

11281

Rej

③

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA.

MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA SINCRONIZACION DEL
RITMO CIRCADICO ELECTORRETINOGRAFICO DEL AGOCIL.
(Sincronización por luz monocromática).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(FISIOLOGIA).

PRESENTA
VIRGINIA INCLAN RUBIO.

FECHA DE ORIGEN

1938



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 está 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.

CONTENIDO:

	PAGINA
<u>INTRODUCCION</u>	1
Concepto de tiempo	1
propiedades de los ritmos biológicos	4
frecuencia natural de oscilación y sincronización	12
sincronización y relaciones de fase	14
cambio de fase del sincronizador	17
curva de respuesta de fase	19
ritmo electrorretinográfico en el acocil	22
sistema visual en el acocil	23
sensibilidad espectral en los crustáceos	29
sincronización por luz monocromática	37
<u>HIPOTESIS</u>	40
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	43
<u>RESULTADOS</u>	50
efecto de la luz monocromática sobre el ritmo electrorretinográfico	50
curvas de respuesta de fase	61
efecto de la aplicación de luz monocro- mática en forma continua sobre el rit- mo electrorretinográfico	69
sincronización por fotoperiodos con luz monocromática sobre el ritmo ERG	71
<u>DISCUSION</u>	81
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	101

INTRODUCCIÓN.-

Concepto de tiempo.

El concepto del tiempo es uno de los más importantes que el hombre ha logrado abstraer a lo largo de su evolución. Desde las primeras etapas de la humanidad, la noción del tiempo seguramente fue sugerida por diversas manifestaciones naturales, como son: la sucesión del día y la noche, los cambios observados durante las estaciones del año, el desarrollo ontogénico de los organismos vivos, etcétera. La noción del transcurso del tiempo aparece en forma trascendental y primigenia en aquellas culturas dependientes, en mayor o menor grado, de su cálculo. Si bien, todo en la naturaleza nos muestra la linealidad del curso del tiempo, alternando con ella en imbricaciones sucesivas, se hace manifiesto un elemento cíclico: el tiempo transcurre entre revoluciones y es mediante estas que se nos hace aparente. Dividimos el tiempo en años. El desplazamiento de la luna genera otra unidad temporal, el mes, y la rotación terrestre uno más, el día. De acuerdo con la hora del día, la superficie de la tierra y el fondo del mar cambian conspicuamente de aspecto, póblandose con especies animales distintas, que emergen de sus madrigueras con regularidad cronométrica, para retornar a ellas, también con

mucha exactitud. Según la época del año, todo el paisaje cambia y tanto vegetales como animales aparecen o se modifican con el paso de las estaciones.

De la gran variedad de ritmos, que pueden medirse a través de estos cambios, son los ritmos diurnos los que nos interesan en este trabajo. Por ser los vegetales en donde se describieron por primera vez esta clase de ritmos, sus principales características, se refieren a estas especies. Suele acreditársele a Andróstenes, médico de la expedición de Alejandro magno en Asia Menor, el haber observado que las hojas de un papilionácea, Tamaridus indicus, cambiaban de posición rítmicamente a lo largo del ciclo diurno (citado por Bünning, 1967). Sin embargo, transcurrieron muchos años antes de que se realizara el primer estudio de este fenómeno. En 1729, el astrónomo francés J.J. d'Ortoús de Mairan observó el movimiento de hojas de una posición a otra según la hora del día (nictastía) de la compuesta, Mimosa pudica. Treinta años después, De Manceau (1759) caracterizó la nictastía como una ritmicidad endógena. En 1832, Agustín de Candolle, señaló que el periodo era diferente, aunque cercano a 24 horas (citado por Moore-Ede, 1981). De Mairan sentó además las bases para el estudio de la cronobiología hace más de 200 años: indicó la necesidad de aislar a los

organismos respecto al medio, para poder separar los componentes endógenos de los exógenos en un ritmo dado. Sin embargo, a pesar de que los ritmos obedecen a mecanismos intrínsecos a la materia viva, son susceptibles de modificar su fase de acuerdo con señales geofísicas. La propiedad de variar rítmicamente a lo largo del ciclo de 24 horas es común a casi todas las especies. Durante los últimos 50 años se ha recabado información acerca de la existencia de ritmos endógenos en la inmensa mayoría de los grupos biológicos. La ritmicidad parece ser una propiedad universal de la materia viva, desde organismos unicelulares hasta el ser humano. A esta regla sólo parecen escapar los seres que habitan en las profundidades de las cavernas o en el fondo del océano. En ambos casos, el elemento común es la falta de luz. Son ya muchas las observaciones (Pittendrigh, 1957, 1958, 1960, 1965; Aschoff, 1960, 1965; Bünning, 1967; Enright, 1965) que indican que ésta, entre todas las formas de energía ambiental, es la que tiene una mayor influencia sobre los ritmos biológicos. El hecho de que los ritmos biológicos se manifiesten con igual claridad tanto en especies simples, filogenéticamente primitivas, como en otras recientes más evolucionadas, sugiere que la ritmicidad es una propiedad de la materia viva que apareció en ella desde

etapas muy tempranas de su evolución. Cuando se han hecho experimentos para saber si disponemos de un sólo sistema de cómputo del tiempo, se ha llegado a la conclusión de que la duración del fotoperiodo, es decir, la parte iluminada del ciclo de 24 horas, es la fuente de información determinante, de tal manera que los ritmos con un periodo más largo que el circádico, son múltiplos de éste, lográndolo mediante dispositivos de transformación de frecuencia. Como consecuencia, podemos considerar la ritmicidad circádica como modelo de organización cronobiológica.

Propiedades de los ritmos biológicos.

Sin importar que tan simple o complejo sea el organismo en el que se presenten, y de que función afecten, los ritmos circádicos presentan siempre las mismas propiedades generales que se pueden resumir así: en primer lugar son endógenos. En la materia viva existe un mecanismo tal que, independientemente de la fase del nictámero exterior, es capaz de generar su propia señal de tiempo, sin embargo el periodo de estos ritmos difiere del valor de la señal geofísica que les dió origen, en este caso la rotación de la tierra; de ahí que se hable de ritmos circádicos o circadianos ("de duración cercana a un día" Halberg, 1959). Si los sistemas biológicos se aíslan de este cambio ambiental, persiste en ellos

una actividad periódica, poniéndose de manifiesto la "frecuencia natural de oscilación del sistema" (Aschoff, 1967), con lo cual se hace evidente un desfaseamiento en relación al nictámero externo. Si esta frecuencia natural de oscilación persiste sin atenuarse durante muchos periodos, se puede decir que el ritmo pertenece a un sistema capaz de producir oscilaciones autosostenidas, esto es, que es endógeno. Otra característica de los sistemas circádicos se refiere a la estrecha relación que guardan con la intensidad de la luz que reciben. Se ha confirmado que la frecuencia natural de oscilación, en distintos organismos, varía de manera lineal con el logaritmo de la intensidad luminosa (Johnson, 1939; Aschoff, 1960; Sulzman y cols. 1979). El cambio en la velocidad del ritmo depende de la fase que éste tenga cuando se reciban las diferentes cantidades de luz. De esta manera - hay una influencia directa sobre la frecuencia de oscilación. Un ritmo circádico obtenido en condiciones constantes presenta dos componentes en el ciclo, uno de actividad y uno de reposo. Si durante la fracción de actividad la velocidad del sistema es mayor y en la fracción de reposo la velocidad es menor, entonces es posible esperar que un aumento en la intensidad de la luz produzca mayor velocidad de cambio en organismos activos en el día y una disminución provoque lo

contrario. Los organismos nocturnos presentan una situación inversa. También se puede pensar que alargar la porción de actividad, cuando el sistema presenta mayor velocidad de cambio, provoque un acortamiento del ciclo circádico. Cuando el ritmo se encuentra en estado estable, la frecuencia natural de oscilación (o recíproco del periodo del ritmo) y la relación entre la actividad y el reposo (o relación α/ϵ) se mide fácilmente. Existe un tercer parámetro importante para estudiar un ritmo biológico, el nivel de actividad que tiene la oscilación. La pendiente que los puntos de inicio y fin de la oscilación tengan entre sí puede dar una idea de cual es este valor. En la mayoría de los organismos estudiados, el nivel de actividad, el valor en el periodo y la relación α/ϵ están estrechamente ligados y el cambio en uno de ellos repercute sobre los otros dos. Cuando los organismos diurnos reciben más luz, aumentan la frecuencia, la relación α/ϵ y el nivel de actividad, en tanto que los nocturnos reducen los tres parámetros en esta situación experimental. La generalización de estos hechos se conoce con el nombre de "regla circádica de Aschoff" (Aschoff, 1960). Otra cualidad de los ritmos es que su frecuencia es "independiente de la temperatura ambiental", expresión acuñada por Büning (1967) y que se refiere al hecho de que los sistemas circádicos no

modifican el valor de su periodo ante cambios bruscos en la temperatura ambiental. Se sabe que el Q_{10} es igual a 1.0 esto es, el cociente que resulta de dividir el valor de la velocidad de la oscilación ($1/\lambda$) a una temperatura dada, sobre el obtenido de otra, diez veces menor es igual a la unidad. El hecho de que el valor del Q_{10} sea casi siempre de 1.0 adquiere mayor relevancia si consideramos que el Q_{10} para la mayoría de los procesos biológicos tiene valores entre 2.0 y 3.0. El valor del Q_{10} para los ritmos circádicos va de 0.8 a 1.3 y el hecho de que se hayan encontrado valores menores de 1.0 es una fuerte sugerencia de la existencia de un mecanismo compensador de los cambios de temperatura para el marcapaso circadiano (Sweeney y Hastings, 1960). Esto no implica una falta de sensibilidad del sistema a la temperatura; de hecho, establece la posibilidad de compensar sus efectos. Bruce y Pittendrigh (1956) encontraron que la temperatura puede sincronizar los ritmos (cambiando su fase) si los cambios térmicos se aplican a intervalos fijos. La amplitud de las oscilaciones es muy sensible y algunos ritmos casi no se expresan cuando la temperatura es muy baja (Hastings y Sweeney, 1960) o si es muy alta (Pittendrigh, 1974). Lo que si es muy claro es que tanto la frecuencia como el ángulo de fase, que son las propiedades de un ritmo en las que realmente se lleva el control del tiempo, se mantienen con total

independencia de la temperatura. Además, el efecto de la temperatura sobre un ciclo circádico depende de la fase en que éste se encuentre en el momento de la aplicación del cambio térmico, de tal suerte que un estímulo que posea las mismas características provocará efectos diferentes (adelantos o atrasos de fase) de acuerdo con la sensibilidad del sistema estudiado (Aschoff, 1965). Tal vez el acocil Procambarus bouvieri posea un mecanismo compensador de la temperatura. Al cambiar la temperatura de 20°C a 12°C y de 12°C a 20°C se observan modificaciones importantes en la amplitud del ritmo circádico motor, pero no hay cambios en la frecuencia del ritmo (Fuentes-Perdo e Inclán-Rubio, 1981). Wilkins (1965) propuso que, en algunos casos, un cambio de temperatura puede iniciar las oscilaciones en organismos vegetales aperiódicos que han permanecido en condiciones uniformes durante mucho tiempo. Podemos concluir que aunque no esté claro el mecanismo involucrado, parece evidente que la temperatura no afecta en forma importante el periodo circádico, siempre y cuando el cambio térmico se aplique en la fase estable del ritmo y los intervalos tengan una duración tal que no puedan ser interpretados como señales periódicas (Pittendrigh y Calderola, 1973). Otra característica que presenten los ritmos circádicos es su dependencia de la historia

previa al momento de registro. Un ritmo circádico que expresa su frecuencia de oscilación libre en condiciones constantes puede estar influenciado durante más de 100 días por la situación ambiental a la que estuvo previamente sujeto; esta condición se conoce con el nombre de posefecto (Pittendrigh, 1960). Entre las situaciones experimentales más efectivas para provocar posefectos está el número de horas de luz en un ciclo de luz-oscuridad que se quiera imponer al sistema circádico. Los posefectos indican que los eventos que se quieren imponer al periodo de un "reloj" circádico alteran las propiedades de este reloj de tal manera que los efectos residuales de la condición impuesta permanecen durante muchos ciclos. Otra propiedad se refiere a que la ritmicidad circádica es innata y hereditaria. Cuando un organismo se somete a condiciones ambientales constantes, desde los primeros días de su desarrollo, se puede comprobar que este hecho no interfiere con la aparición de su frecuencia natural de oscilación, lo que permite proponer que el organismo tiene una periodicidad innata. El periodo de un ritmo circádico no se asimila ni se imprime en el organismo por medio de estímulos ambientales. Semon (1908) encontró un ritmo circádico de expansión y retracción de las hojas de Acacia lohnata en plantas de semillas previamente expuestas a regímenes diferentes

de luz y oscuridad. Naylor, en 1958, observó en cangrejos que además del ritmo circádico de actividad locomotora, se da otro en fase con el movimiento de la marea. Si el cangrejo habita una playa donde este movimiento es casi nulo, el ritmo se amortigua. Naylor tomó especímenes de estas playas y observó que sus descendientes eran arrítmicos, los sometió a un breve pulso de enfriamiento y, en fase con este, se manifestó un claro ritmo, con periodicidad de marea en animales que jamás habían experimentado esa frecuencia en su medio ambiente. De esta clase de experimentos se puede inferir que lo que se hereda es la capacidad de mantener la periodicidad rítmica pero no la fase. Büning (1935) realizó una serie de experimentos con lo que puso de manifiesto que el ritmo de eclosión de la mosca Drosophila desaparecía si los huevecillos eran colocados en condiciones constantes de oscuridad; la población se mantuvo arrítmica durante 15 generaciones sucesivas, pero cuando se le aplicó un destello único de luz, reasumió la periodicidad circádica que tiene en condiciones normales. Estos hechos llevaron al autor a sugerir que el periodo circádico está genéticamente controlado. Esta sugerencia fue corroborada por otros autores (Konopa y Benzer, 1971) quienes indujeron cuatro mutaciones en el cromosoma X de Drosophila melanogaster, afectando el periodo de eclosión

y el ritmo de actividad locomotora. Los estudios realizados fueron tan precisos que permitieron ubicar el locus que al mutar provoca el alargamiento del periodo circádico en esta especie (Konopa, 1972). Otras características de los ritmos circádicos que pueden incluirse y que se han establecido con base en sólidas proposiciones experimentales son las siguientes: los ritmos circádicos son ubicuos en los sistemas vivos; son muy precisos, ya que en un gran número de casos persisten con un grado de variabilidad temporal insignificante; mantienen estables la amplitud, la fase y la duración de su periodo ante un buen número de estímulos cuínicos. La excepción a esta afirmación son los hallazgos de Bruce y Pittendrigh (1960) acerca del efecto del óxido de deuterio sobre el aumento en la duración del período de actividad del dinoflagelado Euglena. Büning y Baltes (1963) demostraron lo mismo en Phaseolus. Otros fármacos que desfazan y alargan el ritmo circádico en el movimiento de las hojas de Phaseolus son, el alcohol etílico, la teofilina y la teobromina. Otra característica muy importante de los ritmos circádicos, y que revisaremos con sumo cuidado a lo largo de este trabajo, es que son susceptibles de ser afectados por influencias ambientales. La capacidad que muestran los ritmos circádicos para adelantar o atrasar su fase, después de haber sufrido

una perturbación, así como la modificación de su frecuencia natural de oscilación, que suele aparecer después de la aplicación de algún factor periódico externo, se conoce como "sincronización de los ritmos circádicos". La capacidad de sincronización de un ritmo circádico nos permite entender con mayor claridad de qué manera los sistemas biológicos pueden estar en fase con señales geofísicas de diversa índole. Un aspecto especial de la compleja relación entre los mecanismos endógenos y las influencias ambientales en la generación de la ritmicidad circádica es que la influencia sincronizante de un agente externo depende de la fase del ciclo sobre la que incide, es decir, que los sistemas biológicos no son igualmente sensibles a las influencias exteriores en cualquier hora del día. Otros efectos de las señales externas son: sincronizar una periodicidad circádica con el medio ambiente, sincronizar varios "relojes" biológicos en un organismo, sincronizar individuos de una misma especie y modificar el patrón circádico (Aschoff, 1960).

Frecuencia natural de oscilación y sincronización.-

Pittendrigh (1960) estableció que la sincronización con estímulos de diferentes características puede dar como resultado diferencias en los valores del periodo circádico (τ). Este autor propuso dos tipos de efectos posteriores al estímulo:

a) τ es influido por la relación luz-oscuridad (fotoperiodo) del estímulo sincronizante; b) el periodo circádico es afectado por el periodo del estímulo. Hay una gran correlación entre τ y el periodo del estímulo (T), con el cual el ritmo ha sido previamente sincronizado. Se ha propuesto que hay otros efectos posteriores al estímulo sincronizante (Aschoff, 1979; Pittendrigh y Dean, 1976a), si éste se interpone entre dos ciclos circádicos o si se aplica un estímulo único, se puede provocar el cambio en la fase, siendo frecuente que un adelanto en la fase dé como resultado un acortamiento de τ , en tanto que un atraso provoca un aumento del mismo. Otros autores han propuesto otro efecto sobre τ posterior a la aplicación de un estímulo, cuando se alternan estados de iluminación con diferentes intensidades se provoca un acortamiento de los periodos circádicos registrados después del cambio (Menaker, et al. 1978; Aschoff, 1978b). Es posible que la participación de osciladores múltiples en la generación de los ritmos circádicos pueda ser la base para explicar el hecho de que distintos ritmos presenten un comportamiento distinto ante la aplicación de un mismo estímulo. Una de las consecuencias de este comportamiento se conoce con el nombre de "sincronización parcial", situación en la que, ante la presencia de un estímulo, algunas partes del sistema circádico

modifican las características de la oscilación, en tanto que otras se mantienen sincronizadas (Aschoff, 1978a).

Sincronización y relaciones de fase.-

En el estado estable de sincronización la diferencia entre el ángulo de fase (ϕ) del ritmo y el del estímulo sincronizante depende de las propiedades del estímulo y la capacidad de respuesta del sistema circádico ante el estímulo sincronizante; estos dos factores constituyen lo que Aschoff llamó "intensidad del estímulo sincronizante" (Aschoff, 1960). Dada una cierta intensidad del estímulo, el factor determinante del ϕ es la relación entre la duración del periodo circádico antes del estímulo y T; la relación entre ϕ y T se pone de manifiesto por la aplicación de un estímulo sincronizante, el cual provoca que un ritmo relativamente rápido adelante su fase a la del estímulo y que un ritmo lento la atrase. Lo aaguesto ocurre cuando un ritmo de frecuencia media es sincronizado por un estímulo de alta frecuencia que provoca un atraso o de baja frecuencia, que provoca un adelanto.

