

RITMOS CIRCADICOS EN INVERTEBRADOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JAVIER RAMOS CARVAJAL

1977



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Con mucho cariño para mi madre Eva Carvajal F.

Agradezco la dirección, colaboración y revisión del presente trabajo a la M. en C. Beatriz Fuentes Pardo, Profesora e Investigadora del Depto. de Fisiología de la Facultad de Medicina y Profesora de Fisiología Animal de la Facultad de - Ciencias de la UNAM.

Agradezco al Dr. Alberto Guevara Rojas, Jefe
del Depto. de Fisiología de la Facultad de -
Medicina de la UNAM las facilidades presta--
das para la realización de este trabajo.

Indice

	Pags.
Introducción	1-17
Ritmos Circádicos de Invertebrados	18-51
Mecanismos de Regulación de los Ritmos Circádicos	52-65
Bibliografía	66-85

INTRODUCCION

La ritmicidad circádica es un fenómeno que se presenta en un número - particularmente grande de casos en Biología. Movimientos de hojas y pétalos de plantas, actividad espontánea o provocada en numerosos animales, eclosión de -- larvas de insectos, etc.

Verdaderamente, el sentido del tiempo de animales y vegetales ha sido reconocido por el hombre desde tiempos muy antiguos; originalmente se creía que el proceso de este reconocimiento dependía de que un cierto evento (ingestión - de alimentos, llegada de luz, etc.), desencadenara una serie de reacciones las que al terminar provocarían una señal en estructuras específicas. Actualmente se conocen las ventajas que ha reportado a plantas y animales, el medir el tiempo con fenómenos cíclicos.

Los primeros experimentos reportados acerca de la ritmicidad circádi- ca son los de De Mairan (76) astrónomo que en 1729 comprobó que plantas puestas en condiciones constantes de luz y de temperatura presentaban cambios en el mo- vimiento de las hojas. DuRoi en 1758 (82) y Zim en 1759 (269), reportaron re- sultados similares.

Ya en el siglo XIX De Candolle (75) habla de una "tendencia inherente en las plantas a mostrar movimientos periódicos". Sachs (234, 235), Dutrochet (86) y Hofmeister (128) llegaron a conclusiones similares.

En 1873 Pfeffer hizo experimentos en condiciones constantes de luz -- que le permitieron confirmar la validez de los resultados anteriores (191). Más tarde, en 1875 el mismo Pfeffer (192) contribuyó al conocimiento de los ritmos circádicos estudiando los movimientos de las flores de *Calendula* y de las hojas

de Phaseolus.

Los estudios intensivos que realizó Pfeffer en 1915 sobre las actividades rítmicas relacionadas con el día solar le llevaron a conocer propiedades interesantes de las mismas. Así, comprobó que cuando las plantas se formaban de semillas que habían estado en obscuridad continua mostraban ausencia del movimiento diario de sus hojas el que, sin embargo, era inducido al exponer a las plantas a un breve período de iluminación; si se regresaba a la obscuridad, el ritmo persistía. Por primera vez se hizo aparente la capacidad de sincronización que tienen estos ritmos ya que la posición que reasumían las hojas correspondía al momento del día en el que se había aplicado el estímulo luminoso.

Otra propiedad de los ritmos circádicos que puso este autor de manifiesto es que la duración del ciclo cuando la estructura ha sido colocada en condiciones constantes de luz no es de 24 horas sino de períodos que se aproximan a este valor.

Hasta 1925, sin embargo, no puede hablarse realmente de un reloj fisiológico, idea que por otra parte no ha podido hasta ahora aclararse completamente debido a la fácil confusión que se establece entre el "reloj" y las "manecillas". Hay que hacer notar sin embargo, que ya Darwin, en 1880 había puesto de manifiesto que una de las características de estos ritmos es la de ser hereditarios. En las primeras dos décadas de este siglo se trataba de encontrar el "factor X" supuestamente causante de la periodicidad de estos eventos cuando las condiciones de temperatura y luminosidad permanecían constantes. En 1894 Kiesel (143) describió la persistencia de ciclos de pigmentación de artrópodos en ausencia de cambios de luz.

Otra contribución interesante la hizo Kleinhönte quien en 1929, (147) descubrió que el movimiento diario de las plantas puede inducirse por ciclos ar

tificiales de fases alternantes de luz y obscuridad con duraciones de "días" -- que van desde 18 hasta 30 horas; si estos "días" se alejan de estos límites, -- las plantas regresan a su periodicidad diaria normal a pesar de los ciclos artificiales de luz.

Pfeffer en 1915 (193) concluyó que el período del ritmo debía depender de un mecanismo interno medidor del tiempo y autónomo.

La posición de Pfeffer fué, sin embargo, atacada durante muchos años por Stoppel (239). Este autor sugirió que es la ionización de la atmósfera la que presenta modificaciones diarias en virtud de las cuales en los organismos -- se generan modificaciones en la actividad sin que pueda aceptarse un cambio de carácter endógeno.

Con base en lo anterior se originaron dos corrientes en la investigación sobre los ritmos biológicos: La de los autores que consideran que son los factores externos los responsables de las modificaciones cíclicas de actividad de los organismos (origen exógeno) y la de los que sostienen que estos cambios se originan en el organismo mismo (origen endógeno). Los autores que pertenecen a la primera corriente consideran que el reloj comprende un "sistema abierto" y que la medida del tiempo que persiste en las supuestas condiciones constantes se deriva de una respuesta de los organismos vivos a su medio geofísico rítmico y que los ajustes de frecuencia y de fase que se observan en la ritmicidad circádica no son más que la manifestación de mecanismos adaptativos muy -- finos que posee el organismo para ajustarse a los cambios geofísicos (39, 40, -- 42, 43, 44).

Por su parte, los autores de la segunda corriente sostienen que son -- los organismos los que poseen intrínsecamente la capacidad de oscilar y que las señales externas sólo actúan como sincronizadoras de los elementos oscilantes,

(4, 5, 6, 199, 200, 202, 205). Aproximadamente en la década de los '30 surgió entre algunos autores la duda sobre si los ritmos biológicos son permanentes o no en los organismos. El que se descubriera que la periodicidad cercana a las 24 horas se mantiene a pesar de que previamente se aplicara una gran variedad de patrones de iluminación (4); así como el haber obtenido cambios cíclicos en la actividad de insectos cuyos padres habían permanecido en la oscuridad todo el tiempo (194, 196) y más aún, el observar ritmo de 24 horas en larvas de insectos cuyas 14 generaciones anteriores habían estado en oscuridad constante - confirmó la idea acerca de la transmisibilidad de esta característica y su permanencia en las condiciones más variadas.

Algunos autores, sin embargo, han confundido el reloj con las manecillas, por más que otros han puesto de manifiesto que la clave habría que encontrarla en la observación de los cambios metabólicos que hay atrás de todos los cambios cíclicos registrables.

Las estructuras vivas tienen una gran capacidad de oscilación; es frecuente que esta oscilación no tenga carácter circádico sino que haya desviaciones importantes de las 24 horas; en cualquier caso, es evidente que las oscilaciones son importantes en las células si pensamos que en ellas se pasa de momentos en los que predomina el catabolismo a momentos en los que es el anabolismo lo que prevalece. Según este punto de vista no se requiere adoptar la periodicidad de la rotación de la tierra, aún cuando las ventajas que se obtienen de la sincronización con ella son muy claras; de estos hechos se desprende que los ritmos circádicos pueden haberse generado como una adaptación a la rotación de la tierra a partir de oscilaciones de una gama muy variada de frecuencias, las que aún caracterizan a algunas estructuras inferiores como los hongos.

El principio de un proceso de medición del tiempo consiste en la ini-

ciación de una oscilación diurna; es interesante hacer notar que en plantas y muchos animales inferiores que han sido colocados en la obscuridad o luz constante por períodos prolongados, faltan estas oscilaciones las que, sin embargo, se presentan ante la aplicación de un solo estímulo luminoso. Las condiciones de esta iniciación y la regulación subsiguiente por distintos ciclos de luz y obscuridad han proporcionado mucha información acerca de la naturaleza de la periodicidad circádica.

Los relojes biológicos han sido considerados como la expresión de alteraciones en el estado de macromoléculas; sea o no el caso, lo que sí resulta obvio y ha sido probado experimentalmente es que las oscilaciones dependen de la energía que la célula obtiene de las reacciones de transferencia de energía, aún cuando baste una muy pequeña fracción de esta energía para sostener la actividad oscilante. Sin embargo el mecanismo mediante el cual se puede sostener el cambio periódico en la organización de las macromoléculas permanece desconocido.

Por otra parte se sabe que aún cuando el reloj consista de oscilaciones de naturaleza física, regula muchos procesos bioquímicos y de esta forma de termina la aparición de fenómenos fisiológicos en células y tejidos, fenómenos que se transforman en periódicos. Es evidente que alteraciones en propiedades físicas pueden así regular procesos metabólicos influyendo sobre todo en la actividad enzimática. Se conoce por ejemplo, que la acción enzimática está controlada por el grado de estiramiento de cadenas de proteínas. Sin embargo, siempre es importante recordar que frecuentemente los cambios a los que aludimos son la manifestación de la presencia de un reloj más que el reloj mismo.

La idea de un "reloj maestro" que tiene mecanismos de compensación de la temperatura sugiere una acción de índole biofísico más que de carácter bio-

químico (123), lo que no contradice lo que se conoce hasta ahora sobre el funcionamiento en la célula. Actualmente se ve muy claro el que en el protoplasma se dan las condiciones adecuadas para una transferencia de energía intramolecular debida al transporte de electrones. Estos procesos, a diferencia de aquellos en los que hay movimientos térmicos de moléculas, son insensibles a la temperatura.

Mucha evidencia experimental pone de manifiesto el que el reloj opere por una alternancia de fases de tensión y relajación. Evidentemente es la fase de tensión la que depende de la energía química.

La evidencia de un oscilador independiente de la temperatura la da un buen número de datos experimentales; así, se sabe que si el aporte de energía se reduce por debajo del mínimo requerido para que se de la oscilación normal, aparecen oscilaciones de cortos periodos, notablemente por debajo de las 24 horas. Este hecho podría explicarse como sigue: sólo pueden darse procesos de tensión por periodos cortos ya que al haber un aporte energético bajo, el sistema regresa bruscamente al estado de relajación que le supone bajo consumo de energía. Evidentemente que si la temperatura llegase a 0°C por ejemplo, la oscilación se suspendería completamente y si se volviera a aumentar la temperatura, el efecto que produciría sería el equivalente al de un sincronizador el que sería responsable de activar de nueva cuenta el mecanismo de acción circádico con una acción que dependería importantemente de la hora circádica a la que se aplicara.

Si por otra parte, el "reloj" ha dejado de operar debido a la aplicación constante de luz, por ejemplo, se sabe que una interrupción de esta condición durante cierto tiempo provocaría la reiniciación de la actividad circádica en el sistema. Este hecho también se explica con base a un mecanismo de ten-

sión-relajación.

Tratando de comprender el origen de la oscilación circádica, el hombre ha aplicado diferentes estímulos a los ritmos que analiza, algunos de los cuales producen, a diferencia de los que mencionamos en el párrafo anterior, alargamiento del período circádico. Entre estos factores tenemos la luz roja de 650 por ejemplo (53), la que alarga los períodos entre 2 y 3 horas, el agua deuteriada - (95, 47) el alcohol (96), la papaverina y la nicotina (142), la cicloheximida -- (99) etc.

En ninguno de estos casos, sin embargo, se explica el mecanismo a través del cual se estaría efectuando el cambio de período, lo que hace sea ese uno más de los muchos problemas que hay sin resolver dentro del estudio de los ritmos circádicos.

Hay que hacer notar que la investigación sistemática sobre la ritmicidad circádica puede decirse que empezó a partir de hace sólo 40 años con los trabajos de Kleinhoonte (148). A partir de ese momento muchos otros trabajos sobre ritmicidad han sido reportados como, por ejemplo los estudios de Forsgren sobre el ritmo del glicógeno en el hígado (106), los de Beling (18), Kalmus (139) Birukow (22, 24) y Dingle (80) sobre el sentido del tiempo de los insectos; los de - Welsh (258, 259, 260, 261, 262) Fingerman (102), Hines (126) y Enami (92) sobre los cambios de pigmentos en Crustáceos, los de eclosión de insectos hechos por - Bremer (36), Truman (250), Kalmus (139, 140), Bunning (51), los de Palmer (182) y Cloudisy Thompson (60) sobre actividad locomotora de artrópodos.

Caracterización de los Ritmos Circádicos.

Muchos autores han tratado de caracterizar los ritmos circádicos, aún cuando sólo lo hayan logrado parcialmente. Entre estos autores figuran Aschoff (4) y Pittendrigh (199) como los más importantes ya que la recopilación de datos en

los que destaca la actividad circádica, le llevó al primero a la formulación de las llamadas "reglas circádicas de Aschoff".

Hay que hacer notar que para establecer una periodicidad como endógena, es necesario excluir todo posible "Zeitgeber" (sincronizador). Esto supone trasladar al organismo o estructura a condiciones constantes. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que de antemano es muy difícil conocer cuáles factores ambientales son los que potencialmente podrían considerarse como "Zeitgeber". Al mantener constantes los factores más frecuentes como son la temperatura y la luz suele observarse cualquiera de las siguientes tres posibilidades: a) la periodicidad se suspende súbitamente o se amortigua en muy poco tiempo, b) la periodicidad continúa con una duración de 24 horas exactamente, c) la periodicidad continúa pero ligeramente distinta de las 24 horas.

Los casos a y b, evidentemente no son pruebas concluyentes de que la periodicidad observada tenga carácter endógeno o no, no así el caso c, el que sólo se explica por la presencia de un ritmo generado en el propio organismo (endógeno).

Esta frecuencia espontánea debe poder ser registrada un cierto número de veces para que efectivamente, se le confiera el carácter de período de "actividad o ritmo libre" (free running); hay que hacer notar que el término "espontáneo" tiene aquí un significado comparable al que se utiliza en neurofisiología, es decir es un evento que no depende de la manipulación de algún factor conocido, si bien pone de manifiesto un determinado estado funcional del sistema.

Es entonces la primera característica de un ritmo circádico, la de presentar una frecuencia espontánea, cercana a las 24 horas.

Una segunda característica de los ritmos es la que se refiere a la dependencia que tiene la frecuencia de la intensidad de luz que hay en el medio -

(134).

En general, puede afirmarse que la frecuencia cambia linealmente con respecto al logaritmo de la intensidad luminosa (Figura 1) de manera directa en los organismos diurnos y de manera inversa en los organismos nocturnos.

La frecuencia de la oscilación se mide como el recíproco del período aunque es interesante hacer notar que hay una característica relacionada con la frecuencia de una manera indirecta que suele cambiar dependiendo de la cantidad de luz que reciba el sistema y que es la velocidad de cambio. En otras palabras: en un ciclo hay puntos en los que el ascenso o el descenso se da en períodos mayores o menores que en otros puntos, lo que está hablando de cambios en la velocidad a la que se está dando el proceso (sólo que la curva fuera perfectamente senoidal la velocidad de cambio sería la misma en todo el ciclo). Resulta razonable aceptar que en condiciones ambientales estos cambios de velocidad estén coordinados por la acción del sincronizador externo. Aceptando esto resulta muy evidente que los datos presentados en la figura 1 pueden interpretarse como el que un aumento en la intensidad luminosa tienda a producir un aumento en la velocidad de cambio de los organismos activos de día mientras que la reducción de la velocidad sería la respuesta a la disminución en la intensidad luminosa. El efecto contrario, se ha observado en los organismos nocturnos.

Más aún, si se parte del hecho de que el tiempo de mayor actividad -- coincide con el tiempo de mayor velocidad del sistema, puede hacerse una predicción susceptible a la comprobación experimental: alargando el tiempo de actividad es decir, el tiempo en el que el sistema corre más rápido que durante el -- promedio, el período debe ser más corto. Esto ha sido observado en muchos casos, aún cuando sólo haya datos indirectos que pudieran servir como apoyo a -- ellos (por ejemplo, se sabe que los animales que usan al sol como compás para --

orientarse tienen que calcular el movimiento del sol con una velocidad angular promedio de $15^{\circ}/\text{hr}$. Algunos datos no publicados citados por Aschoff, indican - que peces activos de día calculan más de 15° por hora durante el día y menos du rante la noche).

En condiciones constantes, la frecuencia de oscilación espontánea y - el tiempo de actividad son relativamente fáciles de medir.

Un tercer parámetro cuya medida algunas veces se dificulta un tanto, es el nivel alrededor del cual se presenta la oscilación. Este nivel no es - igual a la amplitud sino que está más bien relacionada con la cantidad total de actividad desarrollada por la estructura en la unidad de tiempo. Este "nivel - de actividad" se ha correlacionado con el consumo de oxígeno el que muchas ve- - ces cambia dependiendo de la frecuencia de oscilación del sistema.

En un buen número de estructuras estudiadas, la frecuencia espontánea, la relación tiempo de actividad/tiempo de reposo (relación α/ρ) y el nivel de excitación, se encuentran correlacionados de tal suerte que un cambio en alguno de ellos supone un cambio en los otros dos. Los cambios, a su vez, dependen de la cantidad de luz que reciba el sistema de tal manera que los animales diurnos aumentan la frecuencia, la relación α/ρ y el nivel de excitación al recibir - más luz y los nocturnos reducen estos tres parámetros ante la misma situación - externa.

El establecimiento de estos hechos y su generalización se conoce como la "regla circádica de Aschoff (4)".

Otro factor relacionado importantemente con la actividad circádica es la temperatura. En general, se acepta que las oscilaciones circádicas presen- - tan mecanismos de compensación de la temperatura por más que no hay ningún - -- acuerdo entre los autores acerca de cuál sea el mecanismo involucrado.

FIGURA-1 FRECUENCIA ESPONTANEA EN LUZ CONSTANTE

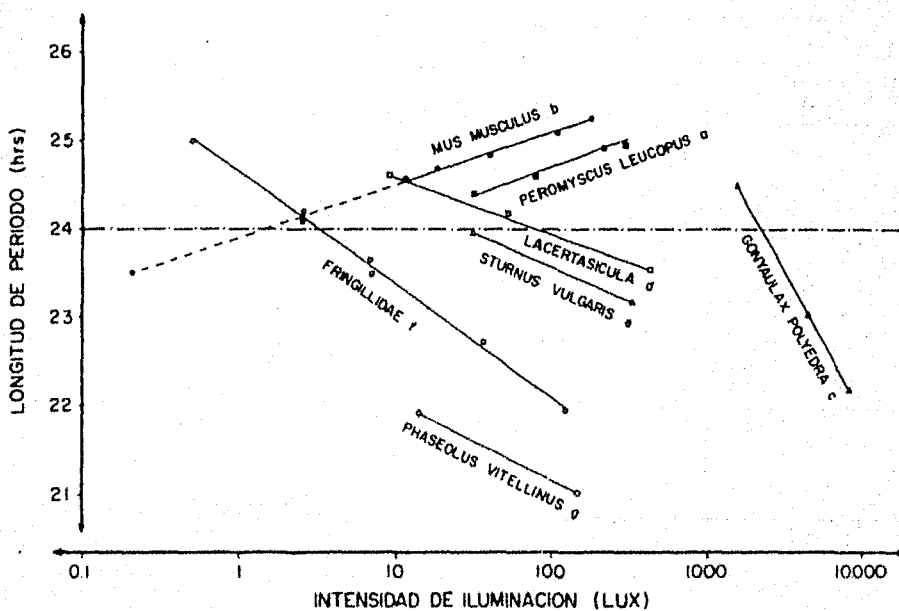


Figura 1. Período circádico espontáneo de diversos organismos en medio ambiente constante, dependiendo de la intensidad de iluminación. Cada punto representa el registro de diferentes individuos y períodos.

a) Actividad; b) Actividad; c) luminiscencia; d) Actividad; e) Actividad; f) Actividad; g) movimiento de hojas

Se ha hablado de mecanismos apropiadamente acoplados de carácter físico-químico que presentasen independencia de la temperatura; de tal suerte que -- mientras una actividad aumentase al aumentar la temperatura (la química), la -- otra (la física), disminuiría ante la misma situación.

Habría que hacer notar que hay cierta dificultad en entender claramente el término de "compensación de temperatura", ya que algunas veces se ha usado como sinónimo de "independiente de la temperatura"; este término deja la impresión de que ningún parámetro de los ritmos se ve afectado por la temperatura lo que, evidentemente, no es cierto ya que este factor afecta algunas características de los ritmos particularmente la amplitud; a esto habría que añadir -- que la temperatura es capaz de modificar incluso la periodicidad de los ritmos cuando se aplica no en el período estable sino durante el transitorio (154) y -- que ha sido señalado también con frecuencia, la posibilidad de que la temperatura actúe como sincronizadora de los ritmos cuando se han aplicado los cambios -- con intervalos fijos (45).

