

23
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EFFECTO DE LA APLICACION DE LUZ ROJA
SOBRE EL RITMO CIRCADICO ELECTRO-
RRETINOGRAFICO DEL ACOCIL (CAMBIO
DE FASE).**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS HERRERA LEON



**DIRECTORA DE TESIS,
DRA. VIRGINIA INCLAN RUBIO**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO DE MEX.

1990



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.

I N D I C E .

| | Pagina |
|---|--------|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCION..... | 3 |
| 1.1. Propiedades de los ritmos biológicos..... | 4 |
| 1.2. Frecuencia natural de oscilación y sincronización..... | 8 |
| 1.3. Curva de respuesta de fase (CRF)..... | 9 |
| 1.4. El sistema visual del acocil..... | 10 |
| 1.5. Ritmo circádico electrorretinográfico en el acocil..... | 16 |
| 1.6. Sensibilidad espectral en crustáceos..... | 17 |
| 1.7. Sincronización por luz monocromática..... | 19 |
| 2.0. FUNDAMENTO DE LA HIPOTESIS..... | 23 |
| 2.1. HIPOTESIS..... | 24 |
| 2.2. OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.0. MATERIAL Y METODOS..... | 26 |
| 4.0. RESULTADOS..... | 33 |
| 4.1. Tiempo de duración del estímulo..... | 33 |
| 4.2. Influencia de la luz blanca sobre el ritmo circádico ERG..... | 33 |
| 4.3. Propiedades de la luz roja..... | 36 |
| 4.4. Efecto de la luz roja sobre el periodo..... | 36 |
| 4.5. Efecto de la luz roja sobre la relación a/r..... | 38 |
| 4.6. Efecto de la luz roja sobre el nivel de oscilación..... | 41 |
| 4.7. Efecto de la luz roja sobre la amplitud relativa..... | 41 |
| 4.8. Curva de respuesta de fase (CRF)..... | 44 |
| 5.0. DISCUSION..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.CONCLUSIONES..... | 68 |
| 6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 71 |

R E S U M E N

Se sabe que el ritmo circádico electroretinográfico (ERG) del acocil, es susceptible de modificar su frecuencia natural de oscilación (cambios de fase y periodo) cuando recibe estímulos de luz monocromática a nivel fotópico. Estos cambios dependen tanto de la longitud de onda (λ) como del momento circádico de aplicación del estímulo. Cuando se aplica luz roja de alta intensidad sobre este ritmo, se obtienen principalmente atrasos de fase y aumentos en el nivel de oscilación. El objetivo del presente trabajo fué determinar la capacidad sincronizadora de la luz roja al aplicar pulsos únicos de baja intensidad sobre el ritmo circádico ERG. Para ello utilizamos 80 acociles *Procambarus bouvieri* adultos y de ambos sexos, los cuales se trabajaron en forma individual y en condiciones constantes de temperatura e iluminación. El ERG se obtuvo implantando un electrodo a través de la cornea que captó la respuesta de los fotorreceptores retinianos a destellos de 400 lux de intensidad y 20 ms de duración. Los estímulos únicos de luz roja (632 nm), fueron aplicados en la fase estable del ritmo ERG, durante las 24 horas circádicas (hc) del ciclo. Se utilizó una intensidad de 100 lux y 15 minutos de duración. El análisis de los resultados consistió en medir los cambios de fase (adelanto o atraso) así como las propiedades del ritmo provocados después de aplicada la perturbación. Con

estos datos se construyó la curva de respuesta de fase estable (CRFe) y la curva de respuesta de fase transitoria (CRFt), graficando la magnitud de los cambios de fase en función de la hc de aplicación del pulso. Nuestros resultados muestran que la luz roja de baja intensidad provoca cambios en todos los parámetros del ritmo, los cuales están relacionados, con el momento circádico en que el estímulo se aplica. En general se observa que el periodo se acortó cuando se presentó un adelanto de fase y los atrasos de fase provocaron alargamiento del periodo. Se observa también que en la mayoría de las horas exploradas aumentó la duración de la actividad del ciclo. La CRFe obtenida muestra un comportamiento bimodal continuo con momentos de transición de fase situados a las 15.5 y entre las 19-20 hc. La CRFt muestra también un comportamiento bimodal continuo. Estos resultados muestran efectos propios de la capacidad sincronizadora del estímulo y sugieren que el cambio que provoca la luz roja sobre el ritmo circádico ERG, modifica en forma importante a los osciladores responsables de esta oscilación y repercuten en los mecanismos adaptativos del acoplamiento a su medio ambiente.

I N T R O D U C C I O N

La periodicidad de muchos fenómenos naturales fue un descubrimiento importante para el hombre primitivo. Más tarde pudo identificarse como esta periodicidad no se limitaba al mundo exterior, sino que incluía eventos fisiológicos rítmicos. Los fenómenos autosostenidos y representativos han sido llamados ritmos, ciclos u oscilaciones.

El estudio sistemático de los ritmos biológicos se realiza a través de la cronobiología, que en la actualidad ha analizado, medido e identificado los mecanismos de una gran cantidad de ritmos biológicos en todos los seres vivos, estableciendo que los diferentes ritmos revelan una programación temporal de las actividades metabólicas, nerviosas, endócrinas, etc., que se producen en el seno de un organismo. Los máximos y mínimos de las diversas actividades rítmicas, están organizados con base en el tiempo. Por ejemplo en la especie humana algunas destrezas, (memoria, atención o actividad motora), la actividad cardiovascular o pulmonar, la fuerza muscular etc. presentan una fase máxima (acrofase) localizada hacia la mitad de una jornada diurna, en tanto que otras variables tienen su acrofase situada a la mitad de la noche como es el caso del

número de linfocitos en sangre y de la concentración de la hormona adrenocorticotropa producida por la hipófisis (Reinberg, 1982). Esta organización temporal de las variables biológicas del hombre le permite enfrentarse a sus necesidades biológicas en un espacio temporal adecuado, proporcionando además un marco predictivo de fenómenos. Por lo tanto esta noción de la organización temporal tiene no solo-importancia teórica, sino también práctica.

1.1 Propiedades de los ritmos biológicos

Sin importar que tan simple o complejo sea el organismo en el que se presenten y que función afecten, los ritmos circádicos tienen siempre las mismas propiedades generales que se pueden resumir así: en primer lugar son endógenos. En la materia viva existe un mecanismo, que independientemente 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 le dio 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, persisten en ellos una actividad periódica, poniéndose de manifiesto la "frecuencia natural de oscilación del sistema" (Aschoff, 1967) con el cual se

hace evidente un desfaseamiento en relación al nictámero externo.

Otra característica de los sistemas circádicos es la referida 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 de la velocidad del ritmo depende de la fase que este tenga cuando reciban diferentes cantidades de luz.

Existe un tercer parámetro importante para estudiar los ritmos biológicos: el nivel de actividad que tiene la oscilación. La pendiente entre el punto de inicio y fin de la oscilación puede dar una idea de cual es este valor. En la mayoría de los organismos estudiados, el nivel de actividad, el valor del periodo y la relación α/σ o relación actividad/reposo (a/r) están estrechamente ligados y el cambio en uno de ellos repercute sobre los otros dos. Cuando los organismos diurnos reciben más luz, aumenta la frecuencia, la relación a/r y el nivel de actividad, en tanto que los nocturnos reducen los tres parámetros citados en la situación experimental. La generalización de estos hechos se conoce con el nombre de "regla circádica de Aschoff" (Aschoff, 1960). Otra cualidad de estos ritmos es

que su frecuencia es "independiente de la temperatura ambiental", expresión propuesta por Bünning (1967) y que se refiere al hecho de que los sistemas circádicos no modifican el valor de su periodo ante cambios bruscos de temperatura ambiental. Se sabe que Q_{10} es igual a 1.0 esto es, el cociente que resulta de dividir el valor de la frecuencia de oscilación ($1/\Delta$) a una temperatura dada, sobre el obtenido de otra diez veces menor es igual a la unidad. Tal vez el acocil *Prosennerus bouvieri* posee 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-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). Aunque el mecanismo involucrado no este claro, parece evidente que la temperatura no afecta en forma importante el periodo circádico, siempre y cuando el cambio térmico se aplique en la forma estable del ritmo y los intervalos tengan una duración tal que no pueda ser interpretada como señales periódicas (Pittendrigh y Calderola, 1973.) Otra característica que presentan los ritmos circádicos es su dependencia de la historia previa al momento del 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). 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 condición 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.

Otras características de los ritmos circádicos que pueden incluirse y que se han establecido con base a 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 estable la amplitud, la fase y la duración de su periodo ante un buen número de estímulos químicos.

Una característica también muy importante de los ritmos circádicos, 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 que manera los

sistemas biológicos pueden estar en fase con señales geofísicas de diversa índole.

1.2 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 sobre el periodo, posteriores al estímulo: a) es influido por la relación luz-oscuridad (fotoperiodo) del estímulo sincronizante; b) el periodo circádico es afectado por el periodo del estímulo. Se han propuesto que hay otros efectos posteriores al estímulo sincronizante (Aschoff, 1979; Pittendrigh y Daan, 1976c), si éste se interpone entre dos ciclos circádicos o si se aplica un estímulo único se puede provocar el cambio de fase, siendo frecuente que un adelanto en la fase dé como resultado un acortamiento del periodo, en tanto que un atraso provoca un aumento del mismo. Otros autores han propuesto otro efecto sobre el periodo posterior a la aplicación del estímulo; cuando se alteran estados de iluminación con diferentes intensidades se provoca un acortamiento de los periodos circádicos registrados después del cambio (Menaker, y col., 1978; Aschoff, 1978).

1.3 Curva de respuesta de fase (CRF)

Cuando un estímulo único se aplica sobre un ritmo circádico, puede o no provocar un cambio de fase, y si éste se produce, su magnitud y dirección dependerán del momento circádico del ciclo afectado por la perturbación así como de las características del estímulo.

Mediante una curva de respuesta de fase (CRF), se puede analizar en forma sencilla, los efectos provocados por un estímulo único sobre el sistema circádico. La CRF se clasifica a su vez en dos tipos: a) curva de respuesta de fase estable (CRFe) y, b) la curva de respuesta de fase transitoria (CRFt) y cada una proporciona una información específica y complementaria sobre la capacidad sincronizante del estímulo. La CRFe se construye al graficar los cambios de fase ($\Delta\phi$) provocados sobre el sistema circádico como función de la hora circádica (hc) en la que se aplicaron. La CRFt se construye al graficar el valor de la fase del ciclo, al día siguiente de aplicado el estímulo en función de la hc de aplicación. Una hc corre de las 0 a las 24 horas y mide un ciclo completo de la sensibilidad de un organismo. Para determinar la hc, el periodo de un ciclo se ajusta a una duración de 24 horas. La hc=0 es el punto del ciclo en el cual la actividad excede el 50% de la amplitud del ciclo; la hc=24 ocurre un ciclo completo después. Los estímulos deben aplicarse a diferentes horas circádicas, cuando el ciclo se

encuentra en su estado estable. Los efectos que esto provoca se deben evaluar cuatro ciclos después de aplicada la perturbación, ya que después de este tiempo es muy probable que el sistema haya recuperado el estado estable, que suele desaparecer después de la aplicación del estímulo. La proyección unidimensional de la CRF indica el grado de sincronización de un organismo (Enright, 1965). Si se analizan las curvas que resultan se puede apreciar la dependencia que existe entre la oscilación forzada y el estímulo así como el momento circádico en el que los cambios externos dejan de producir efectos en el sistema.

