



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

MODULACIÓN DE LA RESPIRACIÓN EN
ACHETA DOMESTICUS L. POR CAMBIOS EN EL PH DE LOS LÍQUIDOS ENDOLINFÁTICOS
(ORTHOPTERA: GRYLLIDAE).

Tesis para obtener el título de

LICENCIADO BIOLOGÍA

PRESENTA:

MOISES RZEPKA BRIONES

MATRÍCULA

201322108

DIRECTOR: SALVADOR GALICIA ISASMENDI



Puebla, 04 MARZO 2024

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre porque ha sabido formarme con buenos valores y hábitos, lo cual me ha ayudado a seguir adelante en los momentos más difíciles.

A mi padre que desde el cielo me ilumina para seguir adelante con mis proyectos.

Agradezco a mi director por el apoyo y paciencia, y a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron con la realización de este trabajo.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
1.RESUMEN	5
2.INTRODUCCIÓN.	6
2.1 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA	7
2.3 Aparato circulatorio	16
2.4 Innervación del Sistema nervioso	17
2.5 Sistemas de redes autónomas en mamíferos.	19
5.OBJETIVOS	27
<i>Objetivo general:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Objetivo Especifico:</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
6.-HIPÓTESIS	28
7.MATERIAL Y METODOS	29
8.RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.-Modelo de un espiráculo. (Nation <i>et al.</i> ,2008).	10
Fig.2- Modelo de la respiración traqueal. (Muñoz <i>et al.</i> , 2000).	11
Fig.3- Representación del sistema traqueal de los insectos, (Callier y Nijhout,2014)	12
Fig. 4.- Punto de contacto entre célula muscular y traqueola.	13
Fig. 5.-Sistema de espiráculos de una cucaracha	14
Fig. 6.- Representación esquemática del modo en que la hemolinfa ventila el sistema traqueal.	15
Fig. 7 Sistema circulatorio de los insectos.	17
Fig. 8. Esquema del sistema nervioso de los insectos y su conexión nerviosa.	18
Fig. 9 Ganglio subesofágico de <i>Acheta domesticus</i> .	19
Fig. 10.- Registro de la actividad eléctrica	20
Fig 11.- Registro del tallo cerebral del complejo preBötzinger.	22
Fig. 13.- Modelo experimental para el estudio de la frecuencia respiratoria en <i>Acheta domesticus</i> .	30
Figura 14. Registro típico de la actividad respiratoria del ganglio subesofágico de <i>Acheta domesticus</i>	32
Figura 15. Cambios en la frecuencia del ganglio subesofágico	33

1.RESUMEN

Los mecanismos de modulación en la respiración de invertebrados son poco estudiados, en comparación a los mecanismos de los vertebrados. Algunos trabajos previos en el laboratorio han identificado modificaciones en la frecuencia respiratoria a distintas concentraciones de CO₂. El propósito de este trabajo es estudiar la modulación respiratoria en ortópteros (*Acheta domesticus*) en respuesta a cambios en el pH de la endolinfa. Para ello se utilizó el registro de potencial de campo con un amplificador diferencial y electrodos de aguja adyacentes al ganglio subesofágico de organismos machos adultos, dicho ganglio es el responsable de la generación del ritmo respiratorio en invertebrados.

Mediante cánulas se sustituyeron 0.4 ml de endolinfa del insecto por endolinfa artificial la cual se presentó en dos condiciones experimentales que permitieron alterar el pH: solución oxigenada pH= 7.4±0.2 y sin oxigenar pH 6.9±0.1.

La frecuencia respiratoria típica, 0.40 ± 0.06 Hz, se incrementa hasta los 0.6 ± 0.17 Hz (p<0.05; ANOVA) tras la aplicación de la solución de pH 6.9, pero la inyección de una solución de pH 7.4 no produjo cambios significativos en la frecuencia respiratoria respecto de los registros control. Por lo que puede concluirse que al igual que en los vertebrados el pH, además del CO₂, puede modular la frecuencia respiratoria.

Entre las perspectivas del trabajo se encuentran saber cómo los cambios en el pH de otras regiones del organismo pueden alterar la frecuencia respiratoria; Podemos sugerir que las regiones torácica y cefálica, quienes poseen órganos importantes para la fisiología del organismo, puedan ejercer también un efecto importante sobre los núcleos generadores de patrones respiratorios.

Los experimentos realizados en este proyecto son por tanto el punto de partida para el estudio detallado de los mecanismos de detección y respuesta del sistema respiratorio de ortópteros, al contarse con una preparación asequible para el estudio de los cambios en la frecuencia respiratoria y que pueden extenderse a otros grupos de insectos.

2.INTRODUCCIÓN.

Los seres vivos emplean O_2 como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria expulsando como uno de los subproductos CO_2 . Según la teoría del acoplamiento quimiosmótico que aplica tanto para vertebrados como invertebrados, el proceso respiratorio produce un gradiente de protones en la llamada cadena respiratoria, que es empleada en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP (Rosado, *et al.*, 2011).

La fosforilación oxidativa se conforma de dos componentes estrechamente relacionados: la cadena de transporte de electrones y la quimiosmosis. En la cadena de transporte de electrones, los electrones se transportan de una molécula a otra, y la energía liberada cuando se transfieren los electrones se utiliza para formar un gradiente electroquímico. En la quimiosmosis, la energía almacenada en el gradiente se utiliza para sintetizar ATP (Wasserthal LT *et.*, al 2018).

En los ortópteros como en cualquier ser vivo el ATP es una molécula energética muy importante dada la alta energía libre almacenada en sus enlaces fosfato, que le permite funcionar como "moneda energética"; sin O_2 , en la fosforilación oxidativa, un animal no puede producir ATP dado que el O_2 es el último aceptor de electrones en la cadena de producción de ATP (Rosado, *et al.*, 2011).

El oxígeno se encuentra al final de la cadena de transporte de electrones, donde recibe electrones y recolecta protones para formar agua. Si el oxígeno no se encuentra ahí para recibir electrones la cadena de transporte de electrones se detendrá y la quimiosmosis no sintetizará más ATP. Sin el ATP suficiente, las células no podrán llevar a cabo las reacciones que necesitan para funcionar e incluso podrían morir después de un cierto periodo de tiempo (Rollag *et al.*, 2003).

En organismos pluricelulares, no obstante, el aporte de oxígeno hacia las células debe asegurarse mediante sistemas ventilatorios, que aseguren el mantenimiento de las funciones homeostáticas mediante patrones de activación regulados por el sistema nervioso central (Anderson, 2015).

Hace más de 70 años se observó que algunas funciones del SNC se mantienen tras la eliminación del cerebro por encima del tronco encefálico y que la respiración automática sólo cesa después de seccionar el tronco del encéfalo en la

unión del bulbo raquídeo con la médula espinal. Los llamados centros respiratorios, generadores del patrón central respiratorio, tienen una estructura laxa y se localizan precisamente en el bulbo raquídeo (Kandel *et al.*, 2011).

El generador central del ritmo o generador central del patrón respiratorio (CPG), está constituido por una serie de redes neuronales organizadas como un oscilador acoplado, capaces de elaborar un patrón de descargas que se mantiene espontáneamente activo durante toda la vida y que subyace al ciclo periódico de inspiración y espiración (Ganong, 2004).

El CPG presenta un alto grado de redundancia funcional; este hecho, junto con su distribución relativamente diseminada en el tronco del encéfalo, representa probablemente un mecanismo para asegurar su funcionamiento de forma continua y segura, la respiración es la única función que exige que los músculos esqueléticos se contraigan ininterrumpidamente desde el nacimiento hasta la muerte (Kandel *et al.*, 2011).

2.1 REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN RESPIRATORIA

El CPG tiene una función importante, la cual es mantener las presiones normales de O_2 y CO_2 junto con la concentración de H^+ . Esta función reguladora homeostática del sistema respiratorio se consigue cuando se ajusta la frecuencia y volumen de la ventilación pulmonar a las necesidades metabólicas de consumo de O_2 y producción de CO_2 del organismo. El CPG funciona automáticamente por una doble excitación: nerviosa y química; dependiente del pH de la sangre, cantidad de O_2 y CO_2 que recibe, además de la modulación de los centros superiores corticales (Semenza, 2010).

Los CPG tienen las siguientes funciones:

- Establecer el ritmo de la respiración y actuar como un generador central del patrón respiratorio.

- Transmitir el ritmo central a las motoneuronas que inervan los músculos respiratorios.
- Ajustar el ritmo y volumen respiratorio y de la respuesta motora a las necesidades metabólicas, así como a las funciones conductuales y voluntarias.

Los quimiorreceptores en los mamíferos son sensores, localizados en SNC, que responden a cambios en la composición química de la sangre o del medio que los rodea. Los mecanismos químicos reguladores operan para ajustar la ventilación de manera que la presión de O₂ alveolar se mantenga constante, que los efectos del exceso de H⁺ en la sangre sean contrarrestados y que la pO₂ se eleve cuando disminuya a un nivel potencialmente peligroso (Richerson, 2004).

