

88  
24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE LA APLICACION DE FOTOPERIODOS ESQUELETO  
SOBRE EL RITMO CIRCADIANO DEL ERG DE ACOCIL *Procambarus digueti*"

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE BILOGO PRESENTA:

FRANCISCO GUTIERREZ ZEPEDA

Cd. Universitaria. D. F. Junio de 1991.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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

	pág.
Introducción.....	5
Material y Metodo.....	21
Resultados.....	24
Discusion.....	33
Conclusiones.....	41
Figuras.....	42
Referencias Bibliográficas.....	52

## INTRODUCCION.

### ORGANIZACION ANATOMOFUNCIONAL DEL OJO DEL ACOCIL.

Un aspecto importante de abordar como parte del tema que desarrollaremos en esta tesis se refiere a la organizacion anatomofuncional del ojo compuesto del acocil por ser esta estructura la región de la que se obtuvo la información experimental en la que se basa este trabajo.

Los primeros estudios sobre la organización de los ojos compuestos de los invertebrados se encuentran en los trabajos de Parker, en los crustáceos (Parker, 1891; 1895 y 1897) y de Exner en los insectos (Exner, 1891). De hecho, buena cantidad de la información que hasta la fecha se maneja sobre el tema, procede de los trabajos de estos dos autores.

De acuerdo con Parker el tallo ocular del acocil presenta la forma de un corto cilindro móvil mantenido al cuerpo del animal por su porción proximal. La región distal se caracteriza por tener una superficie semiesférica dentro de la que se localiza la retina; el eje mayor del tallo, se proyecta desde el centro de la región distal hasta el centro de la región proximal. Si se hace un corte longitudinal sobre este eje puede observarse de fuera hacia dentro una gruesa capa impregnada de sales que forma la cutícula corneal; hacia la zona proximal esta capa se torna delgada y flexible, mientras que en la zona distal forma una capa transparente que cubre la retina. En la porción central hay una cutícula blanda que cubre la superficie interna de la cutícula corneal llamada hipodermis; del engrosamiento de esta zona se forma, a su vez, la retina (Figura 1).

La retina del acocil tiene la superficie dividida en facetas cada una de las cuales corresponde a una omatidia o unidad funcional del ojo compuesto. En cada omatidia se encuentran tres componentes: el dióptrico, el fototransductor y el parareceptor. El componente dióptrico está formado por dos células corneágenas secretoras del material translúcido que forma la córnea y por las células piramidales que al unirse forman el cono cristalino; las células corneágenas son el sitio de entrada de la luz; el cono

cristalino, al prolongarse mediante un filamento hasta las células fotosensibles, permite que el estímulo luminoso entre en contacto con el componente fototransductor.

En los fotorreceptores o células retinulares se lleva a cabo el proceso de la fototransducción. Son estructuras especializadas en la captación de la energía luminosa la que transforman en señales eléctricas susceptibles de ser manejadas por el sistema nervioso; hay ocho en cada omatidia y su membrana presenta prolongaciones con pliegues o microvellosidades en las que se encuentra el pigmento fotosensible o rodopsina (Wald, 1968). La fusión de las prolongaciones (llamadas rabdómeros) constituye el rabdomo; sitio en el que se lleva a cabo la transformación de la señal luminosa en señal eléctrica. Las células retinulares tienen axones que emergen desde el extremo proximal de la retinula, atraviesan la membrana basal y se proyectan hacia la lámina ganglionar donde establecen la primera sinapsis de la vía aferente.

El componente parareceptor está formado por una serie de estructuras localizadas en regiones próximas a los fotorreceptores y que desempeñan un papel fotorregulador importante. Entre estas estructuras se encuentran las células que contienen el pigmento accesorio distal y las que contienen el pigmento accesorio de reflexión. También se incluye a las propias células retinulares debido a que contienen al pigmento accesorio proximal. Hay dos células del pigmento distal en cada omatidia. Estas células tienen forma de banda con el núcleo colocado hacia la posición distal de la retina y se localizan en los espacios interomatidiales a nivel de los conos cristalinos, en la región más alejada de la membrana basal hacia afuera; su característica más importante es la de cambiar de posición hacia el polo distal de la omatidia o hacia la membrana basal, dependiendo de la ausencia o presencia de luz, respectivamente. El pigmento que contienen es, probablemente, la melanina (Kleinholz, 1961). Las células del pigmento de reflexión son células irregulares que están colocadas sobre la membrana basal en la zona más proximal de la retina. La naturaleza química del pigmento que contienen no ha sido bien establecida ya que mientras algunos proponen que es

la guanina (Waterman, 1961) otros piensan que es una mezcla de bases púricas y pirimídicas (Kleinholz, 1961). Otra posibilidad que se ha planteado (Krebs, 1972) es que este pigmento no sea un verdadero pigmento de gránulos blanquecinos sino que sean más bien vesículas llenas de material graso que al agruparse reflejarían la luz en forma comparable a como lo haría la espuma. El pigmento accesorio proximal se localiza dentro de la célula retinular en forma de gránulos oscuros capaces de migrar longitudinalmente a través del citoplasma regulando la cantidad de luz incidente sobre el rhabdomo en diferentes condiciones de iluminación (Parker, 1932; Lockwood, 1968). Sin que se pueda afirmar hasta ahora cual es la composición química de este pigmento, se ha sugerido que pueda ser la melanina (Parker, 1932; Kleinholz, 1961). La función reguladora de los tres pigmentos accesorios se expresa claramente mediante la migración que muestran los pigmentos distal y proximal hacia el centro de la célula retinular durante la iluminación, o hacia los polos de la célula durante la oscuridad. En el primer caso el pigmento de reflexión quedaría cubierto por los pigmentos proximal y distal, lo que equivale a decir que la luz incidente tendría muy poca posibilidad de ser reflejada: en estas condiciones se tiene una "pseudopupila" (Day, 1941; Stavenga, 1979) pequeña. Si los pigmentos proximal y distal migran hacia los polos de las células retinulares, la luz incidente es reflejada en buena medida por el pigmento de reflexión y se genera así una pseudopupila de mayor tamaño. Entre el ojo y el sistema nervioso hay una estrecha relación estructural y funcional, de tal manera que los axones de las células retinulares se proyectan inmediatamente a su salida de la omatidia hacia la masa de tejido nervioso que ocupa la parte central del tallo ocular de los decápodos. Esta se compone de cuatro ganglios distintos colocados de tal forma que constituyen una serie que se extiende desde la retina hasta el ganglio cerebroide. Se han designado del I al IV y en tanto que el primero (I) se conecta con la retinula por medio de los axones que proceden de las células retinulares, el (IV) envía sus fibras directamente hasta el ganglio cerebroide. Cada ganglio está formado por las fibras que llegan a la región, los somas de