El ritmo circádico electroretinográfico (ERG) en el acocil posee la capacidad de ser sincronizado mediante señales luminosas únicas aplicadas en forma directa sobre los ojos (Fuentes-Pardo e Inclan-Rubio, 1987).

1.4 El sistema visual del 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 encuentra en unión de forma articulada a la cabeza del acocil. En su mayor parte está cubierto por una cutícula engrosada con sales de calcio, que en la porción más

anterior da lugar a 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 (en donde se localiza el órgano X), la médula interna y una buena parte del nervio óptico (Waterman, 1961) (Fig. 18). En general hay poca diferencia intergenérica en la morfología del tallo ocular dentro del grupo de los llamados acociles (Waterman y cols., 1982) por lo que los datos pertenecen a varios generos como Astacus, Pacifastus, Procambarus, sin haber distinción entre uno u otro. El nombre de ojo compuesto en los artrópodos se debe a que está formado por varias unidades denominadas omatidios cuyo número es de 2000 a 3000, y que se repite en forma regular constituyendo la unidad funcional del ojo (Nässel, 1976).

El omatidio es una estructura alargada constituida por cinco tipos celulares. La porción más superior de cada omatidio la ocupa la córnea. El conjunto de córneas da un aspecto facetado en el exterior que es característico del ojo compuesto. Cada córnea es secretada por cuatro células corneágenas translúcidas, unidas en su base a los conos cristalinos, que son estructuras cilíndricas que se extienden desde la córnea hasta la retina. El aparato dióptrico cuenta también con un cono cristalino que corre a lo largo del omatidio desde la córnea hasta los

fotorreceptores y esta 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 rabadomo separado con microvellosidades horizontales situadas distalmente al omatidio (Waterman, 1977; Hafner y Tokarski, 1978). Las otras 7 células retinulares (también llamadas R1 a R7) forman la porción proximal del rabadomo 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 tienen 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 de la luz polarizada (Waterman y Fernández, 1970). En la membrana del rabadomo se encuentra el pigmento fotosensible (Wald, 1968; Fernández y Nicker 1976). En este sitio es donde, por efecto de la luz, la rodopsina se transforma en metarrodopsina la cual presenta fluorescencia intrínseca. No hay intermediarios o bien si los hay 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 rdbdomo está constituido por expansiones tubulares retinulares (Eguchi y Waterman, 1966). Químicamente está formado por dos capas de lípidos y de proteínas, recibe al Apice 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 si modulan la sensibilidad de la luz. Estos pigmentos son: el de reflexión, situado en la membrana basal y formado por cristales de guanidina. Este pigmento en en acocil está fijo, a diferencia de 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 proximal ocupa 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 (figura 1A).

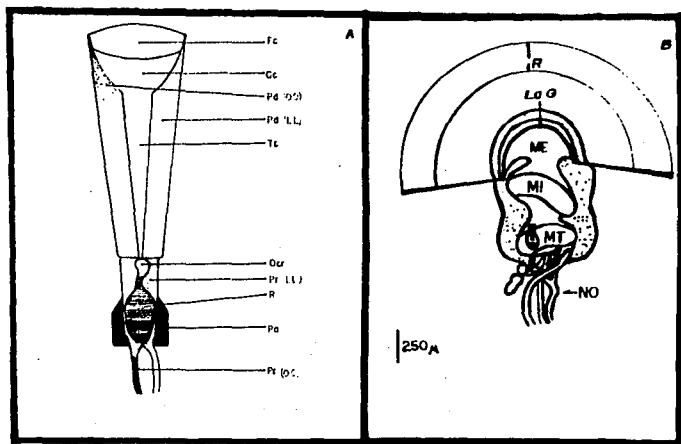


FIGURA 1A. Diagrama de un omatidio de acocil presentando la posición de los pigmentos de protección en los estados de adaptación a la oscuridad (O:O) (izquierda) y adaptación a la luz (L:L) (derecha). Fc: faceta corneal; Cc: cono cristalino; Pd: pigmento distal; Tc: tracto cristalino; Ocr: octava célula retinular; Pr: pigmento retinular; Pa: pigmento accesorio (tomada de Kong y Goldsmith, 1977).

FIGURA 1B. 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: organo X. La zona sombreada representa las regiones en las que se localizan los cuerpos celulares (tomada de Inclán-Rubio 1988).

La transmisión de 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 acocil *Procaecabarus* se han descrito 46 fibras visuales (Wiersma y Yamaguchi 1966) de las aproximadamente 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 luz; (3) fibras que detectan un movimiento rápido de aproximación; (4) 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 esta 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).

1.5 Ritmo circádico electrorretinográfico 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 electrorretinograma (ERG) y de la frecuencia de descarga de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa. El ERG en el acocil tiene dos componentes HI y HII. El HI es generado por las células retinulares en tanto que el HII depende de la duración del estímulo (Naka y Kuwabara, 1959). Los cambios en la amplitud evidenciaron una mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día. Años más tarde, Aréchiga y cols. (1974), caracterizaron las propiedades del ERG en el acocil *Procambarus clarkii* y comprobaron que los cambios de la amplitud del ERG correspondían a un ritmo circádico representativo de un animal nocturno, con un periodo cuya duración depende de la cantidad de luz recibida por el acocil. 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 se interpretó como que la actividad periódica es influida pero no depende de la integridad del sistema nervioso (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977). Los

autores sólo observaron algunas diferencias en el ritmo circádico ERG del ojo aislado con relación al ERG con animales integros; finalmente Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981), encontraron que la respuesta eléctrica ERG en el acocil *Procambarus bouvieri*, tiene características circádicas propias 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).

1.6 Sensibilidad espectral en 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. Algunos crustáceos poseen también un pigmento visual porfiropsina con el cromóforo 3-dehidroretinal. Este último pigmento absorbe luz de longitudes de onda más largas que la rodopsina. El acocil *Procambarus clarkii* posee un sistema visual a base de rodopsina-porfiropsina (Suzuki y cols. 1984) y la producción de la porfiropsina con respecto a la cantidad total varía de acuerdo con la estación del año en que se determine.

El estudio de la sensibilidad espectral en los crustáceos permite entender algunas pautas adaptativas. Una de las técnicas más empleadas para el mencionado estudio es

el ERG (Wald, 1968; Goldsmith, 1986). Al comparar las características de sensibilidad espectral en cuatro especies de crustáceos, Goldsmith y Fernández (1968), encontraron en la respuesta valores situados entre 300 y 600 nm.

Wald (1962, 1963) encontró evidencias en los ojos del Procambarus de la existencia de más de un pigmento visual. Trabajos posteriores a este han demostrado la presencia de pigmentos fotosensibles con variaciones en la absorción de la longitud de onda. (Fujimoto y cols. 1966; Wald 1967).

En los rabinos aislados del acocil se realizaron determinaciones microespectrofotométricas, y se observó una banda de absorción ancha con un pico de 525-530 nm (Fujimoto y cols., 1966; Waterman, Fernández y Goldsmith 1969) y una metarrodopsina con una longitud de onda máxima cercana a 515 nm (Goldsmith, 1972).

En el ojo del acocil Procambarus las células retinulares muestran respuestas a longitudes de onda, que varían en cuanto a espectro de absorción, con los cambios de las estaciones del año. (Nosaki 1969; Goldsmith, 1977).

La presencia de dos grupos de fotorreceptores, con diferente sensibilidad espectral también se ha sugerido en el acocil de acuerdo con los resultados obtenidos al hacer curvas de sensibilidad espectral para cuatro neuronas de

acción sostenida del nervio óptico de *Procambarus clarkii*. Después de la adaptación a la oscuridad, la longitud de onda máxima 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 longitud de onda máxima de 445 nm. Estos datos sugieren que las fibras de acción sostenida pueden llevar información compatible con la visión en color (Treviso y Larimer, 1970; Woodcock y Goldsmith, 1970). En el cuadro 1 se describen las características de sensibilidad espectral en cinco especies de crustáceos.

1.7 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

| CRUSTACEO (nombre vulgar) | SENSIBILIDAD MAXIMA (nm) | OBSERVACIONES |
|---|--------------------------------|---|
| <u>Porcellio scaber</u> (Cochinilla) | 515 (+) | Poseen sistema visual monocromático y su valor de sensibilidad espectral no se modifica por adaptación a la luz roja. |
| <u>Callinectes sapidus</u> (Jaiba común) | 505 (+) | |
| <u>Palaemonetes paludosus</u> (Gangrejo) | 550 - 555 (+) | Con adaptación a la luz roja-amarilla se descubre una respuesta al UV con una sensibilidad max. de 380 nm. Es muy probable que los pigmentos de 550-555 y de 380 nm estén localizados en diferentes células receptoras. |
| <u>Orconectes virilis</u> (Acocil) | 565 - 570 (+),(++) | Con adaptación a la luz roja intensidad de estímulo cercana al umbral del registro ERG (50 v), aparece un segundo pico de sensibilidad entre los 425 y 435 nm. (+++) |
| <u>Procambarus clarkii</u> (Acocil) | 570 -600 (++++) | Con adaptación a la luz roja se encuentra un pico de sensibilidad en 435-440nm.y con adaptación a la luz azul la sensibilidad máxima es 575 nm. |
| <p>(+).- Goldsmith y Fernández, 1968. (++).-Kennedy y Bruno, 1961; Kong y Goldsmith 1977. (+++).- Wald, 1968. (++++).- Fujimoto y cols. 1966</p> | | |

CUADRO 1. Características de sensibilidad espectral en algunos crustáceos. Los datos reportados de estas investigaciones fueron obtenidos por técnicas de registros electrofisiológicos.

Chandrashekaran (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* ~~sporis~~ y encontraron que estos cambios dependen de la longitud de onda utilizada, responsabilizando a la luz verde (520 nm) 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 la retina 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 motora. Encontraron que el mecanismo de sincronización de este último 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 solo un flujo de 5 fotones por ojo, es suficiente para sincronizar esta actividad. Sin embargo 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 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 silvestre y observaron su relación con los cambios en la intensidad y en la composición espectral del régimen luminoso empleado.

En estudios recientes realizados en el acócil Procambarus bouvieri se observó que al aplicar luz monocromática en forma continua sobre el ritmo circádico ERG de esta especie, se provocaban cambios en la velocidad angular del ritmo circádico dependiendo del contenido espectral utilizado. (Herrera-León e Inclán-Rubio, 1988). También se postuló que la luz monocromática puede actuar como señal sincronizadora del ritmo circádico ERG del acócil debido a que al aplicar pulsos únicos de luz monocromática a nivel fotópico (500 lux durante 50 min.), se obtienen curvas de respuesta de fase que dependen de la longitud de onda que se utilice. En este caso, la luz verde (565 nm) y la luz azul (465 nm) provocaron adelantos, en tanto que la luz roja, provocó atrasos. Con base en los resultados anteriores se sugirió la existencia de cuando menos dos clases de fotorreceptores funcionales capaces de ser sincronizados por luz monocromática (Inclán-Rubio 1988).