Los iones H⁺ en el líquido extracelular rodean a los quimiorreceptores, de forma que los estimulan si su concentración aumenta, por el contrario cuando su concentración se reduce, la actividad basal respiratoria disminuye (Semenza, 2010). Los cambios en la actividad de los quimiorreceptores centrales se transmiten a los centros respiratorios, capaces de producir transformaciones compensatorias en la ventilación para modificar la pCO₂ y en consecuencia mitigar los cambios que ocurren en la concentración de H⁺ (Hilaire, 2003).

Los valores de referencia del pH de la sangre arterial cubren el intervalo 7.35 a 7.45, que en unidades de concentración de H⁺ corresponde a 35-45 nM. La concentración estable de H⁺ en líquidos corporales asegura el curso normal de los procesos enzimáticos, sobre todo los relacionados con la producción de compuestos de alta energía. El equilibrio acuoso en el organismo o isohidria, es mantenido en parte por los pulmones mediante la eliminación de CO₂ en forma de gas (Mendoza, 2007).

El equilibrio de los ácidos y las bases en los líquidos corporales de los organismos tienen una importancia vital. Un desequilibrio puede provocar acidosis (exceso de acidez) o alcalosis (exceso de basicidad), trastornos metabólicos, que

se caracterizan por unos síntomas que sin tratamiento pueden tener consecuencias graves. Las primeras definiciones contemporáneas de ácido y base pueden atribuirse a Arrhenius, quien en 1887 definió ácido como un donante de ion hidrógeno y base como un donante de ion hidroxilo. En 1948, Singer y Hastings (cfr. Muñoz et al., 2000) propusieron el concepto de base buffer (BB) de la sangre total como un índice cuantitativo de la cantidad en exceso de ácido o base fija en la sangre. En 1960, Astrup propuso el concepto de que el bicarbonato estándar o el exceso de bases deberían utilizarse como un índice del estado ácido-base no respiratorio de la sangre (cfr. Muñoz et al., 2000).

El descenso del pH estimula a los quimiorreceptores carotídeos y aórticos originando una hiperventilación aumentando la eliminación de CO_2 lo que provoca una disminución H_2CO_3 y el aumento del pH inhibiendo a los quimiorreceptores (Mendoza, 2007).

2.2. EL SISTEMA RESPIRATORIO DE LOS INSECTOS

Los invertebrados realizan el intercambio respiratorio mediante una red de tubos que se abren al exterior, en el interior del organismo estos se ramifican en espiráculos, tráqueas, traqueolas y sacos aéreos. Las tráqueas constituyen una red de conductos cuyo diámetro es 1 o 2 μm . Las traqueolas son las ramificaciones derivadas de las tráqueas y su diámetro es menor a 1 μm . Estos túbulos respiratorios son delgados y permeables, siendo por contacto con los tejidos que se hace el intercambio de gases que llega a todo el cuerpo del invertebrado (Rosado et al., 2011).

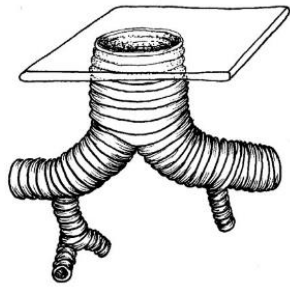


Fig. 1. Modelo de un espiráculo. Los invertebrados realizan el intercambio respiratorio mediante una red de tubos que se abren al exterior, en el interior del organismo estos se ramifican en espiráculos, tráqueas, traqueolas y sacos aéreos. Las tráqueas constituyen la red de conductos cuyo diámetro es 1 o 2 μm (Nation et al., 2008).

Los espiráculos son las aberturas del sistema traqueal presentes en la superficie corporal del insecto. Suelen situarse en las pleuras, es decir, en las placas laterales. Además, los espiráculos se dan en pares simétricos, por lo que de cada par, cada uno se localiza a un lado del cuerpo. Su número es variable; sin embargo, en la mayoría de los casos suele haber entre dos y tres pares de espiráculos en el tórax y entre 7 y 8 pares en el abdomen (Triplehorn *et al.*, 2005).

Aunque los espiráculos son necesarios para conectar el sistema traqueal con el medio y para poder respirar, también dan lugar a una serie de problemas, el principal problema tiene que ver con la pérdida de agua que puede producirse a través de ellos; finalmente no dejan de ser aberturas al interior del organismo.

Por ello la mayor parte de los insectos presentan mecanismos de cierre de espiráculos que minimizan esta potencial pérdida de agua. Existen un mecanismo de cierre consistente en una serie de pliegues en la superficie cuticular adyacente a los espiráculos, que al accionarse mediante su musculatura provoca el cierre de los mismos (Matthews, 2017).

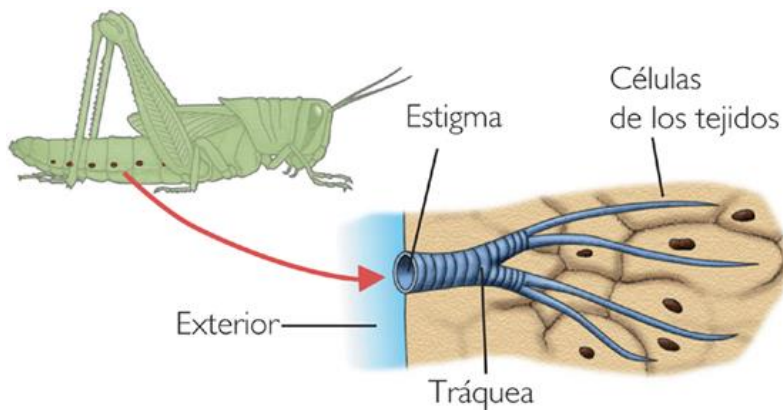


Fig.2- Modelo de la respiración traqueal (Muñoz et al., 2000).

La respiración traqueal de invertebrados consiste en un sistema de tubos llenos de aire que penetran desde la superficie corporal hasta las células.

Es importante recalcar que en los artrópodos el transporte de gases es generalmente independiente del aparato circulatorio. Muchos artrópodos son demasiado pequeños como para tener o necesitar órganos respiratorios. Los artrópodos acuáticos, suelen presentar branquias, apéndices internamente más vascularizados que los otros órganos. Las branquias se encuentran en los crustáceos, como especializaciones de la rama dorsal de los apéndices torácicos, al igual que en los xifosuros, los euriptéridos o en los primeros escorpiones fósiles. También se encuentran branquias secundarias (derivadas de las tráqueas) en las larvas acuáticas de algunos insectos, como las efímeras. Como es común en los

animales, los organismos de vida aérea respiran por órganos internalizados, que en los artrópodos pueden ser de dos tipos:

- **TRAQUEAS:** Presentes en los arácnidos, los miriápodos o las cochinillas de la humedad, que presentan una red de conductos (sistema traqueal) que comunican con el exterior por orificios llamados espiráculos, frecuentemente dotados de aberturas provistas de válvulas que regulan su diámetro (Dasen, 2018).
- **PULMONES EN LIBRO** que presentan una estructura interna muy plegada lo que multiplica la superficie por la que se realiza el intercambio de gases (Sena y Chandel, 2012).

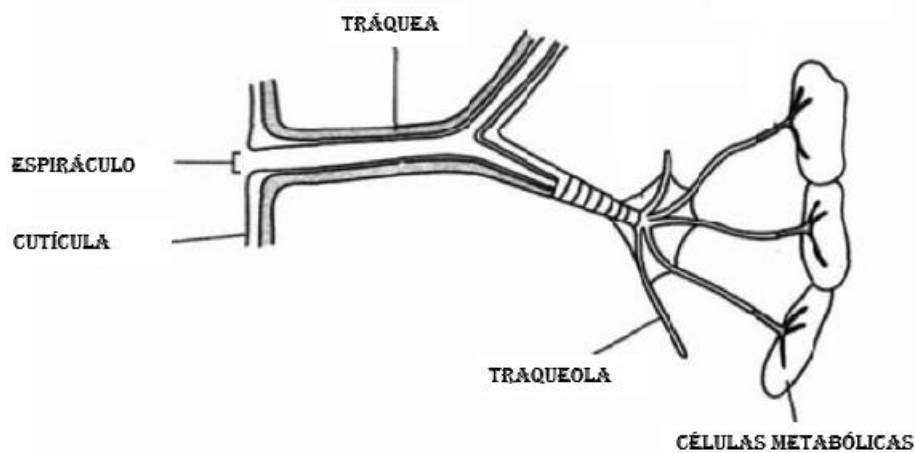


Fig.3- Representación del sistema traqueal de los insectos

El espiráculo en la superficie del cuerpo se conecta con la tráquea que se ramifica en un conjunto de traqueolas conectadas a células de distintos tejidos mediante las cuales se produce el intercambio de gases celular en los insectos permitiendo el metabolismo celular (Callier y Nijhout, 2014).

