

REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA EN *Acheta domestica* L. (ORTHOPTERA: GRYLLIDAE) Y SU MODULACIÓN POR O₂ Y N₂

Darío Moreno-González¹, Adriana Rocha-Ramírez² y Salvador Galicia-Isasmendi¹✉

¹Escuela de Biología. ²Instituto de Fisiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla-México, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio, Edificio 112-A, Ciudad, Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, C. P. 72570.

Autor para correspondencia ✉ Autor de correspondencia: salgalic@gmail.com

RESUMEN. En los ortópteros la respiración es facilitada por movimientos rítmicos del cuerpo que son iniciados en neuronas del ganglio subesofágico. Estas neuronas poseen propiedades marcapaso que les permiten generar potenciales de acción que se regulan generalmente por la concentración de CO₂, fenómeno bien estudiado en los vertebrados pero que se encuentra descrito en menor medida en los invertebrados. Se estudió la modulación de la respiración por una atmósfera saturada de O₂ (95 %) y otra carente de este (N₂) con objeto de determinar la viabilidad del modelo para el estudio de la fisiología respiratoria. Se empleó un amplificador diferencial y electrodos de aguja adyacentes al ganglio subesofágico de adultos macho de *Acheta domestica* (n = 12). Se encontró que el O₂ inhibió la respiración ya que en estas condiciones puede difundir por sí sólo a los tejidos sin necesidad del sistema de ventilación de los espiráculos. La ausencia de O₂ generó un incremento súbito y significativo de la frecuencia respiratoria que puede ser modulada nuevamente a las condiciones basales una vez que se restituye el oxígeno atmosférico. El estudio muestra que esta preparación puede resultar útil en el estudio de las bases fisiológicas que subyacen a la fisiología respiratoria en los insectos.

Palabras clave: fisiología respiratoria, ganglio subesofágico, O₂.

Electrophysiological recordings of breathing activity in *Acheta domestica* L. (Orthoptera: Gryllidae) and the modulation due to O₂ and N₂

ABSTRACT. In Orthoptera the breathing activity is enabled by repetitive movements of the body which are initiated by neurons inside the sub-esophageal ganglion. These neurons display regular spontaneous activity typically modulated by the concentration of CO₂, a well-known process in vertebrates but poorly described in invertebrates. The modulation of breathing by a high concentration of O₂ (95 %) was studied as well as the modulation in the absence of O₂ (100 % N₂), in order to determine the utility of the present model to study breathing physiology. A differential amplifier and pin electrodes were used to make recordings of the activity of the sub-esophageal ganglion in twelve adult males of *Acheta domestica*. Oxygen at high concentrations inhibits breathing activity since it can easily diffuse without the help of the spiracle respiratory system. In the absence of O₂ a fast increase in breathing frequency was observed as well as the recovery of basal frequency after the substitution of N₂ by atmospheric oxygen. Our results show that the present model may be useful for future studies of the neuronal basis of breathing physiology.

Key words: breathing physiology, sub-esophageal ganglion, O₂.

INTRODUCCIÓN

En los ortópteros la respiración se lleva a cabo mediante estructuras especializadas de su sistema traqueal el cual está constituido por extensas invaginaciones tubulares, que se abren a través de la cutícula mediante poros denominados espiráculos. Para evitar que las tráqueas se colapsen se encuentran reforzadas por engrosamientos espirales denominados tenidios, estas estructuras permiten además los cambios de longitud que acompañan los movimientos respiratorios del organismo (Fanjul y Hiriart, 2008). Los movimientos respiratorios rítmicos generan un flujo de aire que facilita el intercambio gaseoso y son iniciados por grupos de neuronas que se encuentran en el ganglio subesofágico. 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 (Otto y Janiszewski, 1989; Otto y Hennig, 1993). Pero esta actividad rítmica debe ser regulada en términos de las concentraciones parciales de los gases implicados en la respiración (CO_2 y O_2), fenómeno bien estudiado en los vertebrados, pero que se encuentra descrito en menor medida en los insectos (Guyenet y Bayliss, 2015).

En los vertebrados el incremento en la presión parcial de oxígeno en los líquidos corporales trae consigo una reducción en la cantidad de CO_2 disuelto y con ello de la concentración de ácido carbónico (H_2CO_3) así como el consecuente incremento del pH. Por el contrario la reducción de O_2 conlleva una acidificación de los líquidos corporales. Las neuronas marcapaso en los núcleos respiratorios de los vertebrados son sensibles a los cambios de CO_2 y de pH, no a los cambios directos en la concentración de O_2 , pero se conoce menos de la regulación y fisiología de las neuronas marcapaso en el ganglio subesofágico de los insectos (Op. cit). En este trabajo se investigó a nivel del animal íntegro, mediante técnicas electrofisiológicas, la regulación del patrón respiratorio por una concentración elevada de O_2 (95 % O_2 , 5 % CO_2).