2.0 FUNDAMENTO DE LA HIPOTESIS

La organización temporal de muchas variables biológicas en los organismos esta determinada por los ritmos circádicos. La sincronización establece la posibilidad de que un ritmo modifique su frecuencia natural de oscilación cuando recibe un estímulo externo potencialmente efectivo. La capacidad de un estímulo sincronizante depende tanto de las propiedades del estímulo como de la capacidad de respuesta del sistema circádico ante la señal. Una característica de los sistemas circádicos se refiere a la estrecha relación que guardan con la intensidad de luz que reciben. En los fotorreceptores del ojo compuesto del acocil se ha identificado un ritmo circádico en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG). Este ritmo circádico es susceptible de adelantar o atrasar su fase mediante la aplicación de estímulos únicos de luz blanca, así como de ser sincronizado por la aplicación de estímulos fotoperiódicos. Por otra parte, en este mismo sistema visual, se han identificado dos funciones de sensibilidad espectral: una para el color verde (570 nm) detectada en condiciones de adaptación a la oscuridad y otra para el color violeta (440 nm) que sólo es evidente bajo adaptación a la luz roja. Se sabe además, que el sistema visual en el acocil (rodopsina-porfiropsina) permite absorciones espectrales de longitudes de onda mayores a 600 nm. Trabajos

previos han demostrado la posibilidad que tiene la luz monocromática de provocar cambios de fase sobre el ritmo circádico ERG cuando se aplica en diferentes momentos del ciclo. Las características del ritmo dependen de la longitud de onda utilizada.

2.1 H.I.P.O.T.E.S.I.S.

Si el sistema circádico electrorretinográfico es capaz de ser alterado por estímulos de luz roja, la aplicación de estímulos únicos de 632 nm de baja intensidad, provocará cambios de fase, alteraciones en la relación a/r, modificaciones en la amplitud y cambios de periodo, que dependerán del momento de aplicación del estímulo.

Si la aplicación de luz roja está involucrando al pigmento porfirina, las modificaciones que se produzcan sobre las características del ritmo dependerán de la intensidad y de la duración del estímulo.

2.2 O B J E T I V O S

Para someter a prueba las hipótesis propuestas, el trabajo experimental contempló los siguientes objetivos:

1) Conocer los efectos que provoque la aplicación de luz roja (632 nm) de baja intensidad sobre las características de la oscilación circádica electroretinográfica en el acocil.

2) Evaluar mediante la construcción de la curva de respuesta de fase estable, la magnitud y dirección de los cambios de fase provocados por la aplicación de luz roja de baja intensidad.

3) Evaluar mediante la curva de respuesta de fase transitoria si la instalación del área de los atrasos antecede a la de los adelantos, o viceversa.

3.0 MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 80 acociles de la especie *Procambarus bouvieri* adultos, de ambos sexos con un peso aproximado de 18 a 26 g y un tamaño de 7 ± 2 cm (n.s. 0.025) (figura 2). Estos invertebrados fueron traídos de arroyos de Zamora Michoacán, donde se encuentran en condiciones de vida libre. Antes de los experimentos, los acociles se mantuvieron en tinas con agua sometida a aereación, alimentándolos dos veces por semana con zanahorias y un componente proteínico (lombrices o hígado de pollo) recibiendo un régimen de 12 horas de luz (de las 6:30 a las 18:30) y 12 horas de oscuridad (de las 18:30 a las 6:30).

Durante la fase experimental, se trabajó cada animal en forma individual colocándolo dentro de un sistema regulador de temperatura que la mantuvo en 19 ± 1 °C (n.s. 0.025) y en oscuridad constante. Los acociles se mantuvieron inmóviles al nivel del cefalotórax, sumergidos parcialmente en agua, mantenida en condiciones de aereación durante todo el tiempo que duró el experimento.

A cada acocil, bajo las condiciones antes descritas, se le implantó un electrodo de acero de 1 a 5 micras de diámetro a través de la córnea (figura 3). El electrodo captó la respuesta de los fotorreceptores retinianos a los

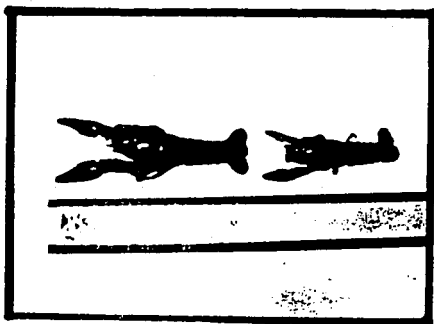


FIGURA 2. Esta fotografía muestra el tamaño de un acocil *Procambarus bouvieri* (ORTMAN). El tamaño promedio de la especie adulta utilizada es de 7 ± 2 cm (n.s. 0.025).



FIGURA 3. En esta fotografía se ilustra la forma en que se colocó el electrodo sobre el ojo del acocil.

destellos de luz blanca enviados cada 30 minutos por un fotoestimulador (Grass PS 22) con una intensidad de 400 lux y 20 microsegundos de duración el cual estaba conectado a un quimógrafo. La actividad eléctrica captada en estas condiciones fue transmitida a un preamplificador 7171 y de ahí a un amplificador 7070 de un fisiógrafo Narco 4B para obtener un registro gráfico durante todo el tiempo que duró el experimento (no menos de 10 días). La luz monocromática se aplicó a través de un sistema de iluminación de luz blanca (American Optical mod. 650) provisto de un filtro Wratten (Kodak 89 B) para eliminar la radiación infrarroja (figura 4). A su vez a este sistema se le acopló un filtro de luz roja (632.8 nm). Los estímulos de luz roja fueron de 100 lux de intensidad y 15 minutos de duración aplicados al cuarto día de registro, es decir una vez que el registro del ritmo circádico ERG presenta características bien definidas. El estímulo se aplicó a las horas circádicas 1,4,7,10,11,12,14,15,16,17,19,20, 22 y 23, con el fin de explorar el ciclo a lo largo de las 24 horas. Se aplicó un pulso único de luz blanca en las mismas condiciones, con el objeto de conocer las características de la oscilación ERG y compararlas con las obtenidas con la luz roja. El intervalo entre el apagado y el encendido del estímulo se controló utilizando un marcador de tiempo automático (Intermatic, mod. T101). La intensidad luminosa se calibró con una aparato Li-cor, Inc. (mod. LI-185B,O/R/F).

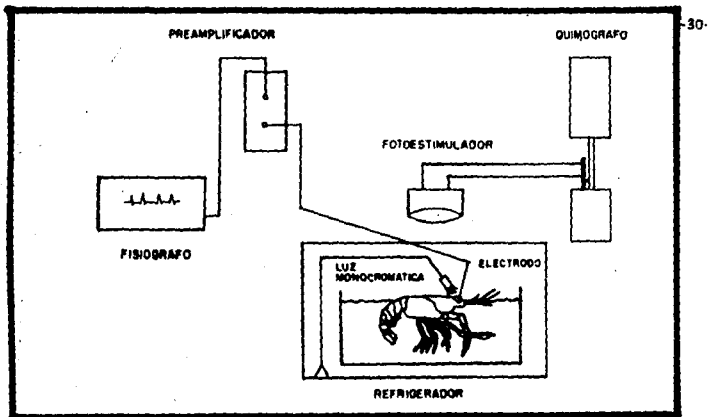


FIGURA 4. Esquema del dispositivo utilizado en nuestros experimentos. El electrodo capta la respuesta de los fotorreceptores retinianos a destellos de luz blanca enviados cada 30 minutos por el fotoestimulador. La actividad eléctrica captada en estas condiciones se registra gráficamente en un fisiógrafo. La aplicación de luz roja se hizo mediante un iluminador con acoplamiento de filtros.

Los resultados de estos experimentos se analizaron midiendo cada 30 minutos, el valor total del componente HI del ERG, de acuerdo con lo propuesto por Naka y Kuwabara (1959). Los valores obtenidos se graficaron en función del tiempo. Estas gráficas mostraron cambios en la amplitud total de la respuesta lo cual permitió establecer el valor de: 1) el periodo (medido de valle a valle en cada oscilación); 2) la relación actividad/reposo (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 y considerando el punto en que cambia el sentido de la oscilación dentro de un mismo ciclo); 3) el nivel de oscilación (medido como la pendiente de una recta trazada 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 amplitud de la oscilación ERG entre su valor más bajo). En cada caso se hicieron las pruebas estadísticas necesarias para conocer la significancia de los resultados, antes y después de aplicado el estímulo.

La segunda parte del análisis de resultados consistió en medir los cambios de fase (adelantos $\Delta\phi^+$ o atrasos $\Delta\phi^-$) cuatro días después de aplicado el estímulo. Con estos valores se construyó la curva de respuesta de fase estable CRFe (que relaciona el cambio de fase provocado por el

estimulo en función de la hc de aplicado el pulso) y la curva de respuesta de fase transitoria CRFt (que se construye graficando el valor de la fase del ciclo, al día siguiente de aplicado el estímulo en función de la hc de aplicación). Una vez construida la la CRFe se calculó el área bajo la curva de los atrasos y de los adelantos, para expresar con la relación atrasos/adelantos el tipo de cambio predominante.

4.0 RESULTADOS.

4.1 Tiempo de duración del estímulo

La duración del estímulo sincronizante fue la mínima necesaria para provocar un cambio de fase (adelanto o atraso), sobre la oscilación circádica electroretinográfica. En la figura 5 se presenta una gráfica del cambio de fase ($\Delta\phi$) como función de la duración del estímulo con 100 lux de intensidad y aplicado en la hc 6. En experimentos previos, se encontró que es en este momento del ciclo, cuando se producen los cambios de fase de mayor magnitud, aunque se utilizaron parámetros de estimulación diferentes (500 lux (lx) y 50 min.). (Inclán-Rubio 1988). Como se puede observar en la gráfica, la duración mínima que debe tener el estímulo para provocar una respuesta es de 15 minutos.

4.2 Influencia de la luz blanca sobre el ritmo circádico ERG

En la figura 6 se presenta un registro del ritmo circádico ERG obtenido en condiciones constantes de oscuridad y temperatura. La fase de ascenso y descenso de la amplitud total de la respuesta ponen de manifiesto un ritmo circádico característico de un animal nocturno, presentando

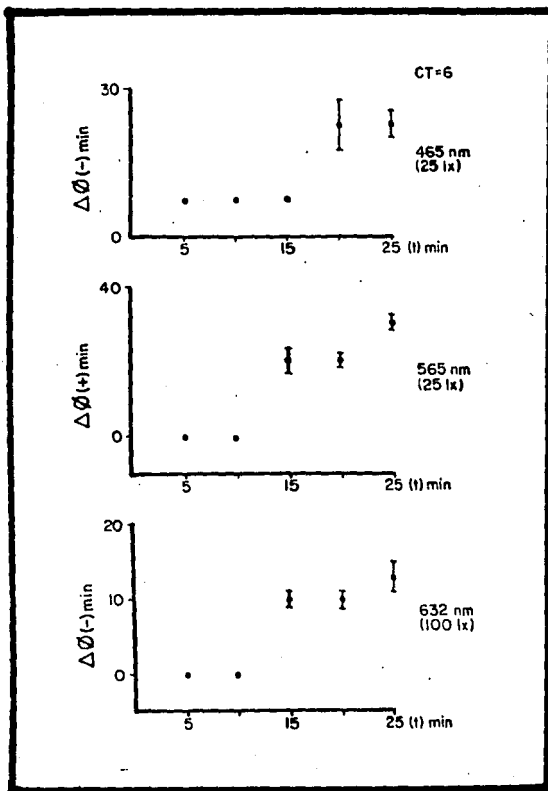


FIGURA 5 Gráfica que muestra el cambio de fase como función de la duración y la intensidad del estímulo, aplicado a la hc 6 del ritmo circádico ERG, utilizando tres diferentes longitudes de onda. La duración mínima que debe tener un estímulo de luz roja para provocar un atraso de fase es de 15 minutos a 100 lux (lx).