Existen otras estructuras llamadas sacos aéreos que se observan como dilataciones de las tráqueas, estando presentes en el abdomen de la mayoría de los insectos, pero destacan más en los voladores (Guyenet, 2015)

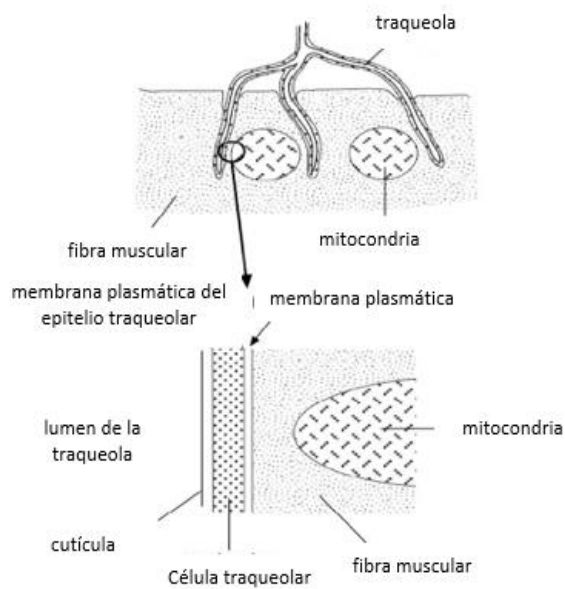


Fig. 4.- Punto de contacto entre célula muscular y traqueola.

Representación esquemática del punto de contacto entre una célula muscular y las traqueolas. Obsérvese cómo las traqueolas se hunden en la célula muscular, lo que permite que la distancia entre las mitocondrias y las traqueolas se disminuya significativamente. Este hecho facilita la difusión. Imagen modificada de (Chapman, 2013)

En la representación aumentada (figura 4), puede observarse el lumen de la cutícula, las células del epitelio traqueolar y una mitocondria de la célula muscular. También pueden apreciarse las membranas plasmáticas de la célula del epitelio traqueolar y de la célula muscular (Dubose, 2001).

La función de los sacos aéreos es múltiple además de facilitar el intercambio de gases ya que la contracción de los músculos provoca el bombeo del aire desde los sacos aéreos a los tejidos, (Zhang *et al.*, 2011) actuando por tanto como reservorios de O₂, los sacos aéreos permiten el vuelo en los insectos al reducir el peso del insecto (Engel, 2005), los sacos aéreos permiten también el cambio de volumen de los órganos internos durante el desarrollo sin que cambie la forma del insecto.

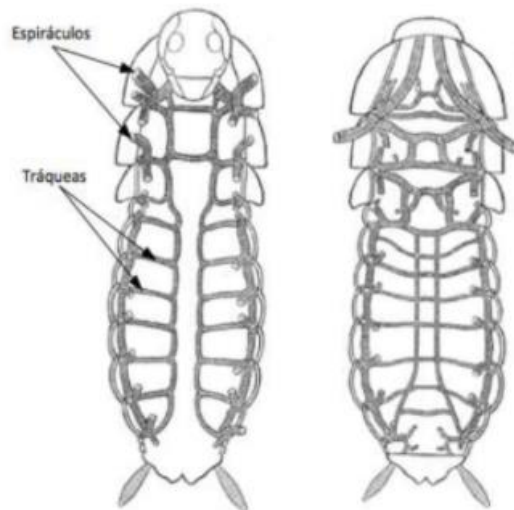


Fig. 5.-Sistema de espiráculos de una cucaracha

Representación esquemática del sistema de espiráculos de una cucaracha, vista desde la región ventral (izquierdo) y región dorsal (derecho). En ella se puede observar las ramificaciones de las tráqueas, que empieza desde la apertura de los espiráculos. (Engel, 2005).

En la Figura 5 se observa el sistema complejo de espiráculos de una cucaracha donde también puede notarse la interconexión de todo el complejo de tubos debido a su tamaño reducido.

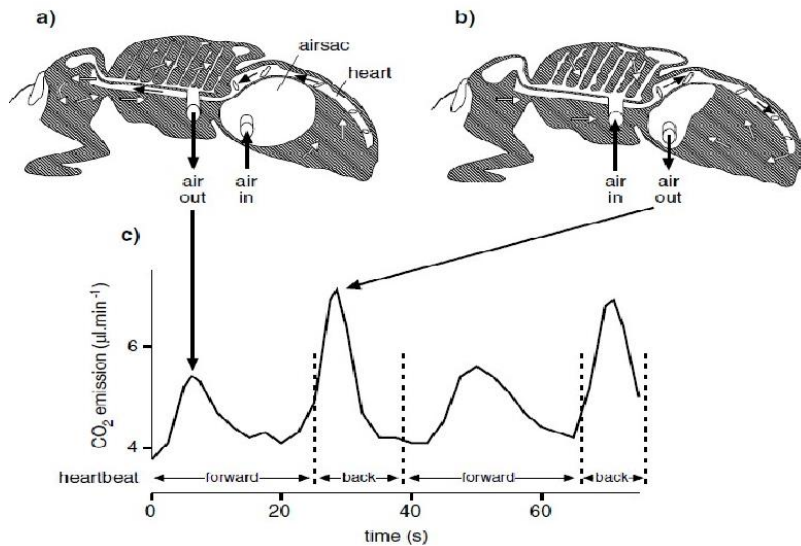


Fig. 6.- Representación esquemática del modo en que la hemolinfa ventila el sistema traqueal.

a) Flujo ordinario de hemolinfa, que va desde el corazón abdominal ("heart") hasta el tórax. Esto permite hinchar los sacos aéreos abdominales ("airsac") y vaciar el sistema traqueal torácico ("air out"). b) Ejemplifica el proceso contrario: el aire retorna desde el tórax al abdomen, llenando el sistema traqueal torácico de aire que entra por los espiráculos, y vaciando los sacos aéreos abdominales. En la gráfica c) puede observarse la liberación de dióxido de carbono en función del tiempo conforme van ocurriendo estos procesos (Hrycaj y Wellik, 2016).

El sistema espiracular hasta aquí descrito, es fundamental para la realización de la ventilación activa, el proceso por el cual un insecto es capaz de "bombear" el aire desde el exterior hacia el sistema traqueal y viceversa. La ventilación de los sacos aéreos mediante cambios en el sentido de circulación de la hemolinfa provoca que no solo capte O₂, sino también cumple con la función de liberación de CO₂.

En primer lugar (figura 6), podemos advertir que estos ocurren secuencialmente. Se observa también que cuando la hemolinfa se desplaza en sentido posterior- anterior, el CO₂ liberado es menor que el que se libera cuando esta se desplaza en sentido anterior posterior. Esto se debe a que, dado que los sacos aéreos abdominales son mayores que el sistema traqueal torácico, el volumen de aire que mueven los primeros es mayor y más veloz (Hrycaj y Wellik, 2016)

2.3 Aparato circulatorio

El aparato circulatorio de los artrópodos es abierto. Es decir, no existe un circuito cerrado de vasos por el que circule un líquido diferenciado, lo que propiamente se podría llamar sangre; lo que existe es un motor de bombeo que es un vaso especializado de posición dorsal que mueve la hemolinfa, esta se compone de casi un 90% de agua y todo el resto es una variedad de compuestos orgánicos, componentes inorgánicos y células, llamadas hemocitos (Anderson, 2015).

Para que se realice la circulación de la hemolinfa, el vaso dorsal permanece en gran actividad; de esa forma la hemolinfa penetra a las cámaras del corazón a través de unas aberturas llamadas ostias u ostiolos. La cámara cardiaca que se dilata se llena y posteriormente mediante un movimiento de contracción se queda vacía.

Estos movimientos alternos hacen que la hemolinfa llegue hasta la aorta de donde es vertida a la cavidad del cuerpo a la altura de la cabeza, para cumplir con las funciones necesarias para la circulación. El patrón de flujo de la hemolinfa es regular entre las extremidades y los órganos, asistido por contracciones musculares de algunas partes del cuerpo, especialmente las contracciones peristálticas del vaso longitudinal, el también llamado corazón como se muestra en la figura 7 (Hiriart, 2008).