neuronas cuyo aspecto de masa puntiforme hizo que Parker los designara como "punktsubstanz", capilares y tejido conjuntivo. También de acuerdo con Parker se puede distinguir dos tipos de células ganglionares: las apolares, elementos de material indiferenciado, y las monopolares que proceden de las apolares y que se encuentran ampliamente distribuidas en las capas I, II, III y en menor proporción en la capa IV.

El primer ganglio recibe el nombre de "lámina ganglionar" es relativamente delgado y en él se han descrito cuatro capas neuronales próximas a la base de la omatidia (Bullock y Horridge, 1965). En cada una de estas capas los somas ocupan una porción superficial con las ramificaciones hacia la región central donde forman un neuropilo. Las fibras que salen de este ganglio conectan con el segundo ganglio llamado "medula externa", el que es ligeramente más grueso que el anterior y en el que se encuentran somas neuronales que forman una masa puntiforme y axones que se proyectan hacia el tercer ganglio, el llamado "médula interna". Este ganglio tiene forma esférica similar a la del segundo ganglio y como él, está formado por somas periféricos y un neuropilo central. La conexión que establece con el cuarto ganglio o "médula terminal" es bastante irregular. Este último ganglio es el más grande de todos y mantiene la misma organización básica de los anteriores con un neuropilo en el centro y somas neuronales en la superficie, aun cuando no se hayan encontrado éstos en las regiones proximal y distal.

Las fibras que emergen del cuarto ganglio forman parte del nervio óptico y se proyectan directamente hasta el lóbulo óptico del ganglio supraesofágico.

Otro problema que consideramos importante tratar en la introducción se refiere a la organización básica que presentan los sistemas circadianos, particularmente en el acocil. De hecho, la parte experimental de este trabajo se basa en la aceptación de la existencia de un sistema circadiano que tiene a su cargo el que el ojo del acocil cambie periódicamente su sensibilidad a la luz durante un ciclo de 24 horas.

## PROPIEDADES GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

La capacidad de los seres vivos de mostrar cambios periódicos en sus reacciones bioquímicas, electroquímicas, fisiológicas y conductuales es un hecho que se ha podido establecer en los últimos años de investigación, en un gran número de eucariontes, llegando a reconocerse en la actualidad como una propiedad fundamental de todos los organismos que poseen este nivel de organización.

Algunos de estos cambios periódicos, entre ellos los que se aproximan a un ciclo geofísico prominente, son de especial interés. Si las oscilaciones tienen un periodo cercano al de alguna señal externa como las mareas (12.4 horas), el día y la noche (24 horas), las fases de la luna (28 días) o las estaciones del año (365 días), se habla de fenómenos "circa". Debido a que los ritmos circa persisten aun cuando los organismos sean colocados en condiciones constantes esto es, de las que se han eliminado los principales fenómenos ambientales periódicos (sincronizantes), se ha postulado que estos ritmos están bajo el control de un mecanismo cronométrico interno al organismo que se ha denominado "reloj biológico".

El mejor conocido de los relojes biológicos es, con mucho, el "circadiano" el cual debe su nombre a que los fenómenos que dependen de él tienen un periodo cercano pero no igual a 24 horas. Dada la importancia que los fenómenos circadianos tienen en la naturaleza, se han tomado como referencia con respecto a otros fenómenos periódicos llamándose infradianos a los que tienen una frecuencia menor a la de los ritmos circadianos y ultradianos a los de frecuencia mayor.

En 1960, Aschoff (1960) y Pittendrigh (1960) hicieron una caracterización exhaustiva de las propiedades de los ritmos circadianos entre las que destacan las siguientes: (1) Son de carácter endógeno, lo que equivale a decir que son inherentes al organismo y no impuestos por los cambios en los factores externos, sin descartar la posibilidad de que estos factores puedan tener algún efecto sobre ellos; (2) estrechamente ligada con esta propiedad se encuentra la capacidad que tienen los

