



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACCIÓN DEL EXTRACTO DE TALLO OCULAR SOBRE LA RESPUESTA
ELÉCTRICA A LA LUZ DE LOS FOTORRECEPTORES VISUALS DEL
ACOCIL PROCAMBURUS BOUVIERI (ORTMMAN)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

VERA MENDOZA, KATIA E.

ASESOR: FUENTES PARDO, BEATRIZ

Ciudad Universitaria, México, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACCION DEL EXTRACTO DE TALLO OCULAR SOBRE
LA RESPUESTA ELECTRICA A LA LUZ DE LOS
FOTORRECEPTORES VISUALES DEL ACCIL
PROCALBARUS ROUVIERI (ORTMANN)

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

Katia E. Vera Mendoza

MEXICO, D. F.

1978

A mis papás

A mis hermanos

A Daniel

Agradezco al Dr. Alberto Guevara Rojas, Jefe del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, las facilidades que me concedió para la realización de este trabajo.

Asimismo quiero agradecer a la Dra. Beatriz Fuentes Pardo Profesora e Investigadora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, la valiosa guía que he recibido no sólo para la realización de esta tesis sino de una manera general en el inicio de mi formación científica.

Indice

	Pags.
Introducción.....	1-12
Material y método.....	13-18
Resultados.....	19-22
Discusión.....	23-37
Conclusiones.....	38-39
Figuras.....	40-49
Literatura citada.....	50-57

INTRODUCCION.

La presencia de la ritmicidad circádica en muchos fenómenos biológicos ha sido ampliamente reconocida por muchos autores en un gran número de especies animales y vegetales. (Bünning 1960, Aschoff 1960, Pittendrigh 1965).

El movimiento de pétalos (Bünsow, 1953), la posición de pigmentos (Welsh, 1930), la actividad motora Kalmus (1938), la eclosión de larvas (Pittendrigh, 1967), la síntesis hormonal (Kleinholz, 1936), son algunos de los muchos ejemplos que ponen de manifiesto la capacidad desarrollada en los seres vivos de presentar cambios periódicos por medio de los cuales quedan en condiciones de adaptarse a los cambios cíclicos que se presentan normalmente en la naturaleza.

Desde hace más de 30 años han aparecido en la literatura algunos trabajos (Schallek 1912, Welsh 1930, y Bennitt 1932) que han puesto de manifiesto la presencia de fenómenos circádicos en la vía visual del acocil. Entre ellos cabe destacar el trabajo de Bennitt quien en 1932 registró la persistencia de un ritmo diurno en el movi-

miento del pigmento retiniano accesorio proximal del acoel Cambarus virilis. Para ello el autor colocaba un gran número de animales en completa oscuridad y después de 24 horas sacrificaba tres de ellos a intervalos de tres horas durante las siguientes 75 horas; al examinar los ojos macerados de estos animales pudo comprobar que el pigmento retiniano sufría cambios de posición a lo largo del nictámero.

En 1939 y 1941, Welsh detectó un ritmo en el diámetro de la pseudo pupila utilizada como índice de la posición de los pigmentos retinianos proximal y distal. El autor atribuyó este efecto a cambios periódicos en la liberación de las hormonas encargadas del control de la posición de los pigmentos desde la glándula sinusal hacia la circulación general.

En 1960, Aréchiga y Hiersma trabajando con acoelios implantados permanentemente, encontraron un cambio circádico en la amplitud del electroretinograma y en la frecuencia de descarga de las llamadas "fibras de acción sostenida" del nervio óptico del acoel Procambarus clar kii. En 1970 Aréchiga y Fuentes demostraron la estrecha correlación que hay entre la posición de los pigmentos

retinianos accesorios del acocil Procambarus bouvieri y la amplitud del electroretinograma a lo largo del ciclo de 24 horas.

En 1973, Aréchiga, Fuentes y Barrera pudieron comprobar que los cambios cíclicos de amplitud del ERG del acocil previamente propuestos correspondían, efectivamente, a un ritmo endógeno con período cercano a las 24 horas, el que se veía afectado importantemente por la cantidad de luz recibida. En 1976 Sánchez y Fuentes-Pardo publicaron un trabajo en el que demostraron la existencia de un ritmo circádico en la respuesta eléctrica a la luz del tallo ocular aislado del acocil.

En este trabajo se postuló la posibilidad de que el ritmo circádico del ERG fuera el resultado de la interacción de numerosos osciladores los que se presentarían acoplados en el animal íntegro y tenderían a desacoplarse en el tallo ocular aislado al faltar en él algunas influencias probablemente de carácter hormonal.

A pesar de todos estos estudios sobre la ritmicidad circádica en la vía visual del acocil quedan sin embargo, muchos interrogantes aún sin respuesta fundamentalmente en lo que concierne al origen de esa ritmicidad circádica.

Por otra parte desde hace años se sabe del efecto que algunas hormonas ejercen sobre diferentes funciones del acocil. Entre ellas se encuentran la hormona hiperglicémica (HGH) (Kleinholz, 1973), la hormona responsable de la inhibición de la muda (Adiyodi, 1970), la hormona relacionada con la regulación hidromineral (Bliss, 1966; Kamamoto, 1959). La hormona responsable de la movilización de los pigmentos tegumentarios (Kleinholz, 1965, 1970). De todas estas hormonas una de las mejor conocidas es la llamada "hormona dispersora del pigmento distal (HDPD) (Kleinholz, 1976) cuyo nombre corresponde a la acción que se sabe que ejerce sobre los efectores pigmentarios de la retina, los que bajo su influencia mimetizan la acción de la luz pasando de la posición polar que adoptan en la oscuridad a la posición central de blindaje de la omatidia que es típica del estado de adaptación a la luz. Se conoce que esta hormona se sintetiza en el sistema nervioso y se acumula en la glándula sinusal (Kleinholz, 1976) desde donde se libera muy probablemente con carácter periódico hacia la circulación general provocando en la omatidia el efecto descrito.

Estos hechos coinciden con lo expresado por algunos

autores (Kleinholz, 1976), acerca del papel determinante que ejerce la HDPD sobre los cambios de la posición cíclicos que se presentan en los pigmentos retinianos del accil.

El que los pigmentos retinianos accesorios cambien de posición periódicamente favoreciendo la entrada de luz has ta los fotorreceptores durante la noche y restringiéndola durante el día, explica por lo menos en parte el que la respuesta eléctrica de los fotorreceptores sufra también cambios cíclicos en el ciclo de 24 horas, sin embargo, pue de afirmarse que los cambios circádicos del ERG obtenido de la preparación del tallo ocular no sólo dependen de la posición de los pigmentos accesorios ya que hay otros factores que juegan también un papel importante. Así no debe descartarse la posibilidad de que haya cambios cíclicos en la síntesis y/o liberación de los factores humorales que afectan directamente el estado funcional de los fotorreceptores independientemente del papel que desempeñan en la posición de los pigmentos accesorios, haciendo a los fotorreceptores más sensibles a la acción de la luz durante ciertas horas del día.

Este trabajo tiene por objeto probar si los extractos

obtenidos del sistema nervioso del acocil de los que se conoce la acción que ejercen sobre los pigmentos retinianos accesorios tienen también algún efecto detectable en la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil.

Antes de entrar detenidamente a describir el material y el método seguido durante el desarrollo experimental de este trabajo parece pertinente el presentar los datos más relevantes relacionados con la organización del tallo ocular del acocil por ser esta estructura el sitio en el que se llevan a cabo las funciones que pretendemos analizar.

Los primeros estudios anatómicos sobre la retina de crustáceo que se encuentran en la literatura, son los consignados por Parker en diversos trabajos, particularmente los aparecidos en 1931, 1935 y 1937.

Según este autor, el tallo ocular presenta forma de un corto cilindro móvil contenido al cuerpo del animal por su base proximal. La región distal se caracteriza por tener una superficie semicircular dentro de la que se localiza la retina; el eje mayor del tallo, lo formaría una

línea que se proyectaría desde el centro de la porción distal hasta el centro de la región proximal. Si se hace un corte longitudinal sobre este eje puede observarse de fuera hacia dentro una gruesa capa impregnada de sales que forma la cutícula corneal; hacia la zona proximal esta capa se torna delgada y flexible, mientras que en la zona distal forma una capa transparente que cubre la retina. En la porción central hay una cutícula blanda que cubre la superficie interna de la cutícula corneal llamada hipodermis; del engrosamiento de esta zona se forma, a su vez, la retina.