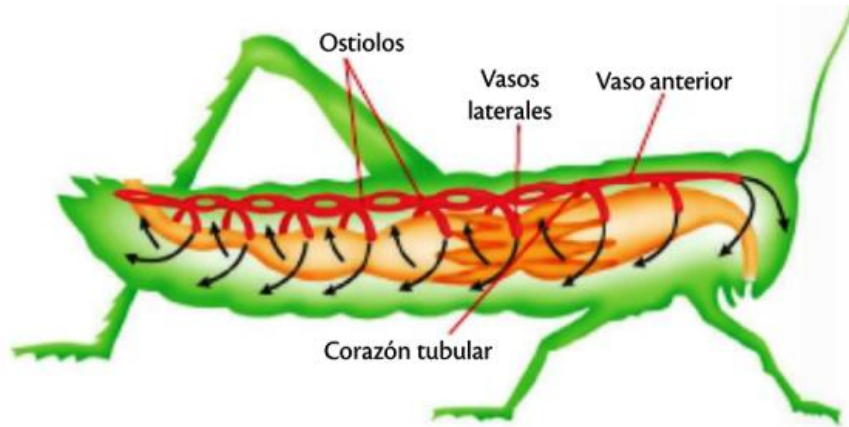


Fig. 7 Sistema circulatorio de los insectos.

La hemolinfa recorre el cuerpo del insecto gracias a los conductos del tubo dorsal. Ésta se desplaza hacia las alas y antenas con la ayuda de otros mecanismos y de pequeñas estructuras distribuidas a lo largo del tubo dorsal (Hiriart, 2008).

2.4 Innervación del sistema nervioso

El sistema nervioso central de un insecto (figura 8 y 9) consiste en un cerebro ubicado en la cabeza, arriba del esófago, un ganglio subesofágico conectado al cerebro y un cordón nervioso ventral que se extiende desde el ganglio subesofágico hasta la parte terminal del abdomen. El cerebro consiste en tres pares de lóbulos: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. El primero inerva los ojos compuestos y ocelos, el segundo las antenas y el último el labro y los intestinos. El cordón nervioso es doble y contiene un par de ganglios por segmento; ocasionalmente los ganglios se fusionan y pueden existir menos ganglios que segmentos (Medeiros, 2006).

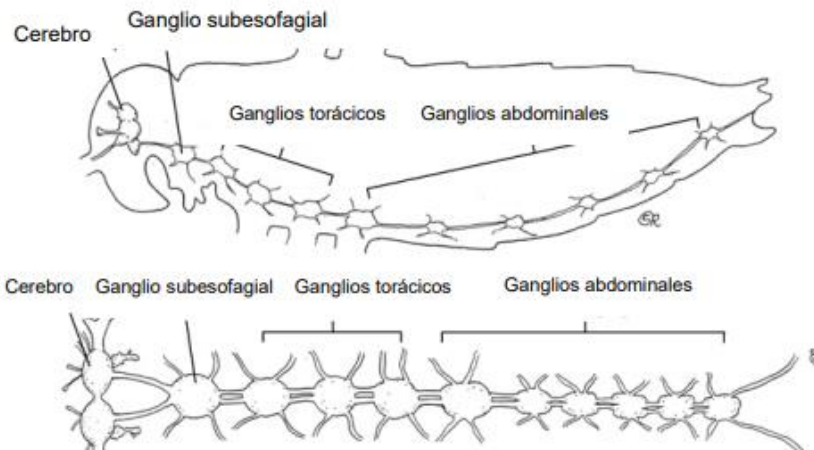


Fig. 8. Esquema del sistema nervioso de los insectos y su conexión nerviosa.

El sistema nervioso central de un insecto controla los procesos fisiológicos sensoriales y motores, así como el sistema endocrino. Consiste en un cerebro, una cadena ventral de nervios y un ganglio subesofágico. Éste está conectado al cerebro por dos nervios que se extienden alrededor del esófago (Muñoz et al., 2000).

Los músculos de cierre de los espiráculos están inervados por neuronas motoras del sistema nervioso central. Los somas de estas neuronas se agrupan en ganglios que suelen controlar espiráculos del mismo segmento adyacente (Dean, et al., 2002).

Las neuronas que se encuentran en el ganglio subesofágico permiten que los movimientos respiratorios rítmicos en *Acheta domesticus* generen un flujo de aire que facilita el intercambio gaseoso, estas neuronas poseen propiedades marcapaso que les permiten generar ráfagas de potenciales de acción que son conducidas hasta los músculos efectores encargados de producir los movimientos respiratorios (Hennig et al., 2018). Las neuronas marcapaso en los núcleos respiratorios de los vertebrados son sensibles a los cambios de CO₂ y de pH, no a los cambios directos en la concentración de O₂, pero se conoce menos de la regulación y fisiología de las neuronas marcapaso en el ganglio subesofágico de los insectos- (Guyenet, 2015).

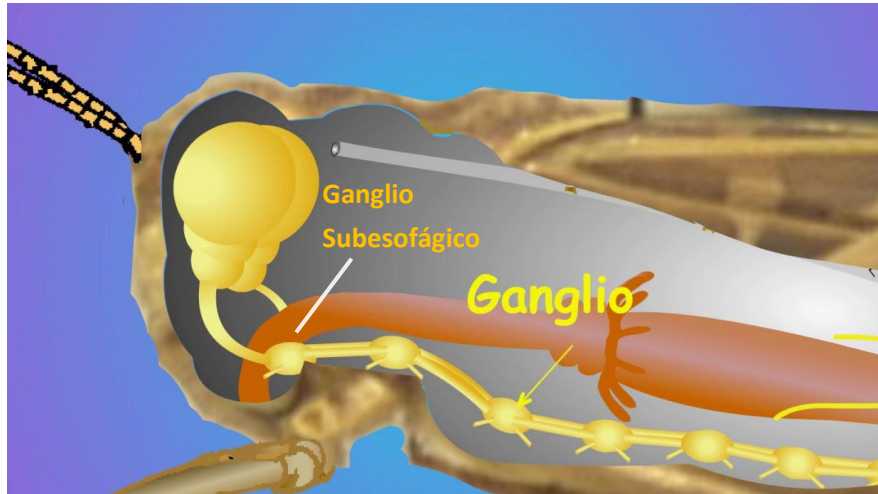


Fig. 9 Ganglio subesofágico de *Acheta domesticus*.

El cerebro se divide en tres pares de lóbulos: el protocerebro, el deutocerebro y el tritocerebro. El protocerebro inerva los ojos compuestos y los ocelos; el deutocerebro las antenas y el tritocerebro el labro y estomodeo. El tritocerebro se divide y rodea el esófago, conectando con el ganglio subesofágico. El ganglio subesofágico permite que los movimientos respiratorios rítmicos generen un flujo de aire que facilita el intercambio gaseoso. El ganglio subesofágico es el resultado de la fusión de tres pares de ganglios. (Guyenet, 2015).

2.5 Sistemas de redes autónomas en mamíferos.

Un buen referente para el funcionamiento de estos sistemas generadores de patrones centrales en los insectos puede ser el complejo pre-Bötzinger (preBötC) de los mamíferos, el sistema mejor estudiado, el cual es una red neuronal bilateral y simétrica localizada en el tallo cerebral, la cual es indispensable para la generación y modulación del ritmo respiratorio (Lavezzi, 2008).

La generación del ritmo respiratorio en mamíferos ha sido estudiada *in vivo* en distintos modelos animales como gato, cabra, rata y ratón. En la rata adulta, el preBötC se extiende 300-400 μm en el plano rostro-caudal bidireccionalmente con conexiones sinápticas que sincronizan la actividad de ambos lados (Krause KL, *et al.*, 2009).

Además de su papel en la generación del ritmo respiratorio, el preBötC es fundamental para la formación del patrón respiratorio (Farris, 2015).

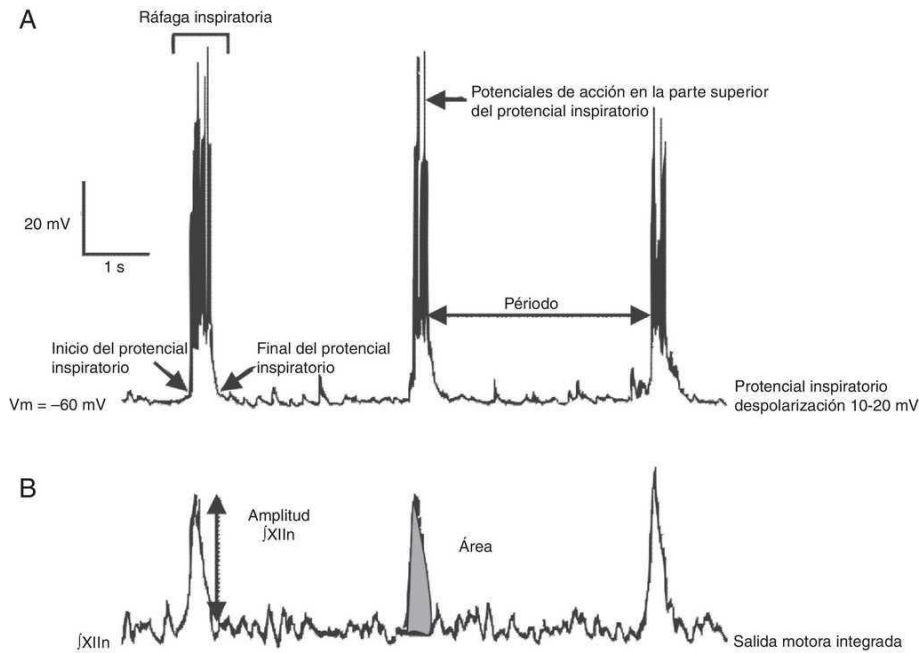


Fig. 10.- Registro de la actividad eléctrica

Parámetros de estudio en el registro de la actividad eléctrica individual de las neuronas del complejo pre-Bötzing (superior) y de la actividad poblacional de la raíz del nervio XII (inferior). La actividad de XIIIn se registra con un electrodo de succión y se integra (Devlin, 2002).