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron 12 individuos adultos macho de la especie *Acheta domestica* obtenidos de un distribuidor local, que fueron colocados en cajas de acrílico (con arena y grava como sustrato) a temperatura ambiente para su aclimatación por una semana previa al inicio de los experimentos y alimentados con Purina® *cat chow*® y agua *ad libitum*.

Para el registro de la actividad eléctrica respiratoria los organismos fueron colocados dentro de una cámara de registro de 12 cm^3 (Fig. 1A) con base de sylgard (Dow Corning, USA) y fueron fijados mediante uno de los electrodos de registro (G, Fig. 1B).

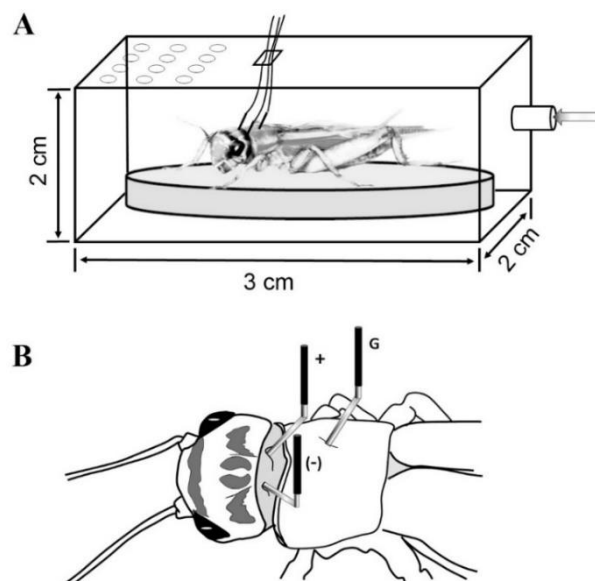


Figura 1. Arreglo experimental para el registro de la actividad eléctrica respiratoria en *Acheta domestica*. Se muestran las dimensiones de la cámara de registro así como la colocación del organismo (A) y la disposición de los electrodos de registro (B).

Se emplearon electrodos de AgCl tipo aguja que fueron conectados a un amplificador diferencial ($\times 100$; DP-311, Warner Instruments). La señal de salida fue digitalizada a 5 KHz, filtrada entre 100 y 3KHz (Tarjeta Analógica-Digital; NI USB 6009, National Instruments), para ser analizada

posteriormente con los programas LabView 11.0 (National Instruments) y Clamfit 9.0 (Axon Instruments). Los electrodos positivo y negativo fueron colocados adyacentes y a cada lado del ganglio subesofágico, en el segmento cefálico, con ayuda de un microscopio estereoscópico (ZMS-90, Nikon) y de micromanipuladores (MM-33, Warner Instruments) y el electrodo de referencia (G) fue colocado en el segmento torácico (Fig. 1B). Una vez colocado el organismo en la cámara de registro, se suministró gas carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂; Infra) mediante un orificio en la pared lateral de la cámara que contenía un aireador comercial para pecera. Para el análisis de los resultados se empleó un análisis de varianza de una vía y una post-prueba de Tukey cuando se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2A se muestra un registro típico control de la actividad eléctrica respiratoria en *A. domestica*, la cual se caracterizó por ser una actividad rítmica formada por salvas de potenciales de acción; tras el suministro de O₂ al 95% se observó una disminución gradual de la actividad respiratoria que se inhibió totalmente después de 2 ± 0.35 min (2B). Tras la inhibición de la respiración se cortó el suministro de O₂ (95 %) para que el organismo volviese a una atmosfera con concentración normal (O₂ al 21 %), después de lo cual se presentó un incremento súbito y transitorio de la frecuencia respiratoria (Figura 2C). Después de 4 ± 0.26 min del regreso a la concentración normal de O₂ la frecuencia retorna a la condición basal (2D).