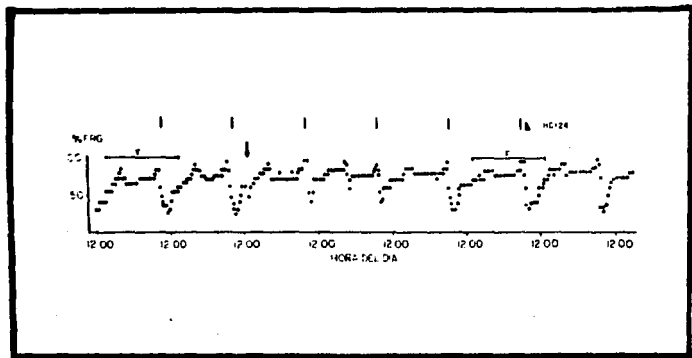


FIGURA 6 Registro que muestra un ritmo circádico ERG obtenido en condiciones constantes de oscuridad y temperatura. La fase de ascenso y descenso ponen de manifiesto un ritmo circádico característico de un animal nocturno con un periodo de 24 horas y una relación a/r de 2.92. La flecha (↓) marca el momento de aplicación del estímulo (hc 24) de luz blanca (500 lx, 50 min.) lo que provoca un (Δ) de 2 h. (atraso). Las barras (|) marcan la fase esperada y el triángulo (▲) la fase obtenida.

un periodo de 24 h, un valor de relación a/r de 2.92, una amplitud relativa de 3.69 y un nivel de oscilación estable. Todos estos parámetros se obtuvieron antes de aplicado un estímulo único de luz blanca a la hc 24, provocando un ($\Delta \phi$ -) de 2 h. El valor del periodo no se modificó, pero el valor de la relación a/r disminuyó a 2.61 y el de la amplitud relativa cambio a 3.0; no se presentaron cambios en el nivel de oscilación.

4.3 Propiedades de la luz roja

Los estímulos aplicados con luz roja provocaron cambios en la frecuencia natural de oscilación del ritmo circádico ERG. En el cuadro 2 se muestran el valor de los cambios provocados por la aplicación de luz roja sobre el periodo, la relación a/r, el nivel de oscilación y la amplitud relativa a las diferentes hc en que se aplicaron los estímulos.

4.4 Efecto de la luz roja sobre el periodo

Para esta especie de acociles estudiados se encontró un periodo promedio de 24.7 h ($s=0.95$). El periodo fue medido en la fase estable del ritmo tanto antes como después de aplicado el estímulo y de esta manera se obtuvo el valor del

| HORA CIRCADICA | CAMBIO EN EL PERIODO (hrs.) | CAMBIO EN LA RELACION a/r (hrs.) | CAMBIO EN LA AMPLITUD RELATIVA | NIVEL DE OSCILACION (m) |
|----------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 1 | + 2.5 | + 0.20 | + 10.9 | - |
| 4 | - 1.0 | + 0.37 | - 0.8 | - 0.05 |
| 7 | + 0.5 | + 0.60 | + 0.3 | - 0.03 |
| 10 | + 0.5 | + 0.44 | - 0.2 | - 0.03 |
| 11 | + 0.5 | + 0.30 | 0 | - |
| 12 | + 0.5 | + 0.22 | + 0.2 | - |
| 14 | - 1.0 | - 0.28 | - 1.7 | - 0.11 |
| 15 | + 0.5 | + 0.20 | + 1.9 | - 0.05 |
| 16 | 0 | + 0.60 | + 0.4 | 0.13 |
| 17 | - 1.0 | - 0.60 | - 3.4 | - 0.05 |
| 19 | - 1.0 | + 0.30 | + 0.6 | 0.06 |
| 20 | + 2.0 | + 0.20 | - 0.9 | - 0.07 |
| 22 | + 1.0 | - 0.20 | + 1.1 | 0.08 |
| 23 | + 2.5 | - 0.21 | + 3.5 | - 0.04 |

CUADRO 2. Resumen de los efectos provocados por la luz roja, sobre el ritmo circádico ERG. Los cambios son medidos al cuarto día de aplicado el estímulo. (m= pendiente).

cambio en el periodo (ΔT). La gráfica de la figura 7 muestra un registro representativo de un cambio en el periodo (alargamiento) cuando se estimula el ritmo circádico ERG con luz roja a la hc 23. También se presentaron alargamientos en el periodo cuando la luz roja se aplicó a las hc: 1,7,10,11,12,15 20 y 23, encontrándose que el alargamiento más importante se produjo cuando el estímulo se aplicó a la 1 y 23 hc. (2.5 h); por otra parte, la disminución en el periodo se observó al aplicar el estímulo en la hc 4, 14, 17 y 19 presentándose en todos estos casos una disminución de 1.0 hora. Sólo cuando el pulso fue aplicado a las 16 hc no se observó cambio en el valor del periodo.

4.5 Efecto de la luz roja sobre la relación actividad-reposo

Un ejemplo del efecto que provocó la luz roja sobre la relación a/r se ilustra en la figura 8. Esta propiedad resulto ser modificada a cualquier hc en que se aplicó el estímulo. Un aumento en la duración de la actividad con relación al reposo (aumento en la relación a/r) fue aparente tanto en el día como en la noche subjetiva. (hc 1,4,7,10,11,12,15, 16,19,20). La disminución en la relación a/r, es decir un aumento en la duración de la fase de reposo con relación a la de actividad, se presentó cuando los estímulos fueron aplicados durante algunos momentos de

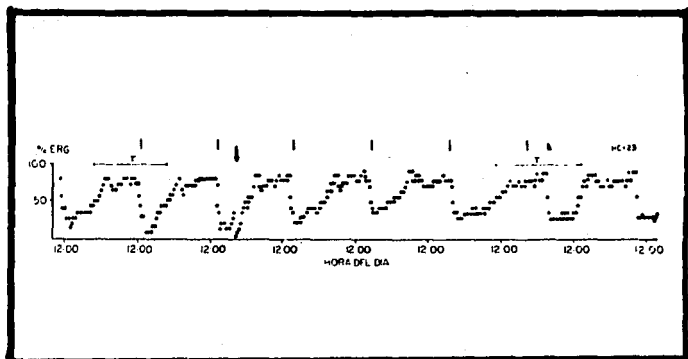


FIGURA 7. En esta gráfica se muestra el efecto que provoca la aplicación de un estímulo único de luz roja sobre el periodo (τ) y la fase del ritmo. La flecha (\downarrow) indica el momento de aplicación del estímulo a la hc 23, lo que provocó un aumento en el periodo de 24 a 26.5 h y un ($\Delta\phi$) de 7.0 h. (|): fase esperada; (▲): fase obtenida.

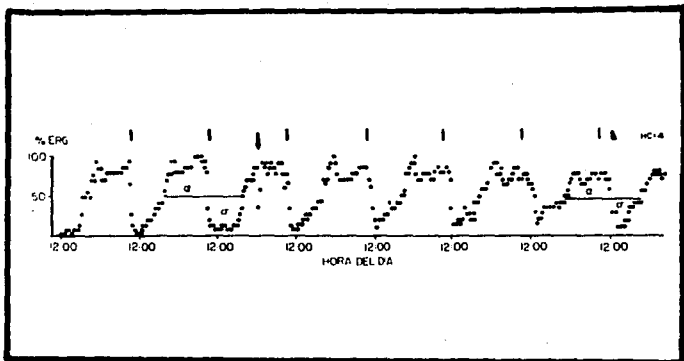


FIGURA B. En esta gráfica se ilustra el efecto que provoca la aplicación de un estímulo único de luz roja (☿) en la relación a/r (α/σ) y la fase del ritmo ERG. El estímulo fué aplicado a la hc 4 provocando un aumento en la relación a/r de 1.55 a 1.80 a expensas de un aumento en la fase de actividad y un ($\Delta\phi$) de 3 horas.

la noche subjetiva (14, 17 y 23 hc). Estos resultados se encuentran resumidos en el cuadro 2.

4.6. Efecto de la luz roja sobre el nivel de oscilación

El nivel de oscilación es otra propiedad del ritmo que se modificó por la aplicación de estímulos breves de luz roja. Los aumentos en el nivel de oscilación se presentaron cuando el estímulo se aplicó en algunas horas de la noche subjetiva (hc 15,16,19 y 22) en tanto que la disminución ocurrió cuando el estímulo se aplicó en todas las hc exploradas en el día subjetivo y en algunas hc de la noche subjetiva (hc 1,4,7,10,11,14,17,20 y 23). En la hc 12 el estímulo no provocó ningún cambio en este parámetro. En la figura 9 se muestra un registro representativo de las modificaciones en el nivel de oscilación provocado después de aplicar un estímulo de luz roja en la hc-14.

4.7. Efecto de la luz roja sobre la amplitud relativa

En la figura 10 se muestra un registro con un gran cambio en la amplitud relativa del ritmo circádico ERG cuando la luz roja se aplica a la hc 1. Los aumentos en la amplitud relativa se observaron con estímulos aplicados a la hc 1,7,12,15,16,19,22 y 23, siendo el cambio más

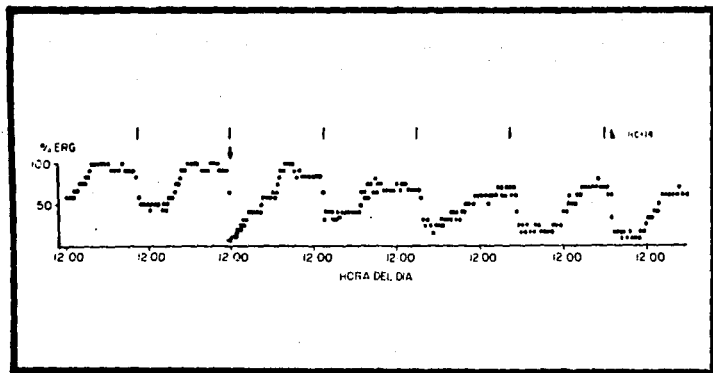


FIGURA 9. En esta gráfica se muestra una disminución (-0.113) en el nivel de oscilación del ritmo circádico ERG provocado por la aplicación de un estímulo único de luz roja (\downarrow) a las 14 hc, encontrándose un ($\Delta\phi$) de 2 horas. (\uparrow): fase esperada, (\blacktriangle): fase obtenida.

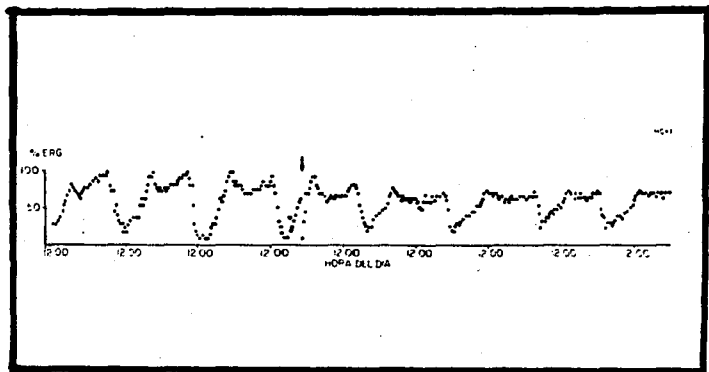


FIGURA 10. En esta gráfica se ilustra claramente una disminución en la amplitud relativa (10.9) del ritmo circádico ERG provocado por la aplicación de un estímulo único de luz roja a la hc 1.

representativo el observado a la hc 1 (10.9). En relación con la disminución de la amplitud relativa, esta se presentó al aplicar la luz roja a las 4,10,14,17 y 20 hc. Los cambios observados en este parámetro fueron discretos (cuadro 2). A la hc 11 no se presentó ninguna modificación.