Gama de sincronización.-

Las oscilaciones autosostenidas pueden modificar su periodo original, sólo dentro de ciertos límites. Los valores de tales frecuencias se conocen con el nombre de "gama de sin-

cronización" (Klotter, 1960) y se ha propuesto que ésta aumenta proporcionalmente con la intensidad del estímulo sincronizante. Aschoff y Pohl (1978) realizaron experimentos en especies diferentes y concluyeron: (a) que la gama de frecuencia en la que los organismos pueden modificar su frecuencia natural de oscilación es relativamente pequeña en los vertebrados (10 horas), tiene valores intermedios en los insectos (cerca de 20 horas) y alcanza valores máximos en plantas y organismos unicelulares; (b) para obtener un cambio en el ángulo de fase ($\Delta\phi$) del sistema circádico (que es como se provocan los cambios en la frecuencia) se necesita aplicar un cambio en el T de la señal sincronizante de, por lo menos, una hora de aumento o de disminución. Si los valores de T son cercanos, múltiplos o submúltiplos de τ suele presentarse lo que se conoce con el nombre de sincronización por desmultiplicación. Existe otro fenómeno llamado "sincronización relativa" (Wever, 1972) que implica que, al estar cerca de los valores límite de sincronización, ésta empieza a ser inestable lo que da como resultado fluctuaciones periódicas de τ . Otro fenómeno que se observa es que algunos ritmos evidentes en ciertos organismos suelen mostrar diferentes gamas de sincronización en otros sistemas circádicos (Aschoff, 1978a), este fenómeno podemos considerarlo complementario al de la

"sincronización parcial", la cual se lleva a cabo ante la presencia de un estímulo sincronizante y consiste en que algunas partes del sistema circádico mantienen su frecuencia natural de oscilación, en tanto que otras llegan a ser sincronizadas (Aschoff, 1978b). Con respecto al papel de la luz como sincronizador de los ritmos circádicos hay que hacer notar que el grado de sincronización que produce varía mucho en las distintas especies estudiadas, aunque se acepta que los organismos más complejos están menos capacitados para cambiar su periodo a frecuencias alejadas de las 24 horas. Se ha propuesto (Bruce, 1960) que la fotofracción (parte del periodo durante el cual la intensidad luminosa está por arriba del mínimo) y la relación entre los valores de intensidad luminosa máxima y mínima (Swade y Pittendrigh, 1967) son los valores que realmente interesan en la sincronización. De alguna forma, un sistema circádico ha resuelto el problema que le representa ser simultáneamente muy sensible a las señales significativas y refractario a las demás, abriendo sólo una estrecha ventana a su sensibilidad cotidiana al ambiente exterior, lo que ocurre al final del día y de la noche, es decir, durante los transitorios naturales de iluminación. El resto del tiempo, el sistema de biocronometría es poco sensible a cambios ambientales. Existen sincronizadores débiles y

fuertes, dependiendo de la señal sincronizadora y la forma de acoplamiento que hay entre ella y el sistema que sincroniza. El acoplamiento, por su parte, se puede realizar directo o indirectamente. Dos osciladores pueden sincronizarse mutuamente, o uno de ellos puede sincronizar al otro (Pittendrigh y Bruce, 1957; Pittendrigh, 1965). Un oscilador puede sincronizarse a la misma frecuencia del sincronizador o a una frecuencia menor. Cuando un oscilador deja de operar por aplicación constante de luz, o por una estancia prolongada en la oscuridad, los cambios bruscos en el estado de iluminación pueden reiniciar la actividad rítmica. Es interesante hacer notar que existe poca transferencia de energía entre la señal sincronizadora y el oscilador sincronizado.

Cambio de fase del sincronizador.-

Cuando se produce un cambio brusco en la fase del estímulo, se presenta en el ritmo una serie de ciclos transitorios (se pierde la ritmicidad estable) antes de que éste adquiera una relación de fase estable con relación a la del sincronizador; si la fase de éste cambia en no más de 6 a 9 horas, un atraso del sincronizador es seguido por transitorios que atrasan y un adelanto por transitorios que adelantan. Si la fase del sincronizador cambia más de 9 horas, el ritmo se re-

sincroniza a través de transitorios que muestren una dirección opuesta a la del ciclo sincronizador. En estos casos la determinante principal está dada por el valor del periodo en su fase estable; los ritmos con periodo corto tienden a presentar transitorios que avanzan, mientras que los de periodo largo muestran transitorios que atrasan (Hoffman, 1969). El tiempo necesario para resincronizar se correlaciona en forma negativa con la intensidad del estímulo sincronizador y en forma positiva con su fase de ascenso (Aschoff y cols. 1975). En la mayoría de las especies estudiadas, la duración de la resincronización depende también de la dirección de la fase, por ejemplo, al estudiar lo que ocurre en pájaros diurnos, se observa que la resincronización, después de un adelanto de fase, toma aproximadamente la mitad del tiempo correspondiente a un atraso de fase. En contraste, los mamíferos nocturnos son resincronizados más rápidamente después de un atraso que de un adelanto de fase (Aschoff, 1978c). El signo de este "efecto asimétrico" parece depender de si las especies tienen un τ mayor o menor de 24 horas (Aschoff y cols., 1975; Daan y Pittendrigh, 1976b). Existe otra particularidad que debe ser mencionada. En contraste con una fase "normal", en donde todos los ritmos manifiestos siguen la fase impuesta por un sincronizador en la misma dirección, puede ocurrir que el sistema sufra una escisión en

dos componentes, uno de los cuales se puede resincronizar por transitorios que adelanten y el otro por transitorios que atrasen. Ejemplos de este tipo de "resincronización por partes" se aprecia en algunos ritmos circádicos de seres humanos expuestos a viajes aéreos con dirección al este, en donde los sujetos experimentan adelantos de fase bruscos a expensas de sincronizadores artificiales, dentro de una unidad aislada (Aschoff, 1978c).

Curva de respuesta de fase.-

El hecho de que un ritmo en un organismo se pueda sincronizar es el resultado de otro ritmo, el dado por la sensibilidad a la luz. Cuando un estímulo único se aplica sobre una ritmicidad circádica, puede o no provocar un cambio de fase y si éste se produce, su magnitud y dirección dependerán del momento del ciclo afectado por la perturbación. Numerosos trabajos han recopilado los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la aplicación de perturbaciones únicas sobre la frecuencia natural de oscilación de los ritmos circádicos (Aschoff, 1982; Daan y Pittendrigh, 1976a; Enright, 1965; Pittendrigh, 1960, 1980) y han corroborado estos resultados. Dos trabajos publicados en 1965 (Aschoff, 1965; Pittendrigh, 1965) resumen un gran número de datos obtenidos sobre los resultados de la estimulación única. La sistematización de los

resultados mostr6 que, mediante una curva de respuesta de fase (CRF), se pueden analizar, en forma sencilla, los efectos provocados por un est6mulo 6nico sobre el sistema circ6dico. La CRF se construye al graficar la hora circ6dica (hc) que tenfa el sistema cuando se aplicaron los est6mulos contra los efectos que estos provocaron sobre la fase del sistema. La hc corre de cero a veinticuatro horas y mide el ciclo completo de la sensibilidad circ6dica en un organismo. Para determinar la hc, el periodo de un ciclo se normaliza (recu6rdese que el periodo de los ciclos circ6dicos, es similar pero no igual a 24 horas) a una duraci6n de 24 horas. $hc=0$ es el punto del ciclo en el cual la actividad excede el 50% de la amplitud del ciclo; $hc=24$ ocurre un ciclo completo despu6s. Los est6mulos deben aplicarse a diferentes horas circ6dicas, cuando el ciclo est6 en estado estable. Los efectos que esto provoca se deben evaluar cinco ciclos despu6s de aplicada la perturbaci6n, ya que despu6s de este tiempo es muy probable que el sistema haya recuperado el estado estable, que suele desaparecer despu6s de la aplicaci6n del est6mulo. La proyecci6n unidimensional de la CRF indica el grado de sincronizaci6n de un organismo (Enright, 1965a). Si se analizan las curvas que resultan se puede apreciar la dependencia que existe entre la oscilaci6n forzada y el es-

tímulo, así como el momento circádico en el que los cambios externos dejan de producir efecto en el sistema. El punto de la abscisa en el cual la CRF es igual a cero, representa la fase de equilibrio entre el sistema circádico y la señal sincronizadora. Winfree (1970) distingue dos tipos de CRF: (1) la curva de respuesta de fase estable (CRFe) que es la que grafica la dependencia del cambio de fase ($\Delta\phi$) en relación con la fase explorada del ciclo (ϕ); y (2) la curva de respuesta de transición de fase (CRFt), la cual asocia a la nueva fase (la causada por el pulso) como una función de la fase original (antes de dar el pulso). Dado que, en términos generales, la CRFe tiene una pendiente de al tam bién se le llama tipo 1, en tanto que la CRFt se denomina tipo 0, aludiendo así al valor de su pendiente. Al estudiar las CRFe obtenidas en roedores, Dean y Pittendrigh (1976b) establecieron una relación muy interesante entre el valor de τ y la forma de la CRFe: cuando τ es de corta duración (> 24 hrs.) en la CRFe predomina el área de los atrasos con relación a la de los adelantos. Esta tendencia entre especies también es válida interespecie, así como en individuos; cuando τ se acorta como posefecto de sincronización previa, la relación área de atrasos/área de adelantos aumenta. El ritmo circádico ERG en el acocil posee la capacidad de ser sincronizado mediante la aplicación de señales luminosas

únicas aplicadas en forma directa sobre los ojos (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981) o a través de los fotorreceptores ciliares (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987). La CRFe para este sistema muestra que hay adelantos de fase cuando el estímulo se aplica entre las 5 y las 13 hc, atrasos cuando se aplica entre las 20 y las 5 hc, y falta de efecto cuando la aplicación ocurre entre las 13 y las 20 hc (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983).

Ritmo circádico electroretinográfico en el acocil.-

En 1969, Aréchiga y Wiersma implantaron microelectrodos en diferentes elementos de la vía visual del acocil Procambarus clarkii y demostraron la existencia de cambios periódicos en la amplitud del electroretinograma (ERG) y de la frecuencia de descarga de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa. Estos cambios evidenciaron una mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día. Años más tarde, Aréchiga y cols (1973) caracterizaron las propiedades del ERG en el acocil Procambarus y comprobaron que los cambios de amplitud del ERG correspondían a un ritmo circádico típico de un animal nocturno, con un periodo cuya duración depende de la cantidad de luz recibida por el acocil. La correlación entre los pigmentos retinianos accesorios y la amplitud del ERG había quedado

demostrada previamente (Aréchiga y Fuentes, 1970). Page y Larimer (1975) encontraron que la sección de las comisuras circunnesofágicas no interfería con el ritmo circádico de amplitud del ERG ni impedía su sincronización. Sin embargo, la ritmicidad desaparecía si se seccionaba el nervio óptico. En este mismo crustáceo se observó que si se lesionaba el ganglio cerebroide la amplitud de la oscilación del ritmo circádico ERG disminuía, aunque no desaparecía (Barrera-Mera, 1976). La persistencia del ritmo circádico ERG en tallos oculares aislados fue interpretado como resultado de que la actividad periódica es influida pero no depende de la integridad del sistema nervioso (Sánchez y Fuentes, 1977). Los autores observaron sólo algunas diferencias en el ritmo ERG del ojo aislado con relación al que se registra de animales íntegros. Finalmente, Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981) encontraron que la respuesta eléctrica ERG en el acocil Procambarus bouvieri, tiene características circádicas de un organismo nocturno y su amplitud es capaz de ser modulada por los fotorreceptores caudales del sexto ganglio abdominal (Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987).

El sistema visual en el acocil.-

El ojo compuesto del acocil es la porción más distal del tallo ocular y muestra un contorno casi hemisférico. El

tallo ocular es una estructura de forma cilíndrica, con un ligero aplanamiento dorsoventral que en su parte proximal se halla unido en forma articulada a la cabeza del acocil. En su mayor parte está cubierto por una cutícula engrosada con sales de calcio, que es muy similar a la que recubre al cuerpo del acocil y a la altura del ojo compuesto se ve sustituido por la córnea (Parker, 1895). En un corte longitudinal del tallo ocular se puede observar que además del ojo compuesto hay cuatro masas ganglionares claramente distinguibles. De la retina hacia el extremo proximal se encuentran: la lámina ganglionar, la médula externa (donde se encuentra localizado un órgano neurohemal muy importante: la glándula sinusal), la médula interna (donde se encuentra el órgano X) y una buena parte del nervio óptico (Waterman, 1961) (fig. 1). En general hay poca diferencia intergénérica de la morfología del tallo ocular dentro del grupo de los llamados acociles (Waterman y cols., 1982) por lo que los datos pertenecen a varios géneros como Astacus, Pacifastacus, Procambarus, sin hacer distinción entre uno u otro. El nombre de ojo compuesto de los artrópodos lo recibe por estar formado de varias unidades denominadas omatidios, cuyo número es de 2000 a 3000 que se repiten en forma regular y que constituyen la unidad funcional del ojo (Nässel, 1976).

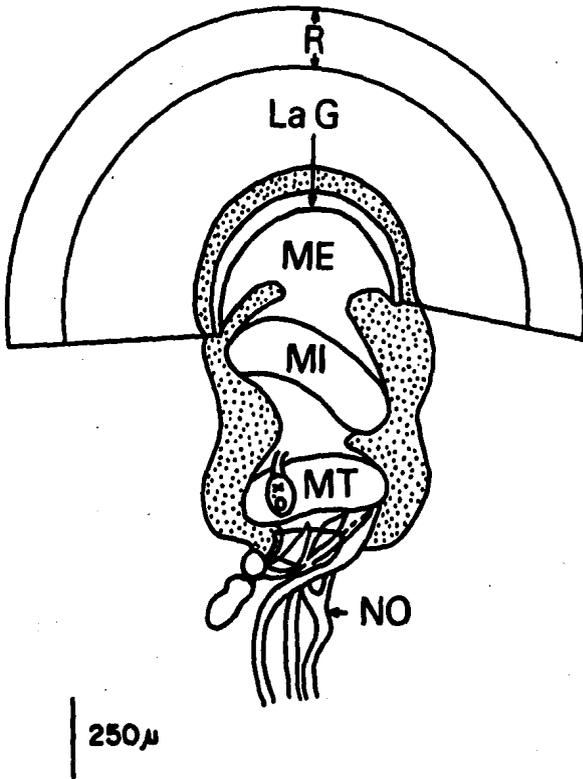


Figura 1.- Esquema de un corte longitudinal del tallo ocular del acocil Procambarus en el que se señalan los principales componentes. R: retina; LaG: lámina ganglionar; ME: médula externa; MI: médula interna; MT: médula terminal; NO: nervio óptico; OX: órgano X. La zona sombreada representa a las regiones de los cuerpos celulares.

El omatidio es una estructura alargada constituida por 5 tipos celulares. La porción más superficial de cada omatidio la ocupa la córnea. El conjunto de córneas dá un aspecto facetado en el exterior que es característico del ojo compuesto. Cada córnea es secretada por cuatro células corneógenas translúcidas, unidas en su base a los conos cristalinos, que son estructuras cilíndricas que se extienden desde la córnea hasta la retínula o retina. El aparato dióptrico cuenta también con un cono cristalino que corre a lo largo del omatidio desde la córnea hasta los fotorreceptores, y es formado por cuatro células proximales (Waterman, 1961). Por debajo de los conos cristalinos se encuentran de 7 a 8 células retinulares que forman los fotorreceptores. La octava célula retinular o R8 se encuentra más diferenciada que las otras (Waterman, 1961) y forma un pequeño rabdomo separado con microvellosidades horizontales situadas distalmente a la omatidia (Waterman, 1977; Hafner y Tokarski, 1978). Las otras 7 células retinulares (también llamadas R1 a R7) forman la porción proximal del rabdomo y se pueden dividir en dos subgrupos con base en la orientación de sus microvellosidades. R1, R2, R5 y R6 están orientadas verticalmente, mientras R3, R4 y R7 presentan un arreglo horizontal. La célula R1 tiene un tamaño equivalente al doble de las otras. Aunque no hay una explicación para esta diferencia, es probable que esta

célula actúe como un elemento organizador en el desarrollo del omatidio (Eguchi, 1965). Se ha propuesto que las dos direcciones que tienen las microvellosidades en el rabadomo implican un mecanismo para analizar el vector-e de la luz polarizada (Waterman y Fernández, 1970). En la membrana del rabadomo se encuentra el pigmento fotosensible (Wald, 1968; Fernández y Nickel, 1976). Es en este sitio donde, por efecto de la luz, la rodopsina se transforma en metarrodopsina la cual presenta fluorescencia intrínseca. No hay intermedios o bien son poco estables y la capacidad para cambiar de metarrodopsina a rodopsina varía de acuerdo con la longitud de onda que estimule al ojo (Cronin y Goldsmith, 1984). El rabadomo está constituido por expansiones tubulares retinulares (Eguchi y Waterman, 1966). Químicamente está formado por capas de lípidos y de proteínas, recibe el ápice del cono cristalino y se extiende proximalmente hasta alcanzar la membrana basal. Junto con el pigmento fotosensible en la retina hay otros tres pigmentos que pertenecen a estructuras parareceptoras, que no participan en el proceso de fototransducción, pero que sí modulan la sensibilidad a la luz. Estos pigmentos son: el de reflexión, situado en la membrana basal y formado por cristales de guanidina. Este pigmento en el acocil está fijo, a diferencia de los otros dos pigmentos, uno dentro de las células retinulares llamado pigmento proximal y otro dentro de células que corren a lo largo

de los conos cristalinos, llamado pigmento distal. Ambos pigmentos son de color oscuro y se han catalogado del tipo omocromo (Struwe y cols., 1975). El pigmento distal y el proximal ocupan diferentes posiciones según la intensidad de la iluminación. Si ésta es intensa el pigmento distal migra desde la córnea hasta la base de los conos cristalinos y el proximal desde la membrana basal hasta la zona nuclear de las células retinulares blindando prácticamente al omatidio. Si la intensidad luminosa disminuye ambos pigmentos se retraen, el distal hacia la córnea y el proximal por debajo de la membrana basal.

La información visual hacia zonas centrales de integración se lleva a cabo por axones que viajan desde la médula terminal hacia el lóbulo óptico del ganglio supraesofágico o cerebroide, agrupadas en el llamado nervio óptico; en esta estructura además de las fibras visuales hay otra variedad de axones, que van a los músculos que mueven el tallo ocular. En el Procambarus se han descrito 46 fibras visuales (Wiersma y Yamaguchi, 196) de las \approx 17000 fibras que constituyen el nervio óptico (Nunnemacher y cols., 1962). Entre las fibras que responden exclusivamente a estímulos visuales encontramos: (1) fibras de "acción sostenida" que se activan al iluminar el ojo; (2) fibras que se activan espontáneamente

en la oscuridad y que son inhibidas por la luz; (3) fibras que detectan un movimiento rápido de aproximación; (5) fibras que se activan con la aplicación de luz monocromática (Wiersma y Yamaguchi, 1967; Treviño y Larimer, 1970; Woodcock y Goldsmith, 1970). Además de los axones sensitivos y motores, se han identificado en el nervio óptico fibras de tipo secretor, que terminan tanto en los diferentes ganglios como en la glándula sinusal, la cual está conectada con el órgano "X" por una serie de axones. Esta glándula regula en el acocil, funciones tan diversas como la migración de los pigmentos retinianos accesorios y de los cromatóforos tegumentarios (Smith, 1948; Shilbey, 1968), el control de la actividad motora y de la glucemia, además de otras actividades metabólicas (Kleinholz, 1966; Brown, 1961).

