109-161. Science Publishers Co., New Hampshire.

Cohen M, Reale V, Olofsson B, Knights A, Evans P, De Bono M (2009) Coordinated regulation of foraging and metabolism in *C. elegans* by RFamide neuropeptide signaling. *Cell Metabolism* 9(4):375–385.

Colmers WF, y Bleakman D (1994) Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons. *Trends Neurosci.* 17: 373-379.

Colmers WF y Wahlestedt C (1993) The biology of neuropeptide Y and related peptides. Humana Press, Totowa, p 564.

Cooke IM y Stuenkel E (1985) The Electrophysiology of the Secretory Cells. *Elsevier*, Amsterdam, first edition.

Coro F, (1996). Fisiología celular, un enfoque biofísico. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Ed. Ducere.

Daniels AJ, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Matthews JE (2001) Food intake inhibition and reduction in body weight gain in rats treated with GI264879A, a non-selective NPY1 receptor antagonist. *Peptides.* 22: 483-491.

Dawbarn D, Hunt SP, Emson P (1984) Neuropeptide Y: Regional distribution chromatographic characterization and immunohistochemical demonstration in post-mortem human brain. *Brian Res* 296: 168-173.

Delgado JM, Ferrús A, Mora F, Rubia FJ (1998) Manual de neurociencia. Ed. Síntesis.

Deklijn D, Coenen T, Laverdure A, Tensen CP, Herp FV (1992) Localization of messenger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus Americanus*. *Neuroscience*, 51:121-128.

Doods HN, Wieland HA, Engel W, Eberlein W, William KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K (1996) BIBP3226, the first selective neuropeptide Y1 receptor antagonist: a review of its pharmacological properties. *Regul. Pept.* 65: 71-77.

Doods HN, Gaida W, Wieland HA, Dollinger H, Schnorrenberg G, Esser F, Engel W, Eberlein W, Rudolf K (1999) BIIE0246: a selective and high affinity neuropeptide Y Y2 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 384: R3-R5.

Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Pheng, LH, Abounader R, Hamel E, Jacques D, Regoli D, Quirion R (2000) BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y2 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 129: 1075-1088.

Edvinsson L, Hakanson R, Wahlestedt C, Uddman R (1987) Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *TIPS.* 8: 231-235.

Fingerman M, Hanumante MM, Kulkarni GK, Ikeda R, Vacca LL (1985) Localization of substance P-like, leucine-enkephalin-like, methionine-enkephalin-

like, and FMRF-amidelike immunoreactivity in the eyestalk of the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Cell Tissue Res.* 241:473-477 .

Fingerman M, Nagabhushanam (1992) Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp Biochem Physiol.* 102C: 343-352.

García-Colunga J, Valdiosera R, García U (1999) P-type Ca²⁺ current in crayfish peptidergic neurons. *J Exp Biol.* 202: 429-440.

García U y Aréchiga H (1998) Regulation of crustacean neurosecretory cell activity. *Cell Mol Neurobiol.* 18: 81-99.

Gehlert DR (1994) Subtypes of receptors for neuropeptide Y: implications for the targeting of therapeutics. *Life Sci.*, 55,551–556.

Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL (1996) A receptor subtype involved in NPY-induced food intake. *Nature.* 382: 168-171.

Goldberg Y, Taimor G, Piper HM, Schlüter K-D (1998) Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y. *Am. J. Physiol.* 275 (*Cell Physiol.* 44): C1207-C1215.

Gray TS y Morley JE (1986) Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system. *Life Sci* 38:389–401.

Gregor P, Milham ML, Feng Y, Decarr LB, McCaleb ML, Cornfield LJ (1996) Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett.* 381: 58-62.

Grouzmann E, Buclin T, Martire M, Cannizzaro C, Dörner B, Razaname A, Mutter M (1997) Characterization of a selective antagonist of neuropeptide Y at the Y2 receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (12): 7699-7706.

Grunder L y Hakanson R (1994) Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 15: 153-159.

Guo H, Castro PA, Palmiter RD, Baraban SC (2002) Y5 receptors mediate neuropeptide Y actions at excitatory synapses in area CA3 of the mouse hippocampus. *J. Neurophysiol.* 87: 558-566.

Hänström B (1939) *Hormones in Invertebrates*. Oxford University Press, London.

Hanumante MM y Fingerman M (1982) Inhibitory effect of histamine on the release of melanin-dispersing hormone in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Biol Bull.* 162: 256-272.

Heiling M y Widerlov E (1990) Neuropeptide Y: an overview of central distribution, functional aspects and possible involvement in neuropsychiatric illness. *Acta Psychiatr Scand.* 82: 95-114.

Higuchi H, Yang H-YT, Sabol SL (1988) Rat neuropeptide Y precursor gene expression. *J. Biol. Chem.* 263: 6288-6295.