ritmos de oscilar de manera espontánea, lo que significa que en condiciones ambientales constantes muestran una oscilación cuya periodicidad es cercana pero no igual a 24 horas; (3) las oscilaciones circadianas quedan definidas por tres parámetros principales: la frecuencia, la amplitud, la cual es equivalente al nivel de actividad, y la relación que guarda el tiempo que el organismo permanece en actividad con respecto al tiempo que permanece en reposo (relación  $\alpha/\rho$ ). Estos tres parámetros dependen de la cantidad de luz que reciba el sistema circadiano de tal manera que los organismos diurnos aumentan estos tres valores al aumentar la intensidad de la luz que reciben y los organismos nocturnos los disminuyen ante la misma situación ambiental. La generalización de estos hechos se conoce como regla circadiana de Aschoff (Pittendrigh, 1960); (4) los ritmos circadianos son susceptibles de cambiar su fase y su periodo (dentro de una cierta gama de valores) cuando reciben señales externas únicas o periódicas, respectivamente. A esta propiedad se le conoce con el nombre de sincronización y es de ella de la que depende, en buena medida, el carácter adaptativo que poseen los ritmos circadianos. Los factores ambientales generalmente aceptados como los sincronizadores más importantes de los ritmos circadianos son la luz y la temperatura; (5) otra característica de los ritmos circadianos se encuentra en la capacidad que poseen de compensar los cambios de temperatura. Se ha encontrado que el valor del  $Q_{10}$  del periodo circadiano cuando el sistema ha sido colocado en diferentes temperaturas es muy cercano a 1; (6) se ha establecido también que la capacidad de oscilar en forma circadiana está determinada genéticamente ya que algunos organismos aperiódicos en etapas tempranas de su vida, solo requieren de una señal externa única para desplegar su frecuencia espontánea de oscilación; (7) se justifica también la ubicuidad de los ritmos circadianos tanto en sentido taxonómico, es decir, en toda la escala de los seres vivos, como en sentido fisiológico, esto es, en lo que concierne a las distintas funciones estudiadas.

Se desconoce hasta ahora el modo de funcionamiento del mecanismo de reloj que subyace a todo ritmo circadiano, sin

embargo, se han propuesto algunos esquemas hipotéticos que se pueden resumir en dos conceptos de reloj. La hipótesis endógena y la hipótesis exógena. Según la hipótesis endógena el reloj es capaz de generar su propio periodo de manera autónoma y funcionar completamente independiente del ambiente. Desde este punto de vista se considera al reloj como una entidad fisicoquímica a nivel celular que puede transmitirse genéticamente sin alteración temporal. La hipótesis exógena propone que el organismo recibe información temporal a través de una fuerza geofísica (no identificada hasta ahora) capaz de penetrar las barreras de las condiciones constantes del laboratorio y llegar hasta el medio intracelular donde se localiza el reloj. Las fuerzas más penetrantes conocidas como el geomagnetismo y la radiación cósmica presentan cambios periódicos de intensidad causados por la rotación terrestre sobre su eje en relación con el sol y la luna.

Aun cuando se ha demostrado que los organismos son sensibles a campos magnéticos, campos electrostáticos y radiaciones gamma, las características de los ritmos circadianos señaladas en los párrafos anteriores apuntan hacia la hipótesis endógena como la explicación más plausible sobre su origen es decir, que por evolución adaptativa a los cambios regulares noche-día en las condiciones ambientales, la mayor parte de los organismos adquirió un programa temporal paralelo al día de 24 horas que se basa en procesos periódicos que tienen la característica de ser oscilaciones autosostenidas (Aschoff, 1989).

La presencia de ritmos circadianos ha sido reconocida por muchos autores en un gran número de especies vegetales y animales y para una variedad de procesos que van desde el consumo de oxígeno, la bioluminiscencia y la fotosíntesis en algas como *Gonyaulax* (Hastings, 1960; Sweeney, 1960), el movimiento de las hojas de *Phaseolus* (Bünning, 1931), la migración de los pigmentos retinianos en crustáceos (Welsh, 1930a), la actividad motriz también en crustáceos (Kalmus, 1938), la eclosión de larvas de mosca (Pittendrigh, 1960), la actividad de vuelo del mosquito (Taylor y Jones, 1969), la actividad motriz de algunos mamíferos (DeCoursey, 1960) el sueño en los infantes (Hellbrügge, 1960), la

temperatura rectal en humanos (Wever, 1974), etcétera.

Desde hace más de 40 años han aparecido en la literatura algunos trabajos (Schalleck, 1942; Welsh, 1930b; Bennitt, 1932) que han puesto de manifiesto la presencia de fenómenos circadianos en la vía visual del acocil. Entre ellos cabe destacar el de Bennitt quien registró la persistencia de un ritmo diurno en el movimiento del pigmento retiniano accesorio proximal del acocil *Cambarus virilis*. Para ello el autor colocaba un gran número de animales en completa oscuridad y después de 24 horas sacrificaba tres de ellos a intervalos de tres horas durante las siguientes 75 horas; al examinar los ojos seccionados de estos animales pudo comprobar que el pigmento retiniano sufría cambios de posición a lo largo del nictámero.

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

Aréchiga y Wiersma en 1969, trabajando en acociles con electrodos implantados permanentemente, encontraron un cambio circadiano en la amplitud del electroretinograma (ERG) y en la frecuencia de descarga de las llamadas "fibras de acción sostenida" del nervio óptico del acocil *Procambarus clarki*. En 1970 Aréchiga y Fuentes demostraron la estrecha relación que hay entre la posición de los pigmentos retinianos accesorios del acocil *Procambarus bouvieri* y la amplitud del ERG a lo largo del ciclo de 24 horas.

En 1973 Aréchiga, et al. pudieron comprobar que los cambios cíclicos de amplitud del ERG del acocil previamente propuestos correspondían, efectivamente, a un ritmo endógeno con periodo cercano a las 24 horas, el que se veía afectado importantemente por la cantidad de luz recibida. En 1977 Sánchez y Fuentes-Pardo publicaron un trabajo en el que demostraron la existencia de un ritmo circadiano en la respuesta eléctrica a la luz del tallo ocular aislado del acocil. En este trabajo se postuló la posibilidad de que el ritmo circadiano del ERG fuera el resultado

de la interacción de numerosos osciladores los que se presentarían acoplados en el animal íntegro y tenderían a desacoplarse en el tallo ocular aislado al faltar en él algunas influencias posiblemente de carácter hormonal.