Sensibilidad espectral en los crustáceos.-

El pigmento visual que se localiza en el rabdomo de los ojos compuestos de los crustáceos se denomina rodopsina, cuando su cromóforo es el 11-cis-retinal. Al igual que muchos vertebrados de agua dulce, algunos crustáceos poseen un pigmento visual con 3-dehidroretinal (porfiropsina) como su cromóforo. Este pigmento absorbe longitudes de onda de luz más larga que la rodopsina y su presencia representa una adaptación al espectro luminoso en el agua de los ríos, que

cepta longitudes de onda mayores a los encontrados en los medios terrestres y marino (Bridges, 1972; Knowles y Dartnall, 1977). El acocil Procambarus clarkii posee un sistema visual a base de rodopsina-porfiropsina (Suzuki y cols. 1984) y la proporción de porfiropsina con respecto a la cantidad total varía de acuerdo con la estación del año en que se determine. Este pigmento desaparece rápidamente cuando la temperatura se mantiene a 25 C, cuando la iluminación aplicada es constante, o bien bajo condiciones de fotoperiodo; sin embargo, no se modifica en oscuridad constante o cuando la temperatura es de 10 C, sin importar el patrón de iluminación (Suzuki y cols., 1985). Como parte del estudio del sistema visual de los crustáceos, la caracterización de la sensibilidad espectral es muy importante. Las técnicas más utilizadas para ello son histológicas, bioquímicas y electrofisiológicas. Dentro de estas últimas, el análisis de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores retinianos (electroretinograma, ERG) es una de las más empleadas (Goldsmith, 1986). Goldsmith y Fernández (1968) encontraron valores de 300 a 600 nm al comparar las características de sensibilidad espectral en cuatro especies de crustáceos. La determinación la hicieron midiendo la cantidad de fotones que se requiere para provo-

car un valor criterio en la amplitud del ERG. El Porcelio scaber tiene una sensibilidad máxima de 515 nm y el Callinectes sapidus, de 505nm. Ambas especies poseen un sistema visual monocromático y su valor de sensibilidad espectral no se modifica por adaptación a la luz roja, sin embargo los datos experimentales procedentes de otros crustáceos apuntan hacia un sistema de visión dicromática. En el Palaeomonetes paludosus, la sensibilidad máxima del ojo adaptado a la oscuridad es de 550 a 555 nm, pero con adaptación a la luz de color rojo o amarillo se descubre una respuesta al ultravioleta, con una sensibilidad máxima de 380 nm, siendo muy probable que los pigmentos de 550-555 nm y de 380 nm estén localizados en diferentes células receptoras. Los estudios en Orconectes virilis revelan que el ojo adaptado a la oscuridad tiene un pico máximo de sensibilidad espectral en 565-570 nm (Kennedy y Bruno, 1961; Goldsmith y Fernández, 1968; Kong y Goldsmith, 1977), pero bajo adaptación a la luz roja y con una intensidad de estimulación cercana a la del umbral para la obtención del ERG ($\approx 50 \mu\text{v}$), aparece un segundo pico de sensibilidad espectral situado entre 425 y 435 nm (Wald, 1968; Goldsmith y Fernández, 1968). En el acócil Procambarus ocurre algo similar; en condiciones de adaptación a la oscuridad, la sensibilidad espectral máxima se sitúa alrededor

de 570 nm (Kennedy y Bruno, 1961) o inclusive entre 570-600 nm (Fujimoto y cols., 1966). Cuando el ojo se adapta a la luz roja o azul, se encuentran dos picos de sensibilidad espectral, uno para 435-440 nm y otro para 575 nm, respectivamente (Wald, 1968). Los datos obtenidos a partir de cuantificaciones espectrofotométricas de pigmentos visuales en crustáceos resultan de particular interés desde que Wald (1962; 1963) encontró evidencias en los ojos de Procambarus de la existencia de más de un pigmento visual. Fujimoto y cols. (1966) encontraron, en esta misma especie, un pigmento fotolábil con una longitud máxima (λ_{max}) de 500 nm con extractos de digitonina. Wald (1967) extrajo dos pigmentos fotosensibles tanto en Procambarus como en Orconectes, uno con una λ_{max} de 556-562 nm y que se blanquea utilizando un intermediario con una λ_{max} de ≈ 515 nm. El segundo pigmento tiene una λ_{max} de ≈ 510 nm y se blanquea sin intermediarios. Wald propuso que el primer pigmento correspondía a la rodopsina del pigmento verde-amarillo, sin poder aclararse la función del pigmento con λ_{max} de 510 nm. Las determinaciones microespectrofotométricas de raddomos aislados en el aco-cil muestran una banda ancha de absorción con un pico en 525-530 nm (Fujimoto y cols., 1966; Waterman, Fernández y Goldsmith, 1969) y una metarrodopsina con una λ_{max} cercana a

515 nm (Goldsmith, 1972). Tanto el pigmento en los rabdomos como la metarrodopsina, son muy sensibles al pH y cuando se miden las λ max en diferentes regiones del rabdomo, no se aprecia ninguna diferencia (Goldsmith, 1978). De acuerdo con los hallazgos de Goldsmith (1977) y de Goldsmith y Wehener, (1977), la absorción máxima en el rabdomo aislado del acocil Procambarus es de 530 nm. Utilizando la técnica de registro intracelular, Nosaki (1969) identificó dos grupos de células retinulares en el ojo del acocil Procambarus, un tipo predominante en el verano que responde a longitudes de onda muy largas (> 600 nm) y otro, menos común, que responde a una λ max de 460 nm. Durante el invierno la mayoría de las células tiene una sensibilidad máxima de 560 nm. Waterman y Fernández (1970), también con registros intracelulares, encuentran que de 91 células implantadas, 17 respondían a la aplicación del color violeta (440 nm) y 74, al amarillo-naranja (594 nm). Las células sensibles al violeta solamente se localizaban en el cuadrante anterior del ojo. Eguchi y cols. (1973), tratando de identificar las células receptoras al color, hicieron adaptaciones selectivas a la luz monocromática de 450 y 570 nm. La condición de adaptación a la luz fue evaluada midiendo la acumulación diferencial de cuerpos multivesiculares asociados a lisosomas y

con base en sus resultados pudieron establecer la existencia de dos grupos de fotorreceptores que responden en forma específica a las longitudes de onda utilizadas. Cummins y Goldsmith (1981) inyectaron amarillo de lucifer mediante microiontoforesis a retinas de Procambarus y encontraron que el cuerpo celular del fotorreceptor que responde al color violeta, se localiza distalmente al rabdomo principal, en la octava célula reticular. En contraste, las células que respondían al color verde son las que contribuyen a formar el rabdomo principal (dado por las células reticulares de R1 a R7); estos resultados fueron confirmados por microespectrofotometría.

La presencia de dos grupos de fotorreceptores, con diferente sensibilidad espectral, ha quedado corroborada en el acocil mediante la realización de curvas de sensibilidad espectral para cuatro neuronas de acción sostenida, cuya respuesta se registró en forma extracelular en fibras de acción sostenida del nervio óptico de Procambarus clarkii. Después de la adaptación a la oscuridad, la λ max fue de 570-575 nm; la adaptación a la luz roja suprime la sensibilidad de los fotorreceptores al color verde-amarillo, altera el patrón de descarga de las neuronas y pone al descubierto una respuesta para una λ max de 445 nm. Estos datos sugieren que las fibras de acción sostenida pueden llevar información compa-

tible con la visión en color (Treviño y Larimer, 1970; Woodcock y Goldsmith, 1979).

Por otra parte, el estudio del o de los mecanismos involucrados en la interacción entre el sistema visual policromático y algunas pautas de conducta en vertebrados e invertebrados ha merecido especial atención en los últimos años: Kirschfeld y Vogt (1985) establecieron la relación entre el ojo compuesto de la mosca Calliphora erythrocephala y el movimiento de las patas. Se sabe que cuando un destello luminoso se aplica al ojo de este insecto, se inicia un reflejo que culmina con un movimiento que, usualmente, desencadena el vuelo del animal. Cuando existe adaptación a la oscuridad, este reflejo tiene una respuesta óptima a dos longitudes de onda, una en la región ultravioleta (350 nm) y otra en el azul-verde entre 460 y 510 nm. También ha quedado demostrada la inducción de la migración de los pigmentos retinianos accesorios en la retina de la polilla Deilephila elpenor al aplicar el color azul y la radiación ultravioleta sobre la retina; los resultados sugieren que los pigmentos fotosensibles están localizados en elementos que se encuentran afuera de las células visuales, aunque no se excluye el que las células visuales participen en la regulación normal de la dispersión del pigmento protector (Hamdorf, y cols., 1986). Por otra parte, Bernhard y Stavenga (1978) el

utilizar luz monocromática pudieron establecer que el movimiento de los pigmentos retinianos accesorios, localizados en el interior de las células visuales en el insecto Manuca sexta, está acoplado en forma directa con las células fotorreceptoras retinianas. El crustáceo Daphnia magna responde con una rotación ventral de su ojo compuesto cuando se le aplica un estímulo luminoso (Cousi y Macagno, 1985); al determinar la sensibilidad espectral para el umbral del movimiento del ojo, se encontró que esta respuesta tiene 3 características espaciales diferentes: (1) una que cubre todo el campo con 180° de amplitud en dirección dorso-ventral, cuya sensibilidad más alta se da en 527 nm; (2) otra que cubre 30° localizada en la región dorsal del campo visual, la respuesta es mayor con un estímulo de 400 nm, y (3) una respuesta obtenida al iluminar una zona ventral también de 30° y que presenta su menor umbral en 570 nm.

En caracoles adultos de la especie Helix aspersa (Müller) se ha observado que, además de la temperatura y la humedad, las características del fotoperiodo son factores determinantes en el ciclo reproductivo; cuando se les aplica luz verde, los caracoles producen y expulsan pocos huevos y muchos mueren, en tanto que los expuestos a la luz roja se reproducen en forma abundante y la mortalidad es muy reducida (Bonnejoy-Claudet y cols., 1983). Brainard y cols. (1986),

examinaron la influencia de las características físicas de la luz en el sistema reproductor del hamster sirio Mesocricetus auratus. Los autores aplicaron fotoperiodos 14:10, en donde la fase luminosa estaba compuesta de 11 horas de luz blanca ($400 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) y 3 horas de luz monocromática ($0.2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) y observaron atrofia del sistema reproductor cuando se utilizó luz roja (668-653 nm) o amarilla (640-550 nm). La aplicación de estas longitudes de onda se relacionó con niveles anormales en la concentración de factor liberador de prolactina (FLP) en plasma y en hipófisis; en contraste con estos resultados, cuando una fracción de la luz en el fotoperiodo incluye luz azul (505-435 nm), verde (555-515 nm) o ultravioleta cercano (385-350 nm) se apreciaba una disminución del FLP plasmático e hipofisario y el sistema reproductor mostraba características normales de crecimiento.

Sincronización por luz monocromática.-

Son muchos los antecedentes conocidos en relación al papel sincronizador de la luz blanca, pero es muy poco lo que se sabe acerca del papel sincronizador de la luz monocromática. Gordon y Brown (1971) determinaron la sensibilidad espectral para cambios de fase del ritmo circádico de la temperatura corporal en el ratón Perognathus penicillatus y Mc Guire y

cols. en 1973, realizaron el mismo estudio en ratas. Hope y Bhatnagar (1979) realizaron estudios electroretinográficos en cuatro especies de murciélagos, determinando las características espectrales de los fotorreceptores visuales; conociendo estos datos, Joshi y Chandrashekarán (1985) realizaron un análisis cuidadoso de la sensibilidad espectral de los fotorreceptores responsables del cambio de fase del ritmo circádico de actividad motora de vuelo en el murciélago Hipposideros speoris y encontraron que estos cambios dependen de la longitud de onda utilizada, responsabilizando a la luz verde (520nm) de los adelantos y a la luz violeta (430 nm), de los atrasos. Con base en estos resultados, los autores postularon la existencia de cuando menos dos clases de fotorreceptores en las retinas de estos vertebrados, que probablemente actúan como osciladores mutuamente acoplados y sean capaces de sincronizar al ritmo circádico de la actividad en estos animales. Mote y Black (1981) demostraron, en la cucaracha Periplaneta americana, la interacción entre el sistema visual dicromático (al color verde y al ultravioleta) del ojo compuesto y el sistema circádico de actividad locomotora. Encuentran que el mecanismo de sincronización de este ritmo está dominado por el grupo de receptores sensibles a longitudes de onda larga (verde) y que

el "reloj" en el ojo es extraordinariamente sensible a estos estímulos, ya que sólo un flujo de 5 fotones por ojo es suficiente para sincronizar esta actividad. El papel que desempeña la luz monocromática como sincronizador de los ritmos circádicos cuando se aplica en forma periódica se conoce poco. Knüll (1976) observó que el inicio de la actividad de vuelo en pájaros diurnos, depende del cambio de color y de la intensidad del régimen luminoso aplicado; encuentra que la variación diaria durante el verano en el color del cielo polar ártico es capaz de sincronizar este ritmo circádico. Nuboer y cols. (1983) estudiaron el inicio y el final de la actividad circádica locomotora del conejo salvaje y observaron su relación con los cambios en la intensidad y en la composición espectral del régimen luminoso empleado.

HIPOTESIS.-

A través de los ritmos circádicos es posible reconocer una organización temporal en muchas variables biológicas. La modulación de los ritmos circádicos se establece a través de la sincronización, la que depende de la capacidad de acoplamiento entre el sistema circádico y las señales externas potencialmente sincronizadoras. Esta capacidad está sujeta a la presencia de estructuras que reciban el estímulo sincronizante, así como a la posibilidad que presente el sistema circádico para modificar su estado funcional de acuerdo con la llegada del estímulo. En los fotorreceptores del ojo compuesto del escorpión se ha identificado un ritmo circádico en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma). Este ritmo circádico es susceptible de adelantarse o atrasarse su fase mediante la aplicación de estímulos únicos de luz blanca, así como de ser sincronizado por la aplicación de estímulos fotoperiódicos.

Asimismo, se han identificado dos funciones de sensibilidad espectral: una para el color verde ($\lambda_{max} \approx 570\text{nm}$) y otra para el color violeta ($\lambda_{max} \approx 440\text{nm}$) que sólo es evidente bajo adaptación a la luz roja.

Si el sistema circádico de actividad electrorretinográfica es capaz de ser modificado por la aplicación de luz monocromática, las características de este ritmo (periodo, valor

de la amplitud relativa, relación actividad reposo, posición de fase y nivel de oscilación) dependerán de la longitud de onda aplicada. Si la luz monocromática tiene la capacidad de sincronizar al ritmo circádico de actividad ERG, la aplicación de un estímulo luminoso a diferentes momentos del ciclo circádico provocará cambios de fase (adelantos o atrasos) que dependerán de la longitud de onda y de la hora circádica de aplicación del estímulo.

Si los fotorreceptores visuales responsables de los cambios de fase del ritmo ERG poseen diferente sensibilidad espectral, la forma de la curva de respuesta de fase obtenida al aplicar pulsos únicos de diferente longitud de onda (465, 565 y 630 nm) tendrá características que dependerán del espectro luminoso utilizado.

Si la relación de fase del ritmo circádico electrorretinográfico depende de la luz monocromática, cuando ésta se aplique en forma constante sobre el ERG, cada longitud de onda provocará momentos de fase que podrán relacionarse con la forma de la curva de respuesta de fase obtenida con el mismo contenido espectral.

Si los cambios periódicos en la composición espectral de un régimen luminoso son capaces de sincronizar al ritmo circádico electrorretinográfico, la aplicación de fotoperíodos con diferente longitud de onda modificará el inicio y el

final de la oscilación circádica.

Para desarrollar las hipótesis propuestas, el trabajo experimental contempló cinco objetivos:

- 1) conocer los efectos que provoque la aplicación de una determinada longitud de onda sobre las características de la oscilación circádica electroretinográfica en el acocil;
- 2) determinar la capacidad sincronizadora de los estímulos únicos de luz monocromática cuando se aplican en el estado estable del ritmo electroretinográfico en horas circádicas diferentes;
- 3) investigar cual es la sensibilidad espectral involucrada en los $\Delta\phi$ del ritmo circádico ERG;
- 4) determinar la capacidad que tiene la luz monocromática aplicada en forma continua, de modificar la velocidad angular del ritmo ERG;
- 5) investigar la capacidad sincronizadora de la luz monocromática sobre el ritmo ERG, cuando está se aplica en forma periódica alternada con intervalos de oscuridad.

MATERIAL Y METODOS.-

Se utilizaron acociles adultos de la especie Procambarus bouvieri (Ortmann) procedentes de Uruapan, Michoacán, sin distinción de sexo, con un peso aproximado de 18 a 26 grs. Antes de los experimentos, los acociles se mantenían en tinas con agua sometida a aereación, eran alimentados dos veces por semana con zanahorias, plantas acuáticas y lombrices, y recibiendo un régimen de 12 horas de luz blanca (6:30 a 18:30 horas) y 12 de oscuridad (18:30 a 6:30 horas).

Durante la fase experimental, se trabajaba cada animal en forma individual, colocándolo dentro de un refrigerador que mantenía la temperatura a $19^{\circ}\text{C} \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ y bajo oscuridad constante. Los acociles se mantenían inmóviles sujetándolos por el caparazón a nivel del cefalotórax y se sumergían parcialmente en agua, la cual se mantenía bajo aereación durante todo el tiempo que duraba el experimento.

Obtención del ERG. - A cada acocil, bajo las condiciones antes descritas, se le implantaba un electrodo de acero de 1 a 5 μ de diámetro a través de la córnea. El electrodo captaba la respuesta de los fotorreceptores retinianos a los destellos de luz blanca enviados cada tres minutos por un fotoestimulador (Grass PS22) con una intensidad de 400 lux y 20 μseg de duración. La actividad eléctrica captada bajo

estas condiciones era transmitida a un preamplificador (Tektronix 122) y de ahí era enviada a un polígrafo (Grass, P7) o bien, a un preamplificador (Marco 7171) conectado a un fisiógrafo (Marco 4B). De esta forma se obtenía un registro gráfico durante todo el tiempo que duraba cada experimento (no menos de 10 días). La luz monocromática se aplicaba a través de un sistema de iluminación de luz blanca (American Optical mod 650) provisto de un filtro Wratten (Kodak 89B) para eliminar la radiación infrarroja. A este sistema se acoplaron los filtros correspondientes con una longitud de onda (λ) específica. Los filtros usados fueron: Wratten (Kodakccc) para el color verde (565 nm), y filtros de interferencia diel (Edmund Scient. Co.) para el color rojo (630 nm), el azul (465 nm) y el rojo lejano (680 nm). Para uniformar las intensidades se usaron filtros Wratten neutros (Kodak) de densidad variable. El intervalo entre el apagado y el encendido de la luz se controlaba mediante un marcadore automático de tiempo (Intermatic Inc. T101). La intensidad luminosa se calibró con un aparato Li-cor, Inc. (mod. LI-185B, Q/R/P). Para realizar los objetivos descritos en la sección precedente, los acociles fueron divididos en cuatro grupos y sometidos a diferentes maniobras experimentales (FIG. 2).

(a) En el primer grupo, el ritmo circádico ERG se obtuvo

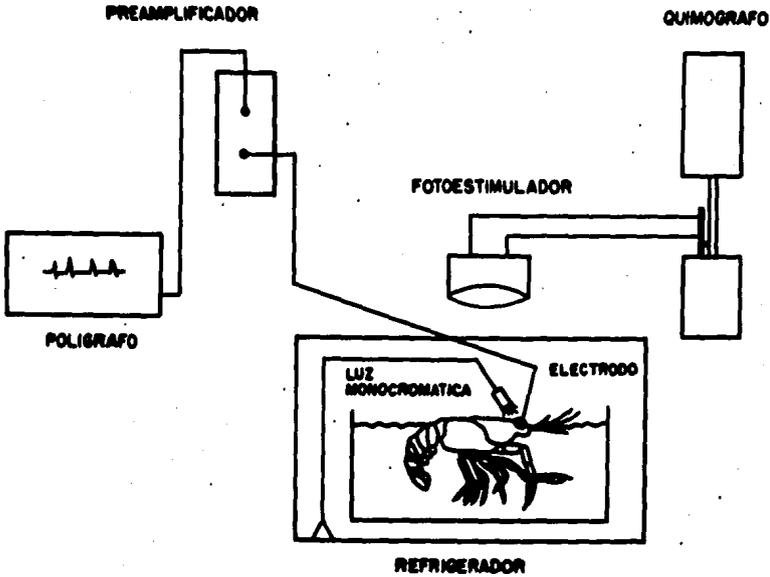


Figura 2.- Esquema del dispositivo utilizado en nuestros experimentos para la estimulación con luz monocromática de los fotorreceptores visuales y el registro de la actividad eléctrica de los fotorreceptores del acocil.

primero con luz blanca y después, variando periódicamente la λ y la intensidad del destello aplicado cada tres minutos. Se utilizó luz azul (465 nm), luz verde (565 nm) y luz roja (630 nm) a intensidades de 50, 500 y 5000 luxes, con el objeto de conocer las características de la oscilación ERG obtenida con luz monocromática y compararlas con la obtenida con luz blanca. Los resultados de estos experimentos se analizaron midiendo cada 30 minutos, el valor total de los componentes HI y HII del ERG, de acuerdo a lo propuesto por Naka y Kuwabara (1959). Cada λ se probó durante un mínimo de 4 días con cada una de las intensidades mencionadas. En cada caso se hicieron 5 registros. Los valores obtenidos se graficaron contra el tiempo. Las gráficas obtenidas pusieron de manifiesto cambios periódicos en la amplitud del ERG, lo cual permitió establecer: (1) el valor del periodo (medido de valle a valle en cada oscilación); (2) el valor de la relación actividad/reposo (o relación a/r , medida tomando como punto de referencia el 50% de la amplitud de la oscilación y trazando una recta hasta el punto de la siguiente oscilación que representa el 50% de su amplitud); (3) las características en el nivel de actividad (medido como la pendiente de una recta que se traza del punto de inicio de una oscilación al punto de inicio de la siguiente); (4) el valor de la amplitud relativa (que se obtiene dividiendo el valor

más alto de la oscilación ERG entre su valor más bajo); (5) la dependencia de la intensidad del estímulo (evaluada mediante el valor de la amplitud total de la oscilación).