La retina del acocil tiene la superficie dividida en facetas las que corresponden a las unidades funcionales del ojo; estas unidades se llaman omatiidas. En cada omatiida, se encuentran dos componentes: uno dióptrico y otro fotorreceptor. El primero está formado por dos células corneógenas secretoras del material traslúcido que forma la córnea y por células piramidales que al unirse forman el cono cristalino; las células corneógenas son el sitio de entrada de la luz; el cono cristalino al prolongarse mediante un filamento hasta las células fotosensi-

bles, permite que el estímulo entre en contacto con el componente fotorreceptor. (Figura A).

Los fotorreceptores son células especializadas en la captación de la energía luminosa; hay 7 en cada ommatidia y presentan prolongaciones que al fusionarse constituyen el rabadomo; es en esta zona donde se encuentra el pigmento fotosensible que algunos autores han identificado como rodopsina (Sald, 1968). En estas células se encuentra también otro pigmento, el llamado pigmento accesorio proximal el que se presenta en forma de gránulos oscuros capaces de migrar longitudinalmente a través del citoplasma regulando la cantidad de luz incidente sobre el rabadomo en diferentes condiciones de iluminación (Parker 1932, Lockwood, 1962). Sin que se pueda afirmar hasta ahora cual es la composición química de este pigmento, se ha sugerido que pueda ser la melanina (Parker 1932, Goodwin, 1961).

Las células retinulares tienen axones que emergen desde el extremo proximal de la retínula, atraviesan la membrana basal y se proyectan hacia la lámina ganglionar donde establecen la primera sinapsis de la vía aferente.

En la retina hay otros dos tipos de células, las que

contienen al pigmento accesorio distal y las que contienen al pigmento accesorio de reflexión.

Las células del pigmento distal son dos células per omatidia que tienen forma de banda con el núcleo colocado hacia la posición distal de la retina; se localizan en los espacios interomatidiales a nivel de los conos cristalinos en la región más alejada de la membrana basal hacia afuera; el pigmento es probablemente melanina (Goodwin, 1961) y tiene como característica importante la de cambiar de posición hacia el polo distal de la omatidia o hacia la membrana basal, dependiendo de la ausencia o la presencia de luz respectivamente.

Las células del pigmento de reflexión son células irregulares que están colocadas sobre la membrana basal en la zona más proximal de la retina. Se llaman así porque el pigmento que contienen refleja hacia la superficie de la omatidia buena parte de la luz que recibe. Esta reflexión de luz genera una zona más clara que el resto de la superficie corneal y ha recibido el nombre de "pseudopupila" (Day, 1961), la pseudopupila tiene una área que depende de la cantidad de luz que incide sobre el pigmento

reflector, lo que depende, a su vez, de la posición de los pigmentos proximal y distal ya que en muchas especies de crustáceos entre los que se incluye al acocil, las células del pigmento reflector no tienen capacidad de movimiento (Parker, 1927). La naturaleza química del pigmento no ha sido bien establecida ya que mientras algunos proponen que es la guanina (Waterman, 1951) otros piensan que es una mezcla de bases púricas y pirimídicas (Kleinholz, 1961). Otra posibilidad que se ha planteado (Krebs, 1972) es que este pigmento no sea un verdadero pigmento de gránulos blanquecinos sino que sean más bien vesículas llenas de material graso que agrupadas reflejarían la luz incidente de manera comparable a como lo haría la espuma.

La masa de tejido nervioso que ocupa la parte central del tallo ocular de los decápodos, se compone de cuatro ganglios distintos colocados de tal forma que constituyen una serie que se extiende desde la retina hasta el ganglio cerebral. Se han designado del I al IV y en tanto que el primero (I) se conecta con la retícula por medio de los axones que proceden de las células retinulares, el IV envía sus fibras directamente hasta el sistema nervioso

central formando parte del nervio óptico.

Cada ganglio está formado por las fibras que llegan a la región, los somas de neuronas cuyo aspecto de masa puntiforme hizo que Parker en 1895 los designara como "Punktsubstanz", capilares y tejido correctivo. Según el mismo autor pueden distinguirse dos tipos de células ganglionares: las apolares, elementos de material indiferenciado y las monopolares que proceden de aquéllas y que se encuentran ampliamente distribuidas en las capas I, II, III y en menor proporción en la capa IV.

El primer ganglio recibe el nombre de "lámina ganglionar" es relativamente delgado y en él se han descrito cuatro capas neuronales próximas a la base de la omatidia (Horridge y Bullock 1965). En cada una de estas capas los somas ocupan una porción superficial con las ramificaciones hacia la región central donde forman una neuro-pila. Las fibras que salen de este ganglio conectan con el segundo ganglio llamado "módulo externa", el que es ligeramente más grueso que el anterior y se halla formado también por somas neuronales que forman una masa puntiforme y

por axones que se proyectan hacia el tercer ganglio, el llamado "médula interna"; la forma de este ganglio es esférica similar a la del segundo ganglio y como él, formado por somas periférico y neurobila central. La conexión que establece con el cuarto ganglio o "médula terminal" es bastante irregular. Este ganglio es el más grande de todos y mantiene la misma organización básica de los anteriores con neurobila en el centro y somas neuronales en la superficie, aun cuando no se hayan encontrado éstos en las regiones proximal y distal.

Las fibras que emergen de este ganglio forman parte del nervio óptico y se proyectan directamente hasta el lóbulo óptico del ganglio subraquideo.

Finalmente hay que mencionar a la glándula sinusal, órgano neurohemal que tiene aspecto de un órgano opalescente situado entre la primera y segunda capas ganglionares; se sabe que es un sitio de almacenaje de diferentes tipos de neurosecreciones provenientes todas ellas del sistema nervioso del acocil.

MATERIAL Y METODO

Los animales utilizados para este trabajo fueron aco-ciles adultos de ambos sexos de la especie Procambarus bouvieri (Orsman) colectados en Uruapan, Mich. y puestos en el bioterio en agua con aireación constante y a temperatura de aproximadamente 19°C; semanalmente eran alimentados con carne de rana y eran traídos al laboratorio dos horas antes de ser utilizados en los experimentos. Los experimentos se dividieron en dos grandes grupos: en los que se registraba la respuesta eléctrica a la luz (ERG) del tallo ocular y los que permitían la detección de la posición de los pigmentos retinianos accesorios.

I.- Registro de la Actividad Eléctrica del Tallo Ocular Alzado.

La preparación que se utilizó en esta etapa experimental fue la del tallo ocular el que era extirpado de un animal que había estado previamente sometido a un período de obscuridad no menor de 2 horas. De inmediato el tallo era colocado en solución de Van Harreveld (Van Harreveld, 1936) fijándose su posición sobre una cánula de polietileno que permitía también introducir las sustancias de

las que se quisiera conocer el efecto que tuvieran sobre la preparación. La Caja de Petri sobre la que descansaba la cónula con el ojo era colocada dentro de un refrigerador que mantenía la temperatura entre 14 y 16°C y que evitaba todo acceso de luz que no fuera el que el experimento requiriera. Sobre la superficie corneal se colocaba una gota de aceite mineral que permitía aislar el cambio eléctrico una vez generado. Un microelectrodo de metal de aproximadamente $3/4$ de diámetro, se encargaba de recoger el ERG enviando la señal a un preamplificador Tektronix 122 desde donde era enviada a un osciloscopio Tektronix modelo 502 para ser fotografiada mediante una cámara quinográfica marca Grass modelo C4. La estimulación luminosa se obtenía de una lámpara conectada a un transformador y era de seis bujías/ pie².

En una primera serie de estos experimentos se utilizaron 40 ojos a los que inicialmente se les aplicaba un pulso de prueba, seguido de diez minutos de luz constante. Inmediatamente después se aplicaban pulsos de prueba cada diez minutos durante un lapso no menor de 2 horas. Este tiempo normalmente era suficiente para que el ojo se adap-

tara completamente a la obscuridad. Una vez adaptado, se procedía a inyectarle dosis conocidas de extracto desde 0.1 hasta 100 tallos oculares/cm³, siguiéndose con el mismo patrón de estimulación que hemos descrito, hasta llegar a otros 70 minutos más de registro.

En otra serie experimental de 20 ojos se seguía este mismo procedimiento excepto en lo que se refiere a la inyección ya que en este caso se aplicaban extractos obtenidos de músculo del mismo accoil.

II.- Detección de la posición de los pigmentos retinianos accesorios.

En los experimentos de esta serie, se utilizaron 300 tallos oculares los que eran colocados en solución de Van Harreveld (Van Harreveld, 1936) a temperatura de 14 a 16°C y obscuridad constante excepto por destellos luminosos de prueba.