El preBötC es una red de interneuronas heterogénea. En las ratas, contiene una población aproximada de 1000 neuronas por lado, de las que aproximadamente 600 en total expresan el receptor neuroquinina-1 (rNK1), cuyo ligando es la sustancia P (SP). Algunas neuronas expresan somatostatina, un neuropéptido con acción moduladora en la respiración (Heinrich *et al.*, 2016).

La inmunorreactividad a rNK1 o a somatostatina es utilizada como marcador de neuronas del preBötC (Feldman, 2003). En estudios *post mortem* de cerebros de

humanos con atrofia multisistémica, demencia con cuerpos de Lewy o síndrome de Perry, se ha observado una disminución significativa de neuronas inmunorreactivas a rNK1 en la región correspondiente al preBötC, con respecto al número de células inmunorreactivas encontradas en la misma área en cerebros de humanos fallecidos por otras causas. Estos hallazgos indican que los trastornos respiratorios asociados a estas enfermedades probablemente se deban a la pérdida de neuronas que regulan la generación del ritmo respiratorio.

El objetivo último de los investigadores que estudiaron el preBötC fue explicar la generación del ritmo respiratorio en mamíferos completos en condiciones normales y patológicas. Varios grupos de investigación han estudiado el núcleo del preBötC bajo condiciones no fisiológicas, desarrollando modelos de estudio *in vitro* de la apnea, hipotermia, hipercapnia, entre otros. Estos estudios tienen un doble propósito:

- Entender la génesis de las patologías respiratorias.
- Comprender la estructura y función del preBötC que permitan entender las propiedades celulares, modulación, y conectividad en un estado fisiológico normal.

Se sabe que el preBötC contiene neuronas marcapaso con propiedades dependientes de voltaje (figura 11; Hunt, 2008), dicha actividad depende de la corriente persistente de sodio (INaP). Mientras que las neuronas marcapasos no dependientes de voltaje dependen de una corriente catiónica inespecífica activada por Ca^{2+} (ICAN; Gómez *et al.*, 2015) Estas dos corrientes parecen jugar un papel importante en la generación de ritmos en otros sistemas neuronales. Sin embargo, un estudio la aplicación de los bloqueadores de las corrientes de la INaP e ICAN (riluzole y ácido flufenámico, respectivamente), en rebanas de tallo cerebral conteniendo el preBötC, provocan la desaparición del ritmo respiratorio.

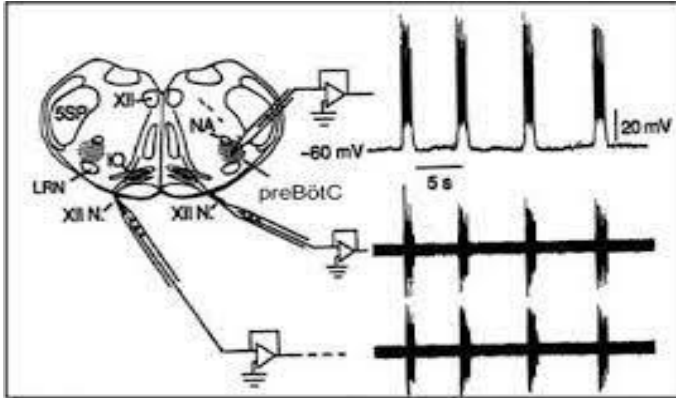


Fig 11.- Registro del tallo cerebral del complejo preBötzingher.

Modelo para el estudio in vitro de la ritmogénesis respiratoria: rebanada transversal de tallo cerebral. Esta preparación contiene el núcleo generador del ritmo: el complejo preBötzingher (preBötC) y una salida motora en fase (nervio XII). Se pueden registrar neuronas inspiratorias en fijación de corriente o fijación de voltaje y la salida motora (Hunt,2008).

Los seres vivos presentan una clara organización temporal en su conducta y los procesos fisiológicos bioquímicos y morfológicos subyacentes, que se manifiesta en los ritmos biológicos. Los ritmos circadianos son endógenos, es decir se generan por el organismo y no dependen del ambiente que lo rodea. La investigación de la generación y modulación del ritmo respiratorio en invertebrados es importante dado que su estudio puede aportar información relevante sobre el funcionamiento comparado de redes neuronales que generan una actividad marcapaso (Randall y Burggren, 2004)

ANTECEDENTES

En los insectos, a diferencia de los mamíferos, se reconocen tradicionalmente 3 ritmos respiratorios distintos, el primero llamado ritmo discontinuo consistente en la apertura cíclica de los espiráculos seguida de una fase prolongada de cierre. El segundo ritmo consiste solamente de una fase: la apertura cíclica de los espiráculos; en el tercer ritmo respiratorio los espiráculos se mantienen abiertos de manera constante (Medeiros *et al.*, 2006)

han demostrado que dichos ritmos respiratorios son en realidad uno solo dentro de un continuo que es función de las demandas metabólicas, la temperatura y un balance entre los tiempos de apertura de los espiráculos para evitar la pérdida de agua (Bradley, 2005).

Por ejemplo, Staples y Mikel-Stites (2021) examinaron los patrones respiratorios de *Rhodnius prolixus* y *Gromphadorhina portentosa* en función de la temperatura, observando la transición del ritmo discontinuo al ritmo cíclico y de allí al continuo. A temperaturas bajas ambas especies muestran periodos extendidos de oclusión espiracular correspondientes al ritmo discontinuo. Conforme la temperatura y la tasa metabólica aumentan los periodos de oclusión espiracular decrecen mostrándose el ritmo respiratorio cíclico; a temperaturas mayores y con ello una mayor demanda metabólica, los espiráculos tienden a permanecer abiertos de manera constante en ambas especies. (Klandorf y Yancey, 2005)

El flujo de gases en los insectos es mantenido por contracciones abdominales que coinciden con la apertura de los espiráculos, posteriormente los espiráculos abdominales se cierran mientras el abdomen se relaja y llena con aire proveniente del tórax. Es decir, el sistema respiratorio de insectos como *Gromphadorhina portentosa* y una amplia diversidad de ellos, sobre todo los de gran tamaño, funciona de manera unidireccional llevando aire en una dirección torácica a abdominal, mediante la acción concertada de la musculatura abdominal y los espiráculos tanto torácicos como abdominales (Hrycaj y Wellik 2016).

La actividad respiratoria mantenida mediante las contracciones abdominales se sincroniza y cambia de frecuencia dependiendo de otras actividades como locomoción terrestre, vuelo o estridulación, ya que en la determinación del volumen respiratorio participan los sacos aéreos (en el caso de insectos voladores) y la compresión transmitida al sistema traqueal dados los movimientos de la pared del cuerpo y la presión desde la endolinfa (Hustert y *Mashaly*, 2013).

La apertura de los espiráculos, además de evitar la desecación, mantiene los niveles de O₂ dentro de límites permisibles, es decir, la respiración discontinua de los insectos habría surgido de la presión de selección para mantener una baja concentración de O₂ en el cuerpo dado el estrés oxidativo. El estrés oxidativo, es definido como un desajuste en el balance entre la producción de especies reactivas derivadas del O₂ (radicales libres) y los sistemas antioxidantes que eliminan dichos radicales. En los insectos la concentración de O₂ es de aproximadamente el 5%, mientras que en la atmósfera es del 21% (Bradley, 2005).

A baja concentración, los radicales libres participan en la regulación de distintos procesos fisiológicos y si bien se consideran tradicionalmente como dañinos, la visión sobre su participación en la regulación y señalización de distintos procesos se ha fortalecido; entre dichos procesos podemos contar la detección de los niveles de oxígeno, la mediación de reacciones del sistema inmune y la regulación de la expresión genética que permite la respuesta ante estímulos estresantes. Las concentraciones normales de radicales libres son particularmente importantes en los insectos, mediando la supervivencia, el inicio de las funciones reproductivas y el envejecimiento (Rosado *et al.*, 2011).