En los últimos diez años ha aparecido un buen número de trabajos en los que se encuentra información acerca de la organización de los osciladores que subyacen al ritmo circadiano de respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981; Fuentes-Pardo y Ramos-Carbajal, 1983; Moreno-Sáenz, *et al.*, 1987; Hernández-Falcón, *et al.*, 1987; Fuentes-Pardo, *et al.*, 1984; Fanjul-Moles *et al.*, 1987; Fuentes-Pardo y Moreno-Sáenz, 1986; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Fuentes-Pardo y Moreno-Sáenz, 1988). A pesar de todos estos estudios sobre la ritmicidad circadiana en la vía visual del acocil quedan muchas interrogantes aún sin respuesta, fundamentalmente en lo que concierne al origen de la ritmicidad circadiana en el acocil.

#### FOTOPERIODO

El fotoperiodismo (palabra que combina las raíces griegas de luz y duración) es la respuesta que presentan los organismos a la duración del día y la noche en un ciclo diario. Bajo condiciones naturales, los organismos sensibles al fotoperiodo son capaces de medir la duración del día, de la noche o de ambos, en cada ciclo de 24 horas y su respuesta dependerá de si se excede una longitud crítica de fotoperiodo (LCF) o de oscuridad (LCN), (Vince-Prue, 1975; Pittendrigh y Minis, 1964).

Dado que la variación en la longitud del día y la noche es uno de los factores que se presentan con mayor regularidad de una estación a otra, sobre todo a grandes latitudes, no es de extrañar que, a través de la evolución, los organismos hayan desarrollado como respuesta adaptativa la capacidad de utilizar esta información para determinar la época del año o, aun más importante, su sucesión en el tiempo. Esta posibilidad confiere a los organismos una ventaja importante pues les permite anticiparse a los efectos de un ambiente en constante cambio. La

respuesta fotoperiódica capacita a los organismos para ocupar su nicho (Vince-Prue, 1975; Aschoff, 1989).

Desde tiempos remotos el hombre ha podido percatarse de los cambios estacionales que presentan las plantas y los animales en procesos como la reproducción y el desarrollo y la ocurrencia de éstos en una época determinada del año. Sin embargo, solo hasta los trabajos de Garner y Allard de 1920 (Vince-Prue, 1975) en las plantas y de Marcovitch (1924) y Rowan (1926) en los animales (Pittendrigh, 1964) es que se hace un análisis crítico del problema. Se ha podido establecer que procesos como la floración, la formación del fruto, la aparición de formas sexuales, la periodicidad reproductiva, la migración de las aves y ciertos peces, entre otros, implican: a) una medición del tiempo muy precisa por parte del organismo. b) que la medición del tiempo posee algún mecanismo de compensación de temperatura. c) que la duración del periodo ininterrumpido de oscuridad es la medida crítica que utilizan los organismos. d) que se requiere la participación de algún pigmento fotosensible. Dicho en otras palabras, los fenómenos que se mencionan se encuentran bajo el control del fotoperiodo (entendido éste como la duración del periodo de iluminación en un ciclo luz:oscuridad).

Estas cuatro proposiciones resumen el conocimiento esencial sobre el problema del fotoperiodismo pero no dan ninguna respuesta al problema que significa el establecimiento de alguna relación causal entre las características del régimen luminoso y los fenómenos a los que se alude. Más aun, dejaron abiertos muchos otros problemas que, hasta ahora están sin solución: ¿Cómo detectan los organismos la relación entre la duración del periodo de iluminación y la duración del periodo de oscuridad en un ciclo de 24 horas?. ¿En qué sustrato se lleva a cabo la(s) reacción(es) en la(s) que se sustenta la medición fotoperiódica del tiempo? El fotoperiodismo. ¿es un fenómeno innato o adquirido? Si es innato, ¿en qué lugar genético se localiza? Y si es adquirido o por lo menos susceptible de serlo, ¿qué factores determinan su adquisición?

Una de las primeras propuestas encaminadas a resolver algunos de estos problemas la hizo Bünning en 1936 por medio de

la que hasta la fecha se conoce como "Hipótesis de Bünning". En este importante trabajo el autor propone, como punto de partida para explicar los fenómenos fotoperiódicos, la existencia de un ritmo endógeno de actividad celular en el que se encuentran dos fases claramente diferenciables, una de ellas, "con requerimiento de luz" o fotófila, y la otra "con requerimiento de oscuridad" o escotofila. La inducción fotoperiódica en los organismos conocidos como "de días largos", se lleva a cabo cuando la luz del día se prolonga hasta incidir en la parte escotófila del ciclo endógeno y no se presenta cuando la duración del día es tan corta que la luz coincide con la fase fotófila del ciclo. Por otra parte, si el organismo es de "día corto" la situación es exactamente la inversa ya que no hay inducción fotoperiódica cuando la luz se prolonga hasta incidir en la fase escotofila y sí se presenta cuando se restringe a la fase fotófila. Otra consideración básica en la hipótesis de Bünning es que el ciclo endógeno está en fase con el amanecer lo que significa que cualquier cambio que haya en la duración del fotoperiodo debe reflejarse, de inmediato, en un cambio de la fase del ciclo endógeno en la que termina la luz.