Hoek RM, Van Kesteren RE, Smit AB, de Jong-Brink M, Geraerts WPM (1997) Schistosome parasites directly induce changes in gene expression in the central nervous system of their molluscan host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14072–14076.

Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, Decarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velázquez N, McCaleb ML (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 26315-26319.

Huberman A, Aguilar MB, Brew K, Shabanowitz J, Hunt DF (1993) Primary structure of the major isomorph of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): Interspecies comparison. *Peptides*, 14:7-16.

Iwasaki S, Satow Y (1971) Sodium- and calcium- dependent spike potentials in the secretory neuron soma of the X-organ of the crayfish. *J Gen Physiol.* 57: 216-236.

Kaga T, Fujimiya M, Inui A (2001) Emerging functions of neuropeptide Y Y2 receptors in the brain. *Peptides.* 22: 501-506.

Kallen, JI, Abrahmse SL, Van Herp F (1990) Orcadian rhythmicity of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the hemolymph of the crayfish. *Biol. Bull.* 179:351-357.

Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, McNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M (2000) Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology.* 141: 1011- 1016.

Kanatani A, Ishihara A, Iwaasa H, Nakamura K, Okamoto O, Hidaka M, Ito J, Fukuroda T, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Ishii Yk, Okabe T, Fukami T, Ihara M (2000a) L-152,804: orally active and selective neuropeptide Y Y5 receptor antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (1): 169-173.

Keller, R (1992) Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48:439-448.

King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G (1999) Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem* 73: 641-646

Kiris IGA, Eroldogan OT, Kir M, Kumlu M (2004) Influence of neuropeptide Y (NPY) on food intake and growth of Penaeid shrimps *Marsupenaeus japonicus* and *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 139A, 239–244.

Lara J, Acevedo JJ, Onetti CG (1999) Large- conductance Ca^{2+} -activated potassium channels in secretory neurons. *J Neurophysiol.* 82: 1317-1325.

Larhammar D (1996a) Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 62:1–11.

Larhammar D (1996b) Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 65:165–174.

Larsen PJ, Sheikh SP, Jakobsen CR, Schwartz TW, Mikkelsen JD (1993) Regional distribution of putative NPY Y1 receptors and neurons expressing Y1 mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system. *Eur. Neurosci.* 5: 1622-1637.

Larsen PJ, Jukes KE, Chowdrey HS, Lightman SL, Jessop DS (1994) Neuropeptide Y potentiates the secretion of vasopressin from the neurointermediate lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology.* 134: 1635-1639.

Latorre R, López-Barneo J, Bezanila F, Llinás R (1996). *Biofísica y fisiología celular*. Sevilla: Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones.

Lundell I, Blomqvist AG, Berglund MM, Schober DA, Johnson D, Statnick MA, Gadski RA, Gehlert DR, Larhammar D (1995) Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem.* 270: 29123-29128.

Lundell I, Statnick MA, Johnson D, Schober DA, Starbäck P, Gehlert DR, Larhammar D (1996) The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous human receptor. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 93: 5111-5115.

Magni P, Barnea A (1993) An early and transient period of protein synthesis is required for induction of neuropeptide Y-mRNA by phorbol ester and forskolin in aggregate cultures of fetal brain cells. *Mol. Cell. Endo.* 94: 205-211.

Mancillas JR, McGinty JF, Selverston AL, Karten H, Bloom FE (1981) Immunocytochemical localization of enkephalin and substance P in the retina and eyestalk neurones of lobster. *Nature Land* 293:576-578.

Martin CE (1985) Endocrine-Physiology New York, Oxford University Press.

Martire M, Pistritto G, Mores N, Agnati LF, Fuxe K (1993) Region-specific inhibition of potassium-evoked [³H]noradrenaline release from rat brain synaptosomes by neuropeptide Y(13-36). Involvement of NPY receptors of the Y2 type. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 230: 231-234.

Matsumoto M, Nomura T, Momose K (1996) Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J Biol Chem* 271:27217–27220.

Meade M, Watts S (2001) Physiological compensation in unilateral eyestalk ablated crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of Experimental Zoology*, 289:184-189.

Michel MC (1991) Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers. *Trends. Pharmacol. Sci.* 12: 389-394.

Michel MC (2004) Neuropeptide Y and related peptides. In: Starke K, Br FI (eds) Handbook of experimental pharmacology. *Springer*, New York, p 555.

Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T (1998) International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* 50 (1): 143-150.

Michel MC, Rascher W (1995) Neuropeptide Y: a possible role in hypertension. *J. Hypertension.* 13: 385-395.

Mihara S-I, Shigeri Y, Fujimoto M (1989) Neuropeptide Y-induced intracellular Ca²⁺ increases in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters.* 259 (1): 79-82.