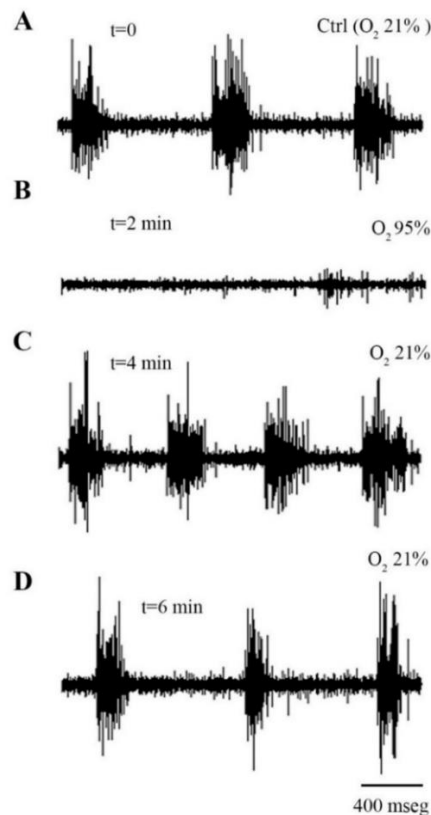


Figura 2. Registro típico de la actividad eléctrica respiratoria en *Acheta domestica*. La actividad control (ctrl) consiste de una actividad rítmica en ráfagas de potenciales de acción, que se ve cancelada tras el suministro de O₂ al 95 % (B). Cuando el organismo vuelve a una atmosfera con concentración normal de O₂ (21 %) se observa un incremento súbito y transitorio de la frecuencia respiratoria (C). El retorno a la frecuencia control se observa después de ≈ 4 min del regreso a la concentración normal de O₂ (D).

En la figura 3 se observan los registros tomados a intervalos de 2 minutos y los promedios de la frecuencia respiratoria (media \pm desviación estándar) para los 12 individuos analizados. Se observó diferencia significativa (**, $p < 0.01$) entre la frecuencia para O₂ al 95 % y las condiciones normales atmosféricas de O₂ al 21 %. El punto posterior al retorno a la concentración de O₂ al 21 % también fue significativamente diferente respecto de la concentración atmosférica de O₂ (*, $p < 0.05$).

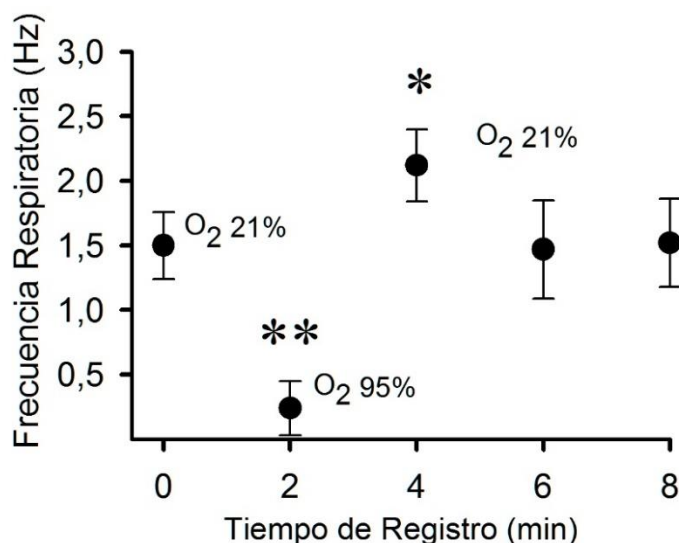


Figura 3. Efecto del cambio en la concentración parcial de O₂ sobre la frecuencia respiratoria. Se muestran los promedios de la frecuencia respiratoria ($n = 12$; media \pm desviación estándar). ** indica una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la frecuencia para O₂ al 95 % y las condiciones normales atmosféricas de O₂ al 21 %. Nótese el incremento en la frecuencia respiratoria posterior al retorno a la concentración de O₂ al 21 % ($t = 4$ min; * $p < 0.05$).

En la figura 4 se muestra el incremento en la frecuencia respiratoria debido al suministro de N₂ al 100 %. Se observó un incremento de esta variable posterior a la administración de N₂, que tardó en revertirse ≈ 4 min después del retorno a una atmosfera de O₂ al 21 %. El curso temporal de los cambios debidos a la ausencia de O₂ fue más rápido que los cambios debidos al incremento en la concentración de O₂ por ello en la figura 4 se muestran registros a intervalos de 1 min. Los resultados mostrados en las figuras 2 y 3, respecto de la inhibición de la actividad respiratoria en presencia de O₂ a altas concentraciones se pueden interpretar mediante un desplazamiento del CO₂ de los líquidos corporales y con ello de la falta del estímulo que desencadena la actividad rítmica en las neuronas marcapaso (Hustert y Mashaly, 2013).