4.8 Curva de respuesta de fase (CRF)

En la figura 11 se observa las características de la CRFe para pulsos de luz roja de baja intensidad. Como puede notarse esta curva presenta un comportamiento bimodal. Todos los estímulos de luz roja fueron capaces de provocar un cambio de fase cuya magnitud y sentido dependió del momento en el que fueron aplicados. Los atrasos (At) se presentaron de las 0 a las 15.5 y de las 20 a las 24 hc. esto es, durante todo el día subjetivo y la segunda mitad de la noche subjetiva. Los adelantos (Ad) se manifestaron cuando la luz roja se aplicó de las 15.5 a las 19 hc. La zona de transición de fase (zona de la CRFe con una pendiente igual o cercana a 1) se ubicó entre las 19 y 20 hc. Basándonos en estos resultados se calcularon los valores del área bajo la curva de los At (86.47%) y de los Ad (13.53%) con una relación At/Ad de 6.39, es decir, un marcado predominio para el área de los atrasos.

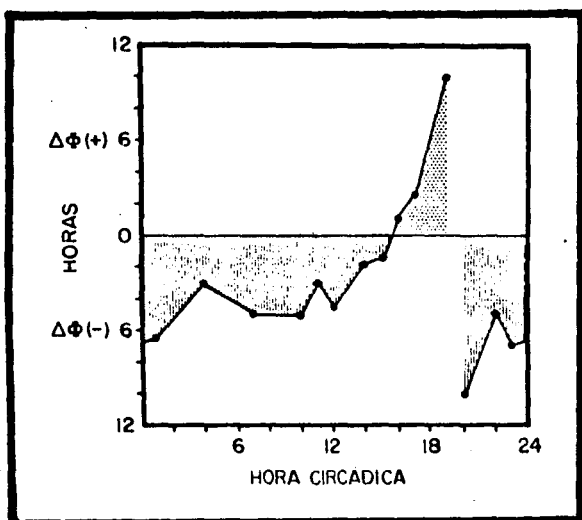


FIGURA 11. En esta gráfica se muestra la curva de respuesta de fase estable (CRFe) obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase provocados sobre el ritmo circádico ERG al aplicar estímulos únicos de luz roja en diferentes hc. La gráfica muestra un comportamiento bimodal con un marcado predominio del área de los atrasos (Relación At/Ad= 6.39).

En el cuadro 3 se enlistan los cambios de fase obtenidos tanto en el ciclo transitorio como en el estable del ritmo circádico en función de la hc en que fué aplicado el estímulo. La figura 7 muestra un ejemplo de como se mide el cambio de fase en la fase estable.

Cabe hacer notar también que los resultados muestran que siempre que el estímulo provocó un aumento en el periodo también se provocó un cambio de fase negativo o atraso (cuadro 4).

Por otra parte en la figura 12 se presentan las características de la CRFt obtenida al graficar el cambio de la fase original (la que tiene el ritmo ERG antes de aplicado el estímulo) como función de la fase nueva (la que presenta el ritmo ERG un ciclo después de aplicado el estímulo). En esta gráfica se observa un comportamiento bimodal, donde a las 14,15 y 16 hc no se produjo cambio de fase transitorio y que en la hc 10,11 y 12 los cambios de fase transitorios fueron positivos, lo que nos muestra que los atrasos se instalan antes que los adelantos de fase, cuando los estímulos se aplican en estas hc .

| HORA CIRCADICA | CAMBIO DE FASE ESTABLE ($\Delta\phi$)(hrs.) | CAMBIO DE FASE TRANSITORIO ($\Delta\phi$)(hrs.) |
|-------------------|---|---|
| 1 | - 6.5 | - 1.0 |
| 4 | - 3.0 | - 0.5 |
| 7 | - 5.0 | - 1.5 |
| 10 | - 5.0 | - 0.5 |
| 11 | - 3.0 | + 0.8 |
| 12 | - 4.5 | + 3.2 |
| 14 | - 2.0 | 0 |
| 15 | - 1.5 | 0 |
| 16 | + 1.0 | 0 |
| 17 | + 2.5 | + 2.0 |
| 19 | +10.0 | - 2.0 |
| 20 | -10.0 | - 1.0 |
| 22 | - 5.0 | + 1.0 |
| 23 | - 7.0 | - 0.5 |

CUADRO 3. Magnitud de los cambios de fase en el estado estable y transitorio del ritmo ERG provocados por la luz roja.

| HORA CIRCADICA | CAMBIO EN EL PERIODO (hrs.) | CAMBIO DE FASE ESTABLE (Δφ) (hrs.) |
|-------------------|-----------------------------------|--|
| 1 | + 2.5 | - 6.5 |
| 7 | + 0.5 | - 5.0 |
| 10 | + 0.5 | - 5.0 |
| 11 | + 0.5 | - 3.0 |
| 12 | + 0.5 | - 4.5 |
| 15 | + 0.5 | - 1.5 |
| 20 | + 2.0 | -10.0 |
| 22 | + 1.0 | - 5.0 |
| 23 | + 2.5 | - 7.0 |
| 4 | - 0.5 | - 3.0 |
| 14 | - 1.0 | - 2.0 |
| 17 | - 1.0 | + 2.5 |
| 19 | - 1.0 | +10.0 |
| 16 | 0 | + 1.0 |

CUADRO 4. Relación entre los cambios en el periodo y la fase provocados por la luz roja a diferentes hc.

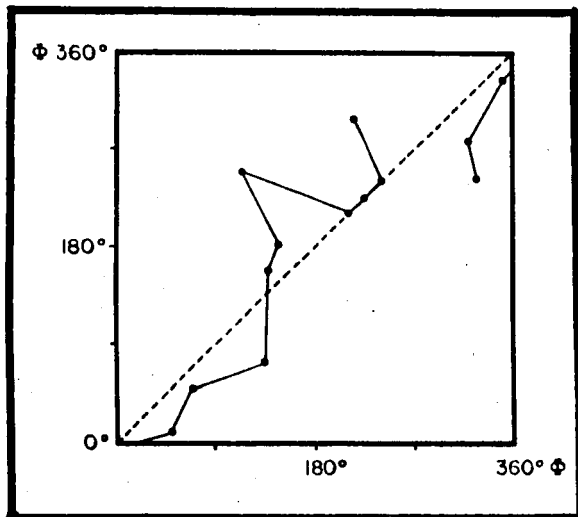


FIGURA 12. En esta figura se ilustra la curva de respuesta de fase transitoria (CRFT) obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase un día después de aplicado el estímulo. En esta gráfica también se observa un comportamiento bimodal y una falta de efecto cuando el estímulo se aplicó a las 14, 15 y 16 hc.

3.0 DISCUSION.

Los cambios en intensidad y longitud de onda de la luz ambiental son dos parámetros importantes en la sincronización de los ritmos circádicos. La imposición de los ciclos de luz artificial con diferentes duraciones en la fase luz-oscuridad y en la aplicación de pulsos luminosos únicos en diferentes momentos del ciclo, son las mejores herramientas para el análisis de las propiedades de los ritmos circádicos.

En 1985 Joshi y Chandrashekarán investigaron el efecto que se provoca por los estímulos de luz monocromática cuando se aplican sobre el ritmo circádico de vuelo del murciélago *Hipposideros speoris* variando la intensidad y duración. Ellos encontraron cambios de fase que variaban tanto en sentido como en magnitud y estos cambios dependían tanto de la longitud de onda (430, 480, 530, 580 y 630 nm) como de la duración del pulso (15 min. y 2.77 h). Estos autores observaron que el sentido de los cambios de fase no depende de la hc de aplicación del pulso ya que a las 2,4,12 y 18 hc los estímulos de 430 y 480 nm provocan atrasos ($\Delta\phi^-$) en tanto que para 530 y 580 nm se observan adelantos de fase ($\Delta\phi^+$). Los estímulos de 630 nm no provocaron ninguna modificación.

En el año de 1988, Inclán-Rubio realizó diversas pruebas con el objeto de determinar la intensidad y la duración mínima necesarias para provocar un cambio de fase sobre el ritmo circádico ERG aplicando luz monocromática con diferentes longitudes de onda. La luz verde (565 nm) requirió 25 lx de intensidad durante 15 minutos para provocar un cambio de fase (adelanto) en tanto que la luz roja (632 nm) debió aplicarse 15 minutos pero a una intensidad mayor (100 lx) para que el ritmo tuviera un cambio de fase (atraso). La luz azul (465 nm) requirió de una mayor duración (20 min.)(Fig.5). Con estos datos se pudo establecer una curva cambio de fase-duración del estímulo. para cada longitud de onda probada y en nuestro caso poder trabajar con estímulos umbrales.

Existe un grupo de artrópodos, los insectos, en donde el espectro de sensibilidad visual esta muy bien caracterizado: varios insectos poseen las características morfológicas para actuar como un sistema visual dicromático, como se infieren en los registros electrorretinográficos de células retinulares que muestran la presencia de pigmentos con diferente sensibilidad espectral, un ejemplo está descrito en la libélula (Horridge, 1969) que muestra dos tipos de receptores: uno sensible a longitudes de onda corta, y otro, a largas. Estos dos receptores configuran para la libélula un espacio cromático bidimensional (Mazokhin-Porshyakov, 1969).

En 1971 Eguchi sugirió una correlación entre la actividad cromática de las células retinulares de la libélula y su morfología característica. La existencia de sistemas bicromáticos se ha descrito también en moscas (Mazokhin-Porshnyakov; 1960 a y b, Goldsmith 1965): cucarachas (Mote y Goldsmith, 1970); langosta (Bennett y cols., 1967); mosca de la carne (Langer y Thonell, 1966) y camarón (Bruckmorser, 1968). La forma más completa de visión es la tricromática exhibida por los primates. Aquí el espacio cromático resulta de la combinación de tres componentes que le imparten tres dimensiones proporcionando mayores posibilidades de diferenciación. Las abejas (mielíferas y el abejorro) son los únicos insectos en los que se ha descrito la visión tricromática. La confirmación inequívoca de este hecho se tuvo en 1964 cuando se realizó el registro eléctrico del potencial de receptor de células individuales (Autrum y Von Zwehl, 1964) encontrando tres clases de receptores con sensibilidad máxima al verde, azul y ultravioleta.

En los crustáceos decápodos se tenía la idea de la existencia de un sistema visual dicromático evaluando las funciones de sensibilidad espectral a través de la respuesta ERG (Wald 1968; Goldsmith y Fernández 1968). Los resultados mostraron dos picos de sensibilidad espectral: uno correspondiente al amarillo-verde (575 nm) y otro cercano al

azul (440 nm), no fue sino hasta 1984 cuando Suzuki y cols. demostraron que el ojo compuesto del acocil Procaecbarus clarkii poseía porfiropsina, pigmento visual capaz de absorber longitudes de onda mayores a 600 nm. La porfiropsina es un pigmento visual que tiene al 11-cis-3-dehidroretinal como cromóforo y cuya concentración en el ojo varía con relación a la temperatura y a las condiciones de iluminación; el 3-dehidroretinal desaparece rápidamente cuando el ojo se expone a 25 °C en condiciones constantes de iluminación, sin embargo cuando es sometido a 10 °C retiene altas proporciones del cromóforo independientemente de los estados de iluminación (Suzuki y cols. 1985, 1988). Basándonos en estos resultados nosotros elegimos como condiciones ambientales previas al experimento un fotoperiodo 12:12 y temperaturas menores a 20 °C (13 a 19 °C). Los parámetros experimentales de oscuridad constante y temperatura de 19 ± 1 °C (n.s.=0.025) nos permitieron considerar que el 3-dehidroretinal en el ojo del acocil estaba presente.