Cada veinte minutos se obtenían 10 ojos los que eran fijados inmediatamente metiéndolos en agua a 85°C durante 60 segundos, lo que permitía quitarles la quitina con facilidad.

Se hizo una sección longitudinal que permitía observar con ayuda del microscopio (Zeiss, modelo 27989) al que se acoplaba un micrómetro, la disposición de los pigmentos proximal y distal durante 120 minutos que duraba esta fase del experimento; posteriormente se inyectaban a través de una cánula de polietileno que se había colocado previamente, 0.2 c.c. de extracto de tallo ocular en dosis que iban desde 0.1 tallo/c.c. hasta 100 tallos/c.c. En otro grupo experimental se seguía exactamente la misma técnica sólo que la inyección era de extracto de músculo. La posición de los pigmentos se juzgaba a través del índice de pigmento proximal, IPP y del índice de pigmento distal IPD (De Bruin y Crisp 1959). Los IPP e IPD son medidas normalizadas que se obtienen de la siguiente manera:

$$IPD = \frac{A1 + A2}{2r} \quad \text{donde } A1 \text{ es la distancia que hay}$$

entre la capa corneágena y la zona distal del pigmento distal. A2 es la distancia comprendida entre la capa corneágena y la zona proximal del pigmento distal y r es la distancia que hay entre la capa corneágena y la parte proximal de la membrana basal (figura B).

IPP $\frac{b_1}{b_2}$ donde b_1 es la distancia que hay desde
 r

la membrana basal hasta la zona más distal alcanzada por el pigmento proximal, b_2 es la distancia entre la membrana basal y la zona de pigmento proximal más próxima a ella.

Por lo que se refiere a la obtención de los extractos, la técnica que se siguió fue la propuesta por Kleinholz en 1936 y que a continuación se describe.

Se utilizan acociles en fase diurna a los que se les seccionan los tallos oculares; se les desprende la cubierta quitinosa y se maceran en 4 ml. de acetona hasta que ésta se volatiliza totalmente; en seguida se añaden 8 ml. de cloroformo y se sigue macerando hasta que éste también se volatiliza completamente.

Finalmente se agrega solución de Van Harreveld para obtener la concentración deseada. Las concentraciones que se emplearon cubrieron 4 unidades logarítmicas y fueron 0.1, 1, 10 y 100 tallos/ ml.

Análisis de los Datos. - Para analizar los datos obtenidos en cada fase experimental se siguieron las técnicas

cas iguales de determinación de promedio, de error estándar y de prueba de T.

En otros casos se siguió la técnica de calcular la curva que mejor se ajustara a los datos experimentales para lo cual se empleaba una computadora PDP 11 alimentada con un programa expresamente formulado para ello.

RESULTADOS

En la figura 1 hemos incluido los resultados de medir la amplitud del ERG a intervalos de diez minutos durante los 210 minutos que duró el experimento.

En los primeros diez minutos se aplicó luz continua, lo que significó una reducción importante en la magnitud del ERG; puede observarse que a partir de que el ojo permanece en la obscuridad la amplitud del ERG empieza a recuperarse rápidamente primero y más lentamente después hasta llegar a lo que será la máxima respuesta aproximadamente a los 90 minutos. El ojo permanecía en estado de adaptación a la obscuridad, y a partir del minuto 120 se le inyectaban 0.2 c.c. del extracto de músculo disuelto en solución de Van Harreveld y preparado de la misma forma en la que se preparó el extracto de tallo ocular. Puede comprobarse que esta substancia no produjo ningún efecto detectable sobre la magnitud del ERG, la que se siguió midiendo hasta llegar al minuto 70, tiempo en el que se daba por terminado el experimento.

La figura 2 muestra los resultados de haber medido

la amplitud del ERG de tallos oculares sometidos a condiciones similares a las descritas en el párrafo anterior só lo que en el minuto 110 se inyectaban 0.2 c.c. de extracto de tallo ocular. Puede comprobarse que el ojo que estaba adaptado a la obscuridad reduce su ERG aproximadamente 20 minutos después de la inyección permaneciendo baja la respuesta durante una hora, aproximadamente, momento a partir del cual se podía ver recuperación hacia los valores de adaptación a la obscuridad, anteriores a la inyección.

Estos resultados ponían de manifiesto no sólo la reversibilidad del efecto sino también el que la preparación no se había deteriorado.

La disminución del ERG dependía de la dosis de extracto aplicada, lo que puede comprobarse al comparar las curvas 2 y 3. Esta última gráfica se obtuvo en condiciones comparables a aquélla sólo que la dosis inyectada fue 10 veces mayor que la del caso anterior; al relacionar la respuesta al extracto (medida siempre a los 50 minutos), con la dosis aplicada, se obtuvo una curva típica dosis-respuesta que es lo que se muestra en la figura 4.

Los datos originales fueron procesados por computadora y se comprobó que, efectivamente, la curva que mejor se ajusta a ellos es la recta que se incluye en la figura 4 y que tiene como ecuación.

$y = m (\log x) + b$ donde m es la pendiente y b es el valor en el que la recta cruza el eje de las Y .

Por lo que respecta a los resultados de la segunda fase experimental, las figuras 5 y 6 ponen de manifiesto un hecho que quedó bien establecido en nuestros experimentos: ni el pigmento retiniano proximal (figura 5) ni el pigmento retiniano distal (figura 6) sufren cambios en la posición que sugieran que se adaptan a la obscuridad en la primera fase del experimento o que se adapten a la luz por la acción de los extractos del tallo ocular inyectados, a pesar de haber inyectado una dosis tan elevada como es la de 50 tallos/cm³. Las medidas fueron tomadas cada 20 minutos durante tiempo no menor de 200 minutos y se aplicó la prueba de F para varianzas homogéneas con el objeto de comparar los valores del IAD y del IEP antes y después de la aplicación del extracto. De esta forma pudo comprobarse que no hay diferencias significativas que se puedan re-

lacionar con la sustancia inyectada.

Al meter los datos originales a la computadora se obtuvo que la curva que mejor se ajusta a ellos es una recta cuya ecuación es igual a $y = mx + b$, donde m es la pendiente y b es el valor en el que la recta cruza el eje de las Y (0.25). Un valor de m tan cercano a cero (-0.0008) como el que se obtuvo corresponde a una recta casi paralela al eje de las X lo que pone de manifiesto una falta de relación entre el tiempo transcurrido y la posición que guardan los pigmentos accesorios (es decir, no hay ni adaptación a la luz ni adaptación a la obscuridad).

Por otra parte la recta que define el comportamiento de los pigmentos es la misma antes y después de la aplicación del extracto, lo que vuelve a apoyar la idea de que la sustancia inyectada no afecta la posición de los pigmentos accesorios por lo menos en las condiciones experimentales empleadas.

D I S C U S I O N

En el ojo compuesto característico de los crustáceos decápodos se conocen tres clases de células pigmentarias capaces de cambiar de posición bajo influencias no totalmente comprendidas pero que en cualquier caso significan modificaciones en la entrada del estímulo luminoso hasta el sitio donde se localizan los elementos fotosensibles. Así, se habla de una "posición de adaptación a la luz" para referirse a un estado en el que los pigmentos distal y proximal ocupan una posición desde los extremos hasta el centro de la omatidia llegando a cubrir la capa del pigmento reflector; por el contrario una "posición de adaptación a la obscuridad" supone un corrimiento de los pigmentos distal y proximal que deja libre buena parte del cono cristalino. Evidentemente la posición de adaptación a la luz significa una reducción en el ingreso neto de luz hasta las capas fotosensibles mientras que en el caso de la adaptación a la obscuridad sucede exactamente lo contrario. Desde fines del siglo pasado la migración de los pigmentos retinales en los crustáceos ha sido estudiada tanto como enfoques puramente morfológicos (Sasaawinska, 1920) como buscando una interpretación funcional.

(Exner, 1891).

En 1897 Parker describió la migración del pigmento proximal en Palaemonetes y encontró que la adaptación de posición a la luz requiere aproximadamente de 30 a 45 minutos mientras que la adaptación a la obscuridad lleva de 45 a 60 minutos. La diferencia entre ambos tiempos ha sido confirmada por otros autores en otras especies: Von Frisch en 1908 en Palaemon y Bennitt en 1924 en Gammarus. En 1907 Congdon estudió en Palaemonetes y en Cambarus el efecto que tiene la temperatura sobre la migración de los pigmentos y encontró que el efecto de este factor es opuesto al de la luz, ya que los incrementos de temperatura favorecen aún cuando sea dentro de una gama más estrecha, la adaptación a la obscuridad.