(b) El segundo grupo de experimentos se realizó con el fin de obtener la curva de respuesta de fase para cada λ utilizada. Para ello, se aplicó sobre los ojos del acocil un estímulo luminoso de 500 lux y 50 minutos de duración al 4o. día de registro, es decir, una vez que el ritmo ERG presentaba características estables y bien definidas. El estímulo luminoso se aplicó a diferentes horas circádicas (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 24) con el fin de explorar el ciclo durante las 24 horas para cada λ utilizada (λ : 465, 565, 630 y 680 nm). El análisis de los resultados consistió en medir el cambio de fase, adelanto ($\Delta\phi+$) o atraso ($\Delta\phi-$) cuatro días después de haberse aplicado el estímulo. Con estos datos se construyeron dos tipos de curvas de respuesta de fase (CRF); la CRF estable (CRFe) que relaciona el $\Delta\phi$ provocado por el estímulo en función de la hora circádica (hc) de aplicación del pulso y la CRF transitoria (CRFt) que se construye graficando el valor de la fase del ciclo en el momento de aplicarse el estímulo en función de la nueva fase (medida un día después de aplicado el estímulo). Una vez construida la CRF para cada λ , se calculó en la computadora mediante un programa de integración, el área bajo la

curva de los atrasos (At), y de los adelantos (Ad), para expresar con la relación At/Ad el tipo de cambio predominante para cada λ aplicada. En esta etapa se hicieron aproximadamente 150 experimentos de no menos de 10 días cada uno.

(c) En el tercer grupo de experimentos, el ritmo circádico ERG se obtuvo en condiciones de adaptación a la luz monocromática. Para todas las λ probadas y para la adaptación con luz blanca, la intensidad fue de 100 lux. Cada experimento duró no menos de cinco días y se hicieron 5 para cada λ azul (465nm), verde (565 nm), y rojo (630 nm). El análisis de los resultados consistió en medir: 1) la duración del período; 2) la relación τ/τ ; 3) el nivel de actividad; 4) la amplitud relativa y 5) la acrofase (porción sobresaliente en la cresta de un ciclo, que corresponde al momento donde la amplitud tiene el valor más alto). Con el objeto de comparar los resultados obtenidos en este grupo, con los del grupo b, los datos se presentan a través del método cosenar, que implica tratar la escala temporal de 24 horas igual que un círculo de 360° , sobre el cual se grafica el valor máximo de la amplitud del ciclo en forma de un vector que tiene su inicio en el centro de un círculo y cuya dirección hacia la periferia estará determinada por el valor de la acrofase. La obtención de la acrofase y de su correspondiente error estadístico se llevó a cabo mediante un ajuste del valor de

los datos del ERG, utilizando un programa de función de seno trigonométrico modificado, en la computadora.

(d) En el cuarto grupo de experimentos se aplicaron regímenes compuestos (luz-oscuridad) para poder observar la capacidad sincronizadora de los fotoperiodos configurados con luz monocromática (465, 565 y 630 nm). Los fotoperiodos utilizados fueron: luz-oscuridad (L-O) 12:12; 16:8; 8:16 y 12:12 invertido (O-L). La intensidad de la luz monocromática fue siempre de 100 lux. El análisis de los resultados consistió en evaluar la capacidad de la luz monocromática presente en cada fotoperiodo, para adelantar o atrasar el principio o el fin de la oscilación ERG, y así poder describir sus posefectos sobre el ritmo circádico ERG. Se realizaron 5 experimentos de cinco días cada uno, para cada fotoperiodo y para cada λ probada.

RESULTADOS.-

Efecto de la intensidad de la luz monocromática sobre el ERG.

La figura 3 muestra un registro típico de la respuesta eléctrica a destellos de luz azul (465 nm) por parte de los fotorreceptores visuales del acocil obtenida durante varios días en un animal íntegro. El primer ciclo corresponde al estado estable del ritmo ERG obtenido con destellos de luz blanca, la que se utilizó como control para poder comparar las características de la oscilación. En ambas situaciones experimentales se utilizó la misma intensidad. El valor promedio del periodo circádico obtenido con luz blanca fue de 22.9 horas (para una intensidad de 5000 lux) y el de la relación α/ϵ fue de 1.1. Cuando se cambió la luz blanca por luz azul, el \bar{T} fue de 27 horas para la intensidad más alta (5000 lux), disminuyendo a medida que se disminuyó la intensidad de la luz (21.8 para 50 lux). El valor de la relación α/ϵ fue de 1.0 para la luz azul de 5000 lux y de 0.9 para 50 lux de intensidad. En todas las intensidades probadas, la máxima actividad del ritmo se presentó siempre alrededor de las 24 horas y la mínima \approx 12 horas. El valor promedio del cambio que se presentó en la amplitud relativa (\bar{Ar}) fue muy importante para esta λ . Con luz blanca de 5000 lux tuvo un valor promedio de 3.0 en tanto que para

luz azul de la misma intensidad fue de 13.0. Como puede verse en la figura, la amplitud disminuyó a medida que disminuía la intensidad del destello de luz azul. Esto ocurrió en todos los experimentos realizados. Es muy importante hacer no tar que sólo el cambio de luz blanca por luz azul fue capaz de modificar en forma conspicua las características de la oscilación ERG. El utilizar luz azul para obtener el ERG dió como resultado las mayores modificaciones al valor de \bar{T} , así como el de la \bar{A} . En las figuras 4 y 5 apreciamos experimentos similares para λ de 565 nm (luz verde) y de 630 nm (luz roja). En la primera parte de ambas gráficas, observamos un ciclo obtenido con luz blanca y después los ciclos obtenidos al aplicar los destellos de luz monocromática. En estas figuras puede observarse que no hay modificaciones importantes en el ritmo cuando se realiza este cambio. La aplicación de destellos de luz roja (fig. 5) provoca cambios en el \bar{T} del ritmo y sobre el valor promedio de la relación \bar{A}/e propios de un sistema nocturno: con una intensidad de 5000 lux (a partir de la barra 1) el valor de \bar{T} es mayor que con intensidades menores (500 lux, parte media y 50 lux, última parte). La relación \bar{A}/e es de 1.7 en 5000 lux y de 1.03 en 50 lux. En cambio, la aplicación de un destello de luz verde para obtener la oscilación ERG (fig. 4) provoca sobre el \bar{T}

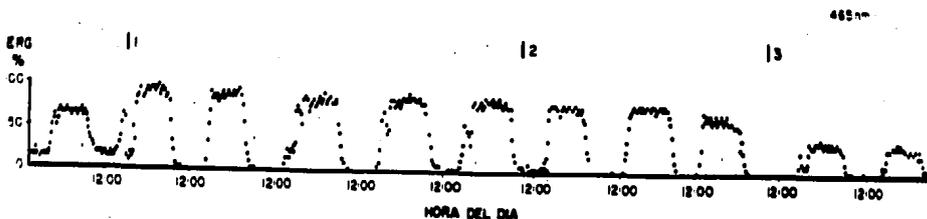


Figura 3.- Registro de cambios de voltaje del ritmo ERG obtenido con destellos de luz azul (465 nm) aplicados cada tres minutos. En la primera parte de la gráfica, se muestra un ciclo obtenido con luz blanca de 5000 lux de intensidad; la barra 1 muestra el momento en el que la luz blanca se cambia por luz azul de la misma intensidad, con lo que la amplitud de la oscilación aumenta considerablemente; la barra 2 muestra el cambio a una intensidad de 500 lux y la barra 3 a una intensidad de 50 lux. Puede observarse como la amplitud del ritmo depende de la intensidad del estímulo en forma directamente proporcional.

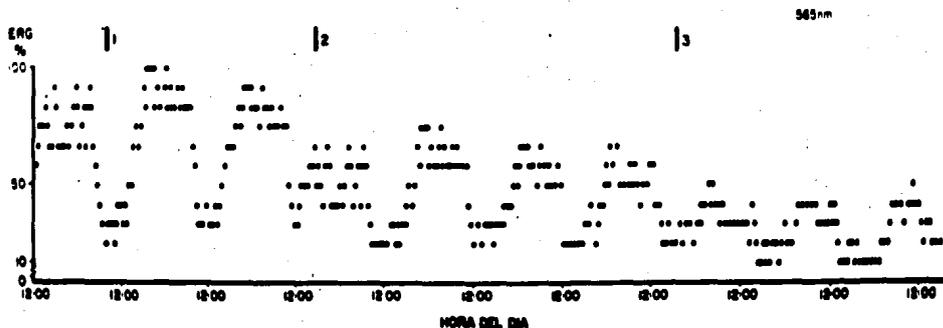


Figura 4.- Variaciones en la amplitud del ritmo ERG cuando se obtiene con destellos de luz de color verde (565 nm) de diferente intensidad. La barra 1 muestra el cambio de destellos de luz blanca por destellos de luz de color verde de la misma intensidad (5000 lux). El valor de la amplitud en ambos casos es similar. La barra 2 indica una disminución de intensidad a 500 lux y la barra 3, el inicio de 50 lux. Es interesante hacer notar en el aumento en el valor de γ a medida que la intensidad disminuye.

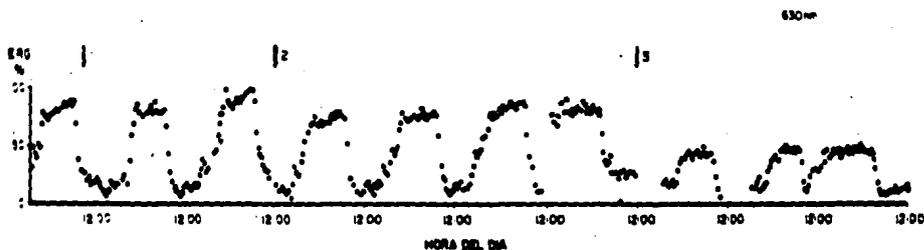


Figura 5.-Gráfica que muestra la dependencia de la amplitud ERG de la intensidad de destellos de luz de color rojo (630 nm). Cuando la intensidad es de 5000 lux (de la barra 1 a la 2) la amplitud es de $\sim 100\%$, muy similar al valor de amplitud cuando recibe destellos de luz blanca (antes de la barra 1); el cambio a una intensidad de 500 lux (barra 2) provoca la disminución ERG a un valor de $\sim 80\%$; cuando la intensidad es de 50 lux (barra 3) el valor de la amplitud ERG cae a un 48% . El cambio de luz blanca por luz roja no modifica ni la amplitud ni el periodo en forma significativa.

cambios propios de un sistema circádico diurno, a mayor intensidad, $\bar{\tau}$ disminuye (con 5000 lx, $\bar{\tau} = 25$ horas; con 50 lx, $\bar{\tau} = 26$ horas) la relación $\frac{\bar{\tau}}{e}$ aumenta a medida que se incrementa la intensidad del destello (para 5000 lx, es de 1.8 y para 50 lx, es de 1.0). Es muy importante señalar que el aumento en la amplitud relativa se encontró solamente para el caso del color azul; el valor de la amplitud total promedio se modifico en forma directamente proporcional con la intensidad de la luz monocromática. Los resultados en este grupo de experimentos se muestran resumidos en la tabla 1.

La capacidad de que la luz monocromática actúe como estímulo sincronizante, se hace evidente en los resultados obtenidos cuando se aplica un estímulo único de luz monocromática. (figuras 7, 8 y 9). En la figura 6 se observa un registro típico de un ritmo ERG obtenido en condiciones de oscuridad constante. El ritmo es unimodal y con un máximo de actividad en la noche subjetiva. Cuando se aplica durante la fase estable del ritmo un pulso único de luz blanca sobre los ojos (de 50 minutos de duración), se producen cambios en el ritmo circádico que se manifiestan por la aparición de ciclos transitorios con una duración variable (entre 1 y 3 días), después de los cuales el ritmo circádico

TABLA I

λ (nm)	RELACION ACTIVIDAD-REPOSO PROMEDIO (\bar{a}/\bar{r})	AMPLITUD RELATIVA PROMEDIO \bar{Ar}	PERIODO PROMEDIO \bar{T} (horas)	AMPLITUD TOTAL \bar{Ato} (%)
LUZ BLANCA	1.1	5.0	22.9	62
LUZ AZUL (465)	1.0	13.0	27	25
LUZ VERDE (565)	1.8	7.1	25	68
LUZ ROJA (630)	1.7	8.0	23.1	76

Características que presenta el ritmo circádico electroretinográfico, cuando se obtiene con destellos de luz monocromática de diferente λ .

se resume con un $\Delta\phi$ que depende de la hc a la que se aplicó el estímulo luminoso. En la figura 7 se observa que el efecto que produce un destellos de luz azul (465 nm) de 500 lx de intensidad y 50° de duración aplicado a las 19 hc, es un $\Delta\phi$ de 2 horas. La etapa transitoria que siguió al estímulo fue muy breve. En ninguno de nuestros experimentos se vió un cambio en el nivel de oscilación ni para la luz blanca ni para la luz azul. El valor de $\bar{\gamma}$ antes y después del pulso fue el mismo. En la figura 8 observamos que al aplicar un pulso de luz verde (565 nm) a las 18 hc se ve un $\Delta\phi$ de 5.6 horas, una fase transitoria de \approx 36 horas y una marcada disminución en el nivel de oscilación. Es importante señalar que este cambio en el nivel de oscilación se observó en un 78% de los casos. Los valores de $\bar{\gamma}$ antes y después de la estimulación fueron iguales. En la figura 9 observamos un registro típico de los efectos que provoca un estímulo con luz roja (630 nm) de las características ya descritas. El $\bar{\gamma}$ es igual en las dos fases estables, antes y después del pulso. El registro típico que mostramos en esta figura, muestra un $\Delta\phi$ de 5.8 horas cuando el estímulo se aplica a las 14 hc, con una fase transitoria de casi 36 horas. Es muy interesante hacer notar que la aplicación de luz roja provocó en casi todos nuestros experimentos, notables aumentos en el

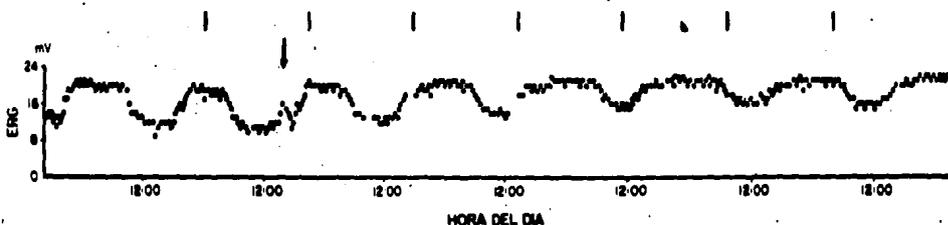


Figura 6.- Registro típico de un ritmo circádico ECG obtenido durante 7 días en condiciones constantes de temperatura y oscuridad. La fase de ascenso y descenso en la amplitud total de la respuesta ponen de manifiesto un ritmo circádico característico de un animal nocturno, con un periodo de 21 horas y una relación ω/ϵ de 1.03. La flecha marca el momento de aplicación de un estímulo de luz blanca (500 lux durante 50'), el que provoca una etapa transitoria de 12 horas y un $\Delta\omega$ de 7.2 horas (▲ fase obtenida, ■ fase esperada).

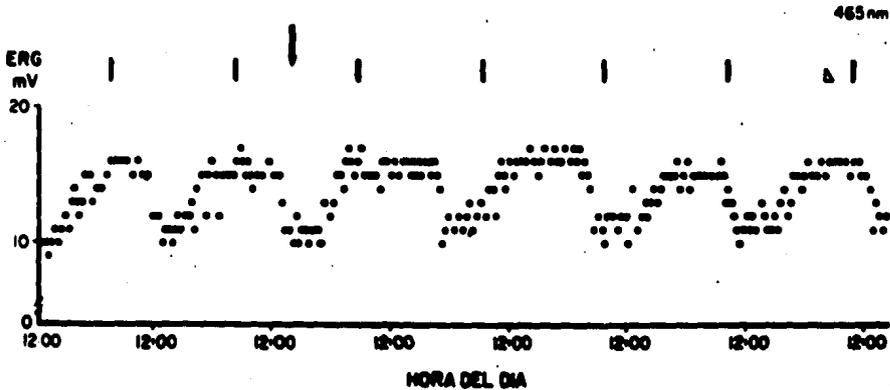


Figura 7.- Gráfica que muestra el efecto que provoca la aplicación de un estímulo único de luz azul, sobre el ritmo circádico ERG, obtenido en condiciones de oscuridad constante. La flecha marca el momento de aplicación de un estímulo a las 17 hc, lo que provocó un ΔT de 2 horas sobre el ritmo (▲ obtenida, ■ fase esperada). El periodo transitorio que siguió a la aplicación del estímulo duró ≈ 20 horas. El valor de T fue igual antes y después del estímulo.

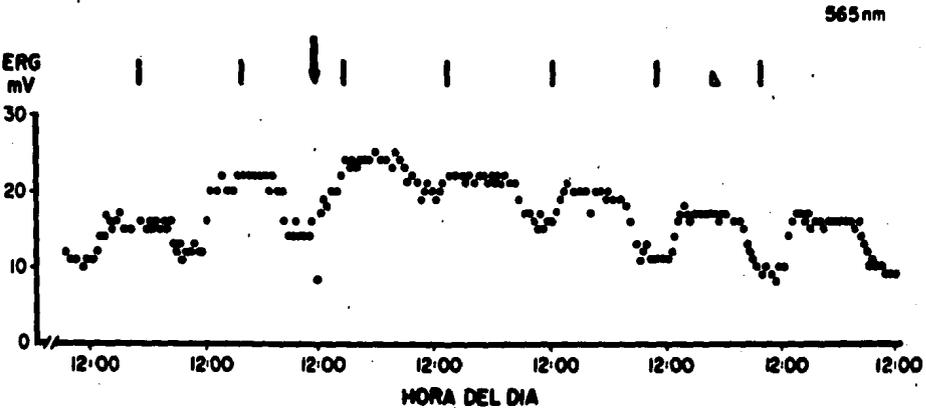


Figura 8.- Efecto de la aplicación de un estímulo luminoso único de luz de color verde sobre el ritmo ERG. La flecha muestra el momento de aplicación del estímulo (18 hc) que provocó un $\Delta\phi$ de 5.6 horas y una disminución gradual e importante en el nivel de oscilación. El valor de τ antes y después de la estimulación fue el mismo (\blacktriangle fase obtenida, \blacksquare fase esperada).

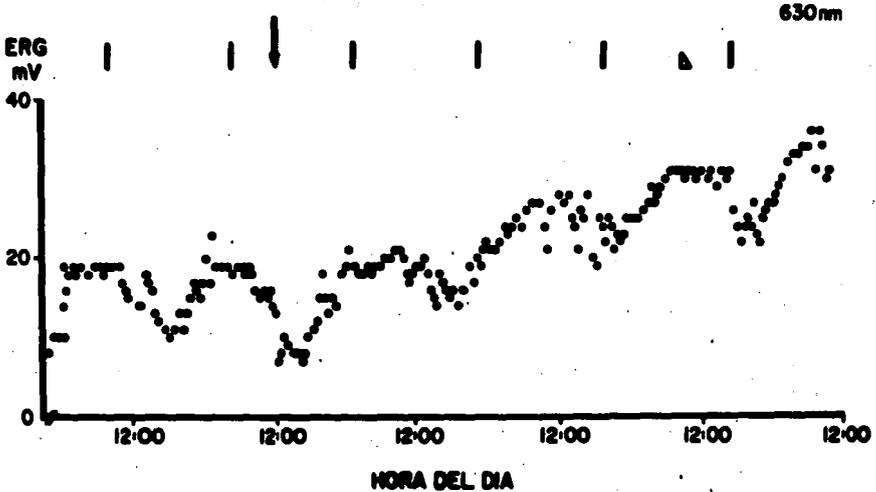


Figura 9.- Esta figura muestra el cambio de fase provocado por la aplicación de un estímulo único de luz roja (señalado por la flecha) sobre el ritmo ERG, a las 14 hc. la etapa transitoria subsecuente al estímulo fue de ≈ 36 horas y el $\Delta \phi +$ fue de 5.8 horas. Note el aumento gradual en el nivel de oscilación. El valor de τ fue igual antes y después de aplicado el estímulo (\blacktriangle fase obtenida, $|$ fase esperada).

nivel de oscilación siempre que se aplicó entre las 12 y las 24 hc. La aplicación breve de luz roja tampoco modificó el valor de \bar{T} en forma significativa.

Curvas de respuesta de fase.