En el año de 1988 Fanjul y cols. estudiaron la sensibilidad espectral del sistema visual del acocil durante las primeras semanas de desarrollo, observando que se presentaba mayor sensibilidad a longitudes de onda corta (ultravioleta y azul) que a las longitudes de onda largas (verde y rojo). Sin embargo cuando el acocil alcanza la edad adulta ocurre lo contrario. Estos cambios de sensibilidad

visual los atribuyen tanto a modificaciones en el sistema dióptrico como a los pigmentos retinianos accesorios. Si bien todos estos resultados apuntan hacia un sistema visual tricromático presente en el acocil, el efecto que tiene la aplicación de luz roja sobre el sistema circádico ERG ha sido poco estudiado.

En el primer grupo de experimentos realizados por nosotros para determinar si este sistema está afectado por la luz roja de baja intensidad, aplicamos estímulos únicos de 632 nm y observamos los cambios presentados en el ritmo, aunque también aplicamos estímulos de luz blanca. Cuando aplicamos estímulos únicos de luz blanca a un sistema circádico como el ERG no se observan cambios en el periodo y los cambios en el nivel de oscilación, la relación a/r y la amplitud relativa no son significativos, si estos parámetros se miden en la fase estable del ritmo (cuarto día después de aplicado el estímulo). Cuando realizamos estas maniobras pero ahora aplicando luz roja, observamos cambios en todos los parámetros del ritmo. Con relación al periodo podemos notar que éste se acortó cuando se presentó un adelantó de fase (hc 17, 19) y los atrasos de fase provocaron (con excepción de la hc 4 y 14) un alargamiento del periodo, (cuadro 4). Estos mismos efectos sobre las modificaciones en el periodo, con relación a los cambios de fase, habían sido observados anteriormente como efectos propios de la

capacidad sincronizadora del estímulo. (Aschoff 1979; Pittendrigh y Daan, 1976 a).

Con relación al nivel de oscilación, observamos que siempre que aplicamos estímulos en la noche subjetiva, las modificaciones en esta propiedad fueron tanto de aumentos como de disminuciones, sin embargo, siempre que los estímulos fueron aplicados en el día subjetivo se provocó una disminución en el nivel de oscilación.

Para el caso de la relación a/r, observamos que en la mayoría de las hc exploradas (con excepción de la 14, 22 y 23) se provocó un aumento en el valor de este parámetro, es decir, aumentó la duración de la actividad en cada ciclo. El desconocimiento de los procesos generadores del ritmo circádico impide que se expliquen los hechos anteriormente descritos, sin embargo con relación a estudios realizados en esta especie pero con otras condiciones de iluminación (Fuentes-Pardo y Ramos-Carbajal 1983; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo 1987; Inclán-Rubio 1988) observamos que los cambios en la frecuencia natural de oscilación están relacionados con el tipo de energía y el momento circádico en que son expuestos.

En vista de que una gran cantidad de mecanismos responsables de la generación y manutención de los ritmos circádicos no se conocen solo podemos limitarnos a observar

algunas características y propiedades consideradas propias del "marcapaso" responsable: 1) El periodo del ritmo en oscilación libre en condiciones de estado estable es necesariamente idéntico al del marcapaso que maneja el ritmo y; 2) La curva de respuesta de fase obtenida para perturbaciones únicas, que refleja los cambios en el estado estable del ritmo, permite observar la relación entre el ritmo "manejado" y el marcapaso.

La curva de respuesta de fase refleja el estado de los osciladores que manejan el ritmo circádico ERG (Enright, 1965). Es importante conocer de que manera se establecen relaciones apropiadas en un sistema de osciladores múltiples ya que es de este acoplamiento de lo que dependerán las características de un ritmo circádico. La existencia de sistemas de osciladores múltiples que participan en el control de los ritmos circádicos han sido propuestos en vertebrados (Takahashi y Menaker 1982; Boulos y Morin, 1985) y en invertebrados (Chandrashekarán y cols. 1973; Christensen y Lewis, 1982). En el acócil el ritmo circádico ERG ha sido bien caracterizado (Arechiga y cols. 1974) y ha quedado claro que ciertos parámetros como el periodo, la amplitud, y la fase del ritmo involucran la participación de diferentes grupos de osciladores. Se ha observado que la resección del ganglio cerebroide provoca un aumento en el periodo, en la relación a/r y en el nivel de actividad. Este efecto puede explicarse por la supresión de algún factor

periódico que se sintetiza y se libera en este ganglio (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). Cuando el ERG se registra en una preparación *in vitro* de un ojo compuesto seccionado se ven cambios en el periodo y la fase, aunque persisten las características en la amplitud ERG propias de un sistema nocturno; además, la oscilación principal muestra oscilaciones infradianas (de minutos de duración) superpuestas en ella, lo que se ha interpretado como la expresión del desacoplamiento de osciladores.

Fuentes-Pardo y Ramos-carbajal (1983) obtuvieron la CRFe para estímulos de luz blanca (200 lx, 15 min.) sobre el ritmo circádico ERG en el acocil *Procambarus bouvieri*: la CRFe resultante es unimodal y presenta las siguientes generalidades:

a) El día subjetivo (0-12 hc) se caracteriza por presentar mayor sensibilidad a la luz en tanto que en la noche subjetiva (12-24 hc) la sensibilidad es menor.

b) Los atrasos de fase se presentaron cuando los estímulos de luz blanca se aplicaron al final de la noche subjetiva y en la primera mitad del día subjetivo.

c) Los adelantos de fase se originan cuando los estímulos son aplicados en la segunda mitad del día subjetivo.

d) La zona de transición de fase se localiza a las 5 hc .

e) Hay predominio de la zona de adelantos (Ad) sobre la zona de atrasos (At) (relación At/Ad = 0.635).

El análisis de nuestros registros, obtenidos durante varios días en condiciones constantes de oscuridad y temperatura, pone de manifiesto un ritmo circádico ERG con un periodo cercano a las 24 h ($\bar{x}=24.7$) hasta antes de aplicado el estímulo (fig.6) con una actividad en la respuesta ERG máxima al anochecer y cambios en algunos parámetros del ritmo (amplitud, periodo, relación a/r y nivel de oscilación) asociados con las condiciones de experimentación, tal y como se había reportado anteriormente (Aréchiga y Fuentes 1970; Page y Larimer 1975; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio 1981).

Los cambios de fase provocados en los diferentes momentos circádicos permitieron construir la CRFe (Aschoff, 1965; DeCoursey, 1960). Acerca de la CRFe obtenida por estímulos breves de luz roja de baja intensidad se puede generalizar lo siguiente:

a) Presenta un comportamiento bimodal con dos zonas de transición de fase: una comprendida entre las 15-16 hc y otra entre las 19-20 hc.

b) Todos los estímulos aplicados en el día subjetivo se caracterizan por provocar atrasos de fase.

c) Los estímulos aplicados en la noche subjetiva presentan cambios de fase en ambos sentidos. Al principio y al final se presentan los atrasos de fase y en la zona intermedia se manifiestan los adelantos de fase.

d) El área de los atrasos (At) de fase es predominante (86.47 %) y se presenta de las 0-15.5 y 20-24 hc.

e) El área de los adelantos (Ad) se presenta en una proporción menor (13.53 %) y queda comprendida de las 15.5 a las 19 hc. La relación At/Ad es de 6.39.

En 1988 Inclán-Rubio obtuvo la CRFe para el ritmo circádico ERG en el ojo compuesto del acocil para estímulos de luz roja de alta intensidad (500 lx, 50 min.). La curva resultante es de tipo bimodal con una zona de transición de fase situada a las 12 hc, otra a las 15.5 hc y con un valor en la relación At/Ad de 4.33 (fig. 13). En esta curva también observamos que todos los estímulos aplicados en el día subjetivo se caracterizan por provocar atrasos de fase. A su vez otros autores (De Coursey 1961; Pittendrigh and Daan 1976b; Nuboer y cols., 1983) han reportado que los estímulos de diferente contenido espectral aplicados sobre el ritmo circádico de actividad locomotora en ciertos mamíferos nocturnos provocan atrasos en el comienzo del próximo día.

Cuando comparamos la CRFe obtenida para estímulos de luz roja de alta intensidad con nuestros resultados observamos que estos últimos provocan en el ritmo una CRF

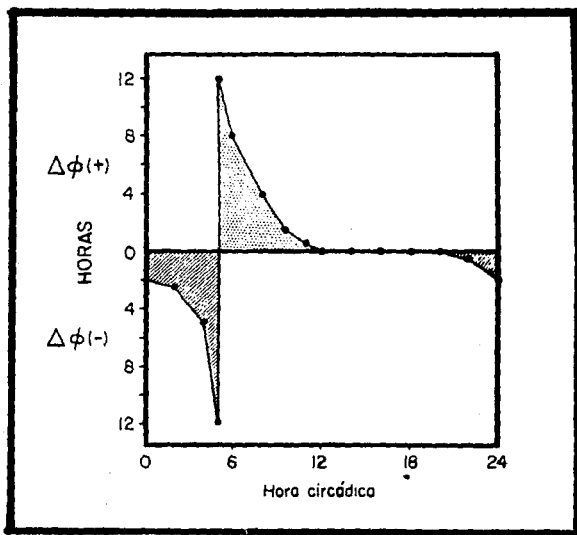


FIGURA 13. Curva de respuesta de fase estable (CRFe) obtenida al aplicar pulsos de luz roja de alta intensidad (500 lx, 50 minutos) en diferentes momentos del ritmo circádico ERG. El área de los atrasos es mayor que la de los adelantos (relación $A_t/A_d = 4.33$) estos se provocan tanto en el día como en la noche subjetiva. (tomada de Inclán-Rubio 1988).

bimodal con un predominio marcado por el área de los atrasos. Sin embargo existen ciertas discrepancias como son los momentos de transición de fase (12 y 15.5 hc para alta intensidad; 15.5 y 19-20 hc para baja intensidad) y el valor en la relación At/Ad. De acuerdo con esta última observación, Daan y Pittendrigh (1976), proponen que a medida que el periodo es menor a 24 horas, el valor de la relación At/Ad es menor. Estos datos experimentales coinciden con los nuestros: cuando aplicamos luz roja de baja intensidad obtuvimos un periodo de 25.2 horas y un valor en la relación a/r de 6.39; cuando se aplicó luz roja de alta intensidad el periodo fue de 23.1 horas y el valor en la relación a/r de 4.33.

En muchos registros se pudo observar también que después de que se ha aplicado el estímulo sobre la oscilación circádica se presenta un estado transitorio donde la duración del periodo y la amplitud llegan a desorganizarse por completo tal y como ha sido reportado por Pittendrigh y Bruce (1957, 1965) y Enright (1976). Las características de esta etapa de desorganización dependen fundamentalmente de la hc en que se aplique el estímulo así como de la naturaleza física de éste. Se sabe, que para estímulos de luz blanca, el ritmo reasumirá sus características de acuerdo con las de la fase transitoria, esto es, un transitorio que adelante dará un cambio de fase positivo y visceversa. Nuestros resultados (fig. 12)

muestran además que cuando se grafica la fase nueva, en función de la fase vieja (CRFt) y se compara con la CRFe (fig 11) es posible observar las siguientes características:

1) Estimulos que provocan un cambio de fase transitorio muy pequeño en el primer día, pero un cambio considerable en la fase estable (hc 14,15,16).

2) Estimulos que provocaron un cambio de fase transitorio en el mismo sentido (atraso-atraso o adelanto-adelanto) que el cambio de fase estable (hc 1,4,7,19,20,22 y 23).