Se sabe poco sobre la respiración en invertebrados y las bases neuronales del control respiratorio en insectos. En estudios previos en el laboratorio con el objetivo de buscar un modelo de estudio asequible y de fácil montaje en invertebrados. Se estudió la actividad respiratoria del núcleo subesofágico en *Acheta domesticus* L. y su modulación por O₂ (González DM, *et al.* 2016); En este estudio se describió como era de esperarse, que la concentración baja de O₂ (N₂: 100%) genera un

incremento de la frecuencia respiratoria, por el contrario el incremento en la concentración de O₂ (95%) inhibió la generación del ritmo respiratorio; La interpretación de los resultados sería que un medio con alta concentración de O₂ desplazaría casi de manera completa al CO₂ en los tejidos del organismo, eliminando a la molécula, que estimula a las neuronas marcapasos. Lo que establece cierta similitud entre los mecanismos de modulación de los vertebrados e invertebrados (Farris, 2015).

En los vertebrados al igual que en los insectos, otra de las variables que alteran la frecuencia respiratoria además del CO₂ es el pH, los insectos terrestres establecen su balance ácido-base mediante cambios en la frecuencia respiratoria, también emplean el bicarbonato para responder a la acidificación de la endolinfa o bien la excreción vía intestinal asociada a las funciones de los túbulos de Malpighi. (Niven *et al.*, 2008)

La regulación ácido base en los insectos ocurre en dos compartimentos principales, el lumen intestinal y en el homocel, dado que estos constituyen las mayores reservas de agua. Después del lumen intestinal, la hemolinfa representa el segundo compartimiento con mayor cantidad de agua del cuerpo de un insecto, ya que representa entre un 17 % y un 21 % del total del agua corporal, pero tiende a ser mayor en los estados larvales (Hillyer, 2020).

El transporte de equivalentes ácido base entre los compartimentos del cuerpo o hacia el exterior es una solución a largo plazo para la regulación del pH, mientras que los procesos de amortiguamiento mediante el balance de CO₂, carbonato y ácido carbónico puede regular los cambios en el pH de manera más eficiente en una escala temporal pequeña, la siguiente reacción muestra el proceso mencionado:



Un incremento en la H⁺ cambia la dirección de la reacción desde bicarbonato hacia la producción de CO₂. El volátil CO₂ puede ser removido entonces de los líquidos

corporales mediante la ventilación, la concentración de HCO_3^- está influida por la PCO_2 . (Forster, 2003).

Dada la importancia del hemocele como compartimiento acuoso, es de esperar que en él existan detectores del nivel del pH que induzcan cambios en la frecuencia respiratoria, en análogo al papel que los cuerpos carotideos desempeñan en los vertebrados, un primer paso en el estudio de estos posibles análogos es contar con un modelo que permita registrar cambios en la frecuencia respiratoria en respuesta a alteraciones del pH en el hemocele (Guyton, 2000).

5.OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar si la frecuencia respiratoria en *Acheta domesticus* es modulable por cambios en el pH de los líquidos endolinfáticos del hemocele.

Objetivos específicos:

- Obtener y analizar los registros electrofisiológicos de la actividad basal del ganglio subesofágico de *Acheta domesticus*
- Describir el efecto sobre la frecuencia respiratoria, de la sustitución de líquidos endolinfáticos de la cavidad abdominal por soluciones fisiológicas que difieren en pH.

6.-HIPÓTESIS

- Si la frecuencia respiratoria en *Acheta domestica* es modulable por cambios en el pH, entonces la substitución de líquidos endolinfáticos de la cavidad abdominal por soluciones fisiológicas que difieren en pH generará un incremento en dicha frecuencia.

7.MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron organismos de la especie *Acheta domesticus* machos criados en el herpetario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, los organismos fueron mantenidos en el laboratorio para un periodo de adaptación de 2 días antes de los experimentos. Fueron mantenidos en un ciclo luz oscuridad de 12-12 hrs. a temperatura ambiente y alimentados con Purina® cat chow® y agua *ad libitum*.

Los experimentos se realizaron en 5 grillos de *Acheta domesticus* de un tamaño aproximado de 20 mm. Los organismos fueron colocados sobre una base de sylgard en posición dorso ventral y fijados con electrodos de aguja de cloruro de plata, los electrodos de fijación fueron empleados como electrodos de registro. Los electrodos fueron colocados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (ZMS90, Nikon), los polos positivo y negativo fueron colocados en el segmento cefálico a cada lado de la línea media, zona en la cual se localiza el ganglio subesofágico, el electrodo de referencia fue conectado en el primer segmento anterior abdominal (figura 13).

La señal fue captada con un amplificador (x100; DP-311, Warner Instruments). La señal de salida fue digitalizada a 5 KHz, filtrada entre 100 y 3KHz (NI USB-6251, National Instruments) para ser analizada fuera de línea con los programas LabView 11.0 (National Instruments) y Clamfit 10.0 (Axon, Instruments).

Se grabaron 2 min control una vez que el registro se mostró estable, después de lo cual se suministró al azar, mediante una cánula colocada en la región abdominal del lado derecho del insecto, 0.2 ml de los siguientes tratamientos:

1. Solución fisiológica específica para insectos oxigenada (95% O₂, 5% CO₂; INFRA; Garay,2021).
2. Solución fisiológica específica para insectos sin oxigenar (Garay,2021).

El pH de las soluciones oxigenada y sin oxigenar fue de 7.4 ± 0.2 y 6.9 ± 0.1 respectivamente. En el lado izquierdo del insecto se colocó una cánula similar a la del lado derecho donde generalmente se desplazaba desde el cuerpo del insecto un volumen de endolinfa semejante al volumen introducido en la cavidad abdominal. Los 5 individuos recibieron los tratamientos 1 y 2 pero no en el mismo orden ya que estos fueron suministrados al azar. Entre cada administración de tratamiento se tomó una lectura de 2 minutos de la frecuencia respiratoria que se muestra en los resultados como “lavado”,

Con ayuda de la herramienta “threshold search” de Clampfit 10.0 se detectó el periodo entre los eventos respiratorios y se calculó la frecuencia respiratoria.

Los datos son expresados como media \pm desviación estándar, y fueron analizados con una prueba anova de una vía y en caso de encontrarse diferencia significativa ($p < 0.05$) se aplicó una post-prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para definir diferencias respecto al control.

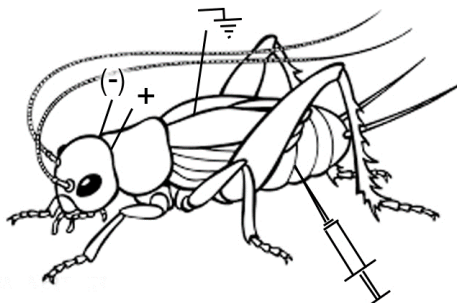


Fig. 13.- Modelo experimental para el estudio de la frecuencia respiratoria en *Acheta domesticus*.

Se muestra la colocación de electrodos de registro + y (-) adyacentes al ganglio subesofágico y el electrodo de referencia en la porción abdominal. Mediante una jeringa de insulina se inyectaron 0.2 ml de solución fisiológica específica para insecto de pH 7.5 y 7.

8.RESULTADOS

En la figura 14 se muestra un registro típico (A) de la actividad respiratoria del ganglio subesofágico de *acheta domesticus*, la frecuencia respiratoria a temperatura ambiente (22°C) y con una PO₂ típica atmosférica fue de 0.40 ± 0.06 Hz. Los registros obtenidos fueron estables por intervalos de varios minutos, pero no todos los organismos registrados (n=36) fueron adecuados para la realización de los experimentos, ya que en la mayoría de ellos el movimiento de las antenas y extremidades, debidos a aparentes conductas de escape, evitaban la toma de registros con una duración suficiente para la aplicación de las variables experimentales; bien porque los registros fueron inestables o los electrodos se desplazaban del sitio de registro.

Al aplicarse la solución fisiológica de pH 6.9 la frecuencia respiratoria se elevó de 0.40 ± 0.06 Hz hasta los 0.6 ± 0.17 Hz (14B; $p < 0.05$) respecto a la basal. No obstante, la inyección de una solución de pH 7.4 no produjo cambios significativos en la frecuencia respiratoria respecto de los registros control (14C; $p > 0.05$).

En la Figura 15 puede observarse la secuencia completa experimental, consistente en la toma de un registro control, seguido de la aplicación de las soluciones de pH 6.9 o 7.4 (aplicación al azar); entre cada una de ellas existió un registro de lavado para permitir que la frecuencia retornara a la frecuencia inicial antes de aplicar la siguiente solución. Se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la frecuencia de disparo al aplicarse la solución de pH 6.9 respecto de las otras condiciones, en el caso de la solución fisiológica de pH 7.4 no se observó modificación.