En las ideas que se acaban de expresar queda implícita la presencia de un sistema circadiano como el sustrato básico de las reacciones fotoperiódicas, siendo ésta la aportación fundamental del autor ya que antes de él no se había considerado esta posibilidad. Sin embargo tuvieron que pasar muchos años para que las ideas de Bünning tuvieran algún eco entre los estudiosos del tema. Es probable que esta reticencia en aceptarlas se haya debido a la complejidad a la que se enfrenta todo investigador que pretender someterlas a las correspondientes pruebas experimentales. De hecho, fue necesario que el mismo Bünning hiciera un replanteamiento de sus ideas (lo que sucedió en 1960) para que empezaran a ser mejor comprendidas y por ende, aceptadas por otros investigadores. Una de las grandes dificultades que se plantean en esta teoría es la de explicar el mecanismo por medio del cual la luz es capaz de "ajustar la fase de la oscilación endógena". Otra, "cómo se efectúa la inducción fotoperiódica al incidir (o no) la luz en la fase escotófila del ciclo". De hecho,

Pittendrigh replanteo la hipótesis de Bünning abocándose a la explicación del papel dual que parece desempeñar la luz durante la inducción fotoperiódica (Pittendrigh, 1964; Pittendrigh, 1966; Pittendrigh y Minis, 1971).

Pittendrigh enfatiza el hecho de que el ritmo circadiano que mide la duración del fotoperiodo esta en fase con el amanecer (es decir, con la transición oscuridad-luz) y que la fase del sistema circadiano depende fuertemente del fotoperiodo del ciclo de luz al que se ajusta el ritmo circadiano mismo. Estas consideraciones lo llevan a plantear que solo después de haber comprendido los mecanismos básicos involucrados en la sincronización por luz de los ritmos circadianos, se está en posibilidad de obtener alguna evidencia experimental en apoyo de la teoría de Bünning. Mas aún, las ideas fundamentales que emanan de esta teoría son tomadas por Pittendrigh quien a ellas añade el concepto de que la luz no solo actúa como un "inductor fotoperiódico" cuando coincide con la fase escotófila, sino que además, actúa como el "agente sincronizador" que determina el momento en el que debe ocurrir tal fase. Con el desarrollo de esta idea, Pittendrigh propuso que el término de fase escotófila (que en la teoría de Bünning tiene una duración de 12 horas) fuera cambiado por el de "fase inducible fotoperiódicamente". Las dos características esenciales de la fase inducible son las siguientes: a) su duración no es necesariamente de medio ciclo circadiano, sino que corresponde al tiempo en el que un determinado sistema circadiano es sensible a la luz (esto implica que el término es mucho más restringido que el de fase escotófila) b) permite diferenciar con mayor precisión entre la luz como señal sincronizadora y la luz como señal con capacidad para inducir un cierto fenómeno (como la floración, la reproducción, etc.).

El cambio de la duración del fotoperiodo durante las diferentes épocas del año hace que de manera natural la luz coincida con la fase inducible sólo en una estación del año y no en las otras; en esta afirmación queda implícita la idea de que la oscilación (circadiana) mantiene una relación de fase definida con el ciclo de luz, esto es, la relación de fase con el ciclo de

luz es tal que la fase inducible está o no está iluminada cuando la oscilación está sincronizada con un cierto ciclo luz:oscuridad. De esta proposición vuelve a surgir en forma inequívoca la importancia que tiene la comprensión de los fenómenos de la sincronización por luz para poder aproximarnos a la comprensión del proceso de medición fotoperiódica del tiempo.

En 1966 Tyshchenko planteó la posibilidad de que la respuesta fotoperiódica en los artrópodos terrestres involucre la participación de dos osciladores, uno relacionado con el amanecer y el otro, en fase con el anochecer. De esta manera los procesos rítmicos controlados por los dos osciladores están sincronizados con la luz y la oscuridad respectivamente. Con esta proposición como punto de partida, el fotoperiodismo se explica con base en una interacción entre por lo menos dos ritmos circadianos independientes. Este modelo se conoce como el modelo de "coincidencia interna" y surgió casi al mismo tiempo, aunque en forma independiente, que otro, desarrollado por Hoshikazi y Hamner (Hoshikazi y Hamner, 1969) quienes, después de años de trabajar el fotoperiodismo en las plantas elaboraron el modelo conocido como de "coincidencia externa". Este modelo, al igual que el de coincidencia interna, implica la utilización de dos osciladores circadianos en la medición fotoperiódica del tiempo, uno relacionado con el amanecer y el otro con el anochecer; los dos osciladores tienen el mismo periodo y solo difieren en la fase ya que muestran un desfaseamiento entre sí de 180 grados. Cuando se enciende la luz, el oscilador asociado con el amanecer iniciaría su "fotofase" la que llegaría a término a no ser que hubiera alguna otra señal luminosa. En forma similar el oscilador asociado con la oscuridad entraría a su "escotofase" a partir del momento en que se apagara la luz y sólo saldría de ella sin haberla completado si hubiera alguna otra señal de apagado. Los dos osciladores circadianos son independientes aunque pueden participar en una misma respuesta. Esto significa que el estado del organismo resulta, en un momento dado de la interacción entre los dos osciladores los que generan un nuevo ritmo resultante de la suma de sus correspondientes estados de fotofase y escotofase. Cuando el organismo está expuesto a un ciclo de 12 horas de luz y

12 horas de oscuridad los dos ciclos circadianos están completamente en fase lo que significa que no hay efecto fotoperiódico alguno. El efecto se produciría debido a una inhibición del proceso correspondiente si la iluminación coincide con la escotofase (organismos de día corto) o a una inducción del mismo si coincide con la fotofase (organismos de día largo). Tanto en los organismos de día corto como en los de día largo, la iluminación produciría inducción si coincide con la fotofase.

Como se puede ver de lo expuesto anteriormente, los distintos modelos que se han desarrollado para explicar los fenómenos fotoperiódicos son, todos, variaciones sobre las ideas expuestas inicialmente por Bunning, lo que equivale a decir que en la medición fotoperiódica del tiempo los organismos utilizan, como punto de partida, un sustrato circadiano.