3) Estimulos que provocaron cambios de fase transitorios con sentido opuesto a los cambios de fase estable (hc 10,11 y 12).

La CRFt reportada por Inclán-Rubio (1988) para estímulos de luz roja de alta intensidad muestra un comportamiento discontinuo y relativamente distinto al nuestro. Estas observaciones nos sugieren que los cambios de fase transitorios dependen del momento circádico de aplicación del estímulo pero también del efecto que ejerce la intensidad de la luz utilizada para una misma longitud de onda y reflejan a su vez un comportamiento diferente de acuerdo con los diversos osciladores responsables que están involucrados en la respuesta a diferentes intensidades.

La CRFt ha sido utilizada para tratar de conocer la estructura interna de un oscilador biológico. Winfree (1970, 1973) y Pavlidis (1973) definieron matemáticamente la CRFt obtenida con estímulos intensos y débiles, y llegaron a la conclusión, que ambos tipos de estímulos representaban un sistema bimodal simple. Sin embargo Kawato (1981) examinó la posibilidad de obtener alguna información o restricción mediante un modelo de ecuaciones que describe un oscilador biológico utilizando el estado estable y transitorio de la CRF. Este autor propone con base en un análisis tanto analítico como topológico y basándose además en discontinuidades encontradas en la CRFt, que el oscilador circádico en la mosca *Drosophila* no está formado por un solo oscilador de dos variables. Para nuestro caso la CRFt obtenida no presenta discontinuidades, mientras que cuando se aplica luz roja de alta intensidad el efecto de discontinuidad en la curva es evidente.

Pittendrigh y Daan (1976c) propusieron un modelo de oscilador dual para marcapasos circádicos en roedores nocturnos basándose en los cambios de fase transitorios. Cuando en ciertas fases de actividad del ritmo, se presentan pulsos simples de luz u oscuridad, se puede provocar un cambio de fase de los dos osciladores propuestos como responsables para este ritmo, esto debido a alteraciones en su relación mutua de fase. La ocurrencia de los transitorios puede reflejar una serie de cambios de fase para uno o ambos

osciladores que gradualmente recuperan sus formas de relación de fase. Consistente con esta interpretación observamos que los cambios de fase transitorios para luz roja de alta y baja intensidad exhiben comportamientos distintos en la CRF que se manifiestan a su vez en la duración del periodo transitorio.

Pittendrigh y Daan (1976 a,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). Inclán-Rubio (1988) observó para estímulos de alta intensidad que durante el día subjetivo (6 y 12 hc) predominan las respuestas para los adelantos de fase a expensas de la utilización de luz verde y en horas de la noche subjetiva (18,20 y 24 hc) predominaban los atrasos provocados por la aplicación de luz roja de alta intensidad, postulando dos grupos funcionales de fotorreceptores: V (565 nm) que provoca los máximos adelantos de fase y R (630 nm) que provoca los máximos atrasos; proponiendo para este caso que los fotorreceptores V tiene un mayor control sobre el oscilador ATA. La coexistencia de dos sistemas con sensibilidad espectral diferente también ha sido descrita en otros ritmos circádicos. (Mote y Black 1981; Feldman y Dunlap 1983; Takahashi y cols 1984; Joshi y cols 1985; Hariyama y cols. 1986).

En la figura 14 se observa una gráfica que muestra la relación temporal aproximada que existe entre las horas circádicas del ritmo ERG y las horas externas de nuestros registros. Con esto podemos inferir que los momentos de transición de fase (CRFe) que se presentan a las 15-16 y 19-20 hc corresponden a las 9-10 y 13-14 horas externas respectivamente.

Creemos que el significado que presenta la luz roja de baja intensidad en este espacio temporal para el sistema circádico ERG en el acocíl, está influenciado por las condiciones ambientales de su habitat. En el agua hay una gran variedad de propiedades ópticas. En la superficie, el color del agua suele ser solo un reflejo del cielo, pero bajo la superficie, el agua llega a ser coloreada y el color puede variar desde un azul oscuro del agua del océano a un color rojo-café en el agua de los lagos, pantanos y riveras. El agua pura por sí sola es azul, esto se debe en parte a la absorción y en parte a la dispersión de los rayos de luz. El verde del fitoplancton puede tener una importante influencia en las aguas ricas en estos nutrientes, especialmente en el verano cuando las temperaturas son altas y los días largos. En el proceso de descomposición estos vegetales dan tonalidades amarillas. En pequeñas cantidades estas sustancias amarillas, en combinación con el azul del agua pura, imparten el color verde. En altas concentraciones y con el movimiento de la tierra por la corriente de agua se

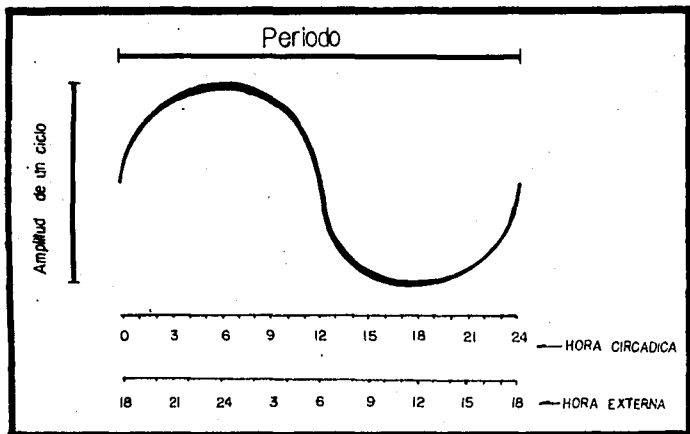


FIGURA 14. En esta gráfica se muestra la relación temporal aproximada que existe entre las horas circádicas del ritmo ERG y las horas externas de nuestros registros. Los momentos de transición de fase (fig. 12) que se presentan a las 15-16 y 19-20 hc corresponden a las 9-10 y 13-14 horas externas respectivamente.

puede llegar a transmitir a longitudes de onda largas, cercanas al infra-rojo. (Muntz 1978; Muntz y Movat 1984).

Lythgoe (1980) formuló la predicción de que los peces de mar profundo que viven en ambientes visualmente coloreados de azul intenso pueden tener un pigmento visual sensible al azul. La situación similar fue observada en peces de agua dulce excepto que su transmisión máxima ocurre a longitudes de onda mayores, entre los 530 y 650 nm. En el año de 1984 este autor establece que la mayoría de los conos sensibles al rojo que contienen porfiropsina de 620-625 nm han sido encontrados solamente en peces que viven en aguas relativamente ricas en luz roja.

Recientemente Heineremann y colaboradores (1989), en dos lagos del Canada, realizaron mediciones del patrón espectral encontrado a un metro de profundidad, con una temperatura de 18°C, encontrando un pico de transmisión máxima de luz en 620 nm a las 13 horas y otro de 660 nm tanto en el amanecer (5:30 horas) como en el anochecer (20:00 horas).

De acuerdo con nuestros resultados y lo reportado por Muntz (1978), Lythgoe (1984) y Heinerman y cols. (1989), Podemos proponer que el efecto que provoca la luz roja sobre el ritmo circádico ERG, consiste en modificar en forma importante, el funcionamiento de los osciladores responsables de él, y repercute en los mecanismos adaptativos del acicil a su medio ambiente.

C O N C L U S I O N :

I. Ciertos parámetros de los ritmos biológicos tales como el periodo, la amplitud y la fase del ritmo permiten proponer la participación de diferentes grupos de osciladores en la generación de los ritmos circádicos. El efecto que provoca los estímulos de luz roja sobre éstos parámetros del ritmo circádico ERG en el acocil pone de manifiesto que:

a) El periodo se acorta después de provocarse un adelanto de fase (esto se logra aplicando los estímulos a las hc 17 y 19) y los atrasos de fase provocan un alargamiento del mismo (hc de aplicación: 1,7,10,11,12,15,16,20,22 y 23).

b) Cuando se aplica el estímulo, en el día subjetivo, (0 a 12 hc) se provoca una disminución en el nivel de oscilación.

c) Con excepción de los estímulos aplicados a las 14,17,22 y 23 hc, la luz roja provocó un aumento en la duración de la actividad de cada ciclo.

II.-Los cambios de fase provocados por la luz roja nos permitieron elaborar la CRFe. Acerca de ésta curva se puede concluir que:

a) Presenta un comportamiento bimodal con dos zonas de transición de fase, una comprendida entre las 15 y 16 hc, y otra entre las 19 y 20 hc.

b) Todos los estímulos aplicados en el día subjetivo se caracterizan por provocar atrasos de fase.

c) Los estímulos aplicados en la noche subjetiva provocan cambios de fase en ambos sentidos.

d) El área de los atrasos (At) de fase es predominante: 86.47, y se presenta de las 0 a las 15.5 y 20 a 24 horas del ciclo..

e) El área de los adelantos (Ad) ocupa una extensión mucho menor: 13.53, y queda comprendida de las 15.5. a las 19 hc. La relación At/Ad es de 6.39.

III. Los valores de las CRFe obtenidas para luz roja de baja intensidad ($t=25.2$, relación At/Ad=6.39) comparados con los reportados con luz roja de alta intensidad ($t=23.1$, relación At/Ad=4.33) están de acuerdo con los resultados encontrados por Daan y Pittendrigh (1976): *"a medida que el periodo de un ritmo es menor, el valor de la relación At/Ad disminuye"*.

IV. Las características de la fase transitoria provocada por la aplicación de pulsos de luz roja, dependen fundamentalmente del momento circádico en que se aplique el estímulo, así como también de la intensidad de luz utilizada, lo que refleja el comportamiento de los osciladores responsables, involucrados en la respuesta.

V. Creemos que los cambios que provoca la luz roja sobre el sistema circádico ERG en el acocil, están involucradas con las condiciones ambientales de su habitat y por lo tanto guardan una estrecha relación con respuestas y conductas de naturaleza adaptativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aréchiga, H. y Fuentes, B. (1970): Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist*. 13: 137.

Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. y Barrera-Mera, B. (1973): Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latin. Am.* 24: 601.

Aréchiga, H. y Wiersma, C.A.G. (1969): Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71.

Arikawa, K., Morikawa, Y., Suzuki, T. y Eguchi, E. (1988): Intrinsic control of rhabdom size and rhodopsin content in the crab compound eye by a circadian biological clock. *Experientia*. 44: 219.

Aschoff, J. (1960): Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological clocks*. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25: 11

Aschoff, J. (1965): Response curves in circadian periodicity. In: *Circadian clocks*. North-Holland. Publish. Co. Amsterdam. pp. 95.

Aschoff, J. (1967): Adaptative cycles: their significance for defining environmental hazards. *International J. of Biometeorology*. 11: 255.

Aschoff, J. (1978): Perspectives in entrainment. *J. Comp. Neurobiol.* 18: 56.

Aschoff, J. (1979): circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift tierpsychologie*. 49: 225.

Autrum, H., y von Zwehl, V. (1962): Zur spektralen Empfindlichkeit einzelner Sehzellen der Dohrwe (Apis mellifica), Z. vergleich. Physiol., 46: 8.

Barrera-Mera, B. (1976): Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. Behav.* 17: 59.

Bennet, R.R., Tunstall, J. y Horridge, G.A. (1967): Spectral sensitivity of single retinula cells of the Locust. *Z. Vergl. Physiol.*, 55: 195.

Boulos, Z. y Morin, L.P. (1985): Entrainment of split circadian activity rhythms in hamsters. *J. Biol. Rhythms* 1: 1

Brown, F.A. (1961): Retinal pigment rhythms in Crustacea In: *The Physiology of Crustacea*. T.H. Waterman (Ed.) II. pp 401-403. New York Academic Press.