Cualquiera que sea la explicación a estos hechos lo que resulta claro es que la temperatura no afecta importantemente el período circádico cuando el cambio se ha aplicado en la fase estable del ritmo y por tiempos lo suficientemente prolongados como para que el sistema circádico no los interprete como señal periódica.

Una revisión muy completa sobre la acción de la temperatura en los -- ritmos circádicos la presentan Sweeney y Hastings en 1960 (246) y Wilkins en -- 1965 (263).

La acción de la temperatura sobre el período libre:

Sobre el particular Sweeney y Hastings (246) presentan los resultados obtenidos por un considerable número de autores que han trabajado especies ani-

males y vegetales muy variadas que incluyen desde protozoarios hasta mamíferos y desde flagelados hasta fanerógamas; a nosotros en lo particular nos interesan los resultados obtenidos en distintos invertebrados. Ehret en 1959 (89) detectó los efectos de la temperatura sobre la conducta de apareamiento del paramecío y encontró que dentro de la gama de temperaturas explorada (de 17 a 29.5°C) no hay cambios en el período el que se mantiene entre 22 y 23 horas. Al medir la tendencia a expandirse y retraerse que tienen las colonias de las plumas de mar (Carvenularia obesa) Mori en 1960 (159) encontró que no hay ningún efecto que pudiera asociarse a cambios de temperatura entre 20 y 30°C ya que el período mide casi 24 horas en los dos casos. Sin embargo si la temperatura es de 10°C, el período puede alargarse en algunas ocasiones hasta casi 48 horas. Estudios de Brown y Webb en 1948 (38) en el cangrejo violinista (Uca pugnax) y relacionados con los cambios de coloración dependientes de los cromatóforos negros y blancos estudiados separadamente pusieron de manifiesto que el período de este ritmo permanece en valores muy cercanos a las 24 horas aún cuando la temperatura sea variada entre 6 y 26°C. El escarabajo Oncopeltus fasciatus, fué estudiado a propósito del control circádico que se ejerce sobre el crecimiento de la cutícula y la acción que ejerce la temperatura, sobre el ritmo, no encontrándose ningún efecto digno de mención (Dingle y cols., 1969) (81). En cuanto al acocil (Cambarus) Welsh en 1941 (262) reportó una periodicidad de casi 24 horas en el ritmo de migración de los pigmentos retinianos accesorios que se mantiene invariable entre 7 y 21°C.

Hay otros casos en los que los cambios de temperatura parecen realmente afectar la periodicidad circádica como es el reportado por Kalmus en 1938 -- (140) sobre el ritmo de eclosión del saltamontes el cual tiene un período de 24 horas cuando la temperatura es de 22°C y de 72 horas si la temperatura es de --

11°C. El ritmo de eclosión de *Drosophila* sp., fué estudiado por Bunning en - - 1935 a 10, 20 y 30°C (51) encontrando que el período era de 30, 24 y 22 horas - respectivamente (Q10 de 1.1 a 1.25); estos datos sin embargo, fueron puestos en tela de juicio por el trabajo que sobre el mismo ritmo fué hecho por Pittendrigh en 1954 (194) en el que reportó que el Q10 del ritmo al ser estudiado a temperaturas entre 16 y 20°C era de 1.02.

Por otra parte, ya se había mencionado que la temperatura sí es capaz de modificar los ritmos aún cuando para ello se requiere que el cambio térmico tenga características muy precisas de frecuencia y de amplitud así como que se aplique en momentos adecuados del ciclo. Wilkins en 1965 (263) hizo una revisión sobre el particular y divide los casos en los que un cambio de temperatura inicia las oscilaciones en organismos aperiódicos en dos tipos: los que se originan en organismos que han estado en condiciones ambientales uniformes y que - por lo tanto tienen amortiguada la ritmicidad circádica y los de organismos que son transferidos de un medio en el que la temperatura inhibe la ritmicidad a -- otro (con otra temperatura) en el que se manifiesta la oscilación gracias al -- cambio de temperatura. Para el primer caso presenta evidencias en las que un solo estímulo (un cambio aplicado a larvas de *Drosophila*, Pittendrigh 1954) de 16 a 26°C durante 4 horas es suficiente para inducir la aparición de la ritmicidad; en otros casos son estímulos repetitivos los que se requieren, como sucede con el escarabajo *Ptinus tectus* el que reinicia su ritmo de actividad locomotora cuando es expuesto periódicamente a temperaturas de 23 y 17°C (Bentley y - - cols., 1941 (21). Tratándose del ritmo de la cucaracha *Pariplaneta americana* - Cludlsey-Thompson en 1953 (61) y Wilkins en 1960 (264) reportaron que ciclos de temperatura eran capaces de evitar que se suspendiera la ritmicidad circádica - pero no de reiniciarla.

Por lo que se refiere a la iniciación de ritmos en organismos que hubieran estado en condiciones inhibitorias, sólo se ha visto el efecto que han tenido los cambios de temperatura sobre algunos ritmos en vegetales pero no se conoce nada sobre organismos animales.

Sincronización.

Otra característica de los ritmos circádicos es la de presentar sincronización la que se define como el fenómeno por medio del cual una repetición periódica de luz y obscuridad (un ciclo de luz) o de temperatura o de algún otro factor externo menos común, produce un cambio en un ritmo circádico que hace que éste asuma la periodicidad de aquélla; esto hace que haya una relación fija de fase entre el ritmo sincronizado y el ciclo sincronizador. Aunque las posibilidades de sincronización son muy variadas, hay algunos aspectos cualitativos que pueden aceptarse como comunes a la mayoría de los casos. Uno de ellos, es la poca transferencia de energía que hay entre la señal sincronizadora y el oscilador sincronizado; hay sincronizaciones débiles y fuertes dependiendo de la intensidad de la señal sincronizadora y del método de acoplamiento entre ella y el oscilador. El acoplamiento, a su vez, puede ser directo o indirecto. Dos osciladores pueden sincronizarse mutuamente o puede uno sincronizar al otro unilateralmente. Un oscilador puede sincronizarse a la misma frecuencia que el sincronizador o a una frecuencia menor (este caso se llama sincronización por desmultiplicación de frecuencia).

El estudio de la sincronización de los ritmos circádicos es importante porque arroja luz sobre la forma de organización del sistema oscilador fundamental, de ahí que tengamos que analizar (aún cuando brevemente) el efecto de, por lo menos, dos de los sincronizadores más frecuentes; la temperatura y la luz, el estudio de este último, nos llevará al concepto de curva de respuesta de fase, -

lo que resulta particularmente interesante por la posibilidad que se abre de hacer estudios cuantitativos sobre los ritmos circádicos (93, 124, 46 y 8).

Por lo que a los efectos de los ciclos de luz se refiere, hay que hacer notar que el grado de sincronización es muy variable entre los organismos - aunque se acepta que, en general, los organismos más complejos están menos capacitados para sincronizarse a frecuencias que se alejen de las de 24 horas. La fotofracción es también importante obteniéndose por ejemplo que ciclos con 16.4, 19.2, 28.2 y 29.3 horas y con fotofracción de 2/3, producen un ritmo de eclo- sión de *Drosophila* de carácter bimodal, mientras que si la fotofracción es de 1/3 hay sólo un pico si los ciclos son de 16.4 y 19.2 horas y 3 picos cuando -- los ciclos son de 28.2 y 29.3 horas (46).

Por otra parte, si lo que se modifica es la duración de los ciclos -- (22, 23, 24, o 25 horas), las relaciones de fase entre los ciclos sincronizado- res y sincronizados es también distinta en cada caso, lo que nos hace aceptar - estos dos parámetros de los ciclos de luz (período y fotofracción) como los de- terminantes en el fenómeno de la sincronización. De gran importancia resulta - también la amplitud del ciclo sincronizador, o lo que es lo mismo las intensidades absolutas en los tiempos de luz y oscuridad y la relación entre ellos.

Se ha comprobado que la aplicación de pulsos luminosos de caracterís- ticas determinadas a lo largo del ciclo circádico de los organismos, produce en ellos efectos muy variados en lo que a cambios de fase se refiere (201). Si se relaciona en una gráfica tiempo circádico de aplicación del cambio contra los - atrasos o adelantos producidos por el mismo, se obtiene una "curva de respuesta de fase" (199, 202); la proyección unidireccional de esta curva indica el "gra- do de sincronización" de los organismos (93).

Estas curvas dan mucha información sobre los ritmos ya que al anali--

zarlos se puede conocer la diferencia de fase de la respuesta de la oscilación forzada al estímulo así como la fase en la cual el elemento que estimula de la oscilación sincronizadora falla en producir el cambio de período (o de fase) de la oscilación sincronizada necesario para la sincronización. El punto de la -- abscisa en el cual la curva de respuesta tiene un valor igual al período de la oscilación sincronizadora, representa la fase de equilibrio para el elemento -- que estimula de la oscilación sincronizadora.

Sincronización por efecto de la temperatura.

Los ritmos circádicos generalmente pueden ser sincronizados por ci - clos de temperatura de 24 horas, aún cuando han sido empleados muchos otros patrones para la sincronización. Experimentos sobre la eclosión de larvas de -- *Drosophila* (46, 197 y 198) muestran la posibilidad de sincronizar su ritmo circádico presentándose diferencias de fase al comparar los resultados obtenidos en luz u oscuridad constante; así con un ciclo de temperatura y en luz constan - te la eclosión sólo se produce durante pocas horas fuera de las 24 horas del ci - clo mientras que en luz y temperatura constantes las moscas emergen durante las 24 horas con un ritmo continuo aunque diferente al obtenido cuando la situación que prevalece es la de oscuridad.

No todos los "relojes", sin embargo, son sincronizables por ciclos de temperatura, aunque debe hacerse notar que, en general, si se compara la fase - de un ritmo sincronizado por un ciclo de temperatura con la fase de un ritmo -- sincronizado por un ciclo luz-oscuridad la actividad asociada con la mayor tem - peratura es la que corresponde a la de la fase diurna y viceversa.

Finalmente, solo cabe añadir que no hay datos en la literatura que -- pongan de manifiesto la sincronización de los ritmos circádicos por ciclos de - temperatura diferentes a 24 horas, por lo que no cabe hacer sobre este punto de

masiadas generalizaciones.

Además de las características de los ritmos que hemos presentado hasta aquí, (endogenicidad de los ritmos, periodicidad cercana a las 24 horas, dependencia de la intensidad de luz, relación con la temperatura, sincronización), se pueden añadir las siguientes características de los ritmos circádicos (199):

- Los ritmos circádicos son ubicuos en los sistemas vivos, ya que no pueden darse ejemplos en los que los autores hayan buscado sin encontrar alguna ritmicidad circádica.

- Usualmente, los ritmos circádicos son oscilaciones autosostenidas. Este hecho es más evidente en los animales que en las plantas en las que se observa el amortiguamiento de una cierta ritmicidad más fácilmente que en otros organismos. Sin embargo, no podemos saber si la pérdida de la oscilación obedece a una real extinción del ritmo en las células o refleja simplemente una des-sincronización que se manifiesta por la aperiodicidad aludida.

- Los ritmos circádicos son innatos. No obedecen a conducta aprendida o impresa posteriormente a los organismos. Basta considerar que es suficiente un estímulo no periódico (destello luminoso de $1/2000$ s) para desencadenar la actividad rítmica característica de *Drosophila* la que ha podido seguirse hasta por 14 generaciones.

- Los sitios de organización de los ritmos circádicos parecen encontrarse a nivel celular y de organismos en su totalidad. No se han reportado casos en los que el nivel de organización sea subcelular, por ejemplo.

- Hay un alto grado de precisión en los periodos circádicos, o por lo menos en un buen número de casos, se reportan periodos circádicos que cambian menos de dos minutos por día.

- El periodo circádico no es una característica invariable de los in

dividuos; hay una gama de valores dentro de la cual pueden producirse cambios - en el período y que parece ser característica del individuo.

- Algunas especies difieren claramente de otras por lo que se refiere a la gama de valores dentro de los cuales se presentan sus ritmicidades circádicas. Se ha sugerido que las especies nocturnas tienen períodos por debajo de las 24 horas mientras que las diurnas tendrían períodos mayores de 24 horas (en condiciones de oscuridad constante).

- Los períodos circádicos presentan "post-efectos" a la aplicación de un determinado régimen al que se les haya sometido.

- Los ritmos circádicos son sincronizables por una cierta gama de periodicidades ambientales. Evidentemente la luz y la temperatura son los agentes ambientales más claramente asociables con la sincronización y en muchos casos probablemente los únicos.

- La fase de frecuencia espontánea de un ritmo circádico puede ser alterado por perturbaciones únicas de luz o temperatura. El cambio de fase depende de la intensidad y duración del estímulo aplicado y sobre todo, del momento circádico en el que dicho estímulo se aplique.

- Los transitorios siempre preceden el arribo a una nueva etapa "estacionaria" de los ritmos circádicos. Este fenómeno es particularmente claro - cuando, se ha alterado la fase por algún agente perturbador.

- Aún cuando es discutible, una última aseveración puede hacerse: -- los ritmos circádicos no son afectados por perturbaciones químicas.

Ritmos Circádicos de Invertebrados.

Habiendo analizado los aspectos generales de los ritmos circádicos, - es hora ya de entrar en lo que constituye el problema central de esta revisión:

la caracterización de los ritmos circádicos que se han reportado en diferentes especies de invertebrados.

Al revisar la literatura sobre el particular, nos hemos encontrado -- con que de la gran variedad de grupos de invertebrados han sido los Artrópodos los más extensamente estudiados desde el punto de vista de los ritmos circádicos, por lo que serán justamente ellos los que ocupen nuestro interés fundamental. Sin embargo debe hacerse notar que el estudio lo hemos dividido no en función de las especies animales sino más bien de los diferentes ritmos reportados.

En la primera parte de este capítulo nos dedicamos a la exposición de algunos de los mejor comprendidos ritmos circádicos de invertebrados, a continuación de lo cual analizaremos las diferentes hipótesis que se han emitido para explicarse la regulación de la actividad circádica. En el tercer capítulo aludiremos a algunos de los modelos que se han formulado para explicarse algunos aspectos de los ritmos y finalmente en el cuarto y último capítulo plantearemos los principales problemas que quedan aún por resolver dentro del campo de los relojes biológicos así como las perspectivas que dicho campo ofrece a toda persona interesada en la comprensión de uno de los fenómenos más apasionantes de la biología contemporánea.

Un cierto número de protistas han sido estudiados a propósito de la ritmicidad circádica que se observa en las mitosis. Entre ellos, destacan los trabajos sobre Amoeba proteus cuya periodicidad de 24 horas fué evidenciada por James en 1959, Trypanosoma mega y otras especies del mismo género fueron estudiadas por Steinert y Steinert en 1962, encontrándoseles un período entre 18.9 y 19.4 horas. Charakroborty y Das Gupta también en 1962 (57) reportaron un período de 24 horas en la Leishmania donovani. Johnson y James en 1960 (135) encontraron un período de 22.2 horas en Chilomonas paramecium. Englena gracilis

fué estudiado por Cook y James en 1961 y Buetow en 1962 (49), los que reportaron periodos de 19.9 y 22.5 hrs respectivamente. Sweeney y Hastings en 1958 -- (245) reportaron un período de 22.7 horas en la especie Gonyaulax polyedra y finalmente Hirshfield y cols. en 1960 reportaron un período de 24 horas en la especie Blepharisma undulans. En 1964 se reporta (251) que ciclos luz-obscuridad puedan jugar un papel como sincronizadores de las divisiones celulares de Paramecium bursaria especie en la que el mismo autor encuentra que hay un aumento en el número de divisiones durante la fase oscura del ciclo. El que el ritmo persista en condiciones constantes sugiere un "reloj" relacionado con la división celular (48).

Por otra parte, se ha observado que los ciclos de vida de algunos esporozoarios presentan aspectos interesantes asociados con la ritmicidad circádica. El parásito se transmite al vertebrado huésped en la fase del ciclo de esporozoide. Los esporozooides usualmente infectan las células sanguíneas del huésped. Después de algunas divisiones nucleares se fragmentan en nuevas células (merozoides) las que infectan más células y se siguen dividiendo y fragmentando. Es justamente la fragmentación en merozoides la que ocurre periódicamente y diferentes especies de Plasmodium tienen diferentes periodicidades de 24, 48, 72 horas o bien de valores no múltiplos de 24. Se ha propuesto que hay factores endógenos al parásito que determinan la periodicidad y que en la mayoría de los casos, hay también factores exógenos al parásito (y en el huésped) que son los que sincronizan la fragmentación.

El que haya variación en el número de divisiones nucleares entre cada fragmentación ha sugerido el que algún estímulo ajeno al parásito "dispare" la fragmentación. Sin embargo, este mecanismo no explica las periodicidades que no son múltiplos de 24 horas. Otra explicación a este hecho es la que dice que

un estímulo en el huésped es responsable de la iniciación de dos ciclos en cada nuevo merozoide liberado; un ciclo es el de la división nuclear y el otro es el que determina el tiempo de fragmentación. Esta interpretación atribuye la sincronización en la fragmentación a la iniciación del ciclo del merozoide. La -- predominancia de ciclos de 24, 48 y 72 horas podría explicarse en términos de -- ventajas selectivas originadas del hecho de que los gametocitos (las células pa -- rásitas que pueden ser recogidas por el insecto vector) se producen también en el ciclo de fragmentación (48).

En Paramecium aurelia, Karakashian en 1960, 1961 y 1965 ha reportado ritmicidad circádica en la conducta de apareamiento. La conducta sexual de estos organismos se ve grandemente influida por el medio nutritivo. La autora -- considera que la iluminación continua inhibe la ritmicidad sin que se vea por -- ello suspendida la conducta sexual. Animales que fueron transferidos de la con -- dición de luz a la de obscuridad constante readquirieron el carácter circádico siempre que la transferencia se hubiera dado 38 horas después de haber sido ali -- mentados por última vez. En otros casos la ritmicidad circádica se reasumió a las 39, 43 o 55 horas de haber sido transferidos pero no se presentó si el tiem -- po transcurrido era de 35 o de 44 horas. Estas peculiaridades no han sido acia -- radas y la autora sólo sugiere que el tiempo crucial para que se de el reacopia -- miento es a la "mitad" del tiempo de descenso del máximo al mínimo del hipotéti -- co oscilador que se propone. La facilidad con la que el "reloj" se ve desaco -- plado por la acción de la luz puede verse, quizá, como algo excepcional dentro de los sistemas circádicos.

Cultivos de Paramecium multimicronucleatum fueron también estudiados desde el punto de vista de su ritmicidad. Empleando un solo paramocio al que -- sometía a ciclos de 12 horas de luz - 12 horas de obscuridad, Barnett (13) pudo

originar cultivos en donde había un ritmo circádico. Después de 6 días se tenían 121,000 animales. Periódicamente se tomaban muestras para localizar, si las había, parejas de conjugados. Los resultados obtenidos por el autor ponen de manifiesto que los animales pueden ser sincronizados mientras se dividen -- cuando el ritmo aún no se expresa y que cuando tales animales llegan a ser reactivos, la fase del ritmo que expresan refleja la fase del tratamiento con el que fueron sincronizados. Las células ensayadas son la progenie asexual de las células sincronizadas y nunca han sido expuestas a ningún sincronizador. Esto -- significa que el paramecio mide un período circádico en oscuridad continua durante la replicación celular aún cuando ésta tenga un período menor que el circádico. Asimismo puede afirmarse que en esta especie este período es hereditario entre las células que forman un determinado cultivo.

Ritmos Locomotores.

Ritmos de naturaleza circádica y relativos a la actividad motora han sido reportados en un buen número de especies animales. De ellos, mucho se conoce sobre el curso temporal y sus relaciones de fase y muy poco sobre los mecanismos de regulación. Así el trabajo de Kandula Pampapathi y T. Gopalakrishna reddy (213) fué hecho con escorpiones de la especie Heterometrus fulvipes habiendo reportado una modulación circádica en la actividad locomotora con máximo alrededor de las 20 horas y una franca caída alrededor de las 23 horas. Además de los registros de ritmo motor, los autores obtuvieron también, cambios en la actividad eléctrica espontánea del cordón nervioso ventral en franca correlación con la actividad locomotora.

La actividad circádica locomotora del isópodo Excirolana chiltoni ha sido puesta de manifiesto por Enright, principalmente quien en 1971b (96) reportó un ritmo locomotor en estos animales con carácter claramente circádico.