En la figura 10, tomada del trabajo de Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal (1983), observamos la amplitud y la dirección de los cambios de fase en el ritmo circádico ERG provocados por estímulos de luz blanca de 15 minutos de duración y 200 lux de intensidad. En este caso particular los $\Delta\phi$ -se provocaron cuando el estímulo se aplicó entre las 20 y las 23 hc. No hubo $\Delta\phi$ con estimulaciones entre las 13 y las 20 hc. La zona de transición de fase se presentó a las 5 hc, y los adelantos ($\Delta\phi+$) se presentaron cuando el estímulo se aplicó entre las 5 y las 13 hc. Con base en los datos encontrados por estos autores, nosotros calculamos los valores del At (área de la curva de los atrasos) y del Ad (área de la curva de los adelantos) obteniendo una relación At/Ad (18.10/28.47) = 0.63. En la parte superior de la figura 11 observamos la CRFe obtenida al graficar los $\Delta\phi$ provocados por estímulos de luz azul, durante 50' con una intensidad de 500 lx, en diferentes momentos circádicos del ritmo ERG. La relación At/Ad=0.69, señala una área predominante de adelantos para esta λ , los $\Delta\phi-$ ocurren en la noche subjetiva (2 a 10 hc)

y los $\Delta\phi+$ durante el día subjetivo (10 a 22 hc). Entre las 22:00 y las 03:00 hc la luz azul no es capaz de provocar $\Delta\phi$. En la parte inferior de la fig. 11 observamos las características de la CRFt obtenida al graficar la fase vieja (la que tiene el ritmo ERG cuando recibe el estímulo) como función de la fase nueva (medida un día después de aplicado el estímulo). En ambos casos el valor del τ (horas) se igualó a 360° . En esta gráfica se puede ver como los adelantos se instalan antes que los atrasos, así como la continuidad de la curva. En la parte superior de la figura 12 se aprecian las características de la CRFe para la luz de color verde. La relación $At/Ad=0.61$ indica un claro predominio de los adelantos sobre los atrasos. Esta gráfica muestra como la luz verde es capaz de provocar $\Delta\phi+$ durante las primeras horas del día (01:00 a 06:00 hc) y $\Delta\phi-$ durante las primeras horas de la noche (17:00 a 24:00 hc). No se aprecian $\Delta\phi$ entre las 7 y las 13 hc. La parte inferior de la figura 12 muestra como los atrasos se instalan más rápidamente que los adelantos, al obtener una CRFt que muestra un trazo unimodal y continuo. La CRFe obtenida para la aplicación de luz roja se ve en la parte superior de la figura 13. Sólo con esta λ (630 nm) la CRFe es bimodal, con un marcado predominio para el área de los atrasos. La relación At/Ad es de 4.33. Esta λ provoca atrasos en ritmo ERG cuando se aplica tanto en el día

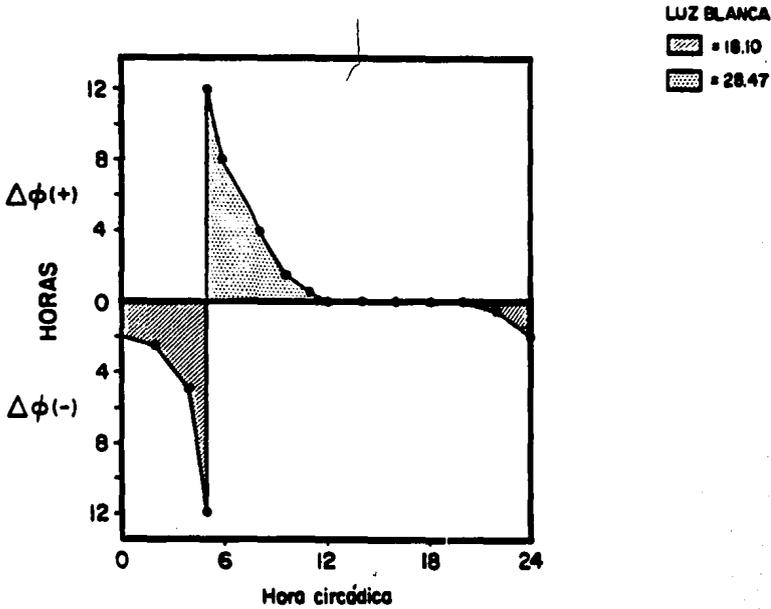


Figura 10.- Curva de respuesta de fase obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase provocados por estímulos de luz blanca a diferente hora circádica, sobre el ritmo ERG. Tanto los adelantos como los atrasos se presentan en el día subjetivo. (Tomada de: Fuentes-Pardo y Ramos Carvajal, 1983).

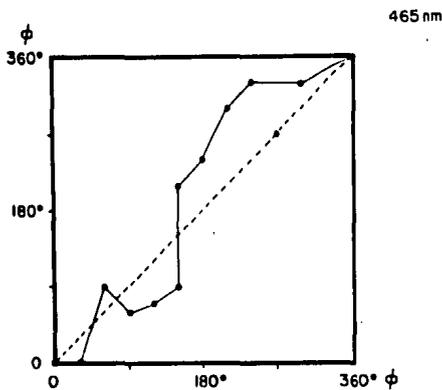
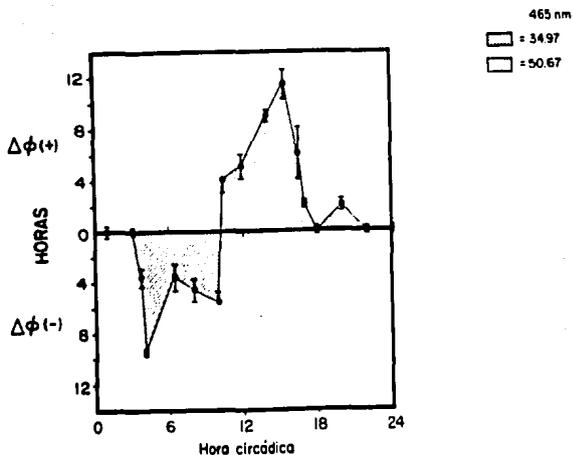


Figura 11.- En la porción superior de esta figura se aprecian las características de la curva de respuesta de fase estable (CRFe) obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase provocados por aplicación de pulsos breves de luz azul (465 nm) como función de la hora circádica de su aplicación. El área de los adelantos (situada en la noche subjetiva) es mayor que la de los atrasos. En la porción inferior de la figura se observa la curva de respuesta de transición de fase (CRFt) obtenida al graficar el valor de la fase vieja en función de la fase nueva, para estos mismos estímulos. Los atrasos se instalan antes que los adelantos.

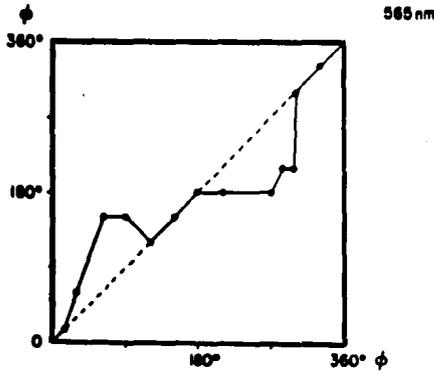
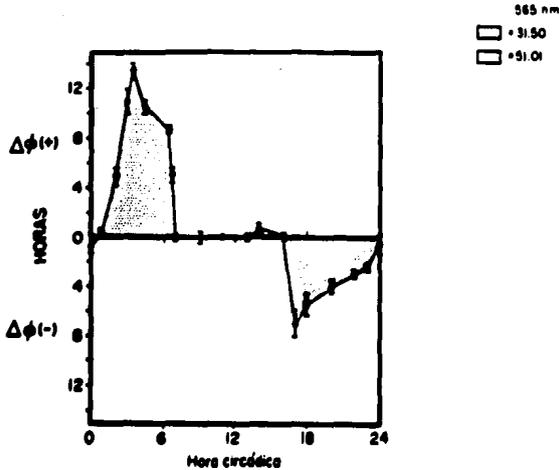


Figura 12.- Curva de respuesta de fase estable (parte superior) para estímulos luminosos breves, de luz verde (565 nm), aplicados sobre el ritmo ERG. El área de los adelantos (que se encuentra en el día subjetivo) es más importante que el área de los atrasos. La CRPT (parte inferior de la figura) muestra un trazo continuo en donde los atrasos y los adelantos se instalan casi simultáneamente.

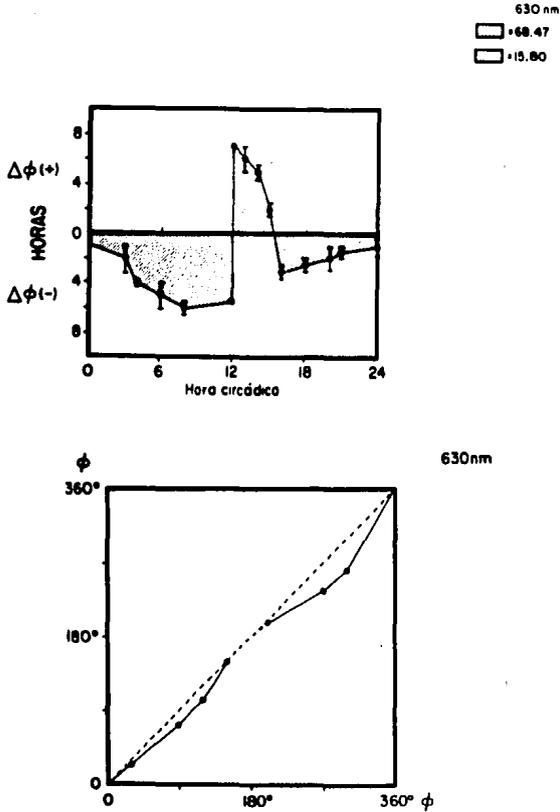


Figura 13.- En la parte superior de esta figura, se observan las características de la CRFe obtenida al aplicar estímulos de luz roja, en diferentes momentos del ritmo circádico ERG. El área de los atrasos es más importante que la de adelantos, éstos se provocan tanto en el día como en la noche subjetiva. La parte inferior de la figura muestra la CRFt obtenida para los mismos estímulos. Es importante hacer notar que esta curva es discontinua y sólo muestra atrasos.

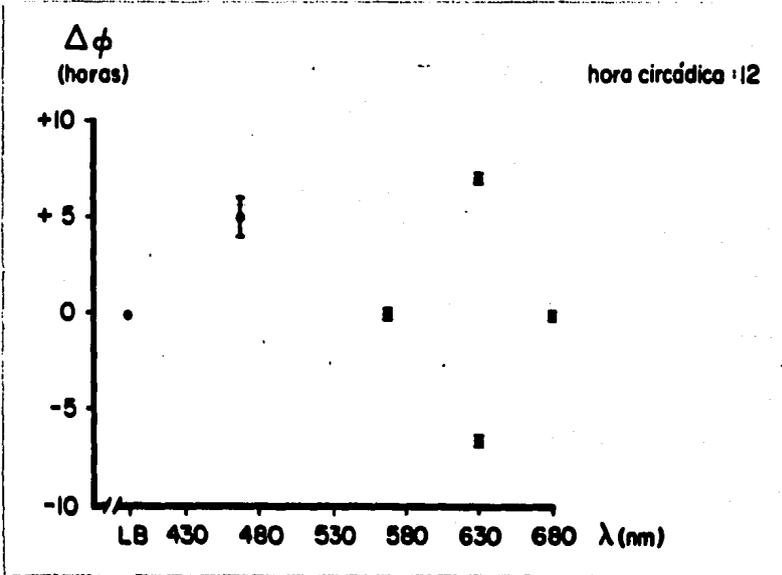
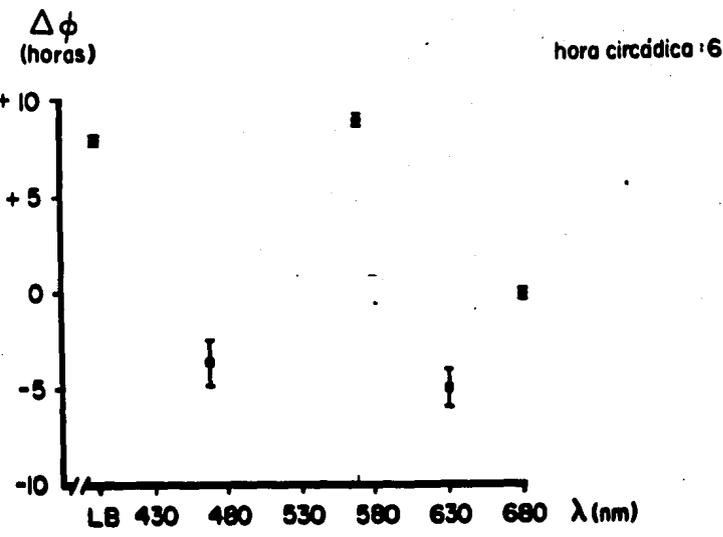


Figura 14.- Gráficas que muestran la magnitud de los cambios de fase como función de la longitud de onda utilizada, cuando los estímulos se aplican a las 6 y 12 hc. En ambos casos, la magnitud de los cambios de fase es muy grande.

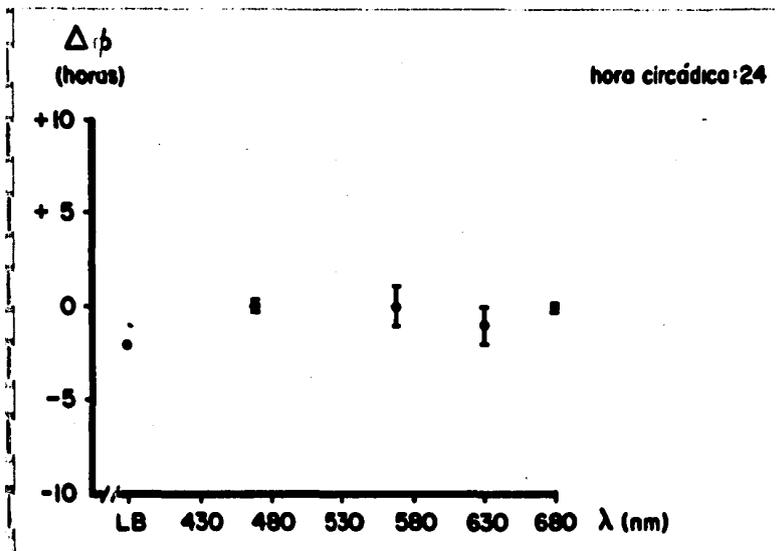
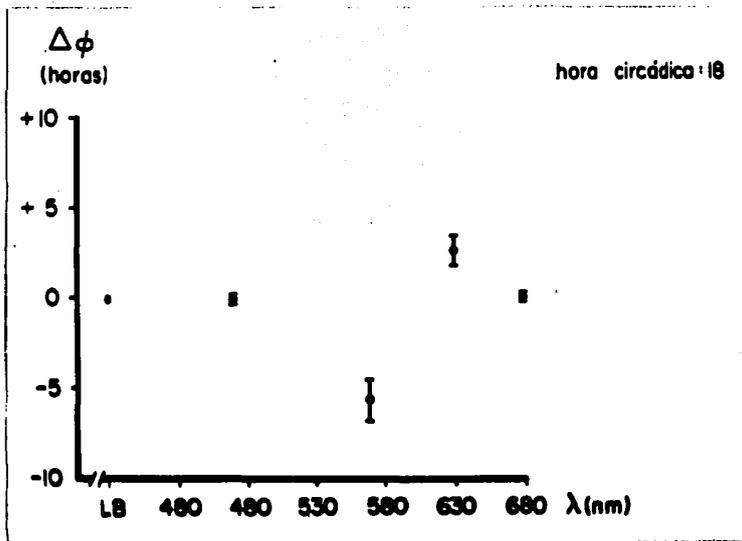


Figura 15.- Estas dos gráficas muestran la magnitud de los cambios de fase que provocan estímulos con diferente λ cuando se aplican a las 18 y a las 24 horas. La gama de sincronización es muy reducida, en comparación con los estímulos aplicados a las 6 y a las 12 hc.

como en la noche subjetiva. Es interesante hacer notar que la luz de color rojo provoca $\Delta\phi$ en cualquier momento circádico. La porción inferior de la figura 13 muestra la CRFT obtenida para estímulos de 630 nm. En forma clara podemos apreciar como los atrasos se instalan antes que los adelantos y como para esta λ se tiene un trazo discontinuo al graficar la ϕ vieja en función de la ϕ nueva. (LOS DATOS DE LAS CRF: TABLA 2).

Cuando graficamos la magnitud del cambio de ϕ como consecuencia de la λ utilizada (fig. 14), observamos que a las 6 hc el sistema presenta una mayor sensibilidad, en relación a lo que se observa a las 12 (fig. 14), 18 y 24 hc (fig. 15). También podemos ver como los atrasos se presentan cuando se aplica luz roja (6, 12 y 24 hc) y los adelantos cuando la λ utilizada es de 565 nm (6, 12 y 24 hc). La excepción a este comportamiento se observa a las 18 hc (fig. 15) cuando la luz roja provoca adelantos y la luz verde atrasos. La luz de color azul (465 nm) provoca adelantos a las 6 hc y atrasos a las 12 hc, sin provocar $\Delta\phi$ a las 18 y a las 24 hc.

Efecto de la aplicación de luz monocromática en forma continua sobre el ERG.-

En la figura 16 observamos un registro típico del ritmo

TABLA 2

λ (nm)	AREA DE ATRASOS (At)	AREA DE ADELANTOS (Ad)	RELACION At/Ad	NIVEL DE OSCILACION
LUZ BLANCA	18.10	28.47	0.635	NO CAMBIA
LUZ AZUL (465)	34.97	50.67	0.690	NO CAMBIA
LUZ VERDE (565)	31.50	51.01	0.617	DISMINUYE EN FORMA GRADUAL
LUZ ROJA (630)	68.47	15.80	4.333	AUMENTA EN FORMA GRADUAL

Resumen de las características de las curvas de respuesta de fase estable, obtenidas cuando se aplican pulsos breves de luz monocromática sobre el ritmo circádico electroretinográfico.

ERG obtenido en condiciones de iluminación constante (100 lx de luz blanca). El valor $\overline{\tau}$ de la población fue de 24.3 horas (mayor que en oscuridad constante, fig. 6). La amplitud máxima del ritmo se localiza alrededor de las 24 horas. Cuando la luz aplicada en forma constante es de 465 nm se aprecia un descenso en el nivel de la oscilación de casi 50%, en comparación con el valor que se observa para la amplitud del ritmo en iluminación constante (porción inferior de la fig. 17). La porción superior de la fig. 17 muestra el valor de la acrofase para está λ que se obtiene como resultado de ajustar los datos de amplitud ERG que se produjeron en cinco experimentos. El vector principal se sitúa en 210° (a las 14:00 horas). La elipse que se muestra en la punta del vector que señala la acrofase corresponde a la expresión del error estadístico y se calcula al mismo tiempo que se ajustan los datos del ERG, a través de un programa de función de seno trigonométrico modificado. En la parte superior de la figura 18 se ve que la acrofase promedio tiene un valor de 15° (01:00 horas) cuando se aplica luz de color verde (565 nm) durante varios días sobre la oscilación circádica. La porción inferior de la misma figura muestra uno de los trazos típicos ERG obtenidos con esta λ y que conjuntamente con 4 experimentos más, permitió realizar los

cálculos mencionados. La figura 19 (parte inferior) muestra el aumento en el nivel de oscilación del ritmo circádico ERG cuando se adapta a luz roja de 630 nm. Si bien el nivel de oscilación disminuye ligeramente los dos primeros días, su aumento subsecuente es considerable. En la porción superior de la misma figura se puede observar como se ha invertido la ϕ del ritmo: la acrofase se sitúa a 180° (12:00 horas). Características de la oscilación ERG cuando recibe luz monocromática en forma de fotoperiodos.-

Las tres figuras siguientes son fotografías de registros típicos de ritmos circádicos ERG sometidos a fotoperiodos, en donde la luz tiene una diferente composición espectral en cada caso. El objetivo primordial en esta serie de experimentos era definir la capacidad sincronizadora de la luz monocromática cuando es aplicada periódicamente. El resultado de la aplicación de 8 horas de luz azul durante el día, alternadas con 16 horas de oscuridad (08:00 a 16:00 horas), se aprecia en la primera parte de la figura 20. El valor promedio de esta oscilación es de casi 2.5 mv y una vez que la aplicación del fotoperiodo se suspende no se aprecia posefecto. Es interesante hacer notar como la amplitud del ERG sigue claramente el patrón de aplicación de la luz. Cuando la

relación luz azul-oscuridad se invierte (luz: 20:00 a 4:00 horas), el valor total de la amplitud de la oscilación es menor que en el caso anterior (cuando la luz se aplica en las horas del día): 2.0 mv y el posefecto observado cuando se suspenden los fotoperiodos dura aproximadamente 48 horas (segunda parte de la figura 20). También en este caso, se observa como la amplitud del ERG disminuye de manera importante durante el intervalo de aplicación de la luz, aunque es importante hacer notar, como durante esta etapa, se apreciaba una pequeña zona de "escape", en la cual la amplitud del ritmo aumenta 0.4 mv, a pesar de la luz.