Comentado [PRC1]:

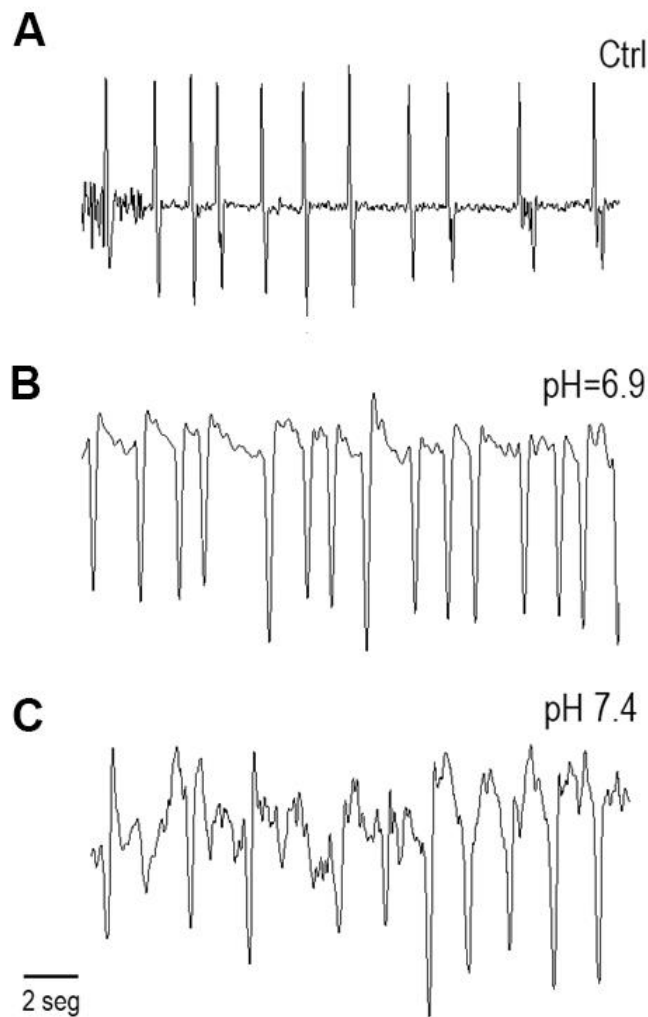


Figura 14. Registro típico de la actividad respiratoria del ganglio subesofágico de *Acheta domesticus* **A.** La frecuencia respiratoria a temperatura ambiente (22°C) y con una PO₂ típica atmosférica se encuentra en el rango de los 0.40 ± 0.06 Hz. Al aplicarse la solución fisiológica de pH 6.9 la frecuencia respiratoria se elevó hasta los 0.06 ± 0.17 Hz (**B**; $p < 0.05$). No obstante, la inyección de una solución de pH 7.4 no produjo cambios significativos en la frecuencia respiratoria respecto de los registros control (**C**; $p > 0.05$).

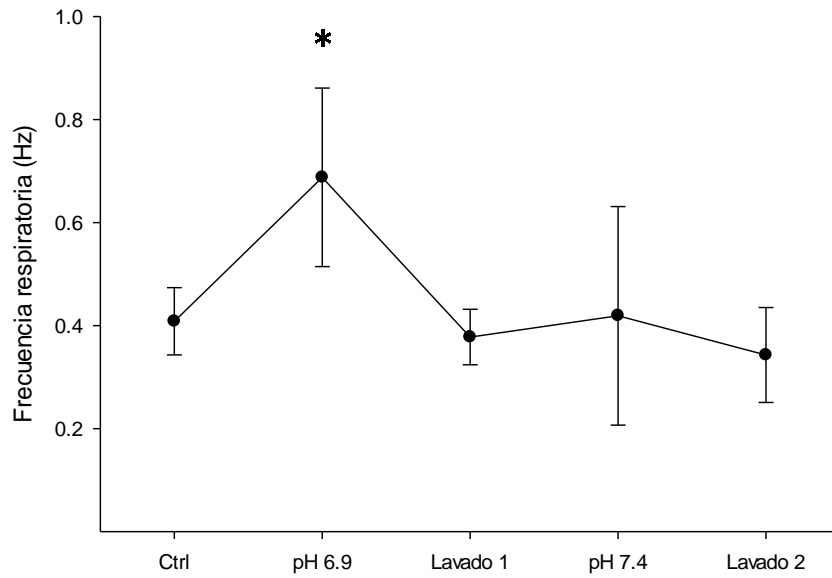


Figura 15. Cambios en la frecuencia del ganglio subesofágico en respuesta a soluciones fisiológicas de pH 6.9 y 7.4 inyectadas en el homocelo de la porción abdominal.

La secuencia completa experimental, consistente en la toma de un registro control, seguido de la aplicación de las soluciones de pH 6.9 o 7.4 (aplicación al azar); entre cada una de ellas existió un registro de lavado para permitir que la frecuencia retornara a la frecuencia inicial antes de aplicar la siguiente solución. Se observó un incremento significativo ($n=5$; $p<0.05$) en la frecuencia de disparo al aplicarse la solución de pH 6.9 respecto de las otras condiciones, en el caso de la solución fisiológica de pH 7.4 no se observó modificación.

DISCUSIÓN

Los sistemas respiratorio y circulatorio de los insectos, como en los demás animales, se encuentran en un punto importante de la regulación de la mayoría de los procesos homeostáticos. El sistema respiratorio se encarga de asegurar el aporte de O_2 a los tejidos, lo cual es fundamental en el metabolismo, dado su papel de último aceptor de electrones en la cadena respiratoria; Pero también remueve el CO_2 fuera del cuerpo de los insectos por difusión y posteriormente por convección a través de los túbulos quitinizados que conforman el sistema traqueal.

El sistema circulatorio está conformado por el homocole, lleno de hemolinfa, la cual es movida por una serie de bombas musculares dispersas por el cuerpo y si bien los hexápodos, especialmente los ancestrales, han conservado a la hemocianina en la hemolinfa como transportador de O_2 , la forma más extendida de transportarlo es mediante el sistema traqueal, esto ha repercutido de una forma muy particular sobre el sistema circulatorio en los insectos ya que no existe sobre él la presión de cumplir con el transporte de oxígeno de manera rápida a los tejidos, este puede llegar por difusión mediante el sistema traqueal.

De forma tal que los corazones de los insectos son pequeños y unidos a una vasculatura reducida, hecho que se ve acentuado probablemente por el tamaño de los organismos para cuyas dimensiones la difusión puede ser bastante efectiva. Los insectos en lugar de poseer una gran bomba central con potencia considerable, como en el caso de los vertebrados, tienen una multiplicidad de bombas accesorias pequeñas distribuidas por todo el cuerpo.

Una tendencia en los insectos es pues la reducción en el sistema circulatorio y un incremento del sistema espiracular, tendencia que se ve acentuada en los grupos voladores, dada la presión extra sobre la reducción del peso corporal para facilitar el vuelo; en organismos voladores altamente eficientes como los *Calliphoridae* el sistema traqueal contiene numerosos sacos que ocupan el 50% del volumen corporal. El incremento del sistema traqueal y reducción del circulatorio en organismos voladores puede observarse al comparar a las orugas y a las mariposas, en las primeras la endolinfa constituye cerca del 50% del peso corporal

pero tan sólo el 15% en las últimas, esto puede expresarse como la substitución de un homocele por una aereocele (Mattews 2017).

En un homocele dividido en compartimentos es por tanto fundamental el poder regular las concentraciones de distintos metabolitos y las presiones parciales de los diferentes gases corporales entre cada parte del cuerpo.

En este trabajo pudimos demostrar cómo la administración de una solución fisiológica con pH reducido (pH=6.9) en la región abdominal, incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) la frecuencia respiratoria. Esta zona del cuerpo elegida para la realización de los experimentos constituye uno de los dos principales compartimentos que almacenan líquidos corporales, el otro es el compartimento intestinal.

La modulación que el intestino puede realizar sobre el pH del organismo ocurre en una escala de tiempo mayor mientras que la modulación vía el sistema respiratorio es mucho más rápida, en escala inferior a los minutos en nuestro caso, en términos de la fisiología del organismo sería importante conocer como ambos compartimentos interaccionan para lograr la modulación del pH en el individuo completo y trabajando en escalas temporales distintas.

Entre las perspectivas del trabajo se encuentran saber cómo los cambios en el pH de otras regiones del organismo pueden alterar la frecuencia respiratoria; Habría de esperarse que las regiones torácica y cefálica con órganos importantes para la fisiología del organismo también puedan ejercer un efecto sobre los núcleos generadores de patrones respiratorios.

Particularmente sería importante saber la respuesta de la porción cefálica sobre la frecuencia respiratoria ya que en ella se encuentran el cerebro anterior encargado del procesamiento e integración (cuerpo seta) de la información proveniente de la visión, el olfato y quimiorreceptores diversos, además de encontrarse en esta región los centros motores de palpos y estructuras masticatorias. Pero sobre todo es allí donde reside el núcleo subesofágico

encargado de la producción de los patrones respiratorios que descienden a los músculos de la región abdominal.

En contraste debemos pensar que en regiones pequeñas del cuerpo como patas o antenas las modificaciones en el bombeo de endolinfa y posible influencia sobre la frecuencia respiratoria debe ser menor en caso de existir.