Por otra parte, Bennitt en 1924 encontró que los incrementos de temperatura provocan un aumento en la velocidad de migración de los pigmentos tanto hacia la posición de adaptación a la luz como hacia la posición de adaptación a la obscuridad, ya que el Q_{10} calculado de sus experimentos fue igual a 2.

Los mecanismos que regulan las migraciones han sido

objeto de estudio desde 1894, tiempo en el que Kiesel observó que las migraciones retinales de molillas de la especie Plusia gamma persistían a pesar de que los animales eran mantenidos en condiciones de oscuridad constante. Los ojos se aclaraban y apenas aparecía una pequeña luz, tornaban a oscurecerse. Esto se atribuyó al cubrimiento y descubrimiento de las capas reflectoras por movimientos de los pigmentos distal y reflector. Pronto el tema fue estudiado en crustáceos y Parker en 1897, analizó la migración en Palaeonetes para lo cual observó los cambios sufridos en ojos extirpados y mantenidos en oscuridad constante.

Pudo así comprobar que la migración hacia la posición de adaptación a la oscuridad se ve reducida en el tallo aislado; también buscó, sin encontrarla, evidencia de la interrelación entre los dos ojos, lo que dió origen a la idea presente hasta nuestros días de la ausencia de eferencias nerviosas hacia los elementos retinulares en el ojo conectado de los crustáceos.

En 1908 Von Frisch publicó resultados similares al estudiar la migración de los pigmentos necesarios en el ojo

de Palaemon. En 1911, Demoll confirmó las observaciones de Niessel sugiriendo que las células pigmentarias están controladas por cambios periódicos en el sistema nervioso. En 1924 Bennett trabajó con ojo aislado de Talorchestia y comprobó que en sus preparaciones únicamente se daba el fenómeno de adaptación a la luz; sólo en el caso de utilizar el cefalotórax completo podían observarse las dos fases, lo que lo llevó a proponer la necesidad de que hubiera conexión entre las células retinulares y el sistema nervioso central para que operara íntegramente la regulación de la migración.

El mismo autor (Bennett 1932), probó que algunos factores que afectan la actividad del sistema nervioso como son la hipoxia y la anestesia promueven la adaptación a la luz de los pigmentos accesorios, lo que sumado a las observaciones de los cambios precedidos en un ojo como resultado de la iluminación del otro, lo llevaron a proponer un control nervioso sobre el movimiento de estos pigmentos.

En 1930, Welsh había abordado el problema en Macrobrachium, donde observó un comportamiento diferente entre las células del pigmento distal y las del pigmento proxi-

mal, ya que sólo aquéllas presentaban movimientos rítmicos aún en condiciones constantes de iluminación. Bennett en 1932 propuso una ritmicidad circádica en la posición del pigmento proximal de Cambarus cuando se ha mantenido en condiciones de obscuridad constante.

Otra línea de investigación relacionada con el papel que desempeñan las diferentes hormonas encontradas sobre distintas funciones del acocil se inició también hacia fines del siglo pasado cuando los trabajos de Pouchet (1876) referentes a los cambios de color de los crustáceos en los que el autor le atribuyó al sistema nervioso un papel fundamental, despertaron en un buen número de investigadores el interés por dilucidar el factor que, efectivamente estuviera involucrado en el fenómeno. Entre estos investigadores ocupa un papel importante Perkins quien en 1928 propuso que una hormona elaborada en el tallo ocular de Palaeomonetes era la responsable de la concentración del pigmento contenido en los cromatóforos. Estudios independientes hechos por Koeller (1928), Koeller y Mayer (1930) Smith (1930), Kohn y Perkins (1935), Bacon (1934) y Hanström (1935), apoyaron la presencia de esta hormona en diferen-

tes especies de crustáceos utilizadas.

Hacia 1934, Brown propuso que en el sistema nervioso de algunos decápodos hay un factor que activa los cromatóforos. El mismo autor en 1935 propuso la presencia de varias hormonas en el tallo ocular entre las que cabe destacar una encargada de la migración de los pigmentos retiniales de accediles.

Sin embargo en esa época estaba aún sin decidir la posible influencia nerviosa sobre la migración de estos pigmentos, lo que probablemente dificultó la correcta interpretación de los resultados.

El primer autor que trató formalmente de demostrar una acción hormonal sobre la migración de los pigmentos retiniales accesorios fue Kleinholz quien en 1936 encontró que la inyección de un principio activo de tallos oculares de Salinonolus en individuos de la misma especie adaptados a la obscuridad, provocaba expansión de los pigmentos hacia la posición típica de adaptación a la luz.

En 1934, Welsh publicó los resultados de probar distintas dosis de extracto de tallo ocular sobre la migra-

ción del pigmento proximal de acociles del género Cambarus, hacia la posición de adaptación a la luz. En 1948, Kleinholz demostró que la extirpación de las glándulas sinusales no modificaba importanteemente la respuesta a la luz tónica de las células pigmentarias accesorias.

El mismo autor Kleinholz (1961) hizo un balance crítico de los resultados obtenidos hasta la fecha acerca de la acción hormonal ejercida sobre los pigmentos accesorios y concluyó que hay datos suficientes para proponer una regulación humoral sobre las células del pigmento distal pero no sobre las células del proximal.

Por lo que se refiere a los mecanismos involucrados en la migración de los pigmentos, poco hay que pueda decirse. En 1924 Bennett estudiando el ojo de Cammarus propuso que el movimiento pigmentario involucrara reacciones de naturaleza química ($Q_{10} = 2$). El mismo autor encontró en Talorchestia que durante la migración hay hinchamiento de la célula en la parte hacia la que se dirige el pigmento con adelgazamiento de la parte donadora, lo que sugiere la presencia de corrientes citoplasmáticas que arrastrarían consigo los gránulos pigmentarios desde un polo hasta el

otro.

La presencia de cargas eléctricas (Stavenga, 1971) así como la acción de microtúbulos (Miller y Cawthon, 1974) se incluyen dentro de los mecanismos propuestos para explicarse las migraciones pigmentarias; aún cuando la poca información de que se dispone hasta ahora no permite aceptar ninguna de ellas de una manera definitiva.

Por lo que respecta a nuestros resultados, las figuras 5 y 6 ponen de manifiesto que en el tallo ocular aislado del acocil no ocurren modificaciones significativas en la posición de los pigmentos retinianos proximal y distal mantenidos en las condiciones constantes de obscuridad y temperatura. Más aún esta falta de movilidad se mantiene después de la inyección de extracto de tallo ocular a dosis tan alta, como es la de 50 tallos oculares en cm^3 de solución de Van Harreveld (figura 5 y 6). Es posible que esta falta de respuesta al extracto aplicado tenga su explicación en el hecho de mantener baja la temperatura (14°C) durante el tiempo del experimento, lo que apoyaría lo propuesto por Bennett (1952) acerca de la naturaleza química de las reacciones involucradas en la movilización del pigmento.

En otra línea de investigación que se relaciona directamente con nuestro trabajo están Ruck y Jahn (1954) Hanaoka y cols. 1950, 1957) y Naka y Kuwabara (1956, 1958) quienes han trabajado sobre el origen de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de los ojos compuestos de los crustáceos. Estos autores han obtenido resultados que a continuación resumimos.

El ERG tiene dos componentes que han sido designados como HI y HII la primera se presenta como respuesta al inicio de la estimulación luminosa mientras que la amplitud de la HII permanece igual todo el tiempo que dure la estimulación.

Al hacerse un mapeo desde la superficie corneal del ojo hasta la región de la membrana basal, la forma del ERG va cambiando y así, por ejemplo, si el electrodo se coloca en la zona del cristalino, se obtiene una respuesta negativa rápida seguida de una meseta lenta, mientras que si el sitio de registro es la zona interna de los receptores se obtiene sólo un pico positivo. Al llegar el electrodo a una cierta profundidad (250 μ) se observa un cambio en el potencial de reposo que los autores (Naka y Kuwabara, 1958) interpretaron como el indicio de haber atravesado -

una membrana, la basal.

A partir de ese momento el ERG apareció monofásico pa ra volverse a ver difásico al penetrar más allá de la membrana.

La penetración llegó hasta muy cerca de los ganglios ópticos. Como no apareció ningún otro componente además del HI y del HII la conclusión a la que se llegó fue de que el ERG sólo depende de los cambios que presentan los fotorreceptores a la luz sin que intervenga ninguna otra estructura en la respuesta.

Estos antecedentes apoyaron nuestros experimentos ya que nos proporcionaron la seguridad de no registrar otra cosa que no fueran cambios en el fotorreceptor visual.