En la figura 21 observamos un experimento típico en el que se hicieron las mismas maniobras que en el caso anterior, pero en esta ocasión se aplicó luz de color verde (565 nm). Aquí, igual que cuando se aplica luz de color azul, la amplitud total de la oscilación es mayor cuando la fracción de la luz del fotoperiodo se aplica durante el día que cuando se aplica durante la noche. el efecto que produce la luz de esta λ es más conspicuo que el producido por la luz azul, y llama la atención el observar como la oscilación libre del ritmo se readquiere en cuanto cesa la aplicación de la luz (no hay posefectos).

La figura 22a muestra el efecto de aplicar luz roja (630

nm) durante 10 horas sobre el ritmo circádico ERG (7:00 a las 17:00 horas) durante tres días. En este grupo de experimentos, la amplitud del ERG sigue fielmente al fotoperiodo aplicado: disminuye cuando se aplica la luz y **aumenta** considerablemente cuando esta **se suspende**. Al contrario de lo que ocurre con fotoperiodos que contienen luz azul y luz verde, cuando se aplica luz roja, la amplitud total de los ciclos es mayor cuando la luz se aplica durante la noche que durante el día. (figura 22b); en esta misma figura podemos observar que cuando la porción luminosa se aplica de las 19:00 a las 05:00 horas, la amplitud ERG disminuye en forma inmediata y cuando aquélla cesa, provoca un efecto de "rebote" que consiste en un gran aumento inicial de amplitud (≈ 3 mv), a pesar de que en condiciones de oscilación libre, el ritmo circádico presenta durante estas horas (6:00 a 11:00 horas) su valor más bajo. El posefecto provocado es discreto y reversible en todos los experimentos. Cuando la luz se aplica durante el día, llegó a provocar posefectos hasta de 5 días, que en dos de seis experimentos fue irreversible.

465nm

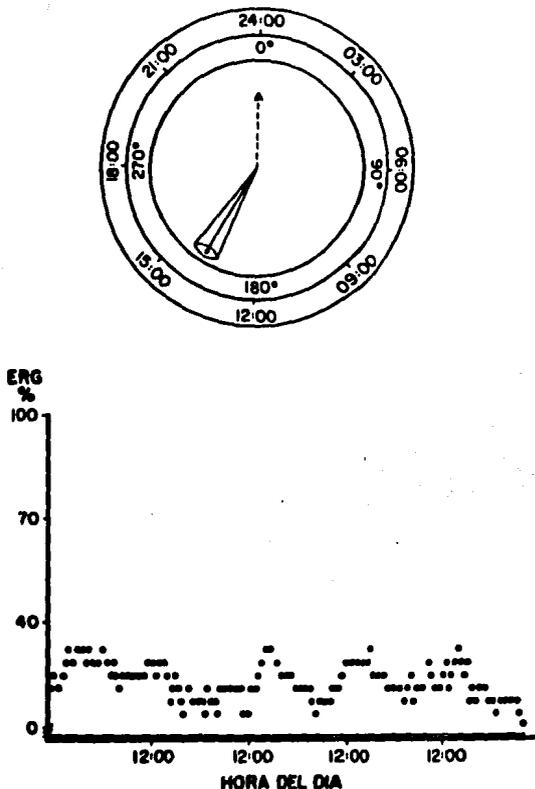


Figura 17.- La parte superior de esta figura, muestra el valor de la acrofase (flecha continua) calculada al hacer un ajuste de los datos de la amplitud del ritmo ERG que se obtiene bajo adaptación a la luz azul (465 nm). El valor de la acrofase para esta λ es de 210° (círculo interno) que equivale a las 14:00 horas (círculo externo). La flecha discontinua señala el valor de la acrofase para el ritmo obtenido con luz blanca (0° , 24:00 horas). La elipse que rodea a la punta de la acrofase corresponde al valor del error estandar. El trazo inferior corresponde a un registro ERG típico obtenido bajo adaptación a la luz azul. E.S. = 60 min.

7

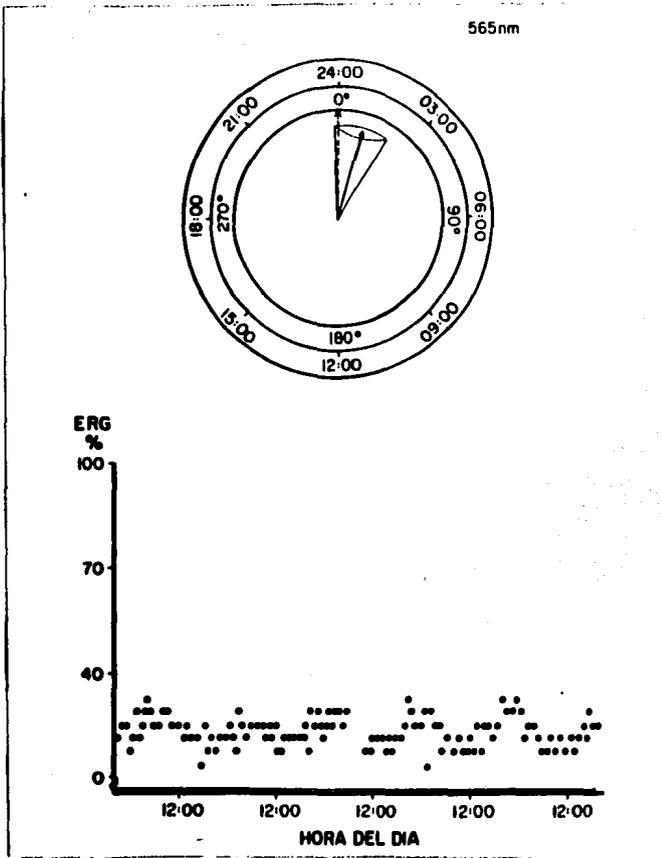


Figura 18.- Esta figura muestra que el valor de la acrofase es de 15° (01:00 horas) cuando se le aplica luz de color verde en forma continua; este valor es muy similar al que presenta la oscilación cuando recibe luz blanca durante varios días (24:00 horas). La desviación estandar es de 112 min. El trazo inferior muestra las características del ritmo ERG obtenido cuando se encuentra bajo adaptación a la luz de 565 nm., no se aprecian cambios en el nivel de oscilación.

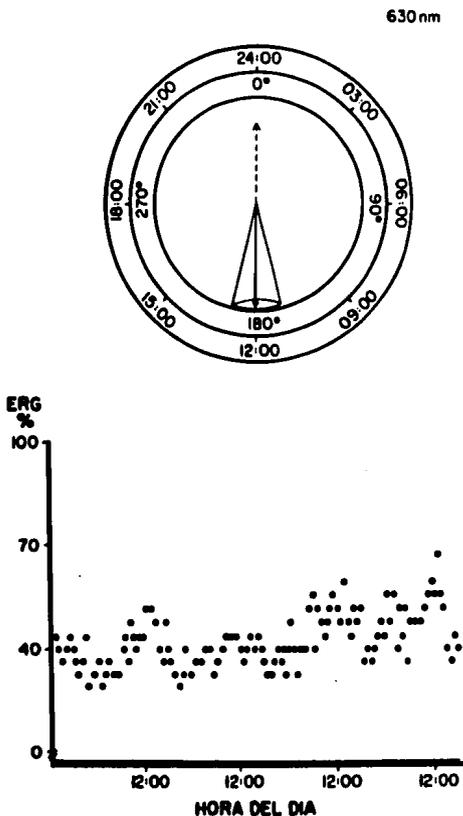


Figura 19.- Esta gráfica muestra que el valor de la acrofase del ritmo ERG cuando se le aplica luz roja en forma continua es de 180° (12:00 horas). El valor de la desviación estándar es de $100'$ (trazo superior). El trazo inferior muestra un registro típico obtenido bajo irradiación de 630 nm. La inversión de fase es evidente; note el paulatino aumento en el nivel de oscilación.

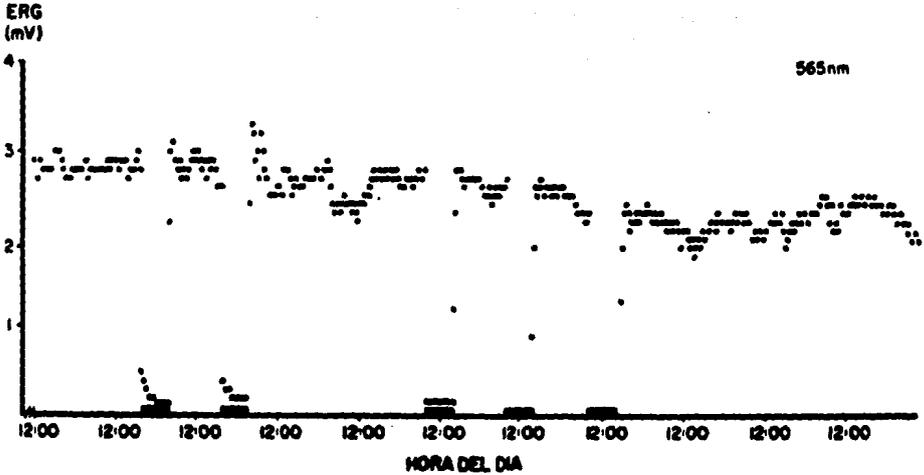


Figura 21.- Esta figura muestra un experimento similar al mostrado en la figura anterior, aunque en este caso se aplicó luz de color verde (565 nm) de la misma intensidad. Las barras de las abscisas indican el intervalo durante el cual se aplicó la luz. El efecto que provoca esta λ es más intenso que el que provoca la luz azul y la sus pensión de los fotoperiodos no provoca posefectos.

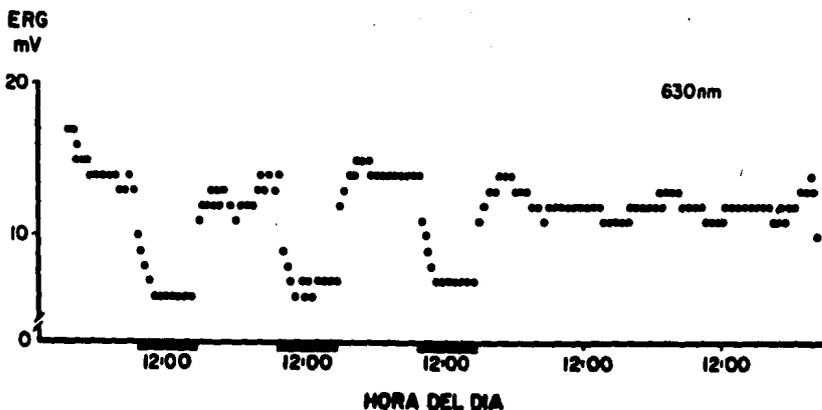
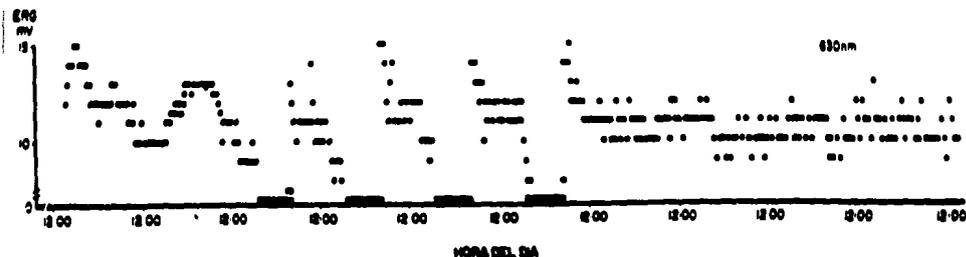


Figura 22a.- Cambios en la amplitud del ritmo ERG cuando recibe luz roja, 10 horas durante el día. La duración del periodo es igual a la del fotoperiodo aplicado y cuando és se suspende, el posefecto es prolongado e intenso.

Figura 22b.- En esta figura la luz roja (630 nm) se aplicó 10 horas durante la noche. Se puede observar como el cese de la luz provocó un importante incremento en la amplitud del ERG a las 6:00 horas. El posefecto provocado por el cese de los fotoperiodos es prolongado pero reversible.



DISCUSION.-

El análisis de nuestros registros de actividad ERG, utilizando destellos de luz monocromática para su obtención, pone de manifiesto un carácter unimodal del ritmo ERG con las mismas características circádicas que se han reportado cuando se obtiene con luz blanca (Arécaiga y Fuentes, 1970; Page y Larimer, 1975; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). En las figuras 3, 4 y 5 se pone de manifiesto una duración de τ cercana a 24 horas, una actividad ERG mínima al mediodía y cambios de algunos parámetros del ritmo (amplitud, periodo, relación ω/ϵ) asociados con las condiciones de iluminación. Es interesante hacer notar que a pesar de que se utilizaron intensidades idénticas para cada una de las λ probadas, la amplitud relativa para la oscilación obtenida con el color azul (465 nm) aumentó considerablemente en el momento en que se hizo el cambio de luz blanca a luz azul (primera parte de la figura 3); esto no ocurrió ni para la luz de color rojo (fig. 5) ni para la luz de color verde (fig. 4). Para las tres λ estudiadas, la amplitud de la oscilación cambio en forma proporcional a la intensidad luminosa. En el caso de la luz azul τ es mayor con intensidades altas y disminuye a medida que estas son menores, el valor de la relación ω/ϵ aumenta a medida que se eleva la intensidad luminosa.

En ningún experimento cambio significativamente el nivel de oscilación. El sistema circadiano ERG se comporta como sistema diurno cuando se obtiene con destellos de luz azul y de luz roja (a mayor intensidad, mayor valor de τ y de la relación τ/ρ) en tanto que se comporta como sistema nocturno cuando se obtiene utilizando luz de color verde (a mayor intensidad luminosa, menor duración de τ y menor τ/ρ) de acuerdo a lo propuesto por Aschoff (1960). Todos estos datos son consecuentes con el hecho de que el ritmo ERG en el acodado es de naturaleza endógena y el que se establezcan claras diferencias de acuerdo con el tipo de espectro luminoso empleado, va de acuerdo con la proposición de que existen dos grupos de fotorreceptores presentes en los ojos de estos crustáceos, capaces de modificar las características del ERG de acuerdo con la λ que se reciba. El efecto que provoca la luz monocromática en los sistemas circádicos se ha estudiado muy poco, sin embargo Bruce y Minis (1969) han determinado el espectro necesario para que los pulsos de luz monocromática inicien el ritmo circádico de eclosión en la mariposa Pectinophora gossypiella. Sus resultados asemejan en términos generales, a los que han sido encontrados para el sistema circádico del microorganismo Neurospora, por Sargent y Bridges, en 1967 y en la mosca Drosophila por Frank

y Zimmerman (1969): existe una zona amplia en el color azul, muy eficaz para iniciar la oscilación circádica. La efectividad va declinando a medida que el espectro utilizado se aleja de 490 nm; la luz de 520 nm carece de efecto sincronizador sobre estos sistemas. Al estudiar lo que ocurre en otro sistema circádico, el de la migración de cloroplastos en Acetabularia mediterranea (Schmid, 1986) la luz azul es capaz de provocar adelantos y atrasos de fase cuando se aplica en forma simultánea con luz roja; además, la aplicación continua de luz azul provoca cambios en τ , lo que probablemente indica que el sistema posee un mecanismo que mide la intensidad luminosa. En nuestros resultados (tabla 1) puede apreciarse como el efecto de la luz azul sobre la oscilación difiere importantemente del encontrado al aplicar luz de color verde o de color rojo, sobre todo en lo que se refiere al valor del periodo y al de amplitud relativa. Esta diferencia en los resultados, podría estar en relación con el número de fotorreceptores para cada color contenidos en el ojo compuesto del acocil; en tanto que los receptores para el color verde son abundantes, los que responden el color azul-violeta son sumamente escasos.

Se han realizado algunos trabajos que analizan los factores que pudieran estar involucrados en la respuesta de los

fotorreceptores retinianos a la luz monocromática y es muy interesante hacer notar que las medidas en la función de sensibilidad espectral difieren con relación al método de evaluación que se utiliza; así, cuando Kennedy y Bruno (1961), Goldsmith y Fernández (1968), Wald (1968) y Goldsmith (1986), determinaron esta función a través de la amplitud del ERG, la λ máxima encontrada en el acocil es de 565-570 nm y de 435-440 nm, sin embargo, el valor de los dos pigmentos fotosensibles extraídos por Wald (1967) tienen una absorción máxima en 510 y 562 nm, lo que sugiere un sistema sensible al amarillo-verde. La discrepancia de los pocos nanómetros encontrada entre la λ máxima del pigmento y el pico de sensibilidad del ERG encontrado en condiciones de adaptación a la oscuridad se atribuyó al papel que juegan los pigmentos retinianos accesorios en el ojo del acocil. La migración de los gránulos de pigmento dentro de un fotorreceptor en el ojo de un crustáceo está asociada con la despolarización inducida por la luz (Stavenga, 1979; Frixione y Aréchiga, 1981). King y Goldsmith (1977) aislaron quirúrgicamente el pigmento accesorio distal y observaron una gran coincidencia entre los valores de las medidas de los registros intracelulares y los encontrados mediante microespectrofotometría por Wald en 1967. En un trabajo posterior, Olivo y Chrismer (1980) encuentran

en el ojo aislado del acocil Procambarus clarkii, que el espectro de sensibilidad para la migración del pigmento es igual al espectro de sensibilidad del ERG, apoyando fuertemente el hecho de que es la respuesta visual la que inicia la migración de los pigmentos accesorios en los ojos de los crustáceos. La excepción a este hecho se plantea para la luz de color violeta (440 nm), ya que el pigmento responsable de la respuesta a esta λ se ha ubicado en la 8a. célula retinular, que carece de gránulos de pigmentos accesorios (Krebs, 1972). Si observamos que el valor de la luz azul que nosotros utilizamos (465 nm) se acerca mucho al valor de la de la luz violeta (440 nm) que activa en forma directa a la octava célula retinular, podríamos proponer que las diferencias de la luz azul con otras λ , tal vez se debe al papel que están desempeñando los pigmentos retinianos accesorios: en tanto que estarían modulando la respuesta del fotorreceptor hacia la luz verde o roja, no tendrían ninguna participación con relación a la luz azul.

La capacidad que tiene la luz monocromática para sincronizar al ritmo circádico ERG mediante la aplicación de pulsos únicos queda evidenciado en las figuras 7, 8 y 9. Es muy interesante hacer notar los cambios en el nivel de oscilación que provocaron en este ritmo la luz de color ver

de y la luz de color rojo. Estos cambios sólo se observaron cuando el estímulo se aplicó entre las 12 y las 24 horas circ ádicas, en tanto que su presentación fue ocasional cuando la estimulación se hacía en otros momentos circádicos. No se observaron cambios en el nivel de oscilación ni con luz blanca ni con luz azul. El desconocimiento de los procesos generadores del ritmo circádico, impide que se explique esta propiedad sin embargo, es probable que este relacionada con el tipo de energía aplicada y no con el momento de aplicación del estímulo. Los cambios de fase provocados por los estímulos en diferentes momentos circádicos, permitieron construir las CRFe (Aschoff, 1965 a,b; De Coursey, 1960) y tal y como fue propuesto por Enright (1965) la proyección unidimensional de una CRF da una idea del grado de sincronización del sistema circádico explorado. Acerca de las CRFe obtenidas por estímulos con luz blanca se pueden hacer las siguientes generalizaciones: (1) el día subjetivo (de las 0 a las 12 hc) se caracteriza por respuestas pequeñas a la luz; (2) la noche subjetiva (de las 13 a las 24 hc) tiene una mayor sen sibilidad a los pulsos de luz; (3) se provoca un atraso de fase cuando el estímulo se aplica al final del día subjetivo y al principio de la noche subjetiva; (4) los adelantos de fase se dan en la parte tardía de la noche subjetiva y al comenzar el día subjetivo.