Bruckmoser, D. (1968): Die spektrale Empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Rückschwimmers. *Z. Vergl. Physiol.*, 59: 187.

Bünning, E. (1967): *The Physiological clock*. pp.75-150. En: Bünning, E. (Ed.) Springer Verlag, Berlin and New York.

Chandrashekar, M.K., Johnsson, A. y Engelmann W. (1973): Possible "dawn" and "dusk" roles of light pulses shifting the phase of circadian rhythm. *J. Comp. Physiol.* 82: 347.

Christensen, N.D. y Lewis, R.D. (1982): The circadian locomotor rhythm of *Hemideina thoracica* (Orthoptera: Stenopelmaticidae): The circadian clock as a population of interacting oscillators. *Physiol. Entomol.* 7: 1.

Cronin, T.W. y Goldsmith, T.H. (1984): Dark regeneration of rhodopsin in crayfish photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 84: 63-81.

Daan, S. y Pittendrigh, C.S. (1976): 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 Coursey, P.J. (1960): Phase control of activity in a rodent. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25:49

De Coursey P.J.(1961): Effect of light on the circadian activity rhythm of the flying squirrel, *Glaucomys volans*. Z. Vergl. Physiol. 44: 331.

Eguchi, E. (1965): Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish retinular cells J. Cell. Comp. Physiol. 66: 411.

Eguchi, E. (1971): Fine structure and spectral sensitivity on retinula cells in the dorsal sector of the compound eyes of Dragonfly Aeschna. Z. Vergl. Physiol., 71: 201.

Eguchi, E. y 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.

Enright, J.T. (1965): Entrainment of a tidal rhythm. Science 147:864

Enright, J.T. (1976): Plasticity in an Isopod's clockwork: Shaking shapes form and effects phase and frequency. J. Comp. Physiol. 107: 13.

Fanjul-Morales, M. y Fuentes-Pardo, B. (1988): Spectral sensitivity in the course of the ontogeny of the crayfish *Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. 91(A):61

Feldman, J.F. y Dunlap, J.C. (1983): *Neurospora crassa*: a unique system for studying circadian rhythms. Photochem. Photobiol. Rev. 7: 319.

Fernández, H.R. y Nicker, E.E. (1976): Ultrastructural and molecular characteristics of crayfish photoreceptor membranes. J. Cell. Biol 69: 721.

Fuentes-Pardo, B e Inclán-Rubio, V. (1981): Correlation between motor and electrorretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. 68(A): 477.

Fuentes-Pardo, B. e Inclán-Rubio, V. (1987): Caudal Photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish- I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem Physiol.* 86A (3): 523.

Fuentes-Pardo, B. e Ramos-Carbajal, J. (1983): The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A: 711.

Fujimoto, F., Yanase, T. e Ishizuka, I. (1966): The visual substance of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Mem. Osaka Gakugei Univ. B.* 15: 109.

Goldsmith, T.H. (1965): Do flies have a red receptor? *J. Gen. Physiol.* 49: 265.

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. (1966): Interpreting transretinal recordings of spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol. A.* 159: 481.

Goldsmith, T.H. y Fernández, H.R. (1968): Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. *Z. vergl. Physiol.* 60: 156.

Gordon, S.A. y Brown, G.A. (1971): Observations on spectral sensitivities for the phasing of circadian temperature rhythms in *Pergonathus penicillatus*. In Menaker, M. (Ed.) *Biochronometry*. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

Hafner, G.S. y 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.

Hariyama, T., Meyer-Rochow, V.B. y Eguchi, E. (1986): Diurnal changes in structure and function of the compound eye of *Ligia exotica* (Crustacea: Isopoda). J. Exp. Biol. 123: 1.

Heinermann, P.H. y Ali, M.A. (1989): The photic environment and scotopic visual pigments of the creek chub, *Semotilus atromaculatus* and white sucker, *Catostomus commersoni*. J. Comp. Physiol 164 (A): 707.

Herrera-León, J. e Inclán-Rubio, V. (1988): Cambios en la velocidad angular del ritmo circádico ERG provocados por la aplicación de luz monocromática en forma continua. XXXI Cong. Nal. de Ciencias Fisiológicas, Oro. Mex. c-161.

Hope, G.M. y Bhatnagar, K.P. (1979): Electrical responses of bat retina to spectral stimulations comparison of four microchiropteran species. *Experientia* 35: 1189.

Horridge, G.A. (1969): Unit studies in the retina of Dragonflies. Z. vergl. Physiol. 62: 1.

Inclán-Rubio, V. (1988): Mecanismos involucrados en la sincronización del ritmo circádico electroretinográfico del acocil (sincronización por luz monocromática). Tesis de doctorado en C. Biomédicas. 3-94.

Inclán-Rubio, V. y 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. y 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.

Jonhson, M. (1939): Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (*Peromyscus*). J. Exp. Zool. 82:315.

Jonhson, M. (1939): Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (*Peromyscus*). J. Exp. Zool. 82:315.

Kawato, M. (1981): Transient and steady state phase response curves of limit cyclic oscillator. J. Mathematical Biology. 12: 13.

Kennedy, D. y Bruno, M.S. (1961): The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. J. Gen. Physiol. 44: 1089.

Kleinholz, L. H. (1966): Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. Amer. Zool. 6: 161.

Knull, F. (1976): Zeitgebers for animals in the continuous day-light of high arctic summer. Oecologia, 24: 149.

Kong, K.L. y Goldsmith, T.H. (1977): Photosensitivity of reticular cells in white-eyed crayfish (*Procambarus clarkii*)

Langer, H. y Thorell, B. (1966): Microspectrophotometry of single rhabdomere in the insect eye. Exp. Cell. Res., 41: 673.

Lythgoe, J.N. (1980): Vision in fish: ecological adaptations. In Environmental Physiology of Fishes (Edited by Ali M.A.). Plenum Press, New York.

Lythgoe J.N. (1984): Visual pigments and environmental light. Vision Res. 24: 1539.

Mazokhin-Porshnyakov, G.A. (1960a): Colorimetric study of the properties of colour vision of insects as exemplified by the house fly. Biophysics. 5: 340.

Mazokhin-Porshnyakov, G.A. (1960b): System of colours vision of the fly, *Calliphora*. Biophysics. 5:790.

Mazokhin-Porshnyakov, G.A. (1969): Insect Vision. Plenum Press, New York. 1

Mc Guire, R. RA., Rand, W.M. y 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., Takahashi, J.S. y Eskin, A. (1978): The physiology of circadian pacemakers. *Ann. Rev. Physiol.* 40: 501.

Menzel, R. (1971): Über den Farbensinn von *Paravespula germanica* F. (Hymenoptera): ERG and selective adaptation. *Z. Vergl. Physiol.* 75: 86.

Mote, M.I. y Black, K.R. (1981): Action spectrum and threshold sensitivity of entrainment of circadian running activity in the cockroach *Periplaneta americana*. *Photochem. Photobiol.* 34: 257.

Mote, M.I. y Goldsmith, T.H. (1970): Spectral sensitivity of color receptors in the compound eye of the cockroach *Periplaneta*. *J. Exp. Zool.*, 173: 137.

Muntz, W.R.A. (1978): A penetacao de luz nas aguas de Rio Amazonicos. *Acta Amazon.* 8: 613.

Muntz, W.R.A. y Muat, G.S.V. (1984): Annual variation in the visual pigments of brown trout inhabiting lochs providing different light environments. *Vision Res.* 24: 1575.

Naka, K. y 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.

Nosaki, H. (1969): Electrophysiological study of color encoding in the compound eye of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Z. vergl. Physiol.* 64: 318.

Nuiboer, J.F.W., Nuys, W.M. van, y Steenbergen, J.C. van (1983): Colour changes in a light regimen as synchronizers of circadian activity. *J. Comp. Physiol.* 151: 359.

Nunnamacher, R. F., Camougis, G. y Mc Alear, J.H. (1962): The fine structure of the crayfish nervous system. 5th. Congress Elect. Microsc. (2), N-11.

Page, T.L. y 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. (1985): The retina and optic ganglia in decapods specially in *Astacus*. Mitl. Zool. Stat. Maepel. Bd. XII. pp. 1-73.

Pavlidis, T. (1973): Biological oscillators: their mathematical analysis. Pavlidis, T. (Ed.) pp. 159-186 New York. Academic Press.

Pittendrigh, C.S. (1960): Circadian rhythms and circadian organization of living system. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. Biol. 25: 159.

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

Pittendrigh, C.S. y Bruce, V.C. (1959): Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism 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. y Caldarola, P.C. (1973): General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2697.

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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-79-

Pittendrigh, C.S. y 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.

Reinberg, A. (1982): La Cronofarmacología. *Mundo Científico.* 2(15): 634.

Sánchez, J. y Fuentes-Pardo, B. (1977): Circadian rhythm in the amplitude of electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem and Physiol.* 56A: 601.

Shilbery, A.G. (1968): Eyestalk function in chromatophore control in a crab. *Cancer magazine. 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.

Sulzman, F.M., Fuller C.A. y Moore-Ede, M.C. (1979): Tonic effects of light on the circadian systems of the squirrel monkey. *J. Comp. Physiol.* 129:43.

Struwe, G., Halberg, E. y 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.

Suzuki, T., Arikawa, K. y Eguchi, E. (1985): The effects of light and temperature on the rodopsin-porphyrpsin visual system of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Scienc.* 2: 455.

Suzuki, T., Makino-Tasaka, M. y Eguchi, E. (1984): 3-Dehydroretinal (vitamin A2 aldehyde) in crayfish eye. *Vis. Res.* 24: 783.

Suzuki, T., Morikawa, Y., Yoshiniro, T. y Eguchi E. (1988): Retinyl and 3-dehidroretinyl esters in the crayfish retina. *Vision Res.* 28: 1061.

Takahashi, J.S., De Coursey, P., Bauman, L. y Menaker, M. (1984): Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature*. 308: 186.

Takahashi, J.S. y Menaker, M. (1982): Entrainment of the circadian system of the house sparrow: a population of oscillators in pinealectomized birds. *J. Comp. Physiol.* 146: 245.

Treviño, D.L. y 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. En Waterman T.H. (Ed.): *The physiology of crustaceans*. 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 at arthropods* (G. Hoyle, Ed).

Waterman, T.H., Fernández, H.R. y Goldsmith, T.H. (1969): Dichroism of sensitive pigment in rhabdoms of the crayfish *Procambarus*. *J. Gen. Physiol.* 54: 415.

Waterman, T.H. y Fernández, H.R. (1970): E-vector and wavelength discrimination by reticular cells of the crayfish *Procambarus*. *Z. vergl. Physiol.* 68: 154.

Waterman, T.H., Wiersma, C.G.A. y Bush, B.M.H. (1982): Afferent visual responses in the optic nerve of the crab, Podophthalmus. J. Cell. Comp. Physiol. 63: 135.

Wiersma, C.A.G. y Yamaguchi, T. (1966): The neural components of the crayfish as studied by single unit analysis. J. Comp. Neurol. 128: 333.

Wiersma, C.A.G. y Yamaguchi, T. (1967): Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. J. Exp. Biol. 47: 409.

Winfree, A.T. (1970): 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. (1973): Resetting the amplitude of Drosophila's circadian chronometer. J. Comp. Physiol. 85: 105.

Woodcock, A.E.R. y Goldsmith, T.H. (1970): Spectral response of sustaining fibers in the optic tracts of crayfish (Procambarus). Z. Verg. Physiol. 69: 117.