#### FOTOPERIODOS ESQUELETO.

Si se toma en consideración el hecho de que los organismos responden no al contenido de luz que pueda haber en las señales luminosas externas sino más bien a la transición entre la luz y la oscuridad o entre la oscuridad y la luz, se puede entender de dónde surgió la idea de probar hasta qué punto los organismos pueden mostrar un seguimiento de señales luminosas breves aplicadas en los extremos (inicio y término) de lo que sería un determinado fotoperiodo, comportándose ante estos breves estímulos como lo harían ante el fotoperiodo completo. A los estímulos aplicados de esta manera se les da el nombre de "fotoperiodos esqueleto" y han sido empleados por un buen número de autores (Pittendrigh, 1965; Oda, 1969; Pittendrigh y Minis, 1971; Hillman, 1964; Pittendrigh, 1966; Pittendrigh y Minis, 1964) para poner a prueba diferentes ideas relacionadas con el fotoperiodismo. Sin embargo hay que hacer notar que, hasta la fecha, no se han entendido por completo las implicaciones que se derivan de las respuestas que muestran los organismos a la aplicación de los fotoperiodos esqueleto. Este término fue acuñado por Pittendrigh (Pittendrigh y Minis, 1964) quien encontró que las pupas de *Drosophila* siguen en forma casi

perfecta todos los fotoperiodos esqueleto menores a 11 horas (es decir, la eclosión de la *Drosophila* se sincroniza sin ningún problema a un par de señales breves de luz aplicadas una al principio y otra al final de un periodo de 11 horas o menos). Con fotoperiodos esqueleto de 12 horas hay un ajuste débil del ritmo de eclosión y fotoperiodos de 13 horas producen una sincronización inestable. Cuando se aplica el fotoperiodo esqueleto de 14 horas (las otras 10 horas del ciclo de 24 son de oscuridad) el ritmo de eclosión se comporta igual que si el fotoperiodo hubiera sido de 10 horas (es decir, con 14 horas de oscuridad). Hay que tomar en consideración que si los dos pulsos de luz son, en efecto, muy breves, cada fotoperiodo esqueleto tiene dos interpretaciones posibles, ya que el esqueleto de 14:10 es también el de 10:14, el de 15:9 es equivalente al de 9:15, etc. Pittendrigh encontró que a partir de una cierta duración del fotoperiodo esqueleto el ritmo de eclosión de la *Drosophila* muestra un brinco de fase que hace que el ritmo se ajuste al periodo que le ofrece la "noche de mayor duración".

#### HIPOTESIS DE TRABAJO

Con los antecedentes que han sido expuestos en los párrafos anteriores, y tomando en consideración de manera particularmente importante la presencia de un ritmo circadiano en la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil, nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

1) Si la medición fotoperiódica del tiempo requiere de un sustrato circadiano, entonces:

El ritmo circadiano de respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil debe ser capaz de ajustarse a, por lo menos, ciertos regímenes fotoperiódicos que le sean impuestos de acuerdo con los "límites de sincronización".

2) Si el ajuste de un ritmo circadiano a un determinado régimen fotoperiódico obedece a la detección, por parte de uno o más osciladores, de la transición de la luz a la oscuridad o de la oscuridad a la luz, entonces:

El ritmo circadiano de respuesta a la luz de los

fotorreceptores visuales del acocil debe ser capaz de ajustarse a los regímenes fotoperódicos esqueleto que correspondan a los regímenes fotoperódicos completos a los que puede quedar sincronizado.

Para probar estas dos hipótesis se plantearon los objetivos que se obtubieron en forma secuencial y que se detallan a continuación:

1). Determinar si la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil muestra las variaciones de amplitud que se esperaría de acuerdo con un comportamiento de caracter circadiano.

2) Determinar la capacidad que tiene el ritmo circadiano de respuesta a la luz de ser sincronizado ante la aplicación de distintos regímenes de estimulación luminosa aplicados en forma periódica.

3) Determinar la capacidad del ritmo circadiano de respuesta a la luz de modificar sus características esenciales (periodo, amplitud y fase) de acuerdo con el fotoperiodo esqueleto que le sea impuesto.

Para cubrir estos tres objetivos se diseñaron los experimentos que están detallados en la sección de Material y Metodos y que consisten, en esencia, en: 1) obtener registros a largo plazo del ERG de acociles colocados en condiciones constantes de iluminación y de temperatura. 2) Registrar el ERG de acociles colocados bajo distintos regímenes de fotoperiodo completo. 3) Registrar el ERG de acociles colocados bajo distintos regímenes de fotoperiodos esqueleto (los que correspondan a los fotoperiodos completo utilizados).

## MATERIAL Y METODO

Para la realización del presente trabajo se utilizaron acociles adultos de la especie *Procambarus dugueti* (Bouvier) sin distinción de sexo, cuya longitud osciló de 6 a 9 cm medidos entre el rostro y el telson.

Los especímenes fueron proporcionados por un colector local de Zamora Michoacan. En el laboratorio los acociles se conservaron en piletas con agua de la llave a las que se hacía llegar de manera continua un burbujeo de aire utilizando para ello bombas comunes de acuario. Se les alimentó regularmente con *Anacharis* sp. y *Tubifex* sp. La iluminación ambiental fue normal.

La preparación de los organismos previa al experimento consistió en colocar tres corchos uno en la parte dorsal y dos laterales adheridos con cemento acrílico, con el fin de sujetar al animal con una pinza a un soporte (Palmer), y prevenir que con las quelas pudieran quitarse el electrodo implantado en el ojo. Para evitar cambios de posición del electrodo implantado se inmovilizaron los ojos, colocando algodón por abajo del rostro y rellenando con cemento acrílico. De esta manera se mantenía inmóvil al acocil durante todo el experimento y sumergido parcialmente en agua dentro de un recipiente de plástico.