Otra observación es que la relación atrasos/adelantos (At/Ad) es menor a medida que τ disminuye (Daan y Pittendrigh, 1976b). La sincronización por luz se ha demostrado para organismos íntegros y para órganos aislados (Menaker y Wisner, 1983; Takahashi y Menaker, 1984), obteniéndose en algunos casos la CRFe correspondiente (Remé y cols., 1986). La capacidad de sincronización también ha quedado demostrada con la aplicación de pulsos de oscuridad en un sistema circádico adaptado a la luz (Boulos y Rusak, 1982). En 1983, Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal obtuvieron la CRFe para el ritmo circádico ERG en el ojo compuesto del acócil Procambarus bouvieri; la curva es unimodal con una zona de transición de fase a las 5 hc con una relación At/Ad cercana a la unidad. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos por nosotros, coincidimos en la unimodalidad de las CRFe para dos de las λ probadas, sin embargo existen discrepancias importantes. En el caso de las λ que corresponden a 465 nm y 565 nm, la relación At/Ad indica predominio de los adelantos (figs. 11 y 12); aunque en el caso de la luz azul su pico máximo se localiza en la noche subjetiva (13 a 24 hc) para la luz verde ocurre en el día subjetivo (01 a 12 hc). Los resultados para el color rojo contrastan con lo anterior: el área bajo la curva predominante está constituida por los atrasos y la curva es bimodal. Además, la zona de transición de fase se sitúa

exactamente a las 12 hc (fig. 13). Las características de las CRFe están resumidas en la tabla 2.

Estos datos permiten cuantificar la respuesta del sistema circádico ERG a la luz monocromática. En el acocil, diversos métodos experimentales han proporcionado información de las dos funciones de sensibilidad espectral para los fotoreceptores retinianos. Una situada en ≈ 570 nm (Wald, 1968; Goldsmith y Fernández, 1968) y otra en ≈ 440 nm, que sólo es evidente con adaptación a la luz roja (Kong y Goldsmith, 1977; Wald, 1968; Goldsmith, 1978). A pesar de que no se ha extraído un pigmento fotosensible específico para el color rojo, Suzuki y cols. (1984) han descrito un sistema rodopsina-porfiropsina en el sistema visual de Procambarus clarkii. La porfiropsina es un pigmento visual que tiene al 3-dehydroretinal como cromóforo, que absorbe λ mayores que la rodopsina y cuya concentración en el ojo, varía con la temperatura de manera inversamente proporcional. Por otra parte, muchos autores han caracterizado las respuestas ERG para esta λ (Goldsmith, 1978, 1986; Wald, 1968). Tal y como ha sido observado por otros autores (Pittendrigh, 1957, 1965; Enright, 1975, 1976) nuestros registros muestran que después de que se ha aplicado un estímulo luminoso breve sobre la oscilación circádica, se presenta un estado transitorio, en

donde la duración de \bar{T} , y la amplitud se desorganizan por completo. Las características de esta etapa dependen de manera fundamental del momento circádico en el que se aplica el estímulo, de la intensidad y del efecto (adelanto o atraso) sobre la oscilación. Nuestros resultados muestran que cuando se grafica la fase nueva en función de la fase vieja (CRFt), es posible observar como los atrasos se instalan en menos días que los adelantos. Esto se observa más claramente cuando se utiliza luz de color verde (fig. 12) y luz de color rojo (fig. 13). Nuestros resultados coinciden con los observados por otros autores cuando utilizaron luz blanca como sincronizador (Pittendrigh y Bruce, 1959; Pittendrigh, 1965). Con base en sus hallazgos, estos autores propusieron que los ciclos transitorios indican que la oscilación es el resultado del trabajo de cuando menos dos osciladores que normalmente están acoplados entre sí, pero que son brevemente perturbados por el estímulo luminoso. Además de proporcionar información sobre la recuperación del marcapaso después de la aplicación de un pulso, las CRFt han sido utilizadas para tratar de conocer la estructura interna de un oscilador biológico. Winfree (1970, 1973) y Pavlidis (1973) definieron matemáticamente las CRF obtenidas con estímulos intensos y débiles y llegaron a la conclusión de que ambos tipos representaban un sistema dinámico bidimensional simple.

Sin embargo, Kawato (1981) examinó la posibilidad de obtener alguna información o restricción con un modelo de ecuaciones que describe un oscilador biológico utilizando el estado estable y el transitorio de la CRF. Este autor propone, con base en un análisis meramente analítico y topológico y con base en las discontinuidades encontradas, que el oscilador circádico en la mosca Drosophila no está formado por un sólo oscilador de dos variables. Su interpretación maneja dos osciladores ciclo-límite acoplados entre sí que son capaces de simular cualitativamente las CRF en esta especie.

La única CRFt discontinua en nuestros resultados es la obtenida para la luz de color rojo; si consideramos que la respuesta al color rojo por parte de los fotorreceptores visuales está dada por una combinación de cuando menos 2 grupos de estos, es probable que la hipótesis de Kawato (1981) pueda también proponerse en este caso.

En algunos mamíferos adultos ha sido posible determinar la sensibilidad espectral de los fotorreceptores retinianos que están involucrados en los cambios de fase del ritmo circádico estudiado. Joshi y Chandrashekarán (1985) obtuvieron la CRFe aplicando luz blanca al ritmo circádico motor de vuelo en el murciélago Hipposideros speoris y también determinaron que la curva de sensibilidad espectral para los ade-

lantos de fase tiene su máximo en 520 nm, en tanto que la de los atrasos tiene su máximo en 430 nm.

Nuestros resultados muestran dos grupos de fotorreceptores funcionales, que responden selectivamente a dos longitudes de onda diferentes y que en la mayoría de los casos provocan cambios de fase con signos opuestos. La luz roja provoca atrasos de fase cuando se aplica a las 2, 6, 12 y 20 hc (figs. 14 y 15) en tanto que a esas mismas horas circádicas

con excepción de hc=20) la luz verde genera adelantos (misma figura). Con base en estos resultados podemos proponer dos grupos de fotorreceptores responsables de los adelantos (565 nm) y de los atrasos (630 nm) de fase en el ritmo del acocil Procambarus. Sin embargo es necesario considerar que estas respuestas se obtuvieron a un nivel fotópico de iluminación (500 lux durante 50') y será necesario establecer si los cambios de fase a un nivel escotópico son iguales.

Pittendrigh y Daan (1976a,b) han simulado teóricamente, que el inicio y el final de la oscilación circádica en animales nocturnos se controla mediante la interacción de dos osciladores acoplados entre sí: el oscilador Ata (atardecer) y el Ama (amanecer). Si nosotros observamos en nuestros resultados que en las horas de la mañana (6 y 12 hc, fig. 14) predominan las respuestas para adelantos, a expensas de la utilización del color verde, y en las horas del atardecer.

(18, 20 y 24 hc, fig. 15) predominan los atrasos provocados por la aplicación de luz roja, y postulamos dos grupos funcionales de fotorreceptores: V (565 nm) que provocan los máximos adelantos de fase, y R (630 nm) que provocan los máximos atrasos, podríamos entonces proponer que para nuestro caso particular, los fotorreceptores V tienen un mayor control sobre el oscilador Ata. La coexistencia de dos sistemas con sensibilidad espectral diferente, ha sido descrita en otros ritmos circádicos (Mote y Black, 1981; Feldman y Dunlap, 1983; Takahashi y cols., 1984; Hariyama y cols., 1986).

Por otro lado, también resulta evidente que los cambios de fase dependen tanto de la λ como de la hc de aplicación del estímulo. Al graficar la magnitud de los cambios de fase obtenidos en función de la λ empleada, observamos que el grado de sincronización depende también de la sensibilidad del sistema oscilante.

El empleo de diferentes λ que a su vez actúan como agentes sincronizadores del ritmo ERG, provoca modificaciones particulares en la frecuencia del ritmo circádico, que por supuesto se reflejan como cambios en la fase de la propia oscilación. Al aplicar luz roja sobre la oscilación en forma continua, la acrofase del ritmo se sitúa a 180° de diferencia con relación al efecto que la luz blanca provoca sobre el ritmo ERG (la acrofase se presenta a las \approx 24 horas; fig. 17).

Al emplear luz azul (fig.17) la acrofase se ubica a las 14:00 horas, en tanto que el efecto observado para la luz verde es similar al que provoca la aplicación de luz blanca (fig. 18), ya que la acrofase esta situada a las 01:00 horas. La luz roja continua, provoca la mayor diferencia de fase con relación a la luz blanca, en tanto que esta relación es casi nula entre la luz verde y la luz blanca. Esto podría apoyar la proposición de que existen dos grupos de fotorreceptores funcionales que manejan diferente a la oscilación ERG dependiendo de la λ que reciban. En todos los casos el valor de $\bar{\tau}$ fue mayor que el valor de $\bar{\tau}$ obtenido en oscuridad constante. El $\bar{\tau}$ del ritmo en oscilación libre depende (Aschoff, 1979): de la especie estudiada, del estado fisiológico del organismo, de las condiciones ambientales (intensidad, temperatura) de la historia previa y, podriamos añadir, de la composición espectral de la luz, ya que el valor de $\bar{\tau}$ obtenido con luz roja es mayor que el encontrado cuando la que se aplica es luz azul (figs.17 y 19). Nuestros resultados coinciden con la proposición de Daan y Pittendrigh (1976 c), quienes señalan que la aplicación de luz continua sobre los sistemas circádicos provoca cambios sobre la velocidad angular del ritmo en cada fase, y que además, utilizando este procedimiento se tiene evidencia indirecta de cual será el

efecto que provocará la luz continua que se aplique en forma de fotoperiodos. Nosotros pudimos observar que cuando aplicamos luz azul en forma continua (fig. 17) la acrofase está a las 14:00 lo que coincide con un $\Delta\phi$ en la CRF obtenida para la CRF de la misma longitud de onda. La luz verde (fig. 18) tiene una acrofase en 20° (01:00 horas) que coincide también con un incipiente adelanto en la CRF para esta λ ; en el caso de la aplicación de luz de color rojo, la coincidencia es aún más clara: la acrofase se sitúa en 180° (12:00 horas), esto es, en el punto exacto en donde ocurre la transición de fase para el color rojo en la correspondiente CRFe. Estos resultados se podrían explicar a través de un modelo obtenido por Daan y Pittendrigh (1976 a,c) cuando exploran a través de simulaciones en computadora si la forma de la CRFe puede proporcionar información para poder predecir los efectos de la aplicación continua de luz sobre un sistema circádico. Las hipótesis propuestas son: a) que una transformación lineal simple de la CRF del marcabaso producirá una curva velocidad-respuesta (CVR); b) que la luz aplicada en forma constante producirá cambios en la velocidad angular (V) sobre el marcabaso, en cada fase del ciclo; c) que el cambio en la velocidad angular (ΔV) de cada fase del ciclo, tendrá el mismo signo que el $\Delta\phi$ causado por un

pulso breve en esa fase; d) que la magnitud de Δv es proporcional a la del correspondiente $\Delta \phi$; y e) que el Δv , al igual que el $\Delta \phi$ dependen de la intensidad del estímulo.

Esto implicaría que la luz continua provocaría un lententecimiento del marcapaso ($\Delta v-$) en la última parte del día subjetivo y que durante la última parte de la noche los estímulos provocarían atrasos de fase, así como también un aumento en la velocidad ($\Delta v+$) en la última parte de la noche subjetiva y al comienzo del día provocándose un $\Delta \phi+$ en la correspondiente CFR. El cambio neto en la velocidad angular se observaría como un cambio en el valor de $\bar{\tau}$ (Daan y Pittendrigh, 1976) que dependería de la forma de la CRF (equivalente a la CVR); esto representaría un alargamiento de $\bar{\tau}$, tal y como nosotros lo corroboramos con nuestros datos: en oscuridad constante el valor de $\bar{\tau}$ fue > 24 horas, en tanto que en luz continua, el $\bar{\tau}$ siempre fue mayor de 24 horas, incluyendo el expuesto a luz monocromática. La utilidad que representa este método para predecir los efectos de la luz continua, sería la de explicar la coordinación relativa de algunos marcapasos con la luz, a través de modelos.

El último grupo de experimentos que realizamos consistió en determinar la capacidad de sincronización que tiene la luz monocromática, sobre el ritmo ERG cuando se incluye como parte de un fotoperiodo.

Algunos autores han explorado esta capacidad de la luz monocromática y han encontrado resultados muy interesantes.

Gordon y Brown (1971) decidieron observar lo que ocurría cuando el ritmo circádico de temperatura en el ratón *Perognathus penicillatus* era sometido a un regimen de una hora de luz monocromática (a las 21:00 horas) y a 23 de oscuridad.

Las λ que resultaron ser eficaces como sincronizadoras son: 450, 500 y 525 nm. Cuando se utilizaron otras longitudes de onda (se probaron desde 300 hasta 725 nm) el sistema circádico lo interpretó como una condición de oscuridad completa. En este trabajo los autores encuentran que la λ más efectiva para provocar atrasos de fase, no está en la región **espectral del rojo**, como ocurrió en nuestros experimentos, sino que se sitúa en la región azul-verde, lo que probablemente va de acuerdo con la función y el número de bastones en el ojo de este ratón (Karli, 1952; Bonaventure, 1961).

Es importante señalar que en este trabajo los autores no definieron la relación energía-respuesta como función de la λ , por lo tanto no pudieron caracterizar en forma adecuada la

λ para provocar cambios de fase o sincronización fotoperiódica en este ritmo circádico.

El fotoperiodismo es probablemente, el primer ejemplo fehaciente de cronometría biológica que se ha documentado

(Garner y Allard, 1920) y se acepta, casi en forma unánime que su control se ejerce a través de algún marcador de tiempo como el involucrado en la ritmicidad circádica (Salisbury, 1969). Algunos autores (Borthwick y Downs, 1964; Takimoto y Hamner, 1965; Cumming, 1973) han demostrado periodicidades circádicas en la sensibilidad a perturbaciones a la luz de color rojo o al color rojo lejano, y han demostrado también que los ciclos luz-oscuridad tienen un efecto inductivo máximo cuando el periodo es cercano a 24 horas. Sin embargo, en algunos sistemas biológicos se ha visto que el "reloj" que controla una actividad circádica actúa separadamente del "reloj" que controla la respuesta fotoperiódica de una actividad diferente en el mismo organismo (Salisbury y Denney, 1971).

En las figuras 20, 21 y 22 podemos observar la capacidad que tiene la luz monocromática para ser "seguida" por el ritmo circádico ERG, esto es, su capacidad sincronizadora es evidente en este sistema cuando se aplica conformando fotoperiodos. La intensidad luminosa utilizada para aplicar cada λ fue intensa (100 lux) y de ahí los efectos pronunciados en la fase de descenso del ERG al momento de empezar la aplicación de cada intervalo de luz, sin embargo los posefectos que se presentaron al suspenderse la luz azul (465 nm, fig.20)

y la luz verde (565 nm, fig. 21) fueron discretos; las características típicas de la oscilación se reanudaron rápidamente. Esto no ocurrió así para la luz de color rojo, que provocó intensos, prolongados y en ocasiones irreversibles posefectos. (fig. 22 a y b). Cronin y Goldsmith (1984) han descrito el curso temporal para la regeneración en la oscuridad de rodopsina contenida en los fotorreceptores del acocil Procambarus clarkii y encontraron que tarda varios días cuando el ojo se ha iluminado con una intensidad de 100 W durante 30seg. con una longitud de onda de 570 nm. Si la λ es de 420 nm el sistema requiere menos de dos días para su regeneración. Los autores proponen un mayor tiempo en la resíntesis de rodopsina a medida que la λ utilizada sea mayor. Estos datos tal vez permitan explicar el prolongado posefecto que se observa en nuestros resultados, después de aplicar luz roja durante varias horas. Los resultados que encontramos en algunos experimentos, en donde el ritmo perdió la capacidad de oscilar, tal vez como consecuencia de la irradiación por luz roja, nos señalan la necesidad de hacer análisis histológico en estos ojos. Meyer-Rochow y Eguchi (1985) encuentran lesiones en los rbdomos de ojos de Procambarus clarkii previamente sometidos a irradiación con luz ultravioleta ($1.46 \times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ fotones, durante 3 horas). Los rbdomos que

recibieron luz de color verde de las mismas características, no presentaron ninguna alteración y tuvieron una apariencia similar a la de aquéllos que habían permanecido en oscuridad. Nuboer y cols. (1983) investigaron si los cambios en la composición espectral podrían sincronizar el ritmo circádico de actividad locomotora en conejos. Encontraron que sus resultados son compatibles con la proposición de que hay un oscilador que controla el inicio de la actividad locomotora y otro que controla el final de ésta. Sus resultados coinciden con la existencia de un sistema visual fotópico que posee dos tipos de receptores, cuya función espectral va de acuerdo con las diferencias conductuales que dependen de la visión en color (Nuboer, 1971).

De acuerdo con nuestros resultados (figs. 11, 12 y 13), hemos podido identificar al grupo de fotorreceptores responsables de los adelantos (565 nm) y de los atrasos (630 nm) de fase para el ritmo circádico ERG y, por otra parte, pudimos constatar la capacidad de sincronización que sobre este ritmo, posee la luz monocromática cuando se aplica formando parte de fotoperiodos (figs. 20, 21 y 22) que se manifiesta como la disminución de la amplitud ERG durante el intervalo de aplicación de la luz y además con un cambio en el valor de τ igual al del fotoperiodo que se aplica.

Conociendo estos datos, podremos identificar al grupo de fotorreceptores involucrado en el inicio y/o en el final de la oscilación ERG, realizando experimentos en donde la intensidad y la λ se cambien en forma simultánea.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.-

- Aréchiga, H. and Fuentes, B. (1970): Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist*. 13: 137.
- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. and Barrera-Mera, B. (1973): Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latin. Am.* 24: 601.
- Aréchiga, H. and Wiersma, C.A.G. (1969): Circadian rhythms of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71.
- Aschoff, J. (1960): Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological clocks*. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25: 11.
- Aschoff, J. (1965a): The phase-angle difference in circadian periodicity. In: *Circadian clocks* North-Holland, Publish. Co. Amsterdam, pp. 262-276.
- Aschoff, J. (1965b): Response curves in circadian periodicity. In: *Circadian clocks*. North-Holland. Publish. Co. Amsterdam. pp. 95.
- Aschoff, J. (1967): Adaptive cycles: their significance for defining environmental hazards. *International J. of Biometeorology*. 11: 255.
- Aschoff, J. (1978a): Circadian rhythms within and outside their ranges of entrainment. In: I. Assenmacher and D. Farnier (Eds.), *Environmental Endocrinol.* Berlin-Heidelberg-New York. pp. 75-98 Springer-Verlag.
- Aschoff, J. (1978b): Perspectives in entrainment. *J. Comp. Neurobiol.* 18: 56.
- Aschoff, J. (1978c): Features of circadian rhythms relevant for the design of shift schedules. *Ergonomics*, 39: 739.
- Aschoff, J. and Pohl, H. (1978): Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften*. 65: 80.

- Aschoff, J. (1979): Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift tierpsychologie*. 49: 225.
- Barrera-Mera, B. (1976): Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. Behav.* 17: 59.
- Bernard, G.D. and Stavenga, D.G. (1978): Spectral sensitivities of retinular cells measured in intact living bumblebees by an optical method. *Naturwissenschaften*. 65: 442.
- Bonaventure, N. (1961): Sur la sensibilité spectrale de l'appareil visuel chez la souris. *Ct. Rd. Soc. Biol.* 155: 918.
- Bonnefoy-Claudet, R., Deray, A. et Gomot, L. (1983): Action de lumières de longuerus d'onde différentes sur la reproduction de l'Escargot Helix aspersa (M)., Comptes rendus des séances de la Société de Biologie. 117(4); 504.
- Borthwick, H.A. and Downs, R.J. (1964): Roles of active phytochrome in control of flowering of Xanthium pensylvanicum. *Bot. Gaz.* 125: 227.
- Boulos, Z. and Rusak, B. (1982): Circadian phase response curves for dark pulses in the Hamster. *J. Comp. Physiol.* 146: 411.
- Butler, R. (1971): The identification and mapping of spectral cell types in the retina of Periplaneta americana. *Z. vergl. Physiol.* 72: 67.
- Brainard, G.C., Vaughan, M.K. and Russel, J.R. (1986): Effect of light irradiance and wavelenght on the Syrian Hamster reproductive system. *Endocrinol.* 119(2): 648.
- Bridges, C.D.B. (1972): The rhodopsin-porphyrpsin visual system. In: *Handbook of sensory Physiology*. Vol VII/1. Photochemistry of vision. Ed. H.J.A. Dartnall. pp. 417-480 Springer Berlin.
- Brown, F.A. (1961): Retinal pigment rhythms in Crustacea. In: *The Physiology of Crustacea*. T.H. Waterman (Ed.) II. pp. 401-430 New York. Academic Press.
- Bruce, V.G. (1960): Environmental entrainment of circadian rhythms. In: *Cold Spring Harbor. Symp. on Cuant. Biol.* 25: 29.