Así, la curva No. 3 nos resume un grupo de experimentos que nos sirvieron como base para explicarnos la acción de la luz, de la obscuridad y del extracto de tallo ocular aplicado, sobre la sensibilidad de los fotorreceptores juzgada mediante la respuesta que dan a un destello luminoso.

Puede constatarso que la aplicación de diez minutos

de luz significó una reducción del ERG hasta de un 40% aproximadamente, la que es menor que la obtenida en animales íntegros (Aréchiga y cols., 1975) probablemente debido a la falta de movilidad de los pigmentos accesorios que se presenta en nuestras preparaciones.

En la misma curva No. 3 puede apreciarse el efecto de mantener los tallos en la obscuridad; evidentemente durante los primeros diez minutos se recupera la capacidad de responder a la luz en más del 50% para llegar al 100% en los noventa minutos siguientes; estos datos son cuantitativamente diferentes a los obtenidos por Aréchiga y cols., (1975) en el animal íntegro debido a que en la obscuridad los pigmentos favorecen la llegada del estímulo luminoso hasta el fotorreceptor, (lo que no sucede en nuestra preparación) reduciéndose así el tiempo necesario para dar la máxima respuesta a la luz.

Un comentario especial, es el que merece la acción del extracto de tallo ocular sobre el electroretinograma (Figura No. 2 y No. 3), debido a que, hasta ahora, no se había encontrado ningún efecto del complejo hormonal contenido en el tallo ocular, sobre la actividad eléctrica de

los fotorreceptores. Cabe sin embargo, hacer notar, que este efecto de reducción del ERG no puede atribuirse a alguna hormona en especial de las muchas presentes en la solución inyectable, aún cuando nos inclinamos a pensar en la hormona dispersora del pigmento distal (HDPD) (Kleinholz, 1962) debido a que la técnica que seguimos para la obtención del extracto es la que Kleinholz propuso inicialmente para la determinación del efecto de esa hormona sobre la dispersión de los pigmentos retinianos accesorios; inclusive las dosis empleadas en nuestros experimentos son las mismas que el autor probó en los suyos. Otra posibilidad que no puede descartarse es la de que el efecto que se observa sobre el ERG lo produzca la hormona depresora del sistema nervioso (HEN), propuesta por Archigga y cols. en 1977. En efecto, los autores hablan de una sustancia cuya acción más importante es la de reducir la excitabilidad del sistema nervioso del acecil aboliendo, probablemente, los mecanismos de intercambio iónico a nivel de la membrana; esta hormona se almacena en la glándula sinusal y tiene un peso molecular muy similar al de la HDPD, por lo que seguramente permanece como tal en los extractos obtenidos por nosotros según la técnica que des-

cribimos. Es pues razonable suponer que su acción no se limita a reducir la capacidad de respuesta del sistema nervioso sino que actuaría también sobre las estructuras re-
centeras.

Cualquiera que sea la ó las hormonas involucradas en el efecto observado, lo que es un hecho es que la acción depende de la dosis aplicada (compare las figuras 2 y 3), lo que nos permitió construir una curva dosis-respuesta como la que se observa en la figura 4.

El análisis de esta curva pone de manifiesto una relación lineal entre la reducción del ERG y el logaritmo de la concentración de extracto utilizado de acuerdo con la ecuación $Y = m \log x + B$ donde Y es el efecto provocado por el extracto y X es la concentración utilizada; los valores de m (la pendiente de la curva) y B (el valor del intersección) fueron calculados mediante un programa hecho para computadora y son iguales a m 11.6 y B 3.5 respectivamente. También puede observarse la curva que "mejor se ajusta" a los datos experimentales según el programa aludido que es de donde se obtuvieron los valores mencionados de m y B .

En 1962 Kleinholz obtuvo una relación dosis-respuesta utilizando extractos del tallo ocular de acocil y midiendo el efecto sobre la migración del pigmento retiniano distal en animales íntegros adaptados a la obscuridad; la curva que este autor presenta es también logarítmica cuando utiliza concentraciones que van desde 0.2 hasta 30 tallos por cm^3 de solución Van Harreveld.

Evidentemente los valores de la pendiente y el intersección quedan determinados en cada caso por las condiciones experimentales utilizadas (especie y efecto observado, para sólo mencionar las más obvias), por lo que podemos afirmar que la curva que se obtuvo de nuestro experimento es en todo comparable a la presentada por Kleinholz al medir la acción del extracto sobre el pigmento retiniano distal.

El que el fotorreceptor sea sensible a la acción de los extractos hormonales contenidos en el tallo ocular, permite suponer que en la preparación crónica del ojo aislado (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) un factor involucrado en el ritmo circádico que registran estos autores, sea justamente la actividad hormonal presente en el tallo ocular aislado. Si tomamos en cuenta que en esta preparación es

muy probable que se sigan generando cambios cíclicos en la producción y/o liberación de las hormonas (datos no publicados); la acción de ellas podía estar influyendo en los cambios periódicos que los autores mencionados observaron en su preparación. Evidentemente faltan datos para aceptar o rechazar esta proposición aunque las evidencias que aquí se presentan apuntan hacia la aceptación de influencias humorales sobre la manifestación de cambios periódicos del fotorreceptor.

CONCLUSIONES

1.- En la preparación de tallo ocular aislado del acocil, se obtuvieron respuestas a la luz (ERG) por períodos no menores de tres horas durante los cuales se pudo observar el efecto de la iluminación constante, de la obscuridad y de la inyección de extractos de tallos oculares.

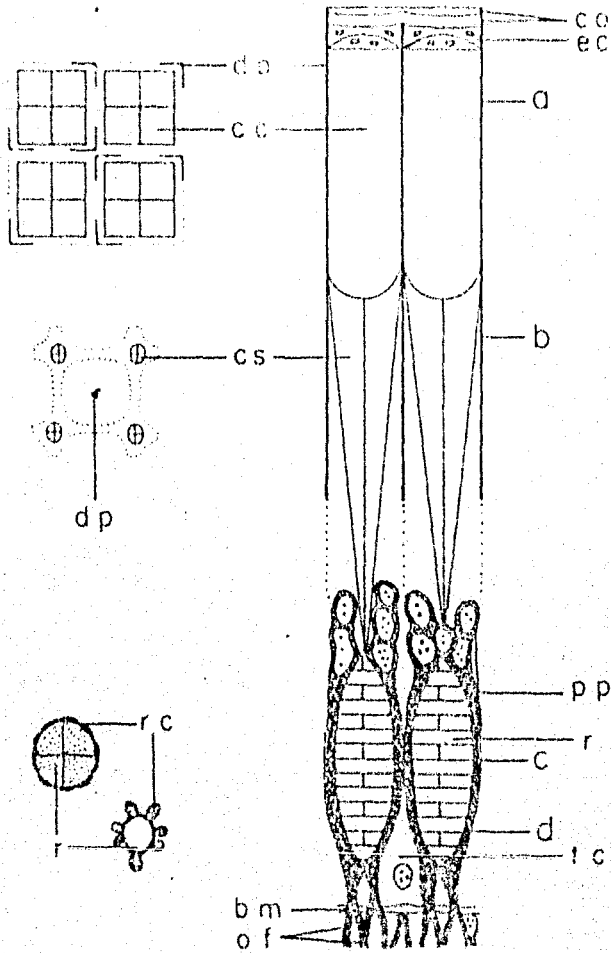
2.- Al aplicar el extracto del tallo ocular se registró una disminución en la magnitud del ERG, proporcional al logaritmo de la concentración del extracto, por lo que se pudo obtener una curva dosis-respuesta cuya ecuación es:

$$Y = m \log X + B$$

3.- Las medidas en la posición de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal obtenidas de nuestra preparación, pusieron de manifiesto que al menos en nuestras condiciones de trabajo, ni la luz constante, ni la obscuridad ni el extracto inyectado provocan cambios significativos en tal posición.

4.- Se concluye que las hormonas presentes en el tallo ocular, afectan la sensibilidad de los fotorreceptores

a la luz sin que en este mecanismo se vean involucrados ne
cesariamente los pigmentos retinianos accesorios.



40)

Figura A.- Esquema que muestra los límites considerados para calcular los índices de pigmento.