Mintz-Worby CA (1994) Transcriptional regulation of the human neuropeptide Y gene by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 269: 15460-15468.

Motulsky H, Michel MC (1988) Neuropeptide Y mobilizes Ca²⁺ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.* 255 (*Endocrinol. Metab.* 18): E880-E885.

Murbartián JA (2000) Participación de las corrientes de potasio activadas por calcio en la actividad eléctrica de las neuronas del órgano X del acocil. Tesis

Doctoral. Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias CINVESTAV. 131 pp.

Nagano M, Cooke IM (1987) Comparison of electrical responses of terminals, axons, and somata of a peptidergic neurosecretory system. *J Neurosci.* 7: 634-648

Nakamura M, Sakanaka C, Aoki Y, Ogasawara H, Tsuji T, Kodama H, Matsumoto T, Shimizu T, Noma M (1995) Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y1 receptor generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 270 (50): 30102-30110.

Nata K, Yonekura H, Yamamoto H, Okamoto H (1990) Identification of a novel 65-kDa cell surface receptor common to pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. *Biochem Biophys Res Comm* 171: 330-335.

Nozdrachev, AD (1996) Chemical Structure of Peripheral Autonomic (Visceral) Reflex, *Usp. Fiziol. Nauk*, , vol. 27, pp. 28–60.

Onetti CG, García U, Valdiosera RF, Aréchiga H (1990) Ionic currents in crustacean neurosecretory cells. *J Neurophysiol.* 64: 1514-1526.

Parker EM, Balasubramaniam A, Guzzi M, Mullins DE, Salisbury BG, Sheriff S, Witten MB, Hwa JJ (2000) [D-Trp34] neuropeptide Y is a potent and selective neuropeptide Y Y5 receptor agonist with dramatic effects on food intake. *Peptides.* 21: 393-399.

Parker RM, Herzog H (1999) Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci* 11:1431-1448.

Passano LM (1951) The X organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anatomical Records*, 111:502.

Pheng LH y Regoli D (2000) Receptors for NPY in peripheral tissues. *Bioassays Life Sci.* 67: 847-862.

Pierroz DD, Aebi AC, Huhtaniemi IT, Aurbert ML (1999) Many LH peaks are needed to physiologically stimulate testosterone secretion: modulation by fasting and NPY. *Am. J. Physiol.* 276: E603-610.

Playford RJ y Cox HM (1996) Peptide YY and neuropeptide Y: Two peptides intimately involved in electrolyte homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996; 17: 436-438.

Potter EK, Ulman LG (1994) Neuropeptides in sympathetic nerves affect vagal regulation of the heart. *News Physiol. Soc.* 9: 174-177.

Price DA, Greenberg MJ (1989) The hunting of the FaRP's: The distribution of FMRFamide-related peptides. *Biol. Bull.* 177:198-205.

Quackenbush LS (1986) Crustacean endocrinology, a review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43:2271-2282.

Quackenbush LS, Fingerman M (1984) Regulation of neurohormone release in the fiddler crab, *Uca pugilator*: effects of gamma-aminobutyric acid, octopamine, Met-enkephalin, and beta-endorphin. *Comp Biochem Physiol C.* 79: 77-84.

Rajpara SM, Garcia PD, Roberts R, Eliassen JC, Owens DF, Maltby D, Myers RM, Mayeri E (1992) Identification and molecular cloning of a neuropeptide Y homolog that produces prolonged inhibition in *Aplysia* neurons. *Neuron* 9:505–513.

Romero HM (2011) Identificación de estructuras del sistema nervioso del langostino de río que sintetizan ARNm que codifica para NPY y los receptores a NPY. Tesis Escuela de Biología BUAP 49 pp.

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, William KD, Entzeroth M, Wiene W, Beck-Sickinge AG, Doods HN (1994) The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y1 receptor antagonist: BIBP3226. *Eur. J. Pharmacol.* 271: R11-R13.

Sabol SL, Higuchi H (1990) Transcriptional regulation of the neuropeptide Y gene by nerve growth factor: antagonism by glucocorticoids and potentiation by adenosine 3',5'- monophosphate and phorbol ester. *Mol. Endocrinol.* 4: 384-392.

Sahu A, Phelps CP, White JD, Crowley WR, Kalra SP, Kalra PS (1992) Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression. *Endocrinology.*130: 3331-3336.

Sarkar DK (1983) Does LH-RH meet the criteria for a hypothalamic releasing factor? *Psychoneuroendocrinology.* 8: 259-275.

Schoofs L, Danger JM, Jegou S, Pelletier G, Huybrechts R, Vaudry H, De Loof A (1988) NPY-like peptides occur in the nervous system and midgut of the migratory locust, *Locusta migratoria* and in the brain of the grey fleshfly, *Sarcophaga bullata*. *Peptides* 9:1027–1036.