- Bruce, V.G. and Minis, D.H. (1969): Circadian clock action spectrum in a photoperiodic moth. *Science* 163: 583.
- Bruce, V.G. and Pittendrigh, C.S. (1956): Temperature independence in a unicellular "clock". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 42: 676.
- Bruce, V.G. and Pittendrigh, C.S. (1960): An effect of heavy water on the phase and period of the circadian rhythm in *Euglena*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 56: 25.
- Bünning, E. (1935): Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmie bei Insekten und bei Pflanzen. *Ber. deutsch. bot. ges.* 53: 594.
- Bünning, E. (1967): *The Physiological clock*. pp. 75-150
Bünning, E. (Ed.) Springer Verlag, Berlin and New York.
- Bünning, E. and Baltes, J. (1963): Zur Wirkung von Schwerem Wasser auf die endogene Tagesrhythmik. *Naturwiss.* 50: 622.
- Consi, T.R. and Macagno, E.R. (1985): The spectral sensitivity of eye movements in response to light flashes in *Daphnia magna*. *J. Comp. Physiol. A* 156: 135.
- Cronin, T.W. and Goldsmith, T.H. (1984): Dark regeneration of rhodopsin in crayfish photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 84: 63-81.
- Cumming, B.G. (1973): Endogenous rhythms and photoperiodism in plants. In: Menaker, M. (Ed.) *Biochronometry*. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* pp. 281-291.
- Cummins, D. and Goldsmith, T.H. (1981): Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. *J. Comp. Physiol.* 142: 199.
- Daan, S. and Pittendrigh, C.S. (1976, a): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodent. II The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 106: 253.
- Daan, S. and Pittendrigh, C.S. (1976b): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. III Heavy water and constant light: homeostasis of frequency? *J. Comp. Physiol.* 106: 267.

- De Coursey, P.J. (1960): Phase control of activity in a rodent. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25: 49.
- De Mairan, J. (1729): Observavation botanique. Histoire de L' Academie Royale des Sciences. 35.
- Eguchi, E. (1965): Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells. J. Cell. Comp. Physiol. 66: 411.
- Eguchi, E., Waterman, T.H. (1966): Fine structure patterns in crustacean rhabdoms. In: The functional organization of the compound eye (Bernhard, C.G. Ed.) pp. 105-124. Oxford. Pergamon Press.
- Eguchi, E., Waterman, T.H. and Akiyama J. (1973): Localization of the violet receptor cells in the crayfish retinula. J. Gen. Physiol. 62: 355.
- Enright, J.T. (1965a): Entrainment of a tidal rhythm. Science 147: 864.
- Enright, J.T. (1965b): Synchronization and ranges of entrainment. In: Circadian clocks. North-Holland Publish. Co. Amsterdam. pp. 112-124.
- Enright, J.T. (1976): Plasticity in an Isonod's clockworks: shaking shapes form and affects phase and frequency. J. Comp. Physiol. 107: 13.
- Enright, J.T. (1981): Data analysis. In: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4 Biological Rhythms (Aschoff, J. Ed.) Plenum Press. New York and London.
- Feldman, J.F. and Dunlap, J.C. (1983): Neurospora crassa: a unique system for studying circadian rhythms. Photochem. photobiol. Rev. 7: 319.
- Fernández, H.R. and Nickel, E.S. (1976): Ultrastructural and molecular characteristics of crayfish photoreceptor membranes. J. Cell. Biol 69: 721.
- Frank, K.D. and Zimmermann, W.F. (1969): Action spectra for phase shifts of a circadian rhythm in Drosophila. Science. 163: 688.

- Frixione, E. and Aréchiga, H. (1981): Ionic dependence of screening pigment migration in crayfish retinal photoreceptors. *J. Comp. Physiol.* 144: 35.
- Fuentes-Pardo, B. e Inclán-Rubio, V. (1981): Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 68(A): 477.
- Fuentes-Pardo, B. and Ramos-Carvajal, J. (1983): The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 711.
- Fujimoto, F., Yanase, T. and Ishizuka, I. (1966): The visual substance of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Mem. Osaka Gakuji Univ. B.* 15: 109.
- Garner, W.W. and Allard, H.A. (1920): Effect of the relative length of day and night and other factors of the environmental growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.* 18: 553.
- Goldsmith, T.H. (1972): The natural history of invertebrate visual pigments. In: *Handbook of sensory Physiology*. Dartnall (Ed.) Vol. VII/1 pp. 685-719. Springer-Heidelberg.
- Goldsmith, T.H. (1977): Photoreceptor processes: Some problems and perspectives. *J. Exp. Zool.* 194: 89.
- Goldsmith, T.H. (1978): The spectral absorption of crayfish rhabdoms: pigment, photoproduct and pH sensitivity. *Vis. Res.* 18: 463.
- Goldsmith, T.H. (1986): Interpreting transretinal recordings of spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol. A.* 159: 481.
- Goldsmith, T.H. and Fernández, H.R. (1968): Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. *Z. vergl. Physiol.* 60: 156.
- Goldsmith, T.H. and Wehner, R. (1977): Restrictions on rotational and translational diffusion of pigment in the membranes of a rhabdomeric photoreceptor. *J. Gen. Physiol.* 70: 453.

- Gordon, S.A. and Brown, G.A. (1971): Observations on spectral sensitivities for the phasing of circadian temperature rhythms in Perognathus penicillatus. In: Menaker, M. (Ed.) Biochronometry. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
- Hafner, G.S. and Tokarski, T.R. (1978): Evidence for putative photoreceptor axon terminals in the medulla externa of the crayfish. Cell. Tiss. Res. 195: 331.
- Halberg, F. (1959): Physiological 24-hours periodicity: general and procedural considerations with references to the adrenal cycle. Z. vitamin. hormon. Fermentforsch. 10: 225.
- Hamdorf, K., Höglund, G. and Juse, A. (1986): Ultraviolet and blue induced migration of screening pigment in the retina of moth Deilephila elenor. 159(3): 353.
- Hariyama, T., Meyer-Rochow, V.B. and Eguchi, E. (1986): Diurnal changes in structure and function of the compound eye of Ligia exotica (Crustacea; Isopoda). J. Exp. Biol. 123: 1.
- Hastings, J.W. and Sweeney, B.M. (1958): A persistent diurnal rhythm of luminiscence in Gonyaulax polyedra. Biol. Bull. 115: 440.
- Hoffmann, K. (1969): Zum Einfluss der Zeitgeberstärke auf die Phasenlage der synchronisierten circadianen Periodik. Zeitschrift für vergleichende Physiologie. 62: 93.
- Hope, G.M. and Bhatnagar, K.P. (1979): Electrical responses of bat retina to spectral stimulations: comparison of four microchiropteran species. Experientia 35: 1189.
- Inclán-Rubio, V. and Fuentes-Pardo, B. (1987): Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish II.- functional relationships between caudal and visual photoreceptors. Comp. Biochem. Physiol. 86A(3): 529.
- Joshi, D. and Chandrashekar, M.K. (1985): Spectral sensitivity of the photoreceptors responsible for phase shifting the circadian rhythm of activity in the bat, Hipposideros speoris. J. Comp. Physiol. A 156: 189.
- Johnson, M. (1939): Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (Peromyscus). J. Exp. Zool. 82: 315.

- Karli, P. (1952): Retinés sans cellules visuelles-recherches morphologiques, physiologiques, et physiopathologiques chez les rougeurs. Arch. Anat. Histol. Embryol. 35: 1.
- Kawato, M. (1981): Transient and steady state phase response curves of limit cycle oscillator. J. Mathematical Biology. 12: 13.
- Kennedy, D. and Bruno, M.S. (1961): The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. J. Gen. Physiol. 44: 1089.
- Kirschfeld, K. and Vogt, K. (1985): The contribution of different colour receptors to a motor output in the fly. J. Comp. Physiol. A 157(4): 417.
- Kleinholz, L.H. (1966): Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. Amer. Zool. 6: 161.
- Klotter, K. (1960): General properties of oscillating rhythms. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25: 185.
- Knowles, A. and Dartnall, H.J.A. (1977): Habitat, habit and visual pigments. In: The eye. (Dawson, H. Ed.) second edition Vol 2B. Photobiology of vision. pp. 581-641 Academic Press, New York.
- Knüll, F. (1976): Zeitgeber for animals in the continuous daylight of high arctic summer. Oecologia, 24: 149.
- Kong, K.L. and Goldsmith, T.H. (1977): Photosensitivity of retinular cells in white-eyed crayfish (Procambarus clarkii). J. Comp. Physiol. 122: 273.
- Konopa, R.J. (1972): Circadian clock mutants of Drosophila melanogaster Ph.D. Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, 1972.
- Konopa, R.J. and Benzer, S. (1971): Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68: 2112-2116.
- Krebs, W. (1972): The fine structure of the retinula of the compound eye of Astacus fluviatilis. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 133: 399.
- Mc Guire, R.R.A., Rand, W.M. and Wurtman, R.J. (1973): Entrainment of the body temperature rhythm in rats: effect of color and intensity of environmental light. Science 181: 956.

- Menaker, M. and Wisner, F. (1984): Neural and endocrine control of circadian rhythms. In: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 6 Biological Rhythms. J. Aschoff (Ed.) pp. 232-256.
- Menaker, M. and Takahashi, J.S. and Eskin, A. (1978): The Physiology of circadian pacemakers. *Ann. Rev. Physiol.* **40**: 501.
- Meyer-Rochow, B.V. and Eguchi, E. (1983): Ultrastructure du rhabdome de Procambarus clarkii immédiatement et 20 heures après l'exposition à la lumière ultraviolette (350 nm) et verte (570 nm) d'un contenu photonique égal. *Biol. Cell.* **48**: 185.
- Moore-Ede, M.C. (1981): Light: an information source for circadian clocks. *Photochem. Photobiol.* **34**: 237.
- Mote, M.I. and Black, K.R. (1981): Action spectrum and threshold sensitivity of entrainment of circadian running activity in the cockroach Periplaneta americana. *Photochem. Photobiol.* **34**: 257.
- Naka, K. and Kuwabara, M. (1959): Two components from the compound eye on the eye on crayfish. *J. Exp. Biol.* **36**: 51.
- Nässel, D.R. (1976): The retina and retinal projection on the lamina ganglionaris of the crayfish Pacifastacus leniusculus (Dana). *J. Comp. Neurol.* **167**: 341.
- Naylor, E. (1958): Tidal and diurnal rhythms of locomotor activity in Carcinus maenas (L.) *J. Exp. Biol.* **35**: 602.
- Nosaki, H. (1969): Electrophysiological study of color encoding in the compound eye of crayfish, Procambarus clarkii. *Z. vergl. Physiol.* **64**: 318.
- Nuboer, J.F.W. (1971): Spectral discrimination in a rabbit. *Doc. Ophthal.* **30**: 279.
- Nuboer, J.F.W., Nuys, W.M. van, and Steenbergen, J.C. van (1983): Colour changes in a light regimen as synchronizers of circadian activity. *J. Comp. Physiol.* **151**: 359.
- Nunnemacher, R.F., Camougis, G. and Mc Alear, J.H. (1962): The fine structure of the crayfish nervous system. 5th. Congress Elect. Microsc. (2), N-11.

- Olivo, R.F. and Chrismer, K.L. (1980): Spectral sensitivity of screening-pigment migration in retinula cells of the crayfish Procambarus. Vjs. R_{as}. 20: 385.
- Page, T.L. and Larimer, J.L. (1975): Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II The ERG amplitude rhythm. J. Comp. Physiol. 97: 81.
- Parker, G.H. (1895): The retina and optic ganglia in decapods specially in Astacus. Mitl. Zool. Stat. Maepel. Bd. XII. pp. 1-73.
- Pavlidis, T. (1970): Biological phenomena attributable to populations of oscillators. J. Theor. Biol. 5: 46.
- Pavlidis, T. (1973): Biological oscillators: their mathematical analysis. Pavlidis, T. (Ed.) pp. 159-186 New York. Academic Press.
- Pittendrigh, C.S. (1958): Perspective in the study of biological clocks. In: Symposium on perspectives in Marine Biology. Berkeley, California. Univ. Cal. Press. pp. 239-268.
- Pittendrigh, C.S. (1960): Circadian rhythms and circadian organization of living system. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25: 159
- Pittendrigh, C.S. (1965): On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: Circadian clocks. North-Holland Publish. Co. Amsterdam. pp. 277-297.
- Pittendrigh, C.S. (1974): Circadian oscillations in cells and and the circadian organization in multicellular systems. In: The Neurosciences (Schmitt and Worden, Ed.). MIT Press. pp. 437-458.
- Pittendrigh, C.S. (1976): Circadian rhythms. What are they? In: Hastings, J. and Schweiger, H. (Eds.). The molecular basis of circadian rhythms. Dahlem Kongerenz, Berlin. pp. 98-120
- Pittendrigh, C.S. (1980): Functional aspects of circadian pacemakers. In: M. Suda, O. Hayaishi and H. Nakagawa (Eds.) Biological rhythms. Their central mechanisms. New York. Elsevier Press.
- Pittendrigh, C.S. (1981): Circadian systems: entrainment. In: Aschoff, J. (Ed.) Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4 Biological Rhythms. pp. 95-124 Plenum Press. New York.

Pittendrigh, C.S. and Bruce, V.C. (1957): An oscillator model for biological clocks. In: Rhythmic and synthetic process in growth: I Rudnick (Ed.) Princeton Press. pp. 75-109 Princeton Univ. Press.

Pittendrigh, C.S. and Bruce, V.C. (1959): Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermo-periodism and photoperiodism. In: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals (R.B. Withrow, ed.) Pub. 55 pp. 475-505 Amer. Assoc. Adv. Sci. Wash. D.C.

Pittendrigh, C.S. and Caldarola, P.C. (1973): General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2697.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976a): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I the stability and lability of spontaneous frequency. J. Comp. Physiol. 106: 223.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976b): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV Entrainment: pacemaker as clock. J. Comp. Physiol. 106: 291.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976c): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V pacemaker structure: a clock for all seasons. J. Comp. Physiol. 106: 333.

Remé, C., Wirz-Justice, A., Rhyner, A. and Hoffman, S. (1986): Circadian rhythm in the light response of rat retina disk-shedding and autophagy. Brain Res. 369: 356.

Schmid, R. (1986): Twofold effect of blue light on a circadian rhythm in Acetabularia. J. Interdisc. Cycle Res. 17(2):99.

Salisbury, F.B. (1969): The induction of flowering. Some case histories of Xanthium strumarium. In: L.T. Evans (Ed.) Cap. 2 Mc Millan Co. of Australia, South Melbourne and Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.

Salisbury, F.B. and Denney, A. (1971): Separate clocks for leaf movements and photoperiodic flowering in Xanthium strumarium. In: Menaker, M. (Ed.) Biochronometry. Natl. Acad. Sci. U.S.A. pp. 292-311.

- Sánchez, J. and Fuentes-Pardo, B. (1977): Circadian rhythm in the amplitude of electretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem and Physiol.* 56A: 601.
- Sargent, M.L. and Briggs, W.R. (1967): The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in Neurospora. *Plant Physiol.* 42: 1504.
- Semon, R. (1908): Hat der Rhythmus der Tageszeiten bei Pflanzen erbliche Eindrücke hinterlassen? *Biol. Central.* 28: 225.
- Shilbey, A.G. (1968): Eyestalk function in chromatophore control in a crab, Cancer magister. *Physiol. Zool.* 41(3): 268.
- Smith, R. (1948): The role of the sinus glands in retinal pigment migration in grapsoids crabs. *Biol. Bull.* 95: 169.
- Stavenga, D.G. (1979): Pseudopupils of compound eyes. In: Autrum H. (Ed.) *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates. Invertebrate Photoreceptors. Handbook of sensory physiology vol. VII/6A pp. 357-439 Springer Verlag. Berlin-heidelberg-New York.*
- Struwe, G., Halberg, E. and Eloffson, R. (1957): The physical and morphological properties of the pigment screen in the compound eye of a shrimp (Crustacea). *J. Comp. Physiol.* 97: 257.
- Sulzman, F.M., Fuller, C.A. and Moore-Ede, M.C. (1979): Tonic effects of light on the circadian systems of the squirrel monkey. *J. Comp. Physiol.* 129: 43.
- Suzuki, T., Airakawa, K. and Eguchi, E. (1985): The effects of light and temperature on the rodopsin-porphyrin visual system of the crayfish, Procambarus clarkii. *Zool. Scienc.* 2: 455.
- Suzuki, T., Makino-Tasaka, M. and Eguchi, E. (1984): 3-Dehydroretinal (vitamin A₂ aldehyde) in crayfish eye. *Vis. Res.* 24: 783.
- Swade, R.H. and Pittendrigh, C.S. (1967): Circadian locomotor rhythms of rodents in the arctic. *Amer. Natur.* 101: 431.

- Sweeney, B. and Hastings, J.W. (1960): Effects of temperature upon diurnal rhythms. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25: 87.
- Takahashi, J.S., De Coursey, P., Bauman, L. and Menaker, M. (1984): Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. Nature. 308: 186.
- Takimoto, A. and Hamner, K.C. (1965): Studies on red light interruption in relation to timing mechanisms involved in the photoperiodic response of Pharbitis nil. Planta Physiol. 40: 852.
- Treviño, D.L. and Larimer, J.L. (1970): The response of one class of neurons in the optic tract of crayfish (Procambarus) to monochromatic light. Z. Verg. Physiol. 69: 139.
- Wald, G. (1962): Visual pigments of the freshwater crayfish. Fed. Proc. 21: 344.
- Wald, G. (1963): Single and multiple visual systems in Arthropods. Fed. Proc. 22: 519.
- Wald, G. (1967): Visual pigments of crayfish. Nature (Lond). 215: 1131.
- Wald, G. (1968): Single and multiple visual systems in Arthropods. J. Gen. Physiol. 51 (2): 125
- Waterman, T.H. (1961): Light sensitivity and vision. In: Waterman T.H. (Ed.): The Physiology of Crustacean. Vol II. pp. 1-64 Academic Press. New York.
- Waterman, T.H. (1977): The bridge between visual input and central programming in Crustaceans. In: Identified neurons and behaviour of arthropods (G. Hoyle, Ed). New York: Plenum Press.
- Waterman, T.H. and Fernández, H.R. (1970): E-vector and wavelength discrimination by reticular cells of the crayfish Procambarus. Z. vergl. Physiol. 68: 154-174.
- Waterman, T.H., Fernández, H.R. and Goldsmith, T.H. (1969): Dichroism of sensitive pigment in rhabdoms of the crayfish Orconectes. J. Gen. Physiol. 54: 415.

- Waterman, T.H., Wiersma, C.A.G. and Bush, B.M.H. (1982):
Afferent visual responses in the optic nerve of the
crab, Podophthalmus. J. Cell. Comp. Physiol. 63:
135.
- Wever, R. (1972): Virtual synchronization towards the limits
of the range of entrainment. J. Theor. Biol. 36: 119.
- Wiersma, C.A.G. and Yamaguchi, T. (1966): The neural components
of the crayfish as studied by single unit analysis.
J. Comp. Neurol. 128: 333.
- Wiersma, C.A.G. and Yamaguchi, T. (1967): Integration of vi-
sual stimuli by the crayfish central nervous system.
J. Exp. Biol. 47: 409.
- Wilkins, B. (1965): The influence of temperature and tempe-
rature changes on biological clocks. In: Circadian
clocks. North-Holland Publish. Co., Amsterdam. pp.
146-163.
- Winfree, A.T. (1970a): The temporal morphology of a biological
clock. In: M. Gerstenhaber (Ed). Lectures on Math.
in the Life Sci. Vol. 2 Providence, R.I. Amer. Math. Soc.
- Winfree, A.T. (1970b): Integrated view of resetting a circadian
clock. J. Theor. Biol. 28: 327.
- Winfree, A.T. (1973): Resetting the amplitude of Drosophila's
circadian chronometer. J. Comp. Physiol. 85: 105.
- Woodcock, A.E.R. and Goldsmith, T.H. (1970): Spectral response
of sustaining fibers in the optic tracts of crayfish
(Procambarus). Z. Verg. Physiol. 69: 117.