Por su parte, Aréchiga y cols. (2) reportaron en 1973 un claro ritmo locomotor en el acocil Procambarus bouvieri, al registrarse la actividad de las patas ambulatorias en condiciones constantes de luz u oscuridad. Más tarde en 1975 y trabajando con una especie de acocil muy próxima (Procambarus clarkii), Page y Larimer en 1975 (180) señalaron la participación del sistema nervioso en la regulación de ese mismo ritmo (el locomotor).

Utilizando diferentes especies de cangrejos, Palmer en 1971 (182) hace un estudio comparativo de la actividad circádica locomotora en estos animales.

La actividad locomotora de cucarachas fué registrada por J. Nishii - Tsutsuji-Uwo y colaboradores (174), individuos de las especies Periplaneta americana y Leucophaea maderae fueron mantenidos a temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) en ciclos que alternaban 12 horas de luz y 12 de oscuridad, en oscuridad total o en una combinación de estos dos patrones. El método de registro -- fué sugerido por Roberts en 1960 (225), quien utilizó un sistema de poleas que corren y que permiten la inscripción de una señal en un aparato de registro.

Con la ayuda de isótopos radioactivos Lehman (153) midió la actividad locomotora de larvas de Anabolia nervosa (Trichoptera) y encontró que animales de esta especie son activos de día y tienen un ritmo circádico el que, sin embargo, no es tan evidente si los animales se colocan en condiciones de luz constante. Otra técnica que resulta interesante en el registro de la actividad locomotora es la empleada por Jones en 1964 (136) utilizando mosquitos. Resulta interesante sobre todo por el grado de automatización alcanzado que es ideal -- para registros prolongados como son los circádicos.

Por su parte Nayar y Sauerman (165) reportaron un ritmo de actividad del mosquito Aedes taenioshynchus que sugiere una oscilación circádica compara-

ble a la que Jones y cols. (137, 138) y Chiba (60) pusieron de manifiesto en --
Anopheles gambiae y Culex pipiens pallens, respectivamente.

En este trabajo utilizaron un método que consistió en lo siguiente:
colocaron grupos de 200 larvas a 27°C bajo un régimen L: D, 12:12 en comparti--
mentos conteniendo 350 ml de una dilución de 1/10 de agua de mar; las larvas --
fueron alimentadas hasta que el 50% de ellas se convirtieron en pupa. Sólo fue--
ron usadas hembras vírgenes en este estudio; 20 hembras fueron colocadas en ca--
jas a prueba de sonido para hacerles el registro del sonido del vuelo. Los mos--
quitos sobrevivieron dentro de la caja hasta 4 semanas sin que se registraran --
efectos de ninguna especie. Los resultados que obtuvieron pueden resumirse de
la siguiente manera:

a) en el régimen 12:12 la actividad se presenta tanto al apagar como
al encender la luz, lo que forma un "patrón bimodal de respuesta". Este patrón
de actividad persiste con la periodicidad de 23.5 horas que lo caracteriza al --
cambiar el régimen a luz constante u obacuridad constante; b) el ritmo de acti--
vidad se origina en los primeros tiempos del estado adulto y es independiente --
de otros ritmos que pudieran generarse en otros estados del desarrollo; c) este
ritmo del vuelo, se puede sincronizar a otro régimen retrasando el apagado de --
la luz; d) un solo estímulo de menos de doce horas no es efectivo para iniciar
el ritmo circadiano bimodal; e) se puede sincronizar este ritmo a 24 horas den--
tro de ciertos límites de frecuencia del estímulo (desmultiplicación); f) se --
concluye que la bimodalidad que presenta este ritmo es una propiedad del ritmo
circádico que prevalece en esta actividad lo que sugiere el que pueda haber --
otros ritmos de actividad asociados con el vuelo que dependan del mismo ritmo.

Por su parte Danilevsky y colaboradores en 1970 (72) hicieron una ex--
tensa revisión sobre los ritmos biológicos de los artrópodos.

La actividad locomotora del escarabajo Trogoderma labrum (59) del -- termita Porcellio scaber (77) y del milípedo Arthrosphaera delayi (183), se caracteriza por tener dos picos de actividad: uno al momento en que se enciende y otro al momento en que se apaga la luz. Es curioso hacer notar que basta cambiar algún factor ambiental como la temperatura, por ejemplo, para que el ritmo locomotor cambie de monofásico a bifásico. El cangrejo Carcinus (166) es un caso en el que este fenómeno se presenta siendo suficiente una modificación de 5 a 10°C de temperatura ambiental. Otro caso lo presentan los escarabajos de la especie Calandra granaria (23) los que en un régimen 12:12 muestran sólo un pico de actividad a medio día, mientras que con cualquier otro régimen luminoso se torna bifásico. También los cambios estacionales parecen influir en la aparición de uno o dos picos, como se infiere de los reportes hechos sobre distintas especies de moscas (247) y escarabajos (176, 255, 256).

Los valores de la periodicidad circádica que se han reportado para -- los artrópodos fluctúan entre 21.5 y 27.5 horas, dependiendo de la cantidad de luz ambiental. Hay datos sin embargo, que sugieren el que la regla de Aschoff referente a la acción de la luz sobre la periodicidad circádica, no se cumple en muchos artrópodos.

Azaryan y Tyshchenko en 1970 (7) presentan registros obtenidos de la actividad motora del grillo (Gryllus domesticus L.) en los que puede verse claramente un ritmo de actividad con un máximo durante la noche. Los actogramas que presenta muestran también cómo la actividad motora está sincronizada con el ritmo de iluminación que se presente (8, 16 y 18 horas de iluminación por día) de tal manera que el máximo de actividad se alcanza poco antes (en "días largos") o poco después de que la luz se apague (en "días cortos"). Estos hechos ponen de manifiesto un incremento en el ángulo de fase positivo entre el pico -

del ritmo y la transición de luz a oscuridad cuando la longitud del día se ha aumentado. Los mismos autores reportan también otros casos observados en animales de la misma especie que le permiten concluir que se comportan como "activos de día". Finalmente concluyen que la oscilación es endógena ya que se obtuvo - en animales que habían sido seguidos durante algunas generaciones, manifestándose se tanto en luz como en oscuridad continua, aún cuando el período sea diferente en cada caso: de 22 horas en la oscuridad y de 26 horas en la luz.

En la misma especie de grillos, Nowosielski y Patton en 1963 (177) reportaron cambios periódicos en la actividad locomotora en registros que se mantenían por más de tres semanas. En 1969, Cymborowsky (63) reportó un ritmo circádico en la actividad locomotora del grillo Acheta domesticus L., el que fué - estudiado en cultivos que incluían desde huevecillos hasta imagos en condiciones de luz constante primero y a regímenes de luz-oscuridad después; el registro se hacía por medio de un actógrafo. En condiciones de luz constante, no -- hay ritmo el que se presenta muy claramente bimodal al ser sometidos los animales al régimen L:D. Este ritmo fué registrado durante dos semanas después de - las cuales se observaron cambios en el patrón de respuesta. El autor concluye que el grillo es un animal nocturno aún en condiciones de laboratorio.

En una serie de artículos, Brady (26, 27, 28, 29, 30, 31 y 33) reseña los resultados de registrar la actividad motora de la cucaracha (Periplaneta americana). El autor colocaba sus animales en un tanque en el que había alimento suficiente y que estaba a 28°C. En una primera etapa el tanque estaba expuesto a la luz natural para después mantener un régimen de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad (12:12), con la transición de luz a oscuridad a las 12 horas. Sólo usó adultos machos. La actividad era recogida en cajas con fotoceldas y actógrafos; los registros obtenidos pusieron claramente de manifiesto un

ritmo circádico en la actividad locomotora, el que se afecta importantemente -- cuando se introduce una serie de manipulaciones entre las que destacan: la decapitación, la cauterización de las células neurosecretoras del ganglio subesofágico in situ, el corte de las comisuras circumesofágicas y el corte de las fibras conectivas procedentes del ganglio post-subesofágico. Con maniobras experimentales comparables Cymborowski y cols. en 1970 (70) y Dutkowsky y Cymborowski en 1971 (84) obtuvieron conclusiones muy interesantes sobre los posibles mecanismos de regulación de los ritmos circádicos aludidos.

En otro artículo el mismo Brady (30) hace una revisión muy extensa acerca de la fisiología de los ritmos circádicos en insectos. Así, alude a la dificultad de interpretación que suelen dejar algunos ritmos locomotores, ya -- que al ser esta actividad una manifestación conductual, se puede asociar con -- múltiples estímulos endógenos que quedarían modulados por el "reloj" que hubiera sido activado por ellos.

Por su parte, Ball en 1965, 1971, 1972 y 1973 (9, 10, 11 y 12) también estudió la actividad locomotora de cucaracha (Braherus craniifer) sólo que con la pretensión de localizar el sitio en el que se originaría la sincronización del ritmo que suele observarse asociada con la iluminación aplicada a este animal.

De todas formas se considera que, efectivamente, la actividad locomotora del insecto es la manifestación de un reloj interno (Roberts, 1962 (266); Jones y cols. 1967 (137). Estos autores reportaron actividad locomotora bimodal con actividad en el "amanecer" y en el "anocheecer" subjetivos en la cucaracha y en el mosquito Anopheles respectivamente. Nayar y Sauerman (165) en una serie de trabajos publicados sobre el origen de la actividad rítmica en poblaciones de mosquitos (Aedes taenioshynchus) encontraron que el ciclo bimodal --

que caracteriza la actividad motora de estos animales es algo más que la manifestación de un cambio cinético a la luz, correspondiendo realmente a cambios endógenos que se presentan en condiciones constantes. Roberts (225) encuentra a su vez que en las cucarachas los ciclos bimodales son mucho más claros en condiciones de luz que de obscuridad constante. Por otra parte se sabe que la mosca tsetsé Glossina morsitans (32) restringe su locomoción a vuelos breves de un minuto separados por grandes intervalos; en períodos de doce horas de luz menos de ocho de esos períodos de actividad fueron registrados; No obstante, también se sabe que pueden registrarse esos períodos en condiciones de obscuridad constante, conclusión a la que se llegó sólo después de haber obtenido la actividad promedio de muchas de estas moscas. Cambios diurnos en la actividad de la lombriz Lumbricus terrestris, fueron puestos de manifiesto a través de los trabajos de Johnson en 1971 y Ralph en 1957 (212).

Una variante de la actividad locomotora, la encontramos en la geotaxia negativa y positiva que presenta la especie Sitophilus granarius (Callandra granaria) estudiado por Birukow en 1964 (23). Esta actividad presenta un ritmo -- circádico sólo en condiciones de cultivo desfavorables, lo que se ha interpretado como una suerte de respuesta migratoria a las dificultades ambientales. Otra modalidad de actividad motora la encontramos en la estridulación. Este movimiento ha sido estudiado en grillos por Loher (156) y Dumortier (83); este último en su trabajo incluye también el estudio que hizo sobre el sitio de entrada de la luz como elemento sincronizador del ritmo. Por estar asociado con cierta clase de movimientos puede incluirse entre estos ritmos el reportado por Loher y Chandrashekar en 1970 (157) acerca del carácter circádico de la oviposición del saltamontes Chorthippus curtipennis.

Otro aspecto también interesante, es el que se presenta en los anima-

les con tendencia a migrar grandes distancias aún cuando la relación entre ritmos locomotores y migración no se ha establecido claramente. Algunos autores - (Caldwell y Dingle, 1967 (54); Dingle, 1968 (79) y Edney, 1973 (87)) reportan una actividad circádica en el escarabajo del género Oncopeltus y en la langosta Locusta migratoria, respectivamente, mientras que en Schistocerca gregaria, Odhiambo en 1966 (179) reporta no haber encontrado tal actividad. Otros ritmos locomotores han sido también reportados en insectos. Eidman en 1956 reportó -- que el ritmo en oscuridad constante de Carausius no se alteró por la extirpación del copora allata; Fingerman y cols. en 1958 (105) observó la ritmicidad circádica del saltamontes (Romalea) y comprobó que no se suspendió después de la remoción de todo el ganglio cerebroides.

Muller en 1965 (160), concluyó que hay cambios rítmicos en la actividad locomotora de las ninfas de Baltes rhodani, coincidiendo con lo expresado por Harker en 1953 (113).

Entre los autores que más han estudiado la actividad locomotora, destacan Harker y Roberts. Harker (114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 y 121) fué la iniciadora de una serie de trabajos en los que el tema central era la periodicidad que podía observarse en la actividad locomotora de la cucaracha (Periplaneta americana y Blatta orientalis) y los factores de los que dependía. La autora reportó cambios circádicos de la actividad lo mismo en el ambiente natural que en condiciones de laboratorio. Esta actividad se caracteriza por trenes de actividad en la primera parte de la noche sobre todo poco antes de la medianoche y un período de silencio en la última parte de la noche y durante el día; este ritmo desaparece si los animales son colocados en luz constante, observándose que en estas condiciones la actividad se vuelve azarosa. A su vez, Roberts, (227, 228, 229, 230, 231 y 232) repite buena parte del trabajo de Harker

y si bien encuentra una ritmicidad circádica en estas especies, le es imposible corroborar el papel que Harker había propuesto que tenían algunas estructuras - del sistema nervioso en la ritmicidad circádica.

También Roberts T.W. en 1942 (233) estudió el ritmo locomotor de algunos crustáceos decápodos encontrando que su mantenimiento dependía en buena parte de la integridad del sistema nervioso central. Algo semejante fué propuesto por Kalmus en 1938 y Schallek en 1942 (236) trabajando con el acocil del género Cambarus. Sin embargo, Bliss en 1962 (25) después de estudiar el ritmo locomotor del cangrejo Gecarcinus, reportó que la periodicidad se mantiene en algunas ocasiones después de la extirpación de los tallos oculares, aún cuando se producen cambios en la frecuencia libre, la que de 24 horas 12 minutos, pasa a 22 horas 42 minutos. También en Crustaceos Bregazzi (34) y Bregazzi y Naylor (35) - registraron el efecto de las bajas temperaturas sobre el ritmo locomotor del anfípodo Talitrus saltator, demostrando que se produce un atraso en los períodos de actividad, como resultado de la aplicación de bajas temperaturas; este cambio depende importantemente de la hora a la que se haya aplicado el cambio.

Rítmicos Asociados con el Desarrollo Embrionario.

Las relaciones entre ontogenia y ritmicidad circádica incluyen una gran variedad de fenómenos aún cuando puedan incluirse en dos grandes grupos: la relación que ejercen los ritmos circádicos sobre el desarrollo ontogénico y la relación que ejerce el desarrollo ontogénico sobre los ritmos circádicos. El primer aspecto comprende ritmos diurnos de divisiones celulares y de crecimiento celular, ritmo diurno de maduración y aparición periódica de algunas etapas del desarrollo como eclosión, muda o emergencia. El segundo aspecto se refiere a la acción de algunos cambios circádicos en el curso de la ontogenia. A propó

sito del segundo aspecto Rensling (216) resume los efectos del desarrollo sobre los parámetros cíclicos, después de haber hecho una revisión de la literatura desde principios del siglo. Los datos referentes a Invertebrados se incluyen en la tabla No. 1 (tomada de Rensling, 1965 a y b) (216, 217).

TABLA No. 1

Especie	Autor	Función	Cambio	Longitud Período	Angulo de fase	Nivel	Patrón	c/p
<u>Tylozgrami-</u> <u>latus</u>	Ondo, 1954	Act. Loco motora	aumento	---	retraso	---	---	dismi nución
<u>Gecarcinus</u> <u>lateralis</u>	Bliss, 1962 (25)	"	---	---	---	cambios cíclicos	---	---
<u>Carausius</u> <u>morosus</u>	Eidmann, 1956 (91)	"	aumento	---	---	disminu- ción	uni a bi modal	dismi nución
<u>Velia</u> <u>caprai</u>	Rensling, 1961 (214)	"	aumento	---	---	disminu- ción	---	dismi nución
<u>Gryllus</u> <u>domesticus</u>	Nowosielski y Patton, 1963 (177)	"	aumento	---	---	aumento	---	aumento

De esta tabla se puede concluir que los ritmos circádicos tienden a aumentar su rango conforme aumenta el desarrollo embrionario lo que pudiera deberse al desarrollo de sistemas inhibitorios que actuarían a nivel celular u hormonal aún cuando no se descarta la posibilidad de que en la edad adulta estuviera sincronizado un mayor número de ritmos. Otra duda que se presenta después del análisis de estos datos es si hay en el metabolismo de los organismos un cambio paralelo al que se observa en los valores circádicos durante el desarrollo ontogenético.

Entre los ejemplos de ritmos circádicos durante el desarrollo embrionario, podemos citar algunos de los mejor establecidos en los insectos: Nielsen y Haeger en 1954 (171) reportaron que la formación del pupario y la pupación de Aedes Taeniorhynchus Wied., se hace por la noche. A su vez Rensing (216, 217) construye otra tabla en la que incluye los datos obtenidos hasta 1965 acerca de la actividad circádica de algunas especies de insectos; esta tabla la reproducimos (modificada) a continuación:

TABLA No. II

Especie	Familia	Autor	Tiempo	Fenómeno
<u>Aedes Taeniorhynchus</u> Wied.	Dip.	Nielsen y Haeger 1954	noche	Formación del pupario y pupación
<u>Coleopa frigida</u>	Dip.	Remmert, 1961	mañana	"
<u>Drosophila melanogaster</u> Meig.	Dip.	Rensing, no publ.	noche	"
<u>Culex.</u>	Dip.	Goray, no publ.	noche	"
<u>Ascia monuste</u>	Lep.	Nielsen, 1961	tarde	"

TABLA II (continuación)

Especie	Familia	Autor	Tiempo	Fenómeno
<u>Aphis fabae</u> Scop	Hemip.	Johnson y cols. 1957	mañana	muda
<u>Carausius morosus</u> L.	Orthop.	Kalmus, 1938	noche	"
<u>Drosophila</u>	Dip.	Kalmus, 1938	mañana	eclosión
<u>Pectniophora gossypiella</u> Saunders	Lep.	Minis, no publ.	mañana	"
<u>Bombyx mori</u> L.	Lep.	Tanaka, 1961	mañana	"

Posteriormente a esta revisión aparecieron algunas otras en las que se detallan aspectos del desarrollo embrionario que se modifican bajo la influencia de una oscilación circádica. Así, por ejemplo, Minis y Pittendrigh en 1968 (158) reportan que la polilla Pectniophora gossypiella está sujeta a una diapausa inducible en el cuarto estado larvario, la que puede observarse claramente en condiciones de laboratorio. Los grupos de huevecillos o de larvas, eran mantenidos a 26°C y sometidos a ciclos de catorce horas de luz por diez de oscuridad (L:D 14:10); los huevecillos eran recogidos en cajas de lucita y alimentados con agua azucarada. Cada noche eran dejados algunos miles de ellos sobre papeles colocados expresamente con ese fin. La embriogénesis termina alrededor de 9 días después y a partir de ese momento se presenta el 1er. estado larvario. Este se presentaba arrítmico si había luz u oscuridad constante, y más rápidamente en aquella que en ésta condición. Si la condición era de ciclos de luz-obscuridad (L:D 12:12) se observaba que la primera muda se presentaba en paquetes discretos, uno cada día, con la mediana de cada distribución muy cerca de la hora del amanecer. Si se cambiaba el patrón de estimulación luminosa podía observarse que hay cambios en la ritmicidad de la emergencia, lo que habla claramente en favor de un ritmo circádico inducido; más aún, al aplicarse un tran-

sitorio de luz a oscuridad, un solo pulso luminoso de 15 minutos o un solo pulso de temperatura de 28°C, se inducía la ritmicidad circádica en las poblaciones estudiadas siempre que estos cambios se hubieran aplicado a partir de la segunda mitad del desarrollo embrionario; los autores hicieron notar que justamente en ese tiempo, aparece en el embrión una mancha rosácea que pudiera ser el sitio de entrada para la información requerida para que el ritmo se manifieste.

También en 1967 Nayar (162) reportó un ritmo diurno endógeno que afecta la población del mosquito Aedes taeniorhynchus y que se manifiesta por la salida de las larvas a intervalos cercanos a las veinticuatro horas (21 horas 57 minutos), pero que pueden afectarse por los regímenes de iluminación o temperatura aplicados. Así, en condiciones de L:D 12:12, el período es de 22 horas 28 minutos y puede seguir cambiando si se aplican señales luminosas únicas (sincronizadores). Los cambios de temperatura que aplica el autor en diferentes momentos circádicos, también afectan el ritmo presentándose el máximo de emergencia durante la fase del ciclo en la que haya mayor temperatura. Estos datos así como los obtenidos en 1968 (163) le permitieron al autor insistir en el origen endógeno de este ritmo el que, por otra parte, ya había sido reportado por Nielsen y Haeger en 1954 (171).