El recipiente en que se encontraba el organismo se mantenía dentro de una cámara de diseño especial, con una temperatura constante de  $13 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ , con la posibilidad adicional de controlar las condiciones de luz y oscuridad independientemente de las condiciones externas a dicha cámara.

El registro consistió en hacer evidente la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma, ERG) del acocil, cuyo ritmo circadiano ha sido establecido y caracterizado por diversos autores.

La respuesta se obtuvo al aplicar al acocil destellos de prueba de intensidad de 800 lux y duración de 10  $\mu\text{s}$  provenientes de un fotoestimulador (Grass, modelo PS-2). Este era accionado por el cierre del circuito conectado al interruptor automático de un quimógrafo (Palmer) con una frecuencia de un estímulo cada tres minutos.

Con el propósito de registrar el ERG, a través de la córnea,

se introdujo un electrodo de acero inoxidable con diámetro en la punta de 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

Del electrodo se enviaba la respuesta a un preamplificador (Tektronix, modelo 122). Se producía un segundo paso de amplificación al pasar la respuesta al amplificador de corriente directa 7 DC de un polígrafo (Grass, modelo 79D), para ser finalmente inscrita de manera continua en un papel, que corría a una velocidad constante durante todo el tiempo del experimento.

Los fotoperiodos (L:O) que se aplicaron fueron los siguientes: (4:20); (8:16); (11:13); (12:12); (13:11); (16:8); y (20:4). Esto significa una alternancia de un periodo de 4 horas de luz y 20 horas de oscuridad; de 8 horas de luz y 16 de oscuridad, etc. Esto se logró al colocar, dentro de la cámara en que se encontraba el acocil y frente a los ojos de éste, un foco de intensidad 0.5 lux cuyo encendido y apagado era controlado por un reloj automático (National, modelo TB-136).

Cada experimento comprendió tres etapas, en la primera etapa se aplicaba durante tres días un fotoperiodo completo (FPC) el cual se refiere a la duración relativa de luz y oscuridad en un ciclo de 24 horas (e.g. un fotoperiodo completo (4:20) se presenta al organismo como 4 horas de luz y 20 de oscuridad). En la segunda etapa se aplicaba el fotoperiodo esqueleto (FPE) correspondiente, el cual consistía en dar solo un par de pulsos luminosos de una hora de duración al inicio y al término de la fotofase de un FPC (v.g. el FPE 4:20 se presenta al organismo como 1 hora de luz, 2 horas de oscuridad y 1 de luz, en lugar de las 4 horas continuas de luz que corresponden a la fotofase del FPC seguidas de 20 horas de oscuridad correspondientes a la escotofase). Una vez aplicado el FPE durante 4 días, el animal era llevado a oscilación libre (OO), que en este caso fue de oscuridad constante, durante los últimos 3 días del experimento. De esta manera, la duración de cada experimento fue de un mínimo de diez días. Esta secuencia se mantuvo constante para todos los experimentos. Una serie adicional de experimentos consistió en colocar inicialmente al animal en (OO) y proseguir con el correspondiente FPE y regresar a la OO hasta el término del experimento.

EL análisis de los resultados se basó en la medición de la

amplitud de la componente rápida (H1) del ERG (Naka y Kuwabara, 1959) como índice del estado funcional de los fotorreceptores a intervalos de quince minutos. se calculó el promedio de la amplitud de la respuesta por hora y se obtuvieron las gráficas de dicho promedio contra el tiempo de duración de cada experimento. De cada gráfica se calculaba el periodo con que oscilaba la amplitud del ERG, los cambios de fase producidos por los fotoperiodos aplicados, y la relación entre el tiempo en el que la amplitud de la respuesta es igual o mayor al 50% (periodo  $\alpha$ ) y el tiempo en el que la amplitud de la respuesta es menor al 50% del máximo (periodo  $\rho$ ). De cada registro se hacía también la estimación del nivel de actividad (es decir, de la tendencia general de la respuesta a crecer, decrecer o a permanecer constante) así como de la amplitud relativa del ritmo: este último valor se calculaba al promediar los valores que se obtenían en cada ciclo, de la relación entre el voltaje del ERG alcanzado en el pico con respecto al alcanzado en el valle.

## RESULTADOS

La figura 2 corresponde a un registro a largo plazo de la actividad electroretinográfica en el acocil. En ella se muestra el curso temporal de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (ERG), registrada durante cinco días consecutivos en condiciones constantes de oscuridad y temperatura ( $13 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Cada uno de los puntos representa el valor promedio de la amplitud de la respuesta calculado por hora (1 determinación cada 15 min.). En el eje de las ordenadas se encuentra el valor de la amplitud del ERG en milivoltios (mV) y en el eje de las abscisas la hora del día (tiempo externo). Se observa que el valor de la amplitud del ERG varía con la hora del día y que se presenta un pico máximo alrededor de las 24 horas con voltajes cercanos a 2.0 mV y un valle alrededor de las 12 horas en el que la respuesta es mínima con valores de 0.5 mV. La periodicidad con que se repiten estos valores (medida como la distancia de pico a pico) es de 23.0 horas, valor que se encuentra dentro de la gama correspondiente a procesos con actividad circadiana.

Con las condiciones de estimulación empleadas (1 destello luminoso cada 3 min.) se encuentra una relación entre el periodo de actividad y el periodo de reposo (relación  $\alpha:\rho$ ) de 1.34 lo cual indica que, como es de esperarse en un animal nocturno colocado en la oscuridad, es mayor el tiempo que permanece activo que el que permanece inactivo. El nivel de actividad así como la amplitud relativa del ritmo permanecieron constantes durante todo el experimento.