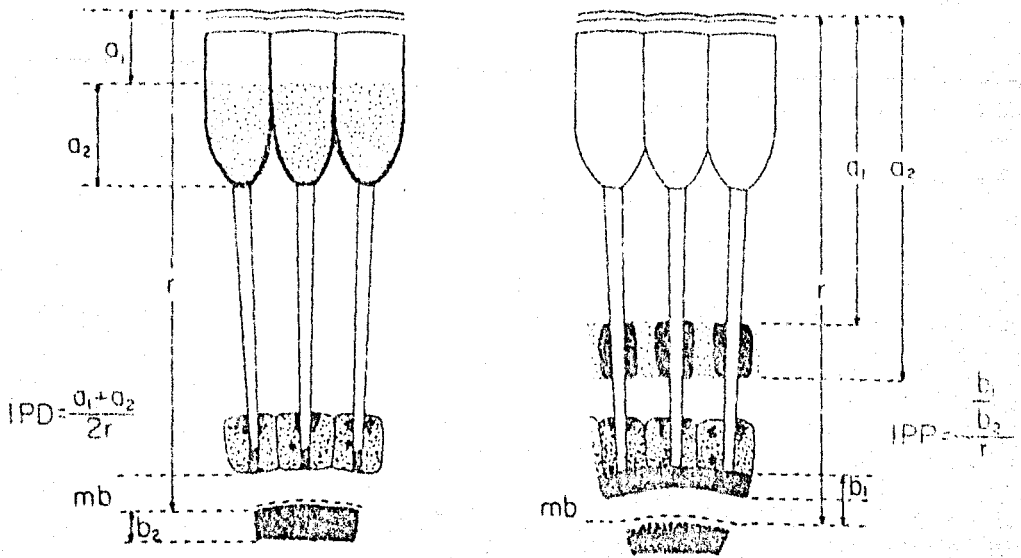


Figura B.- Esquema de la estructura de las omatidias del ojo crustáceo del acocil adaptado a la luz. (co) córnea; (cc) células corneógenas; (ccr) células del cono cristalino; (cc) cono cristalino; (dp) pigmento distal; (cs) tamaño del cono cristalino; (pp) pigmento proximal; (r) rhabdomo; (rc) células retinulares; (bc) células del pigmento de reflexión; (bm) membrana basal; (of) fibras visuales o arcos retinulares. Los niveles a-a, b-b, c-c y d-d indican los planos de corte correspondientes a las secciones transversales A, B, C y D respectivamente (Waterman, 1961).

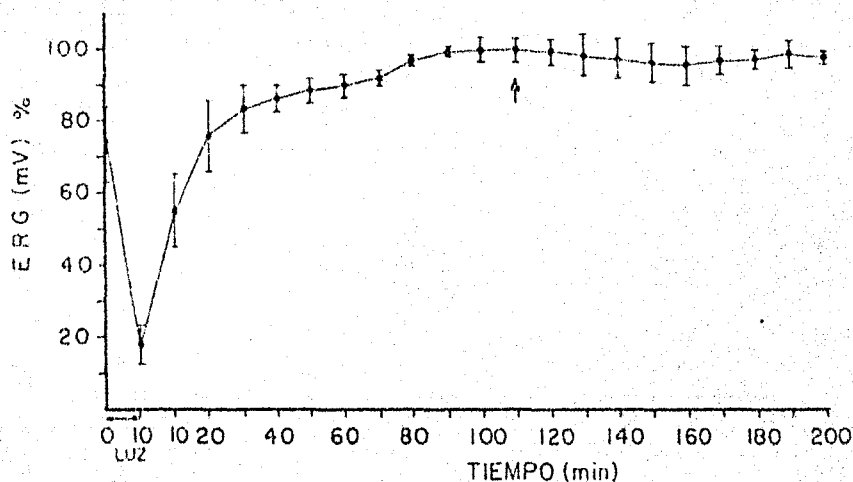


Figura 1.- Cambios en la amplitud del ERG de tallos oculares aislados durante 200 minutos de obscuridad sólo interrumpida por los destellos luminosos de prueba; el experimento se inició aplicando luz continua durante los diez primeros minutos. La flecha indica el momento de la aplicación de 0.2 c.c. de extracto de músculo. Nótese que la magnitud del ERG es casi la misma después de la inyección. Las barras verticales indican el error estándar.

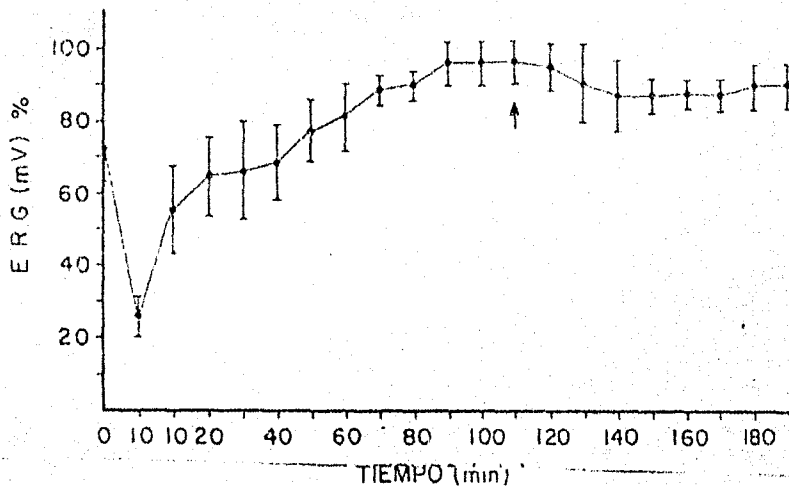


Figura 2.- Cambios en la amplitud del ERG de tallos oculares aislados durante 200 minutos de obscuridad sólo interrumpida por los destellos luminosos de prueba; el experimento se inició aplicando luz continua durante los diez primeros minutos. La flecha indica el momento de la aplicación de 0.2 c.c. de extracto de tallo ocular a la concentración de tallo/c.c. Nótese la reducción en la amplitud de la respuesta 40 minutos después de la inyección, así como la tendencia a la recuperación una hora después de la aplicación del extracto. Las barras verticales indican el error estándar.

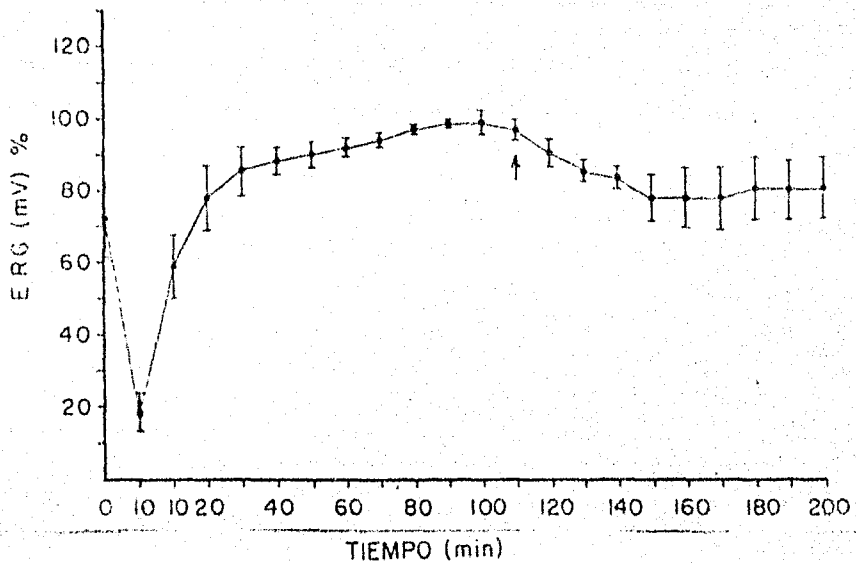


Figura 3.- Cambios en la amplitud del ERG de tallos oculares aislados colocados en condiciones de luz durante los primeros diez minutos y obscuridad inmediatamente después. La flecha indica el momento de aplicación de 0.2 c.c. de extracto a la concentración de 10 tallos/c.c. Las barras verticales indican el error estándar.