En 1970 Truman y Riddiford (249) reportaron la salida circádica de la última etapa larvaria de insectos de las especies Hyalophora cecropia, Antheraea polyphemus y Antheraea pernyi. Esta ecdisis dependía importantemente del régimen L:D que hubieran utilizado los autores así como de la especie de la que se tratara.

También muy importantes resultan los trabajos de Pittendrigh y cols. (195, 203, 204, 207) así como de Brett (37), Chandrasekaran (58) y Zimmerman (267, 268) y Barker (122) sobre la ritmicidad circádica de la eclosión de Drosophila

phila pseudo obscura y Drosophila melanogaster especies que tienen un período - de 22 horas 20 minutos con picos de emergencia justo antes del amanecer. Este ritmo ha sido manipulado ampliamente comprobándose a través de tales manifestaciones el carácter circádico y endógeno del fenómeno. De una manera también -- muy clara este ritmo ha sido utilizado para poner de manifiesto el fenómeno de la sincronización de las oscilaciones circádicas habiendo sido también utilizado como base para algunos de los modelos matemáticos más populares sobre este -- tópico (ver la revisión que hizo Pavlidis en 1973 (190)).

Un ritmo similar al descrito para la eclosión de Drosophila fué reportado por Chandrasekaran y Iohar en 1969 (58) quienes lo obtenían al transferir pupas arrítmicas de la situación de oscuridad constante a la luz constante - - (D D $\rightarrow$ L L), sólo que este ritmo se amortiguaba muy rápidamente.

La diapansa ha sido considerada como el resultado de que se conjuguen una serie de factores ambientales: temperatura, cantidad de luz y disponibilidad de alimentos entre otros. Algunos autores consideran que el control de esta -- función depende fundamentalmente de una actividad circádica regida a su vez por las neurosecreciones del animal (Harker, 1961 (121); Danilevsky et al. (72)) -- mientras que otros le confieren a esta función un carácter más bien ecológico, lo que hace que se excluya la ritmicidad circádica (de Wilde, 1962 (78)). Sin embargo ambos puntos de vista no tienen que ser necesariamente excluyentes ya -- que puede afirmarse con base a una gran cantidad de evidencia experimental, que los "ritmos ecológicos" son el resultado de fenómenos múltiples entre los que -- quedan incluidas las oscilaciones endógenas circádicas.

Aún antes de que se lleve a efecto la oviposición, el desarrollo de -- los huevecillos dentro de la hembra del grillo tiene un carácter rítmico (Dutko wski y Cymborowski, 1971 (84)) presentándose claros cambios en la síntesis de --

RNA que se lleva a cabo en el epitelio folicular de los grillos. Como otras -- etapas del desarrollo están claramente acopladas por relojes circádicos, puede esperarse que la expulsión de los huevecillos tuviera también este carácter; de hecho esto ha sido observado por Minis y Pittendrigh (158), Pittendrigh y Minis (206) y Pittendrigh y cols. (208) en *Pectinophora*.

La ecdisis larvaria de *Aedes* es sincronizable por pulsos luminosos -- aplicados a distintos tiempos del período de obscuridad (Nayar, 1968 (163)). -- Situaciones ambientales como la falta de alimento, la alta salinidad y el número excesivo de larvas, dieron como resultado una aceleración en el proceso de -- desarrollo larvario, de tal suerte que se produjeron hasta siete picos en la pupación asociados con un solo día de postura de huevecillos; también se observó que estos factores eran capaces de sincronizar el ritmo de tal manera que el período quedó indistinguible de 24 horas. En otro trabajo Nayar y Saverman en -- 1970 (164) encontraron claros signos de ritmos de pupación en sólo algunas de las especies de mosquitos que estudiaron.

Otro caso de ritmicidad circádica en la eclosión de larvas es el que reportan Dean y colaboradores en 1968 (73) en la mosca tse-tse así como uno muy interesante estudiado por Neumann en 1971 (a) y 1971 (b) (169, 170) en la especie *Clunio marinus*. Este ritmo de emergencia es circádico pero también se ha -- asociado con las mareas y la luna. El autor lo describe de la siguiente manera: esta especie transcurre sus etapas larvaria y pupal entre las algas rojas que -- hay en la zona de mareas de algunas playas europeas. Los adultos emergen cuando la marea está baja y viven sólo dos horas durante las cuales deben aparearse y poner sus huevecillos pues la marea al avanzar tiende a cubrirlos íntegramente. La especie tiene muchas razas que difieren entre sí por las horas a las cuales se presentan sus ritmos de emergencia, los que están claramente sincronizados a

las horas en las que se dan los cambios de marea. Así, por ejemplo, la raza -- presente en la costa vasca tiene su pico de emergencia a las 18:30 horas locales, mientras que la raza normanda emerge alrededor de las 14:00 horas. Cuando se cruzan entre sí especímenes de ambas razas, el pico de emergencia se presenta a las 16:00 hrs, lo que sugiere un control genético a través de la posible participación de algunos caracteres cuantitativos. Las razas del sur presentan esta periodicidad diaria con carácter circádico observándose su ritmo libre en condiciones de luz constante; en el ártico donde la larva habita en zonas intermareales la emergencia es estrictamente de marea (12 horas 24 minutos); en el laboratorio bajo un régimen L:D 16:8, la emergencia se presenta diariamente, -- diez horas después del amanecer; en luz u oscuridad constante, no se detecta -- ritmicidad alguna. Los autores sostienen que esta raza ha perdido su acoplamiento circádico presentando en ocasiones la emergencia de acuerdo al tiempo en el que previamente hubieran estado sometidos los sujetos a la marea baja.

En algunas razas europeas de Clunio, la situación se complica debido a que la larva vive en el agua baja, mientras que los sitios donde se alimenta quedan expuestos a las mareas de primavera. Esta circunstancia hace que su ritmo de emergencia se produzca al día 15 (14.7 exactamente) del ciclo semilunar -- mientras que con ciclos de luz-oscuridad de laboratorio emergen con una periodicidad de 15 días. Este ritmo semilunar se sincroniza de una manera diferente en cada raza ya que a las del norte de Europa, por ejemplo, basta aplicarles un pulso luminoso débil (que simule la luz de la luna) para sincronizarlos, mientras que las del sur requieren específicamente de pulsos luminosos y de cambios mecánicos para poner de manifiesto un cambio circádico.

Con estos datos Neumann sugirió la existencia de dos relojes: uno circádico y otro semilunar; el primero parece inobjetable; sobre el segundo surgen

dudas ya que esta periodicidad no se presenta a menos que los animales estén sometidos a un régimen de 24 horas de luz y 24 horas de obscuridad; es posible -- que la emergencia cada quince días obedezca a la capacidad de estos animales para contar quince días desde una salida hasta la siguiente, lo que no es lo mismo que una acción producida por la influencia de un reloj circádico.

Rítmicos Circádicos Fisiológicos.

Bajo este rubro hemos incluido una serie de cambios circádicos que -- han sido reportados en distintos grupos de invertebrados y que afectan de una -- manera o de otra el metabolismo de estos organismos.

Es de esperarse, que los cambios metabólicos no se presenten desligados de otros sino que, por lo contrario, se relacionen de alguna manera con la actividad circádica de otros sistemas, particularmente el motor. Se ha demostrado, por ejemplo, que el chapulín Romalea microptera (Fingerman y cols. 1958 (105)), el acocil Cambarellus shufeldtii (Fingerman 1955 a (100)) la cucaracha Periplaneta americana (Janda y Mrciak, 1957 citado por Brady (133)), tienen el pico de consumo de oxígeno máximo coincidente con la máxima actividad locomotora. Similarmente en otra cucaracha (Blattella germanica (Beck, 1963) (15) el pico mayor de consumo de oxígeno se produce en la 1a. o 2a. hora de permanencia en la obscuridad que es el tiempo en el que el animal está en plena actividad motora. Sin embargo, el carácter circádico del ritmo de consumo de oxígeno fué demostrado mucho más tarde en 1969 cuando Richards lo puso de manifiesto con registros obtenidos de cucarachas puestas en obscuridad constante (224). Se encontró también que este ritmo tiende a amortiguarse rápidamente desapareciendo hacia el séptimo día, lo que hace interesante el registro simultáneo de este ritmo y el locomotor puesto que de éste se reporta una ritmicidad más allá de algunas sema

nas; la correlación en estas circunstancias no ha sido establecida. En Blate--lla tampoco ha sido fácil establecer la relación entre nivel metabólico y la actividad locomotora ya que el consumo de oxígeno se inicia a un nivel muy bajo - después del "amanecer" y aumenta muy bruscamente hacia el "anocheecer", durante un período en el que casi no hay actividad locomotora según lo estableció Beck en 1963 (15). El mismo autor sostiene en otra publicación la opinión de que el ritmo de consumo de oxígeno tiene una periodicidad de 8 horas; a su vez Richards y Halberg en 1964 (223) no dan indicación de ninguno de estos cambios en registros de Periplaneta que duraron hasta 13 días.

El consumo de oxígeno en las diferentes etapas del desarrollo larva--rio ha sido otro aspecto también estudiado por algunos autores. Entre ellos -- Rensing en 1966 (219) trabajando con Drosophila melanogaster, estudió la rela--ción del adulto que había sido estudiada por Belcher y Brett en 1973 (17) y el nivel de consumo de oxígeno estudiado por él mismo. Encontró que en condicio--nes de L:D de 12:12 el tercer estado larvario y la pre-pupa tienen niveles de - consumo de oxígeno claramente bimodales con mínimos alrededor del "amanecer" y del "anocheecer" y máximos cerca del medio día y de la medianoche. Estas rela--ciones de fase se invierten completamente en la vida adulta conservándose, sin embargo, el ritmo bimodal de actividad. (Hardeland y Stange en 1971 (112)).

En otra especie de Dípteros, el mosquito Culex pipiens, el consumo de oxígeno máximo se presenta alrededor del amanecer y del anocheecer subjetivos -- persistiendo por lo menos durante el primer día de luz constante (Buffington, 1968 (50)).

El ritmo respiratorio de Drosophila es susceptible a la manipulación por medio del fotoperíodo, observándose que en L:D de 20:4 el pico asociado con el "anocheecer" es de alrededor de 3 horas y el mínimo nocturno se presenta 9 ho

ras más tarde que en condiciones 12:12 (Rensing, 1966 (219)). En condiciones de oscuridad constante persiste el ritmo bimodal mucho más claramente que si la condición es luz constante (Leclerc y cols. 1961 (151)).

Otros ritmos no necesariamente circádicos reflejan sus requerimientos metabólicos a través de cambios en el consumo de oxígeno del que se reportan periodicidades muy variadas, entre 0.8 y 3 horas como el de cucaracha, por ejemplo (Richards y Halberg, 1964 (223)).

En la especie Tenebrio molitor, Campbell encontró un ritmo de 5 horas, aproximadamente (Campbell, 1964 (55)), mientras que Wilkins en 1960 (264)) reportó un ritmo de menos de una hora que no tiene compensación de temperatura. Sobre los ritmos aludidos en el párrafo anterior los autores no indican si hay o no características circádicas.

Un ritmo de 8 horas se presenta en el lepidoptero Ostrinia nubilalis (Beck, 1964 (16)) así como en la larva de Laspeyresia pomonella (Hayes y cols. 1972 (125)). En ninguno de estos dos casos los autores dan datos que permitan aceptar en estos ritmos un verdadero carácter circádico (aunque trimodal) ya -- que no hay una "actividad libre", aún cuando persistan en condiciones de oscuridad constante. Mori en 1960 (159) hizo determinaciones en la concentración de hidrogeniones, el consumo de oxígeno, el contenido de bióxido de carbono, el contenido de NH_3 - N de la sangre y de glicógeno del cuerpo de la pluma de mar Cavernularia obesa y encontró cambios cíclicos que presentan las características de los ritmos circádicos más importantes.

En el crustáceo Hippolyte varians Gamble y Keeble en 1900 (110) estudiaron la frecuencia respiratoria observando un aumento de la misma durante la noche coincidente con la fase de cambio de color que los caracteriza.

Por su parte Gompel en 1937 (111) hizo determinaciones del consumo de

oxígeno del cangrejo *Xantho* a intervalos de una hora durante algunas semanas y, reportó que hay cambios a lo largo del nictámero de tal suerte que el máximo -- coincide con la hora en la que la marea es más alta; hay, sin embargo, muchas -- otras especies en las que los niveles de consumo de oxígeno más altos se presen-- tan cuando la actividad locomotora es máxima (*Onconectes*, *Procambarus* y *Camba-- rus*, por ejemplo) y en condiciones de luz, temperatura y hasta presión constan-- tes (Edwards, 1950 (88)). En *Praunus* se ha encontrado un ritmo diurno en la -- acidez medida en músculo y en hígado (141).

Finalmente Nowosielski y Patton en 1964 (178), pusieron de manifiesto los cambios diarios que se presentan en la concentración de azúcar sanguínea -- del grillo *Gryllus domesticus* L.

Ritmos Relativos a los Cambios de Coloración.

Los Crustáceos y los Insectos son grupos de animales en los que los -- pigmentos tienen un claro papel como efectores sea del sistema endocrino, sea -- del sistema nervioso. Hay dos clases de estos pigmentos: los cromatóforos que se localizan fundamentalmente en el integumento del exoesqueleto y los pigmen-- tos accesorios del ojo compuesto. Tanto unos como otros responden a la luz muy probablemente a través de reflejos de carácter neuroendocrino (253).

Entre las primeras observaciones que describen ritmos diurnos persis-- tentes en los cambios de color de los Crustáceos están los de Gamble y Keeble -- en 1900 (110). En ellos se describe la persistencia de los cambios de colora-- ción del camarón *Hippolyte varians* en condiciones constantes de luz u obscuri-- dad; en el día los pigmentos se dispersan, lo que les permite a estos animales mimetizar las plantas acuáticas con las que suelen vivir asociados; en la noche los pigmentos se retraen y el animal presenta una coloración azul casi transpa-- rente; estas observaciones, sin embargo, no siempre han podido ser corroboradas.

Estos mismos autores (141) reportaron en 1904 una situación similar de los cromatóforos de Praunus. En los isópodos Ligia bandiniana (146, 149) e Idothea exotica (102) se comprobó la persistencia de cambios en los cromatóforos lo que determina que estos animales sean oscuros durante el día y claros durante la noche; también se ha corroborado que tales cambios se suspenden si la iluminación se mantiene constante.

Astacus presenta también cambios cíclicos en la coloración los que se anulan si se extirpan los tallos oculares (140). Resultados similares fueron reportados por Carlson (56) y Abramowitz (1) al estudiar los cambios sufridos por los melanóforos y los cromatóforos de color rojo. En todos estos casos los autores parecen coincidir en la acción cíclica de por lo menos una hormona, la del "oscurecimiento" (144) aún cuando se ha propuesto la acción antagónica de una segunda hormona, la del "aclaramiento" (254).

Brown y cols. (41) estudiaron detalladamente los cambios de coloración y sus fluctuaciones en la especie Uca pugnax y llegaron a la conclusión de que dichos cambios están influidos importantemente por las mareas. Trabajando en Callinectes sapidus Fingerman, en 1955 (101) llegó a una conclusión similar; esta conclusión se ha visto, sin embargo, fuertemente rebatida por Enright (94) quien sostiene el carácter endógeno de la ritmicidad que presentan estos animales. Sin embargo, otros estudios también de Fingerman hechos con Uca speciosa (104) apoyan el punto de vista original ya que cangrejos que ocupan diferentes estratos de arena donde hacen sus excavaciones a dos niveles mareales diferentes, difieren en el período de su ritmo en 1.6 horas, tiempo que corresponde a la diferencia entre el período de las mareas en cada nivel del sustrato.

Migración de Pigmentos Retinianos.

Los primeros reportes sobre un claro ritmo diurno en la migración de

pigmentos en los Crustáceos fueron hechos por Welsh en 1930 (258); en 1935 el mismo autor trabajó con los camarones de agua dulce Macrobrachium olfersii y M. acanthurus (259). Bajo iluminación continua el pigmento distal de estos animales se desplaza distalmente para ocupar la posición típica de adaptación a la oscuridad alrededor del atardecer regresando a la posición de adaptación a la luz durante el amanecer. Sin embargo, el autor no reportó ningún cambio comparable para el pigmento proximal. Por su parte Bennitt en 1932 (20) reportó cambios similares en el acocíl Orconectes virilis al ser colocado en condiciones de oscuridad y temperatura constantes. En la especie Anchistioides antignensis Welsh también demostró en 1936 (260) un ritmo en la posición de los pigmentos distal y reflector que se prolongaba por dos o más semanas de oscuridad constante sin que se observaran modificaciones ni en la amplitud ni en la frecuencia y que permanecía en fase con la hora del día, desde el principio hasta el final del período de observación. Si la condición era de iluminación constante, la amplitud era mucho más baja y la periodicidad cambiaba a 26 horas.

En 1941 Welsh (262) publicó resultados que se consideran de los más claros a propósito de la ritmicidad circádica de los pigmentos retinianos accesorios. La especie que utilizó fué Cambarus bartonii y lo que registró fué la posición de los pigmentos durante cuatro meses a temperaturas entre 21 y 23°C y durante cinco meses a temperatura de 6.8°C.

Resumiendo, podemos afirmar que muchas son las especies de crustáceos que han sido utilizadas en el estudio de las migraciones periódicas de los pigmentos retinianos accesorios (259, 258, 260, 262, 145, 146, 20, 253, 161), algunos de ellos parecen tener un claro ritmo circádico, mientras que en otros sólo se presenta la actividad fotoperiódica ya que los autores no mantuvieron la condición mínima de luz u oscuridad constante que se requiere para obtener un rit-

mo de actividad libre (161, 259); algunos autores sólo observaron cambios en el pigmento distal (258, 146, 145, 253, 161) y muy pocos son los que reportan cambios en el proximal (20, 259, 262).

Ritmos en la Actividad Neuronal.

A fines de la década de los años sesenta y principios de los setenta, aparecieron en la literatura algunos trabajos que ponen de manifiesto la actividad circádica en elementos neuronales registrados tanto "in situ" como "in vitro".

F. Strumwasser (241, 242) hizo estudios muy interesantes en el ganglio parieto-visceral de la Aplysia californica los que después fué afinando -- hasta obtener registros intracelulares de la actividad espontánea y provocada -- en esta estructura.

La actividad de los ganglios era recogida por medio de electrodos colocados en los axones que emergen de los mismos y que corresponden a neuronas -- que han podido ser identificadas plenamente. Estos axones generan descargas intermitentes las que al ser registradas por lapsos de semanas, ponen de manifiesto un ritmo circádico cuya periodicidad fluctúa entre 23.8 y 26.5 horas (frecuencia libre de oscilación) antes de ser sincronizado por alguna señal externa -- (240, 241, 242, 243, 244).

Como este ganglio contiene en sí un sistema oscilante, el autor trató de ir más lejos registrando la actividad de células nerviosas únicas, dentro -- del mismo ganglio. Gracias a esta técnica puso de manifiesto el que la célula 3 (según la identificación que se ha hecho de las células de este ganglio), emite descargas periódicas que tienen carácter circádico. Como en el soma de esta neurona se han encontrado vesículas neurosecretoras (Bernstein, datos no publicados citados por Strumwasser) el autor sugirió que la actividad de esta célula

depende de la liberación de material neurosecretor en las terminales de la neurona. En el animal intacto, por otra parte, la actividad cíclica podría afectar el ganglio genital que es la estructura con la que conectan los axones del ganglio parieto-visceral. Es factible, además, que el nervio pericárdico del que forman parte estos axones, libere estas neurosecreciones a la circulación general. Si los registros de la neurona 3 se obtienen de un órgano aislado perteneciente a un animal previamente sometido a regímenes de luz de distintos tipos, la actividad se presenta también de una manera distinta en la neurona y de acuerdo con la historia previa del sujeto. Esto es: las neuronas tienen diferente actividad dependiendo de que tengan o no "experiencia". La manipulación de la actividad circádica la hizo también el autor, para lo cual aplicó pulsos de temperatura o inyectó actinomicina D (un inhibidor del DNA, RNA dependiendo); en ambos casos se pudo corroborar que la actividad cíclica se modifica dependiendo del momento en el que el cambio haya sido aplicado.