Por otra parte, estos resultados muestran una de las características limitantes para el tamaño de los insectos, su tipo de respiración dependiente de la difusión, la cual es eficiente para pequeñas distancias. Es decir, nuestros resultados muestran que a concentraciones altas de oxígeno el organismo cancela la actividad respiratoria ya que éste puede difundir fácilmente hacia los tejidos aún sin ayuda de los espiráculos respiratorios. Si la concentración de oxígeno atmosférico fuese mayor a 21% este podría difundir a una mayor cantidad de tejido lo cual posibilitaría insectos de mayor tamaño (Callier y Nijhout, 2014). Llama también la atención el rebote o incremento transitorio de la frecuencia una vez que el O₂ al 95% es substituido por O₂ atmosférico, lo cual puede deberse a la presencia de mecanismos compensatorios presentes en las neuronas marcapaso o bien al simple comportamiento de sus corrientes iónicas (Li, 2015), fenómenos que deberán estudiarse en futuros trabajos. Los cambios en la frecuencia respiratoria debidos a la ausencia de O₂ (100% N₂) son congruentes con lo esperado y en conjunto muestran que este modelo es

pertinente para el estudio de la fisiología respiratoria en los ortópteros y abre la posibilidad de estudios futuros sobre los mecanismos a nivel neuronal que subyacen a estos procesos.

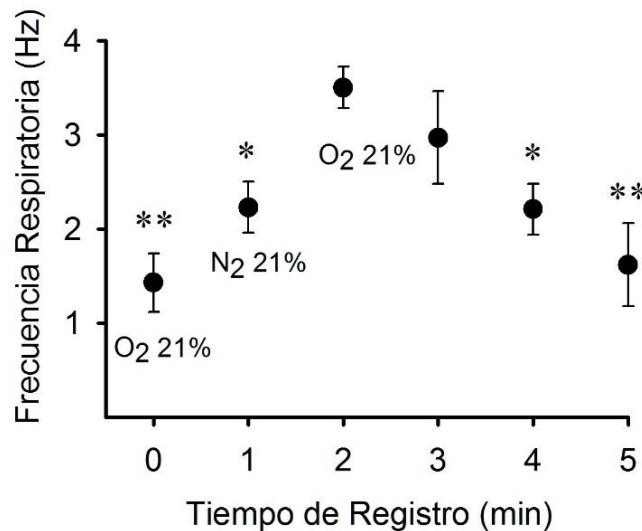


Figura 4. Efecto del suministro de N₂ (100 %) sobre la frecuencia respiratoria. Se observó un incremento en la frecuencia respiratoria posterior a la administración de N₂, incremento que tardó en revertirse ≈4 min después del retorno a una atmósfera de O₂ al 21 %. Se muestra la media ± desviación estándar con n = 12. */ **, p < 0.05/p < 0.01 respectivamente.

CONCLUSIÓN

El oxígeno en concentración elevada inhibe la respuesta marcapaso de las neuronas respiratorias del ganglio subesofágico, permitiendo la respiración aún sin ayuda del sistema de ventilación de los espiráculos. La ausencia de O₂ generó un incremento súbito y significativo de la frecuencia respiratoria que puede ser modulada nuevamente a las condiciones basales una vez que se restituye el oxígeno atmosférico. El estudio muestra que esta preparación puede resultar útil en el estudio de las bases neuronales y de control que subyacen a la fisiología respiratoria en los insectos.

Literatura Citada

- Callier, V. and H. F. Nijhout. 2014. Plasticity of insect body size in response to oxygen: integrating molecular and physiological mechanisms. *Current Opinion in Insect Science*, 1: 59–65.
- Fanjul-de Moles, M. L. y M. U. Hiriart. 2008. *Biología Funcional de los animales*. 2da. Ediciones Siglo XXI, México, 584 p.
- Guyenet, P. G. and D.A. Bayliss. 2015. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron*. 87(5): 946–961.
- 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): 147–151.
- Li, W. C. 2015. Selective Gating of Neuronal Activity by Intrinsic Properties in Distinct Motor Rhythms. *Journal Neuroscience*, 35(27): 9799–9810.
- Otto, D. and R. M. Hennig. 1993. Interneurons descending from the cricket subesophageal ganglion control stridulation and ventilation. *Naturwissenschaften*, 80(1): 36–38.
- Otto, D. and J. Janiszewski. 1989. Interneurons originating in the suboesophageal ganglion that control ventilation in two cricket species: Effects of the interneurons (SD-AE neurones) on the motor output. *Journal of Insect Physiology*, 35(6): 483–491.