Settembrini BP, Nowicki S, Hokfelt T, Villar MJ (2003) Distribution of NPY and NPY-Y1 receptor-like immunoreactivities in the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta:Heteroptera). *J Comp Neurol*;460(2):141–54.

Sheikh SP (1991) Neuropeptide Y and peptide YY: Major modulators of gastrointestinal blood flow and function. *Am. J. Physiol.* 261: G701-G715.

Smith-White MA, Hardy TA, Brock JA, Potter EK (2001) Effects of a selective neuropeptide Y Y2 receptor antagonist, BIIE0246, on Y2 receptors at peripheral neuroeffector junctions. *Br. J. Pharmacol.* 134 (4): 861-868.

Sokolowski MB (2003) NPY and the regulation of behavioral development. *Neuron* 39(1):6–8.

Spittaels F, Verhaert P, Shaw C, Johnston RN, Devreese B, Van Beeumen J, De Loof A (1996) Insect Neuropeptide F (NPF)-related peptides: Isolation from colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) brain. *Insect Biochem Mol Biol* 26:575–582.

Statnick MA, Schober DA, Gackenhaimer S (1998) Characterization of the neuropeptide Y5 receptor in the human hypothalamus: a lack of correlation between Y5 mRNA levels and binding sites. *Brain Res* 810:16–26.

Swanson LW Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraóptico nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 260-324.

Tatemoto K (1982) Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 79: 5485-5489.

Thorsell A, Michalkiewicz M, Dumont Y, Quirion R, Caberlotto L, Rimondini R, Mathé AA, Heilig M (2000) Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. *PNAS.*; 97 (23): 12852-12857.

Velázquez CE (2011) Distribución del NPY y sus diferentes receptores en el tallo ocular del langostino de río *Cherax quadricarinatus* Tesis Escuela de Biología BUAP 40 pp.

Yannielli PC, Harrington ME (2001) Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. *Peptides.* 22: 547-556.

Waeber B (1990) Neuropeptide Y: a missing link? *Hospital Practice* 15: 101-120.

Wahlestedt C, Yanaihara N, Hakanson R (1986) Evidence for different pre- and postjunctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* 13: 307-318.

Wahlestedt C, Grundemar L, Hakanson R, Heilig M, Shen GH, Zukowska-Grojec Z, Reis DJ (1990) Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. *Ann N Y Acad Sci* 611: 7-26.

Wahlestedt C, Regunathan S, Reis DJ (1992) Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/ peptide YY. *Life Sci* 50: PL7-PL12.

Wahlestedt C, Reis DJ (1993) Neuropeptide Y-related peptides and their receptors-are the receptors potential therapeutic drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 309-352.

Wang J.Z, Lundeberg T, Yu L-C (2000) Antinociceptive effects induced by intraperiaqueductal grey administration of neuropeptide Y in rats. *Brain Res.* 859: 361- 363.

Wang ZL, Bennet WM, Wang RM, Ghatei MA, Bloom SR (1994) Evidence of a paracrine role of neuropeptide Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats. *Endocrinology.* 135: 200-206.

Wang J, Clofi P, Crowley WR (1996) Neuropeptide Y suppresses prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: evidence for interactions with dopamine through inhibitory coupling to calcium entry. *Endocrinology.* 137 (2): 587-594.

Weinberg DH, Sirinatsinghji DJS, Tan CP, Shiao L-L, Morin N, Rigby MR, Heavens RH, Rapoport DR, Bayne MI, Cascieri MA, Strader CD, Linemeyer DL, McNeil DJ (1996) Cloning and expression of a novel Neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* 271: 16485-16488.

Wettstein JG, Earley B, Junien JL (1995) Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* 65: 397-414.

Wharton J, Gordon L, Byrne J, Herzog H, Selbie LA, Moore K, Sullivan MHF, Elder MG, Moscoso G, Taylor KM, Shine J, Polak JM (1993) Expression of the human neuropeptide tyrosine Y1 receptor *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 687-691.

Wieland HA, William KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN (1995) Subtype selectivity and antagonistic profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 275 (1): 143-149.

Yan H, Yang J, Marasco J (1996) Cloning and functional expression of cDNAs encoding human and rat pancreatic polypeptide receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4661-4665.

Yokosuka M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (2001) The mPVN mediates blockade of NPY-induced feeding by a Y5 receptor antagonist: a c-FOS analysis. *Peptides.* 2001; 22: 507- 514.

Zaborszky L (1982) Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv. Anatomy Embriol. Cell Biol.* 62: 1-107.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Baroni M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372: 425-432.

Zhang X, Shi T, Holmberg K, Landry M, Huang W, Xiao H, Ju G, Hökfelt T (1997) Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 729-734.

Zigmond MJ, Boom FE, Landis SC, Roberts JL Squire LR (1999) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press UK.