Volviendo al caso del núcleo subesofágico y en analogía a lo observado en mamíferos, los núcleos respiratorios como el pre-Bötzinger responden directamente a cambios en el pH y en la PCO_2 , por lo que no sería extraño encontrar el mismo tipo de respuesta en las neuronas del subesofágico; pero cuál es el sitio de detección del pH o de la PCO_2 en la región abdominal del insecto o el mecanismo mediante el cual la región abdominal incide sobre la actividad del núcleo subesofágico.

En caso de existir un sitio detector en el abdomen es importante investigar si este se encuentra localizado como un sitio anatómico distinguible en analogía a los cuerpos carotídeos de los mamíferos, debiendo existir un “órgano carotídeo” en cada sección del insecto o al menos una red difusa de detectores a lo largo del cuerpo del insecto.

Los experimentos realizados en este proyecto son por tanto el punto de partida para el estudio detallado de los mecanismos de detección y respuesta del sistema respiratorio de ortópteros, al contarse con una preparación asequible para el estudio de los cambios en la frecuencia respiratoria y que pueden extenderse a otros grupos de insectos.

CONCLUSIONES

1. La frecuencia respiratoria, evaluada mediante potenciales de campo generados en el núcleo subesofágico de *Acheta domesticus*, es modulable por cambios en el pH de los líquidos endolinfáticos del hemocele.
2. La preparación *in vivo* empleada en este proyecto constituye un modelo asequible para analizar los registros electrofisiológicos de la actividad basal del ganglio subesofágico de *Acheta domesticus*.
3. La frecuencia respiratoria en *Acheta domesticus* es modulable por cambios en el pH, ya que la substitución del líquido endolinfático de la cavidad abdominal por soluciones fisiológicas con un pH menor al fisiológico generó un incremento en dicha frecuencia.

REFERENCIAS

1. Anderson DT (2015). Relations among Invertebrates: Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods. Pergamon, New York, 496 pp.
2. Bradley TJ (2005). Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433: 516-519.
3. Callier V, Nijhout HF (2014). Plasticity of insect body size in response to oxygen: integrating molecular and physiological mechanisms. *Current Opinion in Insect Science*, 1: 59–65.
4. Chapman RF (2013). The insect's structure and function. 5th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 625-69.
5. Dasen JS. Evolution of locomotor rhythms. *Trends Neurosci* (2018); (10):648.
6. Dean JB, Ballantyne D, Cardone DL (2002) Role of gap junctions in CO₂ chemoreception and respiratory control. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 283:665.
7. Devlin, TM (2002). "Eukaryotic Cell Structure (Chap. 1)", T. M. (ed.) Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 5a ed. Wiley-Liss
8. Dubose TD (2001). "Acidosis and Alkalosis (Chap. 50)", en Braunwald, E.; A. S. Fauci; D. L. Kasper; S. L. Hauser; D. L. Longo and J. L. Jameson (ed.). *Harrison's Principles of Internal*.
9. Engel J (2005). Long-term intracellular recordings of respiratory neuronal activities in situ during eupnea, gasping and blockade of synaptic transmission. *J Neurosci Methods*. 147:138-145.
10. Farris M. (2015) Evolution of brain elaboration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 370(1684):20150054.
11. Feldman JL, Breathing: rhythmicity, plasticity, chemo sensitivity. *Annual Rev Neuroscience* 2003; 26:239.
12. Forster H. (2003). Plasticity in the control of breathing following sensory denervation. *J Appl Physiol*; 94:784.
13. Ganong JL WF, Fisiología médica (2004). 19 ed. México: El Manual Moderno, 701-84.
14. Garay P Staples, Mikel-Stites. (2021) Cuantificación de las emisiones de GEI en dos especies de insectos comestibles (*Gryllus assimilis* y *Blaptica dubia*): análisis del efecto de la dieta. Tesis de Maestría en Ingeniería ambiental. Buenos Aires. 79 p.
15. Gómez T, Puyou, García MJ, Trejo J (2015). "La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa" *Revista Digital Universitaria [en línea]*, Vol. 16, No.1.
16. Guyenet (2015). The role of chemoreception in sex recognition by male crickets: *Acheta domesticus* and *Teleogryllus oceanicus*. *Physiological Entomology* 8 (2): 151-166.
17. Guyton A. (2000). *Tratado de fisiología médica*. 10ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 34:56

18. Heinrich T, David A. Gray, R. Matthias Hennig, (2016). Evolución fenotípica multivariada: señales acústicas divergentes y selección sexual en grillos de campo *Gryllus*, *Biología evolutiva*, 10.1007 / s11692-016-9388-1, 44, 1, (43-55).
19. Hennig JA, Golub MD, Lund PJ, Sadtler PT, Oby ER, (2018). Quick KM, et al. Constraints on neural redundancy. *Elife*; 43:7-180
20. Hilaire G. (2003). Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci*; 18:23.
21. Hillyer JF, (2020). The Insect Circulatory System: Structure, Function, and Evolution. *Annu. Rev. Entomol.* 65: 121–43.
22. Hiriart. (2008) *Biología Funcional de los animales*. 2da. Ediciones Siglo XXI, México, 584 p.
23. Hrycaj SM, Wellik DM. (2016) *Hox genes and evolution*.5:859
24. Hustert, R. and A. M. Mashaly (2013). Spontaneous behavioral rhythms in the isolated CNS of insects presenting new model systems. *Journal of Physiology Paris*, 107(1-2): 147–15.
25. Kandel Eric, James H. Schwartz y Thomas M. Jessell). Pearson Prentice Hall, (2011) *Neurociencia y conducta* 12(5):864.
26. Klandorf H, Yancey PH (2005). *Animal Physiology: from genes to organisms*. Brooks-Cole, Belmont. 22:23-89p
27. Krause KL, Neumueller SE, Marshall BD, Kiner T, Bonis JM, Pan LG (2009). Micro-opioid receptor agonist injections into the presumed pre-Botzinger complex and the surrounding region of awake goats do not alter eupneic breathing. *J Appl Physiol* 107: 1591-1599.
28. Lavezzi, L (2008). Functional neuroanatomy of the human pre-Bötzing complex with particular reference to sudden unexplained perinatal and infant death. *Neuropathology* 28: 10-16.
29. Matthews, P.G.D. (2017). Acid–Base Regulation in Insect Haemolymph. In: Weihrauch, D., O'Donnell, M. (eds) *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer, Cham.
30. Matthews, PG (2017). Acid–Base Regulation in Insect Haemolymph. En: Weihrauch D, O'Donnell M (eds). *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer Int Publishing. 34p
31. Medeiros, E. M., Ramos-Elordut, J. y Pino, J. M. (2006). «Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados» (PDF). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* (38): 395-414
32. Mendoza A. (2007). *Nociones de Química para las áreas médica y biológica*. (Cap. 6, pH y amortiguamiento) UAEM, México
33. Moreno-González D, Adriana Rocha-Ramírez y Salvador Galicia-Isasmendi (2016). Registro electrofisiológico de la actividad respiratoria en *acheta domestica l.* (orthoptera: gryllidae) y su modulación por O2 y N2. *Entomología Mexicana* 3: 765-9.
34. Muñoz M. Dent M. Fuentes D. Hall A. Hernández-Cruz A. Harrington M. and Aguilar Roblero R. (2000). Circadian Modulation of the Ryanodine Receptor Type 2 in the SCN of rodents. *NeuroReport* 10: 481-486.

35. Nation K, Song J, Ausborn J, El Manira A. (2008). Pattern of innervation and recruitment of different classes of motoneurons in adult zebrafish. *J Neurosci* 33(26):10875–86.
36. Niven JE, Graham CM, Burrows M. (2008) Diversity and evolution of the insect ventral nerve cord. *Annu Rev Entomol.* 53(1):253–71.
37. Randall D, Burggren W. (2004): *Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations* 5th ed.; Freeman & Co, New York (13): 687
38. Richerson GB. (2004). Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosc.* 5(6):449-61.
39. Rollag M, Berson D, Provenci I. Melanopsin, Ganglion (2003)-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms* 18: 227-234.
40. Rosado D, Martínez A, Jaramillo R (2011). Oxidación de NADH y succinato por la cadena respiratoria de *Burkholderia Cepacia*. *Biociencias* 6 (2): 41-51.
41. Semenza GL. (2010) O₂-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by HIF-1. *J Applied Physiol* 96(3):1173-7.
42. Sena LA, Chandel NS (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48(2):158-67.
43. Triplehorn, Charles A; Johnson, Norman F (2005). *Borror and DeLong's introduction to the study of insects.* (7th edición). Australia: Thomson, Brooks/Cole.
44. Wasserthal LT, Cloetens P, Fink RH, Wasserthal LK. (2018). X-ray computed tomography study of the flight-adapted tracheal system in the blowfly *Calliphora vicina* analysing the ventilation mechanism and flow-directing valves. *J Exp Biol* 221: jeb176024.
45. Zhang (2011). *Encyclopedia of Insects.* Academic Press. pp. 232-236.