Por su parte Jacklet en 1969 (131) puso de manifiesto la actividad circádica que presenta el ojo aislado de Aplysia californica por medio del registro de los impulsos del nervio óptico obtenidos extracelularmente. El primer día de registro se presentaba un pico de actividad durante el amanecer subjetivo del animal del que se obtenía la preparación y que había sido previamente sincronizado con ciclos de luz y oscuridad o de luz constante por períodos de 2 a 10 días. Los potenciales de acción se obtenían tanto espontáneamente como después de haber estimulado fóticamente al ojo. En ambos casos se observaba un pico de actividad que se repetía con un período que fluctuaba entre poco menos de 24 y 27.5 horas, dependiendo de que la preparación estuviera en agua de mar o en un cierto medio de cultivo.

En un trabajo en el que continúa utilizando la misma preparación (132)

que acabamos de citar Jacklet propone una explicación a la actividad circádica del nervio óptico de *Aplysia* según la cual aquella depende de la interacción de osciladores endógenos localizados en el mismo tallo ocular. Reportó asimismo - que para que el ritmo sostenga un carácter circádico se requiere que haya un mínimo de 20% de las fibras que normalmente forman el nervio óptico. Si la población neuronal se ha reducido al 20% o menos, se obtiene actividad infradiana, - lo que el autor explica basándose en la hipótesis de Pavlidis de los oscilado--res en la que se propone que de la interacción de elementos de diferentes fre--cuencia puede resultar una frecuencia de salida cercana a las veinticuatro ho--ras.

Por su parte Eskin (97) y Eskin y Strumwasser (98) en 1971 trabajaron la misma preparación de ojo aislado de *Aplysia* y lograron la sincronización del ritmo circádico de la actividad eléctrica del ojo tanto "in vivo" como "in vi--tro". Eskin reportó que los ojos "in vitro" requieren un mayor número de expo--siciones a ciclos de luz para obtener sincronización que el que se necesita pa--ra obtenerla en ojos registrados "in vivo". El autor sugiere que la diferencia puede deberse no a la falta de acción reguladora por parte del ganglio cerebroi--de ya que éste permanece unido al tallo ocular, sino más bien a que ambos siste--mas ("in vivo" e "in situ") tienen frecuencias libres de oscilación diferentes.

Entre los Artrópodos se han estudiado pocas especies a propósito de - la ritmicidad circádica de neuronas. Cabe mencionar el trabajo de Aréchiga y - Wiersma de 1969 (3) en el que se reportó un cambio circádico en la frecuencia - de descarga espontánea de las neuronas de "acción sostenida" del nervio óptico del acocil Procambarus clarkii. El registro que se hizo fué extracelular aun--que unitario.

Finalmente, Azaryan y Tyshchenko en 1970 (7) registraron la actividad

eléctrica de neuronas del ganglio cerebroide responsables del ritmo locomotor - del grillo y encontraron cambios cíclicos en esa actividad que los autores interpretaron como circádicos. Inmediatamente después de doce horas de iluminación continua la actividad fué máxima; con fotoperíodos más cortos la actividad máxima empezaba en la obscuridad, mientras que si el fotoperíodo se prolongaba más allá de las doce horas, el máximo se desplazaba iniciándose pocas horas después de que la luz se hubiera apagado. Al hacer cambios en el régimen de fotoperíodo, comprobaron que la aparición del máximo de la actividad neuronal se modificaba también lo que sugirió a los autores la idea de que el ritmo locomotor observado tenía como oscilador fundamental un conjunto de neuronas del ganglio cerebroide.

Rítmicos de Síntesis.

Ya ha sido mencionado que Harker reportó en 1955 (115) que factores liberados a la sangre estaban involucrados en el control del ritmo locomotor de la cucaracha; la misma autora sugirió que esos factores son neurosecreciones, - lo que indujo a la búsqueda de cambios cíclicos en la actividad de síntesis de algunas células nerviosas y glandulares.

De ahí que Klug en 1958 (150) utilizando la técnica de medir volumen nuclear haya encontrado cambios cíclicos en las células del corpora allata y de la porción media del ganglio cerebroide en el escarabajo Carabius nemoralis.

Además de esta técnica también se ha empleado la observación del estado del protoplasma como índice de modificaciones en la síntesis. Debe hacerse notar, sin embargo, que ambas aproximaciones al problema están lejos de permitir un análisis objetivo del mismo debido al gran error experimental que introducen.

Kensington (215) y Brady (33) han tratado de reducir el problema refi-

riéndose simplemente al "tamaño nuclear" el que calculan a partir de los productos de los diámetros mayor y menor de la mayor sección del núcleo de cada célula.

En un estudio de *Drosophila* puesta en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad, Rensing (215, 218, 219, 220) reportó cambios diurnos en el tamaño nuclear de las células neurosecretoras del ganglio cerebroide, ganglio subesofágico y corpora cardiaca y en las células del corpora allata y glándulas protorácicas. Estos ritmos son todos bimodales con máximos en las primeras horas de la tarde y en la noche y mínimos poco antes del mediodía y en las primeras horas de la noche. Ciclos nucleares mucho menos evidentes son a su vez reportados por Brady en 1967 (26) al estudiar las células neurosecretoras del ganglio subesofágico de la cucaracha (estructura que había sido señalada por Harker como la responsable de los cambios locomotores circádicos en este animal). El mismo autor señala cambios cíclicos en el volumen de otras células, las motoneuronas las que son directamente responsables de la actividad locomotora de la cucaracha. Sin embargo, hay que estar atentos a la interpretación de estos hechos pues de ninguna forma son evidencia conclusiva de que estas células sean las responsables de que se den los cambios circádicos como tales; podrían ser, sencillamente, la expresión de una sincronía con cambios cíclicos de carácter metabólico propiciados por la acción de "relojes" diferentes a las células referidas. De nueva cuenta, se presenta la necesidad de no confundir las causas con los efectos de la ritmicidad.

Utilizando la técnica de medir los cambios de citoplasma Brady en 1967 (26), no encontró modificaciones circádicas en las células neurosecretoras del ganglio subesofágico de la cucaracha *Periplaneta*. Sin embargo, De Bessé en 1965 (74), reportó hallazgos en ese sentido sólo que utilizando cucarachas de

la especie *Leucophaea*. Según este autor, hay mayor cantidad de material neurosecretor durante la noche que durante el día, lo que coincide con la vida nocturna que los caracteriza. Por su parte Cymborowski y Flisinska-Bojanowska en 1970 (69), reportaron cambios en los ganglios cerebroide y subesofágico de *Periplaneta* por más que sus resultados no son tan claros como se quisiera ya que -- las diferencias entre los controles algunas veces son mayores que las diferencias entre controles y experimentales. Algo similar sucede con los datos reportados por Raabe en 1965 y 1966 trabajando con el insecto *Chituninus extradentatus* (210, 211).

Análisis del problema bastante más objetivo es el efectuado por Rensing (215) quien utilizó una suerte de microespectrofotómetro para comparar la absorción del material neurosecretor en una región cercana al núcleo de las células neurosecretoras de *Drosophila*. De esta manera, el autor reportó cambios cercanos a las horas del "amanecer" y del "anochece", lo que significa diferencias de, aproximadamente, tres horas con respecto a los máximos reportados de acuerdo con la técnica del tamaño nuclear.

Con la ayuda de la microscopía electrónica, se ha podido enriquecer la información concerniente a los ciclos de la actividad neurosecretora. Así, Dutkowski y colaboradores en 1971 (85), reportaron diferencias marcadas entre las células neurosecretoras del deutocerebro de grillos de la especie *Acheta domesticus*, sacrificados poco después del amanecer y poco después del anochece, cuando los animales están en fases de inactividad y actividad máxima, respectivamente. Los autores señalaron que es justamente en la fase de inactividad -- cuando las células contienen un conspicuo aparato retículo endoplásmico rugoso, vesículas secretoras en la región de Golgi y en el axon y núcleos con membranas suaves.

Durante la fase de actividad, estas estructuras se ven claramente modificadas, lo que sugirió a los autores el que es durante la fase de inactividad cuando hay gran posibilidad de síntesis y liberación de neurosecreciones; - estas características se perderían durante la fase de actividad.

Otra técnica empleada con los mismos propósitos que las anteriores, - consiste en el uso de autorradiografías que permiten medir la actividad metabólica cíclica del tejido endocrino. Trabajando también con Acheta domesticus, - Cymborowski y colaboradores (67, 68, 70), demostraron que hay un ritmo diurno - en la síntesis de RNA en las células neurosecretoras del ganglio cerebroide y - del ganglio subesofágico de grillos sometidos previamente a un régimen de 12 ho - ras de luz 12 horas de obscuridad, coincidiendo los resultados de las células - del ganglio cerebroide con los que ya habían sido obtenidos mediante la técnica de los cambios de volumen nuclear. Con estos resultados los autores propusie - ron un modelo de control de los ritmos biológicos según el cual en respuesta al "zeitgeber" representado por la luz del amanecer, las células del ganglio cere - broide inician la síntesis de RNA y proteínas seguida por la acumulación y libe - ración de hormona. Esta hormona se transmitiría axonalmente al ganglio subeso - fágico donde estimularía la secreción de RNA y la síntesis protéica. La hormo - na secretada en ganglio cerebroide inhibiría la actividad locomotora lo que ha - ría que el animal estuviera quieto todo el día, excepto durante las primeras ho - ras después del anochecer que serían las horas en las que se produciría la sín - tesis (de ahí el pico) para posteriormente llevarse a cabo la liberación de hor - monas responsables de la disminución del movimiento.

Aún cuando este modelo ha sido muy discutido resulta interesante el - destacarlo como un intento para explicar una serie de datos experimentales obte - nidos mediante técnicas más o menos complejas.

En 1971 Rensing (222) reportó un ritmo circádico en los volúmenes nuclear y nucleolar de células de glándulas salivales de larvas de Drosophila melanogaster mantenidas en condiciones de L:D. El autor hizo determinaciones en larvas de diferentes edades y encontró diferencias interesantes entre las que tenían entre 5 y 6 días y las que tenían 7 días, por ejemplo, ya que mientras aquéllos presentaban el máximo volumen durante la segunda mitad de la noche y en las primeras horas de la tarde con mínimos alrededor del "anocheecer" y el "amanecer", éstas eran bimodales originalmente y más tarde tendían a ser asincrónicas. Estas modificaciones eran, sin embargo, comparables a los observados en glándulas obtenidas de las moscas o de células cultivadas "in vitro". Más aún, el autor reportó cambios en la fase de células cultivadas ante la aplicación de pulsos luminosos o de "pulsos" de ecdisona o actinomicina D (221).

En 1967 Hinks (127) trabajando con polillas nocturnas encontró que la producción de hormonas de las células del pars intercerebralis de las zonas medial y lateral, presenta cambios que coinciden con la actividad cíclica que se ha reportado en el vuelo de animales de esta especie.

Por su parte Fowler y Goodnight en 1966 midieron la cantidad de serotonina (5HT) producida en el intestino del arácnido Leiobunum longipes, encontrando un pico en la producción que coincide con el máximo de actividad locomotora de este animal (107).

En 1972, apareció un trabajo de Fowler y colaboradores (109) quienes reportaron que la 5HT presenta un ritmo de veinticuatro horas cuando se mide en pupas, larvas y adultos de la mosca Drosophila melanogaster. Las medidas las hicieron con las pupas y larvas íntegras y con el ganglio cerebroides y el intestino de los adultos; en estos últimos se presenta un aumento en la producción de serotonina alrededor de las 22:00 horas, es decir dos horas después de la es

cotofase, declinando hacia las 10:00 horas. El máximo se da alrededor de las 2:00 horas. En otros casos, la síntesis de serotonina tiene 2 picos de actividad, a las 3:00 y a las 15:00 horas. La actividad de las pupas es siempre bimodal con diferencias de sólo 8 horas entre un pico y el siguiente, ya que se dan a las 14:00 y a las 22:00 horas. Estos máximos que se reportan en la síntesis de serotonina coinciden importantemente con los reportados por Rensing y cols. en la actividad neurosecretora del ganglio cerebroide y del corpora allata de mosca de la especie Drosophila melanogaster (218).

Para terminar esta parte relacionada con ritmos en la actividad de -- síntesis, sólo habría que añadir que en los Crustáceos se han hecho muchos estudios sobre la regulación de la ritmicidad circádica (227) que suponen la participación de algún o algunos factores hormonales. La duda que se plantea es sobre si la actividad cíclica registrada (locomotora, de migración de pigmentos, de desarrollo embrionario, etc) depende a su vez de cambios cíclicos en la síntesis y liberación de hormonas cuyo sitio de producción estaría fundamentalmente localizado en el ganglio cerebroide y en algunas otras estructuras del sistema nervioso, por ejemplo ganglios torácico y abdominal y cadena ganglionar.

Mecanismos de Regulación de los Ritmos Circádicos.

Hasta ahora no puede concluirse de una manera definitiva cuál o cuáles son los mecanismos que regulan la actividad circádica. Sólo es posible apuntar algunos hechos que parecen tener una gran importancia en la manifestación y mantenimiento de esta actividad en los organismos.

Uno de los más notables reportes en la literatura relacionada con el control de la ritmicidad circádica es el de Harker (116) quien aseguró haber encontrado el "reloj" en el ganglio subesofágico de la cucaracha Periplaneta. -- Animales arrítmicos por decapitación readquirían su ritmo locomotor después de

la implantación de ganglios de donadores rítmicos normales.

Experimentos con parabiosis hechos por la misma autora (116) la llevaron a la conclusión de que este ritmo de actividad estaba controlado por un ciclo neurosecretor circadiano y autónomo el que se generaba en el ganglio subesofágico. Para demostrar que el ritmo circádico efectivamente depende de una acción originada en el ganglio subesofágico es indispensable partir del hecho de que el donador y el receptor están fuera de fase antes de la decapitación y del trasplante del ganglio; sólo si en esta condición el aceptor entra aproximadamente en fase con el donador, puede justificarse la proposición inicial.

Hasta cuatro años después (118, 119, 120) es que Harker le dio importancia a este hecho, lo que vino a sumarse a los reportes de Fingerman y colaboradores en 1958 (105), de Roberts en 1965 (227, 228) de Leuthold, en 1966 (155) de Brady en 1967 (26, 27, 28), de Nishiitsutsuji-Uwo y Pittendrigh en 1967 - - (172), de Thomas y Finlayson en 1970 (248) en los que anunciaban la imposibilidad de reproducir los experimentos de la mencionada Harker, así como la ausencia de cambios en las células neurosecretoras después de la maniobra experimental lo que dio como resultado un casi total descrédito a la proposición original.

La misma Harker en 1960 (120) implicó al corpora cardiaca en el origen del mecanismo locomotor circádico de la cucaracha. Así, encontró que la alatectomía causaba una pérdida gradual de la ritmicidad locomotora. Como en esta operación se rompen también dos pequeños nervios que conducen material secretado desde el corpora cardiaca hasta el ganglio subesofágico, se sugirió que ese material es necesario para mantener la ritmicidad del ganglio y por lo tanto la ritmicidad motora. Sin embargo, también Roberts (227) reportó la persistencia de un ritmo locomotor en Periplaneta muchas semanas después de la alatec-

tomía. Más aún, la remoción tanto del corpora cardiaca como del corpora allata no suspende la ritmicidad en estos animales.

Es posible que se requiera un replanteamiento de la participación de las estructuras del sistema nervioso central en el mantenimiento de la actividad circádica de los insectos y en este sentido, quizá resulte muy fructífero el estudio de los para-intercerebralis ya que Scharrer, por ejemplo, mostró en 1952 (237) que esta región del protocerebro produce material neurosecretor que llega hasta el corpora cardiaca después de ser conducido a lo largo de axones que se cruzan. Eidman en 1956 (91) quitó los para-intercerebralis del insecto *Carausius* y observó la suspensión inmediata del ritmo locomotor.

Más tarde estos hallazgos fueron confirmados por Nishitsutsuji-Uwo en 1967 en *Leucophaea* (172) y por Roberts en 1965 en *Periplaneta* (227). Cambios semejantes en escarabajos carábidos habían sido ya reportados por Klug en 1958 (150) y por Rensing en 1964 trabajando con *Drosophila* (215).

Por su parte Lees en 1964 (152) asoció la actividad neurosecretora de estas estructuras con el control de la reproducción en insectos áfidos y postuló esa estructura como el sitio en el que se lleva a cabo la recepción de luz tan importante en los fenómenos de fotoperiodicidad. Finalmente, Huber en 1960 y 1965 (129, 130) encontró que la estimulación eléctrica del para-intercerebralis produce modificaciones en el ritmo respiratorio del grillo.

Cymborowski y Brady (71) también trabajaron en el problema de la acción neuroendocrina sobre los ritmos circádicos. Utilizando grillos de la especie *Acheta domesticus* repitieron las experiencias de Harker en *Periplaneta* y concluyeron que si bien los animales decapitados y reimplantados reasumen un ritmo comparable al de los donantes, también hay que hacer notar que se inducen más ritmos si se interconectan los aparatos circulatorios de ambos animales (do

nador y receptor) que si estos permanecen independientes. La conclusión de Harker ("...una secreción transportada por la sangre o por los tejidos está involucrada en la producción de un ritmo diurno de actividad en la cucaracha...") es aceptada por Brady y Cymborowski con mucha precaución sugiriendo entonces una explicación alternativa según la cual el estado de estrés por el que pasan los donantes al momento de la manipulación asociada con la experimentación, hace -- factible la liberación de algún factor que modifica la actividad circádica locomotora, pero que no tendría que presentarse en condiciones normales. Es también posible que la explicación a los hallazgos de Harker radique en la existencia de una suerte de producción humoral periódica no necesariamente neurosecretora o bien a un efecto estimulante debido al trasplante que reinicia la ritmicidad en los animales aceptores.

El papel del complejo-allata cardiaca ha sido también muy controvertido ya que los trabajos de Harker de 1960 (118) en los que postula que la ritmicidad locomotora desaparece después de la sección de los axones neurosecretores que salen del corpora allata, se contradicen con los hallazgos de Roberts en 1966 (229) y de Brady en 1967 (27), los que comprueban que el ritmo permanece -- después de la sección. Posiblemente los axones aludidos liberan a la circulación general hormonas depresoras de la actividad locomotora antes de llegar al corpora allata, lo que explicaría el que al ser seccionados se produjera si no una amulación del ritmo si una disminución de la amplitud del mismo (27). Algo similar puede decirse del corpora cardiaca, del que se ha demostrado su papel -- relacionado con la cantidad de movimiento y no con la periodicidad del mismo.

Por lo que se refiere a otras hormonas producidas por el sistema nervioso de insectos, habría que hacer notar que las evidencias que se tienen sobre cambios cíclicos neurosecretores en las células del ganglio cerebroides no --

han sido relacionadas con el control de los ritmos.

Los experimentos hechos en insectos en los que se destruye la pars intercerebralis están, sin embargo, relacionados con el punto que ahora nos interesa si bien también se han prestado a mucha discusión, ya que mientras un autor reporta que al remover la gran mayoría (95%) de las células neurosecretoras del cerebro medio de cucaracha, la ritmicidad circádica locomotora no se para (27), otros como Nishiitsutsuji-Uwo y colaboradores (172), no encontraron células neurosecretoras después de haber extirpado la par intercerebralis en 11 de 22 cucarachas. En este caso, los animales permanecen rítmicos en condiciones alternantes de luz y oscuridad. En estos experimentos se plantean dos problemas interpretativos: ¿la ausencia de células que se tienen, indica necesariamente la falta de células neurosecretoras o lo que sucede es que las células que quedan después de la operación liberan su material tan rápidamente que el pericardio queda vacío? y por otra parte, ¿la falta de ritmicidad en animales que han sido operados, indica que el oscilador ha sido afectado (y por lo tanto los mecanismos que están acoplados a él), o simplemente pone de manifiesto que ha habido una pérdida de la coordinación que resulta de la alteración desapercibida de algún circuito involucrado en la actividad locomotora?

Otros problemas relacionados con el papel de las hormonas cefálicas en la ritmicidad circádica surgen del trabajo de Azaryan y Tyschenko quienes en 1970 (7), reportaron que la ligadura del cuello de grillos de la especie Acheta domesticus no modifica su ritmo locomotor, por más que Brady reporta que las ligaduras son capaces de dejar a los grillos totalmente inmóviles. Al lesionar dos pequeñas áreas en el pars intercerebralis también Azaryan y Tyschenko reportaron que la destrucción a cualquier lado de la línea media de esa región produce pérdida del ritmo locomotor, lo que coincide con lo reportado por Nishiitsu-

tsuji-Uwo y Pittendrigh (173). Sin embargo, no hay una clara explicación para el hecho reportado por los mismos autores en el sentido de que el pars intercerebralis presenta un ritmo circádico de descarga con el máximo de actividad - eléctrica coincidiendo con el número de respuesta motora.