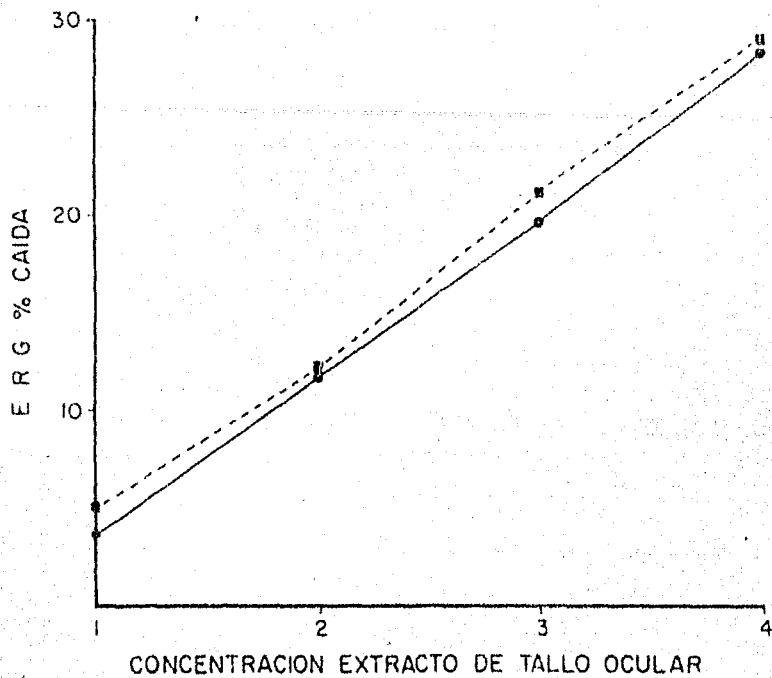


Figura 4.- Relación entre la reducción del ERG medida 50 minutos después de haber aplicado el extracto de tallo ocular y el logaritmo de la concentración de éste. La curva superior (---) se construyó con los valores obtenidos de la experimentación; la curva inferior (—) es la que mejor se ajusta a los datos experimentales, según la computadora.

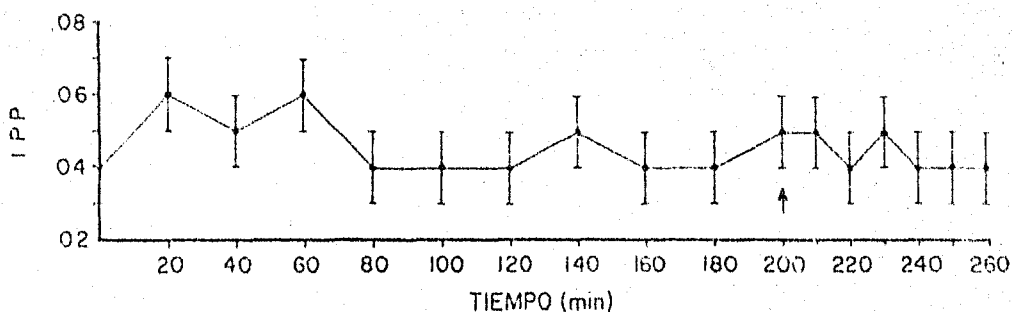


Figura 5.- Cambios en los valores del índice de pigmento proximal (IPP) de tallos oculares colocados en la oscuridad sólo interrumpida por destellos luminosos de prueba aplicados cada diez minutos. Las determinaciones del IPP se hicieron cada 20 minutos. La flecha indica el momento de aplicación de 0.2 c.c. de extracto de tallo ocular a la concentración de 50 tallos/c.c. Nótese que no hay gran modificación entre los valores del IPP antes y después de la inyección. Las barras verticales indican el error estándar.

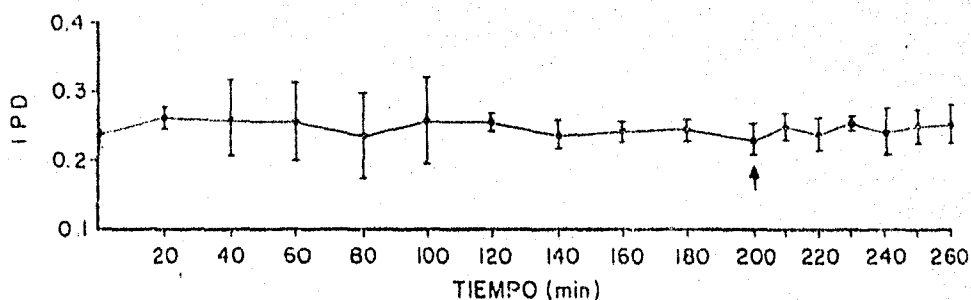


Figura 6.- Cambios en los valores del índice de pigmento distal (IPD) de tallos oculares colocados en la obscuridad sólo interrumpida por destellos luminosos de prueba aplicados cada diez minutos. Las determinaciones del IPD se hicieron cada 20 minutos. La flecha indica el momento de aplicación de 0.2 c.c. de extracto de tallo ocular a la concentración de 50 tallos oculares/c.c. Nótese que no hay gran modificación entre los valores del IPD antes y después de la inyección. Las barras verticales indican el error estándar.

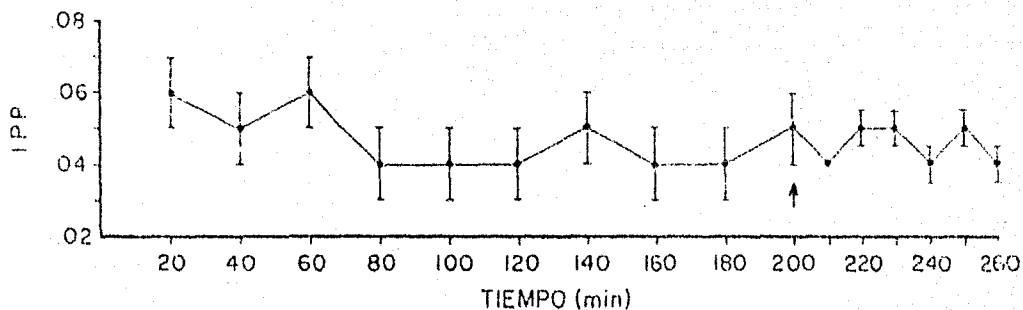


Figura 7.- Cambios en el IPP de tallos oculares colocados en obscuridad constante sólo interrumpida por destellos luminosos de prueba. La flecha indica el momento de aplicación de 0.2 c.c., de extracto de músculo. Las barras verticales indican el error estándar.

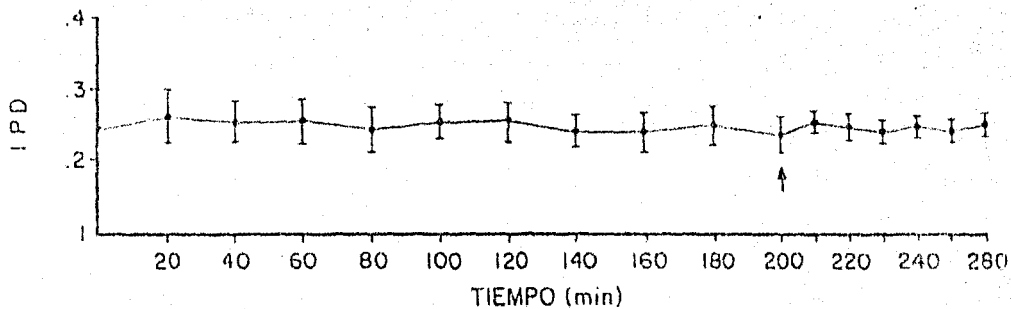


Figura 8.- Cambios en el IPD de tallos oculares colocados en obscuridad constante sólo interrumpida por destellos luminosos de prueba. La flecha indica el momento de aplicación de 0.2 c.c. de extracto de músculo. Las barras verticales indican el error estándar.

LITERATURA CITADA

- Adiyodi, K. G. and R. G. Adiyodi (1970). Endocrine control of reproduction in decapod crustacea. *Biol. Rev.* 45: 121-125.
- Aréchiga, H. y B. Fuentes-Pardo (1974). Influencias hormonales sobre el sistema nervioso del invertebrado. En: Simposio sobre problemas actuales de la Fisiología. Editado por la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas: pp. 261-285.
- Aréchiga, H., B. Fuentes and Barrera (1973). Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: *Neurobiology of invertebrates*. Edited by Sálánky. Tihany, Hungary. pp. 403-421.
- Aréchiga, H. B. Fuentes Pardo and B. Barrera Mesa. (1974). Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latino Amer.* 24: 601-611.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological clocks*. Cold Spring Harbor. Symposium on Quantitative Biology. 25: 11-28.
- Bennett, R. (1924). The migration of the retinal pigment in crustaceans. *J. Exp. Zool.* 40: 381-384.
- Bennett, R. (1932). Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. *Physiological Zool.* 5: 65-72.
- Bliss, D. E., et al. (1966). Water balance in the land crab *Gecarcinus lateralis* during the inter molt cycle. *Amer. Zool.* 6: 197-212.