El papel del cordón nervioso ventral sobre la actividad circádica locomotora es eminentemente inhibitorio. Esto hace que al cortar las comisuras - circumesofágicas se presente tal actividad motora que se hace difícil el registro en el actógrafo (28). Sin embargo en casos como *Leucophaea* en los que la actividad postoperatoria es menos intensa, se reporta una pérdida de la ritmicidad circádica después del corte (231). Si el corte se hace entre los ganglios subesofágico y protorácico, los resultados son discutibles pues algunos autores han querido ver en esta condición, una persistencia del ritmo locomotor (175) - aunque otros niegan tal posibilidad (28, 155).

El corte entre los ganglios pro y metatorácico no interrumpe la actividad circádica según reportaron Nishitsutsuji-Uwo y Pittendrigh, en 1968 (175). Es curioso que la lombriz de tierra presente un comportamiento en todo comparable al de la cucaracha ante una situación experimental equivalente según reportó Bennett en 1970 (19).

Evidentemente todos estos reportes ponen de manifiesto el que el problema de la acción de las hormonas del sistema nervioso central sobre los ritmos circádicos de invertebrados no ha sido aún definido ya que ninguno de los autores que han trabajado sobre el particular ha aportado el argumento definitivo que aclare la situación creada desde los experimentos de Harker, hasta nuestros días.

Los lóbulos ópticos parecen también jugar un papel clave en la actividad circádica de cucarachas, por lo menos si creemos lo que sobre el particular

nos dicen los tantas veces mencionados Nishitsutsuji-Uwo y Pittendrigh (175). Ellos encontraron que si los ojos se separan de los lóbulos ópticos la actividad permanece rítmica pero se desacopla del medio ambiente. En efecto, animales ciegos rítmicos no pudieron ser sincronizados por los ciclos de luz y obscuridad a los que los autores los sometieron. Si, por otro lado, los tractos ópticos eran cortados entre los lóbulos ópticos y el protocerebro, los animales perdían su ritmicidad aún estando sometidos a ciclos de luz y oscuridad. Estos hallazgos fueron confirmados por Roberts (230) quien además demostró que la lámina del lóbulo óptico podía cortarse junto con el ojo y la ritmicidad persistía; bastaba que la parte de la médula quedara incluida para que la ritmicidad persistiera.

Por su parte Loher en 1972 (156) también puso de manifiesto la importancia de los lóbulos ópticos en la ritmicidad circádica, ya que el ritmo de es tridulación de chapulines se vió notablemente afectado después de la extirpación de esas estructuras.

Todos estos experimentos han hecho que se acepte como muy importante la participación de los ganglios ópticos en el control de la ritmicidad circá dica, por más que también cabe aquí una duda semejante a la que nos planteábamos al analizar la participación del ganglio subesofágico en este fenómeno: ¿no será que la lesión de los ganglios ópticos más que la destrucción de un "reloj" - implique la destrucción de algún(os) circuito(s) integrador(es) asociado(s) con el movimiento?.

Sin embargo el que en los lóbulos ópticos se haya encontrado tejido neurosecretor como reporta Beattie en 1971 (14), favorece el punto de vista que apoya el que los lóbulos ópticos de los insectos efectivamente participan en la persistencia de la ritmicidad circádica locomotora de estos animales.

Brady en 1971, utilizó estos datos y con base en ellos formuló un modelo que pretende reproducir lo que sería el control de la ritmicidad circádica. Según el autor habría un marcador de paso en cada lóbulo óptico sincronizado a las señales de luz percibidas por el ojo compuesto. Estos dos osciladores alimentarían la salida circádica a las estructuras encargadas de integrar la información aferente e integrar la salida motora modulando así la salida inhibitoria al ganglio subesofágico, de tal suerte que la salida que da éste hacia la actividad locomotora torácica se convertiría en un ritmo circádico; la presencia de células neurosecretoras en los lóbulos ópticos así como la de axones también -- neurosecretores en las comisuras circumesofágicas, confieren la posibilidad de que la regulación sea humoral más que nerviosa, aún cuando la sincronización entre los dos osciladores (uno de cada lóbulo óptico) probablemente sí tendría carácter eléctrico.

Otros experimentos que apoyan la participación hormonal en la actividad circádica son los que ya se mencionaron en el capítulo de ejemplos de ritmos circádicos con carácter secretor (ver los trabajos de Rensing de 1966 (219), de Cymborowski y Dutkowski en 1970 (67) y de Fowler y cols. en 1972 (109)). En estos trabajos si bien no se determina el papel que tiene la actividad neurohumoral en los ritmos circádicos, sí se apoya el carácter circádico de las neurosecreciones, lo que finalmente podría interpretarse apuntando en la misma dirección.

En 1970 Cymborowski (64, 65, 66) hizo una serie de trabajos en grillos que consistieron básicamente en lo siguiente: lesionarles el pars intercerebralis y transplantarles ganglios cerebroides aislados. Durante dos ciclos L:D completos, los animales receptores mostraron una marcada depresión de la actividad pocas horas después del "anocheecer". Desgraciadamente el autor no re-

gistró la respuesta de animales que hubieran permanecido en oscuridad o luz -- constante, lo que limita importantemente la interpretación de los resultados -- desde el punto de vista circádico.

En los Crustáceos también se ha estudiado el efecto de la remoción de algunas estructuras del sistema nervioso (que también tienen carácter neurosecre tor) sobre la ritmicidad circádica, particularmente la locomotora. Así, desde 1938 se conoce el efecto que produce la lesión de los tallos oculares de cangre jos (140) sobre la ritmicidad locomotora.

El problema se complica en muchos casos debido a que además del ritmo circádico propiamente dicho, hay que considerar los ritmos de mareas (Naylor y Williams 1968 (168); Naylor y Atkinson, 1972 (167)) según los cuales hay mayor o menor producción de hormona(s) inhibidora(s) de la actividad motora (Naylor y Williams (168), o excitadora de la misma (Powell, (209)).

La acción de extractos de tallos oculares aplicados a crustáceos tam poco ha aclarado gran cosa sobre el posible control humoral ejercido sobre es tos animales. Shalleck en 1942 (236) no observó ninguna modificación sobre la arritmicidad locomotora de acociles a los que previamente les habían sido extir pados los tallos oculares una vez que les hubo inyectado extracto de tallo ocu lar o implantado los mismos tallos oculares.

Por su parte Bliss en 1962 (25) reportó la persistencia de ritmos en el cangrejo Gecarcinus lateralis después de la extirpación de los tallos ocula res lo que permite suponer la existencia de osciladores fuera del sistema ner vioso central.

Quizá sólo habría que añadir que en los crustáceos falta aún mucha -- evidencia experimental para aceptar o rechazar la hipótesis según la cual ha bría un control hormonal ejercido a través de neurosecreciones fundamentalmente

responsables de que los ritmos circádicos (particularmente de los ritmos locomotores) se presentan y se manifiesten como tales. Así, por ejemplo, hace falta evidencia para apoyar el modelo que elabora Bregazzi (34) y en el que apoya el control hormonal sobre el ritmo locomotor del anfípodo Talitrus saltator.

Un trabajo aparecido en 1967 de Rao y Gopalakrishnareddy (213) puso de manifiesto el posible control hormonal que se ejerce sobre la actividad eléctrica del sistema nervioso central de escorpiones. Los autores consideran que puede hablarse de factores neuroestimulantes y neurodepresores del sistema nervioso, los que al liberarse cíclicamente darían la pauta para que en él se manifieste una actividad circadiana, esto supone que el oscilador circadiano (si lo hay) está acoplado a los efectores locomotores por medio de la acción humoral, punto de vista que puede o no aceptarse.

Regulación Nerviosa de los Ritmos.

En 1942 Shalleck (236) encontró que la sección del tracto óptico del acocil Cambarus producía hiperactividad locomotora arritmica, la que persistía aún después de la inyección de extractos de glándula sinusal. Estos resultados indujeron a Shalleck a proponer un control sobre la motilidad de estos animales de carácter eminentemente nervioso el que se originaría en los lóbulos ópticos.

En 1975 Page y Larimer (180) publicaron un trabajo en el que presentaron los resultados de haber seccionado las comisuras circumesofágicas sobre el ritmo circádico de la respuesta a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales del acocil Procambarus clarkii; los autores concluyeron que esta sección no afectaba la ritmicidad circádica, lo que los llevó a lesionar otras estructuras del sistema nervioso en su interés por localizar el "reloj" responsable de esta oscilación; efectivamente reportaron que la actividad circádica era abolida si el tracto óptico era el lesionado con lo que concluyeron que la estructura impor-

tante en esta regulación era el ganglio supraesofágico acoplado eléctricamente por vía axónica con el tracto óptico; sugirieron inclusive que es el tracto olfatorio globular la vía a través de la cual la oscilación circádica alcanza el tallo ocular.

De nueva cuenta, los estudios sobre ritmicidad circádica de cucaracha sirvieron para proponer posibilidades sobre el control nervioso de esta actividad. Así, Brady (33) sugiere que un acoplamiento eléctrico entre los axones de los lóbulos ópticos y torácico es suficiente para que se suspenda el ritmo de la actividad locomotora. De ahí que el corte de los tractos ópticos, la separación bilateral del protocerebro o la lesión del cordón nervioso entre el ganglio cerebroide y el ganglio torácico sea la causa de la suspensión del ritmo circádico en estos animales. Sin embargo habría que aclarar que la actividad circádica no parece depender de la interacción de potenciales de acción.

También se ha propuesto una posible acción neural con base a lo reportado por Truman en cucarachas a las que inyectaba ~~tetordotoxina~~ tetordotoxina: en estas condiciones observaba que la actividad locomotora se paraba a una cierta hora circádica; al recuperarse el animal sin embargo, se observaba que el ritmo circádico se reiniciaba a la misma hora a la que se había suspendido el movimiento, lo -- que sugería el que ambos eventos (el de la actividad eléctrica de las neuronas afectadas por la tetordotoxina y el del mecanismo del "reloj", cualquiera que sea la connotación anatómica que haya que asignarle marchan paralelamente. No hay, sin embargo, muchas más evidencias que apoyan o nieguen el papel del sistema nervioso como regulador de los ritmos circádicos en los artrópodos.

Los antecedentes que se han presentado sirven para que se tenga una clara idea sobre la forma cómo se ha desarrollado el estudio de los ritmos circádicos desde sus orígenes hasta nuestros días. Es evidente que hay aún muchos

mecanismos por aclarar y mucho camino por recorrer antes de tener una explicación satisfactoria sobre el origen de la ritmicidad circádica y sobre las formas de operación que determinan sus propiedades más relevantes.

Es justamente en un estado de cosas como el planteado, que la formulación de modelos adquiere relevancia significativa (186, 189), ya que constituyen una herramienta que va señalando el camino a seguir en la experimentación - con base en las predicciones que se obtienen del modelo mismo.

Es evidente que ha habido gran variedad de modelos que incluyen desde aspectos muy particulares de los ritmos hasta generalizaciones más o menos válidas y amplias que simulan más aunque profundizan menos. De esta variedad presentamos algunos de los modelos que a, nuestro juicio, han tenido mayor relevancia.

En lo que se refiere a modelos operacionales que han permitido reproducir algunas características de los ritmos, habría que citar el modelo matemático de Wever quién en 1965 (257) generó este modelo con el que reproduce dos características fundamentales de los ritmos: la persistencia de ellos en condiciones constantes (oscilación autosostenida) y la respuesta a la aplicación de cambios ambientales (luz) juzgada mediante el cumplimiento de la regla circádica de Aschoff (5, 6). La aplicabilidad del modelo la establece el autor para dos situaciones del sistema: en condiciones constantes y en presencia de un sin cronizador (Zeitgeber).

Por su parte, Pavlidis ha propuesto una variedad de modelos matemáticos relacionados con los ritmos circádicos que incluyen aspectos muy variados: simulación de redes neuronales con capacidad de oscilar y que sirven de base para los circuitos responsables de la actividad rítmica (184, 185), por ejemplo. La acción de la luz sobre el ritmo de eclosión de la *Drosophila*, ha sido tam-

bién simulada por medio de otro modelo matemático de este autor (187). Basándose en los trabajos de Pittendrigh y Bruce (196) y de Pittendrigh y Minis (206), Pavlidis elaboró un tercer modelo matemático que le permite predecir el efecto que tienen los cambios luminosos de intensidad constante y de duración conocida aplicados a una determinada hora circádica, sobre el ritmo de eclosión de las larvas de *Drosophila*. En la primera parte de su trabajo, el autor encuentra -- las condiciones necesarias para que un estímulo pueda actuar como un sincronizador; en la segunda parte utiliza ciertas propiedades del sistema para construir un modelo analítico que representa el efecto de impulsos luminosos de corta duración sobre el sistema oscilante, empleando para ello una sencilla regla de transformación. También Pavlidis en colaboración con Osborne y Zimmerman (188) fué el autor de otro modelo que reproduce la acción de la temperatura sobre la actividad circádica de las larvas de *Drosophila*.

Por su parte Winfree propuso en 1967 (265) un modelo matemático por medio del cual trata de responder estas preguntas: ¿qué fenómenos pueden esperarse de la interacción rítmica de poblaciones de procesos periódicos? ¿cómo podría reconocerse, si la hubiera, una población de osciladores múltiples? ¿cómo probar sus mecanismos integrativos?. Para ello hace una descripción del problema trabajando con interacciones débilmente acopladas entre "osciladores de relación generalizados", caracterizando las interrelaciones entre ellos a través de tres funciones que él propone: la función de sensibilidad ($Z(\phi)$), la función de influencia ($X(\phi)$) y la función del estímulo ($S(\phi)$). Manipulando matemáticamente con estas funciones de fase (ϕ , es la fase), el autor obtiene funciones que le permiten definir un estado en el que habría sincronización mutua entre los distintos componentes de una población de osciladores, para de allí -- llegar al concepto de "sintalansis" (capacidad de "oscilar juntos") que se apli

ca a elementos que teniendo originalmente distintos períodos de oscilación bajo ciertas condiciones terminan oscilando a una misma frecuencia.

Conclusiones.

Hemos querido presentar una revisión lo más importante posible acerca del fenómeno de la ritmicidad circádica estudiado en los organismos invertebrados. Estamos, sin embargo, conscientes que por minuciosa que haya sido será -- siempre parcial y no tan objetiva como desearíamos debido a los problemas inherentes a toda revisión bibliográfica.

Finalmente queremos dejar constancia de nuestro deseo de que el esfuerzo que hemos desarrollado signifique una ayuda efectiva en el trabajo bibliográfico de los estudiosos dentro del campo de la ritmicidad circádica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abramowitz, A.A. (1937). The chromatophorotropic hormone of the Crustacea: Standardization, properties and physiology of the eye-stalk glands. Biol. Bull. 72: 344-365.
- 2.- Aréchiga, H., Fuentes, B. and Barrera B. (1973). Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. Neurobiology of Invertebrates, Tihany 1971, pp. 403-421.
- 3.- Aréchiga, H. and Wiersma, C.A.G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. J. Neurobiol. 1: 71-85.
- 4.- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. in Biological clocks, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 25: 11-28.
- 5.- Aschoff, J. (1965 a). The phase-angle difference in circadian periodicity. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 262-276.
- 6.- Aschoff, J. (1965 b). Response curves in circadian periodicity. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 95-111.
- 7.- Azaryan, A.G. and Tyshchenko, V.P. (1970). Neural regulation of the circadian rhythm of motor activity in the house cricket, Gryllus domesticus L. (Orthoptera, Gryllidae). Entomol. Obozr. 49: 72-82 (As translated from Russian in Ent. Rev. 49: 38-45).
- 8.- Baillaud, L. (1965). Remarks on the synchronization of elementary rhythms, considered as a general problem of chronobiology. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 139-145.
- 9.- Ball, H.J. (1965). Photosensitivity in the terminal abdominal ganglion of Periplaneta americana (L). J. Insect. Physiol. 11: 1311-1315.
- 10.- Ball, H.J. (1971). The receptor site for photic entrainment of circadian rhythms in the cockroach Periplaneta americana. Ann. ent. Soc. Am. 64: 1010-1015.
- 11.- Ball, H.J. (1972). Photic entrainment of circadian activity rhythms by direct brain illumination in the cockroach Blaberus cradifer". J. Insect. Physiol. 18: 2449-2455.
- 12.- Ball, H.J. and Chaudhury, M.F.B. (1973). Photic entrainment of circadian rhythms by illumination of implanted brain tissues in the cockroach Blaberus cradifer. J. Insect. Physiol. 19: 823-830.

- 13.- Barnett (1965). A circadian rhythm of mating type reversals in paramecium multimicronucleatum. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam
- 14.- Beattie, T.M. (1971). Histology, histochemistry, and ultrastructure of neurosecretory cells in the optic lobe of the cockroach Periplaneta americana. J. Insect. Physiol. 17: 1843-1855.
- 15.- Beck, S.D. (1963). Physiology and ecology of photoperiodism. Bull. ent. Soc. Am. 9: 8-16.
- 16.- Beck, S.D. (1964). Time-measurement in insect photoperiodism. Am. Nat. 98: 329-346.
- 17.- Belcher, K.S. and Brett, W.J. (1973). Relationship between a metabolic rhythm and emergence rhythm in Drosophila melanogaster. J. Insect. Physiol. 19: 277-286.
- 18.- Beling, L. (1929). Über das Zeitgedächtnis der Bienen. Z. vergl. Physiol. 9: 259-338.
- 19.- Bennett, M.F. (1970). Bilateral symmetry in the mediation of circadian differences in earthworms. Z. vergl. Physiol. 69: 1-5.
- 20.- Bennitt, R. (1932). Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. Physiol. Zool. 5: 65-69.
- 21.- Bentley, E.W., Cunn, D.L. and Ewer, D.W. (1941). The biology and behavior of Ptinus tectus Boie. (Coleptera, Ptinidae) a pest of stored products. I. The daily rhythm of locomotory activity, specially in relation to light and temperature. J. Exp. Biol., 18: 182-195.
- 22.- Birukow, G. (1960). Innate types of chronometry in insect orientation. in Cold. Spring Harb. Symp. quant. Biol. 25: 403-412.
- 23.- Birukow, G. (1964). Aktivitäts und Orientierungsrythmik beim Kornkafer (Calandra granaria L.). Z. Tierpsychol. 21: 279-301.
- 24.- Birukow, G. (1966). Orientation behaviour in insects and factors which influence it. in Insect Behaviour (Ed. P.T. Haskell), Symp. R. ent. Soc. Lond. 3: 1-12.
- 25.- Bliss, D.E. (1962). Neuroendocrine control of locomotor activity in the land crab Gecarcinus lateralis. in Neurosecretion (Eds. H. Heller and R.B. Clark). Mem. Soc. Endocrinol. No. 12, 391-410, Academic Press, New York and London.
- 26.- Brady, J. (1967 a). Histological observations on circadian changes in the neurosecretory cells of cockroach sub-oesophageal ganglia. J. Insect Physiol. 13: 201-213.

- 27.- Brady, J. (1967 b). Control of the circadian rhythm of activity in the cockroach. I. The role of the corpora cardiaca, brain and stress. J. exp. Biol. 47: 153-163.
- 28.- Brady, J. (1967 c). Control of the circadian rhythm of activity in the cockroach. II. The role of the sub-oesophageal ganglion and ventral nerve cord. J. exp. Biol. 47: 165-178.
- 29.- Brady, J. (1968). Control of the circadian rhythm of activity in the cockroach. III. A possible role of the blood-electrolytes. J. exp. Biol. 49: 39-47.
- 30.- Brady, J. (1969). How are insect circadian rhythms controlled?. Nature Lond. 223: 781-784.
- 31.- Brady, J. (1971). The search for an insect clock. in Biochronometry. (Ed. M. Menaker), National Academy of Sciences, Washington. pp. 517-526.
- 32.- Brady, J. (1972 a). Spontaneous, circadian components of tsetse fly activity. J. Insect Physiol. 18: 471-484.
- 33.- Brady, J. (1974). The physiological of insect circadian rhythms. Advances in Insect Physiology 1: 1-115.
- 34.- Bregazzi, P.K. (1972). The effects of low temperature upon the locomotor activity rhythm Talitrus saltator (Montagu) (Crustacea: Amphipoda) J. exp. Biol. 57: 393-399.
- 35.- Bregazzi, P.K. and Naylor, E. (1972). The locomotor activity rhythm of Talitrus saltator (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). J. exp. Biol. 57: 375-91.
- 36.- Bremer, H. (1926). Über die tageszeitliche Konstanz im Schlupftermine der Imagines einiger Insekten. Z. wiss. Insektenbiol., 21: 209-216.
- 37.- Brett, W.J. (1955). Persistent diurnal rhythmicity in Drosophila emergence. Ann. ent. Soc. Am. 48: 119-131.
- 38.- Brown, F.A. and Webb, M.H. (1948). Temperature relations of an endogenous daily rhythmicity in the fiddler crab, Uca. Physiol. Zool. 21: 371-381.
- 39.- Brown, F.A. and Webb, M.H. (1949). Studies of the daily rhythmicity of the fiddler crab. Uca. Modifications by light. Physiol. Zool. 22: 136-148.
- 40.- Brown, F.A. and Stephens, G.C. (1951). Studies of the daily rhythmicity of the fiddler crab. Uca. Modifications by photoperiod. Biol. Bull. 101: 71-83.

- 41.- Brown, F.A., Fingerman, M., Sandeen, M.I. and Webb, M.H. (1953). Persistent diurnal and tidal rhythms of color change in the fiddler crab. Uca pugnax. J. Exp. Zool. 123: 29-60.
- 42.- Brown, F.A., Webb, M.H. and Bennett, F.M. (1955). Poof for an endogenous component in persistent solar and lunar rhythmicity in organisms. Proc. Nat. Acad. Sci. 41: 93-100.
- 43.- Brown, F.A. (1959). "Living clocks". Science 130: 1535-1544.
- 44.- Brown, F.A. Jr. (1965). A unified theory for biological rhythms. in Circadian clocks North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 231-261.
- 45.- Bruce, V.G. and Pittendrigh, C.S. (1956). Temperature independence in a unicellular "clock". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 42: 676-682.
- 46.- Bruce, V.G. (1960). Environmental entrainment of circadian rhythms. in Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25: 29-48.
- 47.- Bruce, V.G. and Pittendrigh, C.S. (1960). An effect of heavy water on the phase and period of the circadian rhythm in Englena. J. of Cell and Comp. Physiol. 56: 25-31.
- 48.- Bruce, V.G. (1965). Cell division rhythms and the circadian clock. in Circadian Clocks-North Holland Publishing Co., Amsterdam, Edited by J. Aschoff.
- 49.- Euetow, D.E. (1962). Differential effects of temperature on the growth of Englena gracilis. Exptl. Cell Res. 27: 137.
- 50.- Buffington, J.D. (1968). A circadian pattern in the respiration of larvae of the mosquito Culex pipiens. Mosquito News. 28: 95-98.
- 51.- Bunning, E. (1935). Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmik bei Insekten und bei Pflanzen. Ber. deutsch. bot. Ges., 53: 594-623.
- 52.- Bunning, E. (1959). Zur Analyse des Zeitsinns bei Periplaneta americana. Z. Naturforsch., 14b: 1-4.
- 53.- Bunning, E. (1960). Opening address: biological clocks. in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 25: 1-9.
- 54.- Caldwell, R.L. and Dingle, H. (1967). The regulation of cyclic reproductive and feeding activity in the milkweed bug Oncopeltus by temperature and photoperiod. Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole, 133: 510-525.
- 55.- Campbell, B.O. (1964). Solar and lunar periodicities in oxygen consumption by the mealworm, Tenebrio molitor. Diss. Abstr. 25: 3648-3649.

- 56.- Carlson, S.P. (1935). The color changes in Uca pugilator. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 21: 549-551.
- 57.- Chakraborty, J. and Dasgupta, N.N. (1962). Mitotic cycle of the kala-azar parasite, Leishmania donovani. J. Gen. Microbiol. 28: 541-5.
- 58.- Chandrashekarau, M.K. and Loher, W. (1969). The effect of light intensity on the circadian rhythms of eclosion in Drosophila pseudoobscura. Z. vergl. Physiol. 62: 337-347.
- 59.- Chernyshou, V.B. (1965). Analysis of the diurnal cycle exemplified by the behaviour of Trogoderma glabrum. Herbst. Zhur. Obshch. Biol. 26: 577-84. Citado por Danilevsky y cols. (1970).
- 60.- Chiba, Y. (1964). The diurnal activity of the mosquito Culex pipiens pallens, in relation to light condition. I. Activity under the continuous light condition. Sci. Rep. Tohoku Univ. Ser. IV (Biol.) 30: 67-75.
- 61.- Cloudsley-Thompson, J.L. (1953) LXIX. Studies in diurnal rhythms. III. Photoperiodism in the cockroach Periplaneta americana (L.). Ann. Mag. Nat. Hist. Ser. 12, 6: 705-712.
- 62.- Cloudsley-Thompson, J.L. (1960). Adaptive functions of circadian rhythms in biological clocks. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 25: 345-355.
- 63.- Cymborowski, B. (1969). The effect of light on the circadian rhythm of locomotor activity of the house cricket (Acheta domesticus L.). Zool. Poloniae. 19: 85-95.
- 64.- Cymborowski, B. (1970 a). Investigations on the neurohormonal factors controlling circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket (Acheta domesticus L.) I. The role of the brain and subesophageal ganglion. Zool. Poloniae, 20: 103-125.
- 65.- Cymborowski, B. (1970 b). Investigations on the neurohormonal factors controlling circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket (Acheta domesticus L.) II. Daily histochemical changes in the neurosecretory cells of the pars intercerebralis and subesophageal ganglion. Zool. Poloniae, 20: 127-149.
- 66.- Cymborowski, B. (1970 c). The assumed participation of 5-hydroxytryptamine in regulation of the circadian rhythm of locomotor activity in Acheta domesticus L. Comp. gen. Pharmac. 1: 316-322.
- 67.- Cymborowski, B. and Dutkowski, A. (1970 a). Circadian changes in protein synthesis in the neurosecretory cells of the brain and subesophageal ganglion of the house cricket. J. Insect. Physiol. 15: 1187-1197.

- 68.- Cymborowski, B. and Dutkowski, A. (1970 b). Sex differences in locomotor activity and RNA synthesis in the central nervous system of Acheta domesticus L. during the circadian rhythm. Z. vergl. Physiol. 70: 29-34.
- 69.- Cymborowski, B. and Flisinska-Bojanowska, A. (1970). The effect of light on the locomotor activity and structure of neurosecretory cells of the brain and subesophageal ganglion of Periplaneta americana L. Zool. Poloniae, 20: 387-399.
- 70.- Cymborowski, B., Skangiel-Kramska, J. and Dutkowski, A. (1970). Circadian changes of acetylcholinesterase activity in the brain of house-crickets (Acheta domesticus L.). Comp. Biochem. Physiol. 32: 367-370.
- 71.- Cymborowski, B. and Brady, J. (1972). Insect circadian rhythms transmitted by parabiosis - a re-examination. Nature New Biol. 236: 221-222.
- 72.- Danilevsky, A.S., Goryshin, N.I. and Tyshchenko, V.P. (1970). Biological rhythms in terrestrial arthropods. A. Rev. Ent. 15: 201-244.
- 73.- Dean, G.J., Wilson, F. and Wortham, S. (1968). Some factors affecting eclosion of Glossina morsitans Estw. from pupas. Bull. ent. Res. 58: 367-377.
- 74.- De Bessé, N. (1965). Recherches histophysiologiques sur la neurosécrétion dans la chaîne nerveuse ventrale d'une blatte, Leucophaea maderae (F.). C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris, 260: 7014-7017.
- 75.- De Candolle, A.P. (1835). Pflanzenphysiologie, oder Darstellung der Lebenskräfte und Lebensverrichtungen der Gewächse. Stuttgart u. Tübingen, p. 639-640 (Transl. into German by J. Roper. French Original: Physiologie végétale. Paris, 1832). Cited by Bunning (1960).
- 76.- De Mairan (1729). Observation botanique. Histoire de l'Académie Royale des Sciences. Paris, p. 35. Cited by Bunning (1960).
- 77.- Den Boer, P.J. (1961). The ecological significance of activity patterns in the woodlouse Porcellio scaber. Latr. Arch. Neerl. Zool. 14: 283-409.
- 78.- De Wilde, J. (1962). Photoperiodism in insects and mites. Ann. Rev. Entomol. 7: 1-26.
- 79.- Dingle, H. (1968). Life history and population consequences of density, photo-period, and temperature in a migrant insect, the milkweed bug Oncopeltus. Am. Nat. 102: 149-163.
- 80.- Dingle, H. (1972). Migration strategies of insects. Science N.Y. 175: 1327-1335.

- 81.- Dingle, H., Caldwell, R.L. and Haskell, J.B. (1969). Temperature and circadian control of cuticle growth in the bug, Oncopeltus fasciatus. J. Insect Physiol. 15: 373-378.
- 82.- Duhamel du Monceau (1758). La Physique des Arbres. Vol. 2, Paris, pp. 158-159. Citado por Bunning (1960).
- 83.- Dumortier, B. (1972). Photoreceptor in the circadian rhythm of stridulatory activity in Ephemeroptera (Insecta). Likely existence of two photoreceptive systems. J. comp. Physiol. 77: 80-112.
- 84.- Dutkowski, A.B. and Cymborowski, B. (1971). Role of neurosecretory cells of pars intercerebralis in regulating RNA synthesis in some tissues of Acheta domesticus. J. Insect Physiol. 17: 99-108.
- 85.- Dutkowski, A.B., Cymborowski, B. and Przerecka, A. (1971). Circadian changes in the ultrastructure of neurosecretory cells of the pars intercerebralis of the house cricket. J. Insect Physiol. 17: 1763-1772.
- 86.- Dutrochet, H. (1837). Mémoires pour servir à l'histoire des végétaux et des animaux. Brussel, p. 287. Citado por Bunning (1960).
- 87.- Edney, E.B. (1937). A study of spontaneous locomotor activity in Locusta migratoria migratorioides (R. & K) by the actograph method. Bull. ent. Res. 28: 243-278.
- 88.- Edwards, G.A. (1950). The influence of eyestalk removal on the metabolism of the fiddler crab. Physiol. Comparata et Oecol. 2: 34-50.
- 89.- Ehret, C.F. (1959). Photobiology and biochemistry of circadian rhythms in non-photosynthesizing cells. Fed. Proc., 18: 1232-1240.
- 90.- Ehret, C.G. and Barlow, J.S. (1960). Toward a realistic model of a biological period-measuring mechanism. in Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 25: 217-220.
- 91.- Eidman, H. (1956). Über rhythmische Erscheinungen bei der Stabheuschrecke Carausius morosus. Br. Z. vergl. Physiol. 38: 370-390.
- 92.- Enami, M. (1941). Melanophore responses in an isopod crustacean Ligia exotica. I. General responses. Japan J. Zool. 9: 497-514.
- 93.- Enright, J.T. (1965). Synchronization and ranges of entrainment. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 112-124.
- 94.- Enright, J.T. (1965). The search for rhythmicity in biological time-series. J. Theoret. Biol. 8: 426-468.
- 95.- Enright, J.T. (1971 a). Heavy water slows biological timing processes. Z. Vergl. Physiol. 72: 1-16.

- 96.- Enright, J.T. (1971 b). The internal clock of drunken isopods. *Z. vergl. Physiol.* 75: 332-346.
- 97.- Eskin, A. (1971). Properties of the Aplysia visual system: in vitro entrainment of the circadian rhythm and centrifugal regulation of the eye. *Z. vergl. Physiol.* 74: 353-371.
- 98.- Eskin, A. and Strumwasser, F. (1971). Properties of the Aplysia visual system: in vitro entrainment of the circadian rhythm centrifugal regulation. *Fed. Proc.* 30: 666.
- 99.- Feldman, J.F. (1967). Lengthening the period of a biological clock in englena by cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences*, 57: 1080-1087.
- 100.- Fingerman, M. (1955 a). Factors influencing the rate of oxygen consumption of the dwarf crawfish, Cambarellus shufeldtii. *Tulane Studies in Zool.* 3: 103- 116.
- 101.- Fingerman, M. (1955 b). Persistent daily and tidal rhythms of color change in Callinectes sapidus. *Biol. Bull.* 109: 255-264.
- 102.- Fingerman, M. (1956 a). The physiology of the melanophores of the isopod Idothea exotica. *Tulane Studies in Zool.* 3: 139-148.
- 103.- Fingerman, M. (1956 b). Phase difference in the tidal rhythms of color change in two species of fiddler crabs. *Biol. Bull.* 110: 274-290.
- 104.- Fingerman, M. (1957). Relation between position of burrows and tidal rhythm of Uca. *Biol. Bull.* 112: 7-20.
- 105.- Fingerman, M., Lago, A.D. and Lowe, M.E. (1958). Rhythms of locomotor activity and O₂ consumption of the grass hopper Romalea microptera. *Am. Midl. Nat.* 59: 58-66.
- 106.- Forsgren, E. (1928). On the relationship between the formation of bile and glycogen in the liver of rabbit. *Scand. Arch. Physiol.* 53: 137. Citado por Bunning (1960).
- 107.- Fowler, D.J. and Goodnight, C.J. (1966 a). Neurosecretory cells: daily rhythmicity in Leiobunum longipes. *Science*, N.Y. 152: 1078-1080.
- 108.- Fowler, D.J. and Goodnight, C.J. (1966 b). The cyclic production of 5-hydroxytryptamine in the opilionid. *Am. Zool.* 6: 187-193.
- 109.- Fowler, D.J., Goodnight, C.J. and Labrie, M.M. (1972). Circadian rhythms of 5-hydroxytryptamine (serotonin) production in larvae, pupae, and adults of Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). *Ann. ent. Soc. Am.* 65: 138-141.
- 110.- Gamble, F.W. and Keeble, F.W. (1900). Hippolyte varians: a study in colourchange. *Quant. J. Microscop. Sci.* 43: 589-698.

- 111.- Gompel, M. (1937). Recherches sur la consommation d'oxygène de quelques animaux aquatiques littorau. Compt. rend. 205: 816-818.
- 112.- Hardeland, R. and Stange, G. (1971). Einflüsse von Geschlecht und Alter auf die lokomotorische Aktivität von Drosophila. J. Insect Physiol. 17: 427-434.
- 113.- Harker, J.E. (1953). The diurnal rhythm of activity of mayfly nymphs. J. Exptl. Biol. 30: 525.
- 114.- Harker, J.E. (1954). Diurnal Rhythms in Periplaneta americana (L.). Nature Lond. 173: 689-690.
- 115.- Harker, J.E. (1955). Control of diurnal rhythms of activity in Periplaneta americana (L.). Nature, Lond. 175: 733.
- 116.- Harker, J.E. (1956). Factors controlling the diurnal rhythm of activity of Periplaneta americana (L.). J. Exp. Biol. 33: 224-234.
- 117.- Harker, J.E. (1958 a). Diurnal rhythms in the animal kingdom. Biol. Rev. 33: 1-52.
- 118.- Harker, J.E. (1960 a). Endocrine and nervous factors in insect circadian rhythms. in Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 25: 279-287.
- 119.- Harker, J.E. (1960 b). The effect of perturbations in the environmental cycle of the diurnal rhythm of activity of Periplaneta americana L. J. exp. Biol. 37: 154-163.
- 120.- Harker, J.E. (1960 c). Internal factors controlling the sub-esophageal ganglion neurosecretory cycle in Periplaneta americana L. J. exp. Biol. 37: 164-170.
- 121.- Harker, J.E. (1961). Diurnal rhythms. A. Rev. Ent. 6: 131-146.
- 122.- Harker, J.E. (1965 a). The effect of a biological clock on the developmental rate of Drosophila pupae. J. exp. Biol. 42: 323-337.
- 123.- Hastings, J.W. and Sweeney, B.M. (1957). On the mechanism of temperature independence in a biological clock. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 43: 804-811.
- 124.- Hastings, J.W. (1960). Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. in Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., Vol. 25, 131-143.
- 125.- Hayes, D.K., Horton, J., Schechter, M.S. and Halberg, F. (1972). Rhythm of oxygen uptake in diapausing larvae of the codling moth at several temperatures. Ann. ent. Soc. Am. 65: 93-96.

- 126.- Hines, M.N. (1954). A tidal rhythm in behavior of melanophores in autotomized legs of Uca pugnax. Biol. Bull. 107: 386-396.
- 127.- Hinks, C.F. (1967). Relationship between serotonin and the circadian rhythms in some nocturnal moths. Nature 214: 386-387.
- 128.- Hofmeister, W. (1867). Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig. Citado por Bunning (1960).
- 129.- Huber, F. (1960). Experimentelle Untersuchungen zur nervösen atemungsregulation der Orthoptera (Saltatoria: Gryllidae). Z. Vergl. Physiol. 43: 359-391.
- 130.- Huber, F. (1965). Neural integration (central nervous system). in The Physiology of Insecta (Ed. M. Rockstein). 2: 333-406. Academic Press, New York and London.
- 131.- Jacklet, J.W. (1969). Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of Aplysia. Science, N.Y. 164: 562-563.
- 132.- Jacklet, J.W. and Geronimo, J. (1971). Circadian rhythm: population of interacting neurons. Science, N.Y. 174: 299-302.
- 133.- Janda, V. and Mrclak, M. (1957). Gesamtstoffwechsel der Insekten. VI. Die Bewegungsaktivität der Schabe Periplaneta americana L. während des Tages und ihre Beziehung zum Sauerstoffverbrauch. Acta Soc. zool. Bohem. 21: 244-255. Citado por Brady (1974).
- 134.- Johnson, M. (1939). Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (Peromyscus). J. Exp. Zool. 82: 315-328. Citado por Aschoff, J. (1960).
- 135.- Johnson, B.F. and James, T.W. (1960). Alteration of cellular constituents by incubation temperature. Exptl. Cell Res. 20: 66.
- 136.- Jones, M.D.R. (1964). The automatic recording of mosquito activity. J. Insect Physiol. 10: 343-351.
- 137.- Jones, M.D.R., Hill, M. and Hope, A.M. (1967). The circadian flight activity of the mosquito Anopheles gambiae: phase setting by the light régime. J. exp. Biol. 47: 503-511.
- 138.- Jones, M.D.R., Cubbin, C.M. and Marsh, D. (1972 a). The circadian rhythm of flight activity of the mosquito Anopheles gambiae: the light-response rhythm. J. exp. Biol. 57: 337-346.
- 139.- Kalman, H. (1934). Über die Natur des Zeitgedächtnisses der Bienen. Z. vgl. Physiol. 20: 405-419.

- 140.- Kalmus, H. (1938). Das Aktogramm des Flusskrebsees und seine Beeinflussung durch Organextrakte. Z. vergl. Physiol. 25: 798-802.
- 141.- Keeble, F.W. and Gamble, F.W. (1904). The colour-physiology of higher crustaceans. Phil. Trans. Roy. Soc. London B 196: 295-388.
- 142.- Keller, S. (1960). Über die Wirkung chemischer Faktoren auf die Tagesperiodischen Blattbewegungen von Phaseolus multiflorus. Z. f. Bot. 48: 32-57.
- 143.- Kiesel, A. (1894). Untersuchungen zur Physiologie des facettierten Auges. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. 97-139.
- 144.- Kleinholz, L.H. (1937 a). Studies in the pigmentary system of Crustacea. I. Color changes and diurnal rhythm in Ligia baudiniana. Biol. Bull. 72: 24-36.
- 145.- Kleinholz, L.H. (1937 b). Studies in the pigmentary system of Crustacea. II. Diurnal movements of the retinal pigments of Bermudan decapods. Biol. Bull. 72: 176-189.
- 146.- Kleinholtz, L.H. (1938). Studies in the pigmentary system of Crustacea. IV. The unitary versus the multiple hormone hypothesis of control. Biol. Bull. 75: 510-532.
- 147.- Kleinhoonte, A. (1929). Über die durch das Licht regulierten autonomen Bewegungen der Canavalia-Blätter. Arch. neerl. Sci. ex. et nat. III b, 5: 1-110. Citado por Bunning (1960).
- 148.- Kleinhoonte, A. (1932). Untersuchungen über die autonomen Bewegungen der Primärblätter von Canavalia ensiformis. Jahrb. f. wiss. Bot. 75: 679-725. Citado por Bunning (1960).
- 149.- Kleitman, N. (1940). The modifiability of the diurnal pigmentary rhythm in isopods. Biol. Bull. 78: 403-406.
- 150.- Klug, H. (1958). Histo-physiologische Untersuchungen über die Aktivitätsperiodik bei Carabiden. Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, math-natur. Reihe, 8: 405-434. Citado por Brady (1974).
- 151.- Leclerc, M.M., Schieber, J.P. and Lienhard, J.P. (1971). L'rythme nyctheméral de la consommation d'oxygène de la Drosophile. C. r. Seanc. Soc. Biol. Fil. 165: 421-425.
- 152.- Lees, A.D. (1964). The location of the photoperiodic receptors in the aphid Megoura viciae Buckton. J. exp. Biol. 41: 119-133.
- 153.- Lehmann, U. (1965). Investigations on periodicity of freshwater invertebrates by radioactive isotopes in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 318-320.