- Brown, F. A. (1953). Differential Production of two retinal pigment hormones in Palaeomonetes by light flashes. J. Cell. Comp. Physiol. 41: 133-144.
- Brown, F. A., Jr. (1935). Control of pigment migration within the chromatophores of Palaeomonetes. Jour. Exper. Zool. 75: 1-15.
- Brown, F., Hines, M. and Wingerman, U. (1952). Hormonal regulation of the distal retinal pigment of Palaeomonetes. Biol. Bull. 102: 212-225.
- Brown, F. A. (1939). Influence of the Sinus Gland of crustaceans on normal viability and ecdysis. Biol. Bull. Woods Hole. 77: 106-114.
- Brown, F. A., Jr. and Scudamore, H. H. (1940). Differentiation of two principles from the crustacean Sinus Gland. J. Cell. Comp. Physiol. 15: 103-119.
- Bünning, S. (1960). Opening Address: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. On Quant. Biol. Biological Clocks. 25: 1-9.
- Bünsow, R. (1953). Endogene tagesrhythmik und photoeriodismus bei Kalanchoë blossfeldiana. Planta. 42: 220-252.
- Congdon, E. D. (1937). The effect of temperature on the migration of the retinal pigment in decapod crustaceans. J. Exp. Zool. 4: 539-548.
- Day, M. F. (1941). Pigment migration in the eye of the moth Echeastia kuchinella Koller. Biol. Bull. 30: 275.
- De Bruin, G. H. P. and Crisp, D. J. (1957). The influence of pigment migration on vision of "higher crustacea". J. Exp. Biol. 31: 447-463.

- Bemoll, R. (1911). Über die Janderung des Iris pigments
 ism Facellenaugc. Zool. Jahrb. Physiol. 30: 169.
- Erner, S. (1891). Die Physiologie der facettirten Augen
 von krebsen und Insecten, Leipzig and Vienna,
 Deuticke.
- Goodwin (1961). Citado por Kleinholtz (1961).
- Harreveld, A. Van. (1936). A physiological solution for
 freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol.
 Med. 34: 428-432.
- Hanaoka, T. (1950a). The electric response which seems to
 be elicited in a unit receptor of single retina
 of crayfish. Zool. Mag. 59: 226-229. (In Japanese).
- Hanaoka, T. y cols. (1957). Light receptive organellae in
 visual cell and their function. II. Ultrastructure
 of the rhabdom of crayfish visual cell and
 the electric response correlated with its structure. Span. Soc. Cell. Chem. 6: 189-202. (In Japanese).
- Hänstrom, B. (1935). Preliminary report on the probable
 connection between the blood gland and the chromotophores
 activator in decapod crustacea. Proc.
 Nat. Acad. Sci. Washington. 21: 584-585.
- Kanamoto, F. I. and K. Cno. (1969). Neuroendocrine regulation
 of salt and water balance in the crayfish
Procambarus clarki. Comp. Biochem. Physiol. 29:
 393-401.
- Kleinholtz, L. H. (1961). "Pigmentary effectors". In the
 physiology of crustacea (Salzman, T. H. ed).
 Acad. Press. New York. 2: 133-169.

- Kleinholz, L. H. (1934). Eyestalk hormone and movement of the distal retinal pigment in Palaeomonetes. Proc. Nat. Acad. Sci. 20: 659-661.
- Kleinholz, L. H. (1936). Crustacean eyestalk hormone and retinal pigment migration. Biol. Bull. 70: 159-184.
- Kleinholz, L. H. (1941). Effects of eyestalk removal on decapod crustaceans. Zool. 27: 145-149.
- Kleinholz, L. H. (1941). Hormones in crustacea. Biol. Rev. 17: 91-119.
- Kleinholz, L. H. (1949). Responses of the proximal retinal pigment of the isolated crustacean eyestalk to light and darkness. Zoology. 35: 215-217.
- Kleinholz, L. H. (1962). Neurosecretion and crustacean retinal pigment hormonal distribution of the light-adapting hormone. Biol. Bull. 122: 73-85.
- Kleinholz, L. H. and Kimball. (1965). Separation of neurosecretory pigmentary effector hormones of the crustacean eyestalk. Gen. Comp. Endocrinol. 5: 336-341.
- Kleinholz, L. H. (1965). Problems in crustacean. Endocrinology proceedings of the symposium on crustacea. Part. III pp.1029-1037. Indian Biological Association of India.
- Kleinholz, L. H. (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. International Symposium on The Functional Organization of the Compound Eye. Program. Press. First. Ed. pp. 89-93.
- Kleinholz, L. H. (1966). Separation and purification of crustacean eyestalk hormone. Am. Zool. 6: 161-167.

- Kleinholz, L. H. (1970). A progress report on the separation and purification of crustacean neurosecretory pigmentary effector hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 14: 579-588.
- Kleinholz, L. H. and Keller. (1973). Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones. The initial survey. *Gen. Comp. Endocrinol.* 21: 557-564.
- Kleinholz, L. H. (1976). Crustacean neurosecretory hormones: physiological specificity. *Jour. Zool.* 16: 151-166.
- Kiesel, A. (1904). Untersuchungen zur Physiologie des facettierten Auges. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien* 37-139.
- Köller, G. (1928). Versuche über die intratorischen Vorgänge beim Garnelenfarbwechsel. *Zetschr. f. vergl. Physiol.* 3: 601-612.
- Köller, G. (1930). Weitere Untersuchungen über Farbwechsel und Farbwechselhormone bei crangon vulgaris. *Zetschr. f. vergl. Physiol.* 12: 632-667.
- Krebs, W. (1972). The fine structure of the compound eye of Antacus fluviatilis. *Z. Zellforsch.* 133: 399-414.
- Lockwood. (1968). "Aspects of the physiology of crustacea". Oliver and Boyd, Edinburgh and London. 3: 242.
- HILLER, J. H. and Carthon, D. P. (1974). Pigment granule movement in Limulus photoreceptors. *Invest. Ophthalm.* 13: No. 5 401-406.
- Hata, K. and Kuwabara, I. (1956). The component analysis of the erg from the compound eye cambarus. *Kom. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. A.* 2: 75-86.

- Naka, K. and Kuwabara, H. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 36: 51-61.
- Parker, G. H. (1891). The compound eyes in crustaceans. *Bull. U.S. Comp. (Harvard)*. 21: 45-140.
- Parker, G. H. (1895). The retina and optic ganglion in decapods, especially in Libinia. *Witt. Zool. Stat. Neapel.* 12: 1-75.
- Parker, G. H. (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment cells of Palaeomonetes and their relations to the central nervous system. *Bull. Comp. Zool. Harv.* 30: 275-300.
- Parker, G. H. (1932). The movements of the retinal pigment. *Ergeb. Biol.* 2: 233-231.
- Perkins, E. B. (1928). Color changes in crustaceans, especially in Palaeomonetes. *Jour. Exp. Zool.* 50: 71-103.
- Pittendrigh, C. S. (1965). On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: *Circadian clocks - North Holland Publishing Co. Amsterdam*, pp. 277-297.
- Pittendrigh, C. S. (1967). Circadian systems. I. The driving oscillation and its agent in Drosophila melanogaster. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53: 1762-1767.
- Pouchet (1876). Citado por Kleinholz (1936).
- Ruck, P. and Jahn, T. L. (1954). Electrical studies on the compound eye of Libinia occidentalis (Crustacea: Decapoda) *Gen. Physiol.* 21: 825-849.

- Sánchez, J. A. and B. Fuentes-Pardo. (1976). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56: 601-605.
- Schalleck, V. (1942). Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. *J. exp. Zool.* 11: 155-166.
- Stavenga, D. (1971). Adaptation of the compound eye. *Proc. Int. Union Physiol. Sc.* 2: 532. NW Int. Congr. Munich.
- Szczawinska, W. (1890). Contribution à l'étude des yeux de quelques crustacés et recherches expérimentales sur les mouvements du pigment granuleux et des cellules pigmentaires sous l'influence de la lumière et de l'obscurité dans les yeux des crustacés et des arachnides. *Archives de Biol.* 10: 523-566.
- Von Frisch, K. (1968). Studien über die Pigmentverschiebung in Facettenauge. *Biol. Centr.* 23: 662-698.
- Waterman, T. H. (1961). *The Physiology of Crustacea. Sense organs integration and behaviour.* Academic Press. New York. Lond. U.K.
- Welsh, J. H. (1930). The mechanism of migration of the distal pigment cells in the eyes of Palaeomonetes. *Jour. Mar. Zool.* 56: 492-494.
- Welsh, J. H. (1930a). Diurnal rhythms of the distal pigment cells in the eyes of certain crustacea. *Proc. Nat. Sci.* 16: 396-398.
- Welsh, J. H. (1939). The action of the eyestalk extracts on retinal pigment migration in the crayfish Cambarus bartoni. *Staf. Bull.* 77: 119-125.

Welsh, J. H. (1961). The sinus gland 24 hours cycles of mg
linal pigment migration in the crayfish. J. Exp.
Zool. 96: 35-49.