- 154.- Leinweber, F.J. (1956). Über die temperatur abhängigkeit der Periodenlänge bei der endogenen Tagersrhythmik von Phaeococcus. Zeit. f. Bot. 44: 337-364.
- 155.- Leuthold, R. (1966). Die Bewegungsaktivität der weiblichen Schabe Leucophaea maderae F im Laufe des Fortpflanzungszyklus und ihre experimentelle Beeinflussung. J. Insect Physiol. 12: 1303-1331. Citado por Brady (1964).
- 156.- Loher, W. (1972). Circadian control of stridulation in the cricket Teleogryllus commodus Walker. J. comp. Physiol. 79: 173-190.
- 157.- Loher, W. and Chandrashekaran, M.K. (1970). Circadian rhythmicity in the oviposition of the grasshopper Chorthippus curtipennis. J. Insect Physiol. 16: 1677-1688.
- 158.- Minis, D.H. and Pittendrigh, C.S. (1968). Circadian oscillation controlling hatching: its ontogeny during embryogenesis of a moth. Science, N.Y. 159: 534-536.
- 159.- Mori, S. (1960). Influence of environmental and physiological factors on the daily rhythmic activity of a sea-pen. in Biological clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 25: 333-344.
- 160.- Müller, K. (1965). Field experiments on periodicity of fresh-water invertebrates. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co. Amsterdam.
- 161.- Nagano, T. (1950). Physiological studies on the pigmentary system of Crustacea. IV. Studies on the diurnal rhythm of the eye pigments of the shrimps. Science Repts. Tôhoku Univ. Fourth Ser. 18: 286-297. Citado por Waterman (1961).
- 162.- Nayar, J.K. (1967 a). Endogenous diurnal rhythm of pupation in a mosquito population. Nature, Lond. 214: 828-829.
- 163.- Nayar, J.K. (1968). The pupation rhythm in Aedes Taeniorhynchus. IV. Further studies of the endogenous diurnal (circadian) rhythm of pupation. Ann. ent. Soc. Am. 61: 1408-1417.
- 164.- Nayar, J.K. and Sauerman, D.M. Jr. (1970). A comparative study of growth and development in Florida mosquitoes. Part 1: effects of environmental factors on ontogenetic timings, endogenous diurnal rhythm and synchrony of pupation and emergence. J. med. Ent. 7: 163-174.
- 165.- Nayar, J.K. and Sauerman, D.M. Jr. (1971). The effect of light regimes on the circadian rhythm of flight activity in the mosquito Aedes Taeniorhynchus. J. exp. Biol. 54: 745-756.
- 166.- Naylor, E. (1963). Temperature relationships of the locomotor rhythm of Carcinus. J. Exptl. Biol. 40: 669-79

- 167.- Naylor, E. and Atkinson, R.J.A. (1972). Pressure and the rhythmic behaviour of inshore marine animals. Symp. Soc. exp. Biol. 26: 395-415.
- 168.- Naylor, E. and Williams, B.G. (1968). Effect of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in *Carcinus*. J. exp. Biol. 49: 107-116.
- 169.- Neumann, D. (1971 a). Eine nicht-reziproke Kreuzungssterilität zwischen ökologischen Rassen der Mücke Clunio marinus. Oecologia, 8: 1-20.
- 170.- Neumann, D. (1971 b). The temporal programming of development in the intertidal chironomid Clunio marinus (Diptera: Chironomidae). Can. Ent. 103: 315-318.
- 171.- Nielsen, E.T. and Haeger, J.S. (1954). Pupation and emergence in Aedes Taeniorhynchus Wied. Bull. Entomol. Res. 45: 757-768.
- 172.- Nishiitsutsuji-Uwo, J., Petropoulos, S.F. and Pittendrigh, C.S. (1967). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. I. Role of the pars intercerebralis. Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole 133: 679-696.
- 173.- Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Pittendrigh, C.S. (1967). The neuroendocrine basis of midgut tumor induction in cockroaches. J. Insect Physiol. 13: 851-859.
- 174.- Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Pittendrigh, C.S. (1968 a). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. II. The pathway of light signals that entrain the rhythm. Z. vergl. Physiol. 58: 1-13.
- 175.- Nishiitsutsuji-Uwo, J. and Pittendrigh, C.S. (1968 b). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. III. The optic lobes, locus of the driving oscillation?. Z. vergl. Physiol. 58: 14-46.
- 176.- Norris, K.R. (1966). Daily patterns of flight activity of blowflies in the Canberra district as indicated by Trap catches. Australian J. Zool. 14: 835-844.
- 177.- Nowosielski, J.W. and Patton, R.L. (1963). Studies on circadian rhythm of the house cricket, Gryllus domesticus L. J. Insect Physiol. 9: 401-410.
- 178.- Nowosielski, J.W. and Patton, R.L. (1964). Daily fluctuation in the blood sugar concentration of the house cricket, Gryllus domesticus L. Science, N.Y. 144: 180-181.
- 179.- Odhiambo, T.R. (1966). The metabolic effects of the corpus allatum hormone in the male desert locust. II. Spontaneous locomotor activity. J. exp. Biol. 45: 51-63.

- 180.- Page, L.T. and Larimer, L.J. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. J. comp. Physiol. 97: 59-80.
- 181.- Page, L.T. and Larimer, L.J. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. J. comp. Physiol. 97: 81-96.
- 182.- Palmer, J.D. (1971). Comparative studies of circadian locomotory rhythms in four species of terrestrial crabs. Am. Midland Naturalist. 85: 97-107.
- 183.- Paulpandian, A. (1965). A preliminary report on the diurnal rhythm in the locomotor activity of pill-milli-pede, Arthrosphaera dalayi Pocock. Proc. Indian Acad. Sci., Ser. B, 62: 235-41.
- 184.- Pavlidis, T. (1965). A new model for simple neural nets and its application in the design of a neural oscillator. Bull. Math. Biophys. 27: 215-229.
- 185.- Pavlidis, T. (1966). Design of neural nets with intermittent response and certain other relevant studies. Bull. Math. Biophys. 28: 51-74.
- 186.- Pavlidis, T. (1967). A model for circadian clocks. Bull. Math. Biophys. 29: 781-791.
- 187.- Pavlidis, T. (1967). A mathematical model for the light affected system in the Drosophila eclosion rhythm. Bull. Math. Biophys. 29: 291-310.
- 188.- Pavlidis, T., Zimmerman, W.F. and Osborn, J. (1968). A mathematical model for the temperature effects on circadian rhythms. J. Theor. Biol. 18: 210-221.
- 189.- Pavlidis, T. (1969). Mathematical models of circadian rhythms: Their usefulness and their limitations. Proc. Symp. Friday Harbor, Washington, Biochronometry, pp. 110-116 Nat. Acad. Sci., Washington, D.C.
- 190.- Pavlidis, T. (1973). Biological oscillators: Their mathematical analysis. Academic Press, New York and London.
- 191.- Pfeffer, W. (1873). Physiologische Untersuchungen. Leipzig. Citado por Bunning (1960).
- 192.- Pfeffer, W. (1875). Die periodischen Bewegungen der Blattoorgane. Leipzig. Citado por Bunning (1960).
- 193.- Pfeffer, W. (1915). Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Schlafbewegungen. Abhandl. Math. Phys. Kl. Kön. Sächs. Ges. d. Wiss. 34: 1-154. Citado por Bunning (1960).

- 194.- Pittendrigh, C.S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 40: 1018-1029.
- 195.- Pittendrigh, C.S. (1957). Circadian Systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58: 1762-1767.
- 196.- Pittendrigh, C.S. and Bruce, V.C. (1957). An oscillator model for biological clocks. in Rhythmic and Synthetic Processes in Growth (Ed. D. Rudnick), pp. 75-109. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey.
- 197.- Pittendrigh, C.S. (1958). Perspective in the study of biological clocks. in Symposium on Perspectives in Marine Biology. Berkeley, Calif. Univ. of Calif. Press. pp. 239-268.
- 198.- Pittendrigh, C.S. (1959). Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. Photo-periodism and related phenomena in plants and animals, pp. 475-505. Amer. Assoc. Advan. Sci., Washington, D.C.
- 199.- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harbor Symp. Quantitative Biol., Biological Clocks, 25, pp. 159-184. Cold Spring Harbor Lab. Quant. Biol., Cold Spring Harbor, New York.
- 200.- Pittendrigh, C.S. (1961). On temporal organization in living systems. Harvey Lect. 56: 93-125.
- 201.- Pittendrigh, C.S. and Minis, D.H. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. Amer. Natur. 98: 261-294.
- 202.- 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.
- 203.- Pittendrigh, C.S. (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: A model for the photoperiodic clock. Z. Pflanzenphysiol. 54: 275-307.
- 204.- Pittendrigh, C.S. (1967 a). Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 58: 1762-1767.
- 205.- Pittendrigh, C.S. (1967 b). Circadian rhythms, space research and manned space flight. Life Sci. Space Res. 5: 122-134.
- 206.- Pittendrigh, C.S. and Minis, D.H. (1969). The photoperiodic time measurement in *Pectinophora gossypiella* and its relation to the circadian system in that species. Proc. Symp., Friday Harbor, Washington, Biochronometry, Nat. Acad. Sci., Washington, D.C., pp. 212-250.

- 207.- Pittendrigh, C.S. and Skopik, S.D. (1970). Circadian systems. V. The driving oscillation and the temporal sequence of development. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 65: 500-507.
- 208.- Pittendrigh, C.S., Eichhom, J.H., Minis, D.H. and Bruce, V.G. (1970). Circadian systems: VI. Photoperiodic time measurement in Pectinophora gossypiella. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 66: 758-764.
- 209.- Powell, B.L. (1965). The hormonal control of the tidal rhythm of locomotor activity in Carcinus maenas. Gen. comp. Endocr. 5: 705-706.
- 210.- Raabe, M. (1965). Etude des phenomenes de neurosécrétion au niveau de la chaîne nerveuse ventrale des phasmes. Bull. Soc. Zool. Fr. 90: 631-654.
- 211.- Raabe, M. (1966). Recherches sur la neurosécrétion dans la chaîne nerveuse ventrale du Phasme, Clitumnus extradentatus: variations d'activité des différents éléments neurosécréteurs. C. r. hebdomadaire des Séances Acad. Sci., Paris, 262: 303-306.
- 212.- Ralph, C.L. (1957). Persistent rhythms of activity and O₂ - consumption in the Earthworm. Physiol. Zool. 30: 41-55.
- 213.- Rao, K.P. and Gopalakrishnareddy, T. (1967). Blood borne factors in circadian rhythms of activity. Nature, Lond. 213: 1047-1048.
- 214.- Rensing, L. (1961). Aktivitätsperiodik des wasserläufers Velia curreus F. Z. Vergl. Physiol. 44: 292-322.
- 215.- Rensing, L. (1964). Daily rhythmicity of corpus allatum and neurosecretory cells in Drosophila melanogaster Meig. Science, N.Y. 144: 1586-1587.
- 216.- Rensing, L. (1965 a). Circadian rhythms in the course of ontogeny. in Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp.399-405.
- 217.- Rensing, L. (1965 b). Ontogenetic timing and circadian rhythms in insects. in Circadian clocks (Ed. J. Aschoff). North-Holland, Amsterdam, pp. 406-412.
- 218.- Rensing, L., Thach, L.B. and Bruce, V. (1965). Daily rhythms in the endocrine glands of Drosophila larvae. Experientia, 21: 103-104.
- 219.- Rensing, L. (1966 b). Aspects of the circadian organization of Drosophila. Union int. Sci. biol. 4: 37-45.
- 220.- Rensing, L., Brunken, W. and Hardeland, R. (1968). On the genetics of a circadian rhythm in Drosophila. Experientia, 24: 509-510.

- 221.- Rensing, L. (1970). Zur Rolle der RNS-Synthese bei zellulären circadianen Rhythmen. Verh. dt. zool. Ges. Zool. Anz. (Suppl.), 34: 282-287.
- 222.- Rensing, L. (1971). Hormonal control of circadian rhythms in *Drosophila*. in *Biochronometry* (Ed. M. Menaker), National Academy of Sciences. Washington, pp. 527-540.
- 223.- Richards, A.G. and Halberg, F. (1964). Oxygen uptake rhythms in a cockroach ganged by variance spectra. *Experientia*. 20: 40-42.
- 224.- Richards, A.G. (1969). Oxygen consumption of the American cockroach under complete inanition prolonged to death. *Ann. ent. Soc. Am.* 62: 1313-1316.
- 225.- Roberts, S.K. (1960). Circadian activity rhythms in cockroaches. I. The free running rhythm in steady-state. *J. cell. comp. Physiol.* 55: 99-110.
- 226.- Roberts, S.K. (1962). Circadian activity rhythms in cockroaches. II. Entrainment and phase shifting. *J. cell. comp. Physiol.* 59: 175-186.
- 227.- Roberts, S.K. (1965 a). Significance of endocrines and central nervous system in circadian rhythms. in *Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam*, pp. 198-213.
- 228.- Roberts, S.K. (1965 b). Photoreception and entrainment of cockroach activity rhythms. *Science, N.Y.* 148: 958-959.
- 229.- Roberts, S.K. (1966). Circadian activity rhythms in cockroaches. III. The role of endocrine and neural factors. *J. cell. Physiol.* 67: 473-486.
- 230.- Roberts, S.K. (1971). Comment, in Roberts et al. (1971) in *Biochronometry*. (Ed. M. Menaker). National Academy of Sciences, Washington, pp. 514-516.
- 231.- Roberts, S.K., Skopik, S.D. and Driskill, R.J. (1971). Circadian rhythms in cockroaches: does brain hormone mediate the locomotor cycle? in *Biochronometry* (Ed. M. Menaker). National Academy of Science, Washington, pp. 505-516.
- 232.- Roberts, S.K. (1974). Circadian rhythms in cockroaches. Effects of optic lobe lesions. *J. comp. Physiol.* 88: 21-30.
- 233.- Roberts, T.W. (1942). Behavior of organisms. *Ecol. Mono.* 12: 339-412.
- 234.- Sachs, J. (1836). Die vorübergehenden Stern-Zustände periodisch beweglicher und reizbarer Pflanzenorgane. II. Die vorübergehende Dunkelstarre. *Flora*, 30: 469. Citado por Bunning (1960).

- 235.- Sachs, J. (1857). Über das Bewegungsorgan und die periodischen Bewegungender Blätter von Phaseolus und Oxalis. Botan. Zeitung. 15, Nr. 47: 814. Citado por Bunning (1960).
- 236.- Schallek, W. (1942). Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. J. exp. Zool. 91: 155-166.
- 237.- Scharrer, B. (1952). Neurosecretion XI. The effects of nerve section on the intercerebralis-cardiacum-allatum system of the insect Leuco-phaea maderae. Biol. Bull. 102: 261-272.
- 238.- Schmitt, O.H. (1960). Biophysical and mathematical models of circadian rhythms. in Biological clocks. Col. Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25: 207-210.
- 239.- Stoppel, R. (1910). Ueber den Einfluss des Lichtes auf das Oeffnen und Schliessen einiger Blüthen. Z. f. Bot. 2: 369-453. Citado por Aschoff, J. (1960).
- 240.- Strumwasser, F. (1963). A circadian rhythm of activity and its endogenous origin in a neuron. Federation Proc., Vol. 22, p. 220 (Abstract).
- 241.- Strumwasser, F. (1965 a). The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron, in Circadian clocks (Ed. J. Aschoff), Amsterdam, North-Holland, pp. 442-462.
- 242.- Strumwasser, F. and Bahr, R. (1966). Prolonged in vitro culture and autoradiographic studies of neurons in Aplysia. Federation Proc., 25: 512 (Abstract).
- 243.- Strumwasser, F. (1967 a). Neurophysiological aspects of rhythms. in The Neurosciences (Ed. by Quarton G., Melnechuk, T. and Schmitt, F.), pp. 516-528.
- 244.- Strumwasser, F. (1967 b). Types of information stored in single neurons, in Conference on invertebrate nervous system. (Ed. C.A.G. Wiersma), Chicago, University of Chicago Press, pp. 291-319.
- 245.- Sweeney, B.M. and Hastings, J.W. (1958). Rhythmic cell division in populations of Gonyaulax polyedra. J. Protozool. 5: 217-224.
- 246.- Sweeney, B. and Hastings, J.W. (1960). Effects of temperature upon diurnal rhythms. in Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. Vol. 25, 87-104.
- 247.- Sytshevskaya, V.I. (1962). On the daily dynamics of the specific composition of synanthropic flies within a season. Entomol. Obozrenie, 41: 545-553. Citado por Danilevsky y cols. (1970).
- 248.- Thomas, R. and Finlayson, L.H. (1970). Initiation of circadian rhythms in arrhythmic churchyard beetles (Blaps mucronata). Nature, Lond. 228: 577-578.

- 249.- Truman, J.W. and Riddiford, L.M. (1970). Neuroendocrine control of ecdysis in silkworms. *Science*, N.Y. 1967, 1624-1626.
- 250.- Truman, J.W. (1971 a). Hour-glass behavior of the circadian clock controlling eclosion of the silkworm Antheraea pernyi. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 68: 595-599.
- 251.- Volm, M. (1964). Die Tagesperiodik der Zellteilung von Paramecium bursaria. *Z. Vergl. Physiol.* 48: 157-180.
- 252.- Waterman, T.H. (1961). The physiology of crustacea. Academic Press, New York and London, 2: 133-163.
- 253.- Webb, H.M. and Brown, F.A. Jr. (1953). Diurnal rhythm in the regulation of distal retinal pigment in Palaemonetes. *J. Cellular Comp. Physiol.* 41: 103-122.
- 254.- Webb, H.M., Bennet, M.F. and Brown, F.A. Jr. (1954). A persistent diurnal rhythm of chromatophoric response in eyestalkless Uca pugilator. *Biol. Bull.* 106: 371-377.
- 255.- Weber, F. (1965). Zur Tagaktivitat von Carabus-Arten. *Zool. Anz.*, 175: 354-60. Citado por Danilevski y cols. (1970).
- 256.- Weber, F. (1966). Zur Tageszeitlichen Aktivitäts verteilung der Carabus-Arten. *Zool. Jahrb., Abt. 1*, 72: 136-56. Citado por Danilevski y cols. (1970).
- 257.- Weber, R. (1965). A mathematical model for circadian rhythms. in *Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam*, pp. 47-63.
- 258.- Welsh, J.H. (1930). Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 16: 386-395.
- 259.- Welsh, J.H. (1935). Further evidence of a diurnal rhythm in the movement of pigment cells in eyes of crustaceans. *Biol. Bull.* 68: 247-252.
- 260.- Welsh, J.H. (1936). Diurnal movements of the eye pigments of Archistoides. *Biol. Bull.* 70: 217-227.
- 261.- Welsh, J.H. (1938). Diurnal rhythms. *Quart. Rev. Biol.* 13: 123-139.
- 262.- Welsh, J.H. (1941). The sinus glands and 24 hour cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool.* 86: 35-49.
- 263.- Wilkins, B. (1965). The influence of temperature and temperature changes on biological clocks. in *Circadian clocks-North-Holland Publishing Co., Amsterdam*, pp. 146-163.

- 264.- Wilkins, M. (1960). A temperature-dependent endogenous rhythm in the rate of carbon dioxide output of Periplaneta americana. Nature, Lond. 185: 481-482.
- 265.- Winfree, A.T. (1967). Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. J. Theor. Biol. 16: 15-42.
- 266.- Zimmerman, W.F., Pittendrigh, C.S. and Pavlidis, T. (1968). Temperature compensation of the circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura and its entrainment by temperature cycles. J. Insect Physiol. 14: 669-684.
- 267.- Zimmerman, W.F. (1969). On the absence of circadian rhythmicity in Drosophila pseudoobscura pupae. Biol. Bull. 136: 494-500.
- 268.- Zimmerman, W.F. and Ives, D. (1971). Some photophysiological aspects of circadian rhythmicity in Drosophila. in Biochronometry (Ed. M. Menaker). National Academy of Sciences, Washington, pp. 381-391.
- 369.- Zinn, J.G. (1759). Von dem Schläfe der Pflanzen. Hamburgisches Magazin 22, 1: 49-50. Citado por Bunning (1960).