Cuando los organismos fueron sometidos a los diferentes fotoperiodos (FPC y FPE que se ordenan aquí de menor a mayor relación luz:oscuridad aunque todos tienen 24 horas de duración), se pudieron observar algunos cambios importantes en el patrón circadiano.

Entre esos cambios destaca, por su claridad, el cambio de periodo del ritmo circadiano el cual es ahora de 24 horas poniendo de manifiesto su sincronización con el fotoperiodo impuesto. En la figura 3 se muestran los resultados que sobre el

ritmo circadiano del ERG tuvo la aplicación del fotoperiodo completo 4:20. Es evidente que el acocil se ajusta poco a poco a los ciclos impuestos de 24 horas aun cuando hacia las 12 horas muestra una tendencia a reducir su amplitud a pesar de estar en condiciones de oscuridad. Un hecho importante es que este ajuste parece significarle al animal una modificación de sus hábitos nocturnos ya que los valles se presentan alrededor de la media noche y la actividad máxima se da entre las 12 y las 18 horas. De hecho, el corto periodo de luz, que invariablemente se aplicaba de las 7 a las 11 horas, sólo produjo una pequeña reducción de la respuesta sin afectar, en forma evidente, ningún otro parámetro.

También parece comprobarse que el cambio más drástico que muestra el ritmo se presenta en la relación  $\alpha:\rho$ , la que tiene un valor de 3.20 en el FPC, esto nos habla de un predominio considerable de la actividad sobre el reposo, situación que va claramente de acuerdo con la regla de Aschoff para animales nocturnos ya que en este fotoperiodo la proporción de la fase de iluminación es muy baja con respecto a la de la duración de la etapa de oscuridad.

En lo que se refiere al nivel de actividad éste se mantiene relativamente constante durante el FPC. El cambio de FPC 4:20 a FPE 4:20, significó que en lugar de dar un pulso de 4 horas de luz (de las 7 a las 11 horas) se aplicaron dos pulsos de 1 hora de duración cada uno; el primero de las 7 a las 8 y el segundo de las 10 a las 11 horas de la mañana; esto se hizo a partir del quinto día de registro y los resultados se muestran en la figura 3. De esta figura es evidente que el ERG sigue mostrando características circadianas ( $\tau=24$ ) si bien su relación  $\alpha:\rho$  aumentó a 4.36. La última parte de la figura 3 muestra la forma cómo el ritmo circadiano se afecta al regresar al acocil a condiciones de oscuridad constante. De esta situación es evidente que con respecto a la situación previa, la amplitud (y la relación noche-día) tienden a disminuir; el periodo aumenta (27.5 horas) y la relación  $\alpha:\rho$  disminuye (1.6). Todos estos hechos se pueden interpretar en el sentido de una tendencia general a que el ritmo circadiano se amortigüe debido, quizá a la falta de una señal sincronizadora.

Cuando se aplica una mayor duración de la etapa luminosa como es el fotoperiodo 8:16, (las 8 horas de iluminación se aplicaron de 7 a 15 horas) la sincronización del ritmo es más evidente. La figura 4 muestra un registro típico de un experimento con estas condiciones de iluminación. Se puede observar que el periodo circadiano se ajusta con gran precisión a las 24 horas del fotoperiodo impuesto; la relación  $\alpha:\rho$  es de 1.90 y la amplitud relativa del ritmo tiene valores próximos a 2. El cambio de FPC 8:16 a FPE 8:16, significó la aplicación de una señal luminosa de 1 hora de duración de las 7 a las 8 y otra señal igual de las 14 a las 15 horas. El efecto de este cambio se aprecia en la figura 4 a partir del quinto día del registro y consiste en un ligero aumento en el nivel de actividad y de la relación  $\alpha:\rho$  (2.30). El regreso a la condición de oscuridad constante se llevó a cabo a partir del octavo día y produjo un desarreglo del ritmo circadiano ya que se perdió la regularidad del periodo, de la amplitud relativa y de la relación  $\alpha:\rho$  por la misma razón que en el caso anterior.

Un hecho interesante en este registro es el que durante el FPC el acocil puede mantener una cierta actividad oscilante al margen de las entradas de luz y oscuridad como lo indica el hecho de que durante la oscuridad muestra cierta caída.

Los resultados de aplicar un FPC 11:13 (con el periodo de iluminación de las 7 a las 18 horas y el de oscuridad de las 18 a las 7 de la mañana siguiente) se presentan en la figura 5.

La sincronización a 24 horas es casi perfecta con una gran coincidencia entre las fases de luz y oscuridad con las actividades mínimas y máximas, respectivamente. La actividad oscilatoria, sin embargo, sigue mostrando cierta independencia con respecto a los ciclos L:O, ya que la caída del ERG se presenta antes de que se inicie la fase de iluminación y el aumento de actividad que se espera para la fase de oscuridad, también se presenta antes de que ésta se aplique. En apoyo de esta interpretación está el hecho de que durante la fase de oscuridad el ERG muestra una clara tendencia a oscilar. La aplicación de fotoperiodos esqueleto 11:13, se llevó a cabo a partir del cuarto día de registro y consistió en encender la luz

durante 1 hora de las 7 a las 8 y de las 17 a las 18 horas. Se puede ver en el registro que, asociada con la llegada del primer estímulo luminoso hay una caída en la amplitud del ERG la cual, sin embargo, tiende a recuperarse casi de inmediato inclusive antes de que termine la primera hora del estímulo luminoso; Durante la primera fase de oscuridad el ERG permanece sólo ligeramente por encima del valor al que cayó durante la iluminación previa; a partir de que se aplica el segundo periodo de iluminación vuelve a caer sólo para recuperarse de nueva cuenta, antes de que acabe la hora que dura el estímulo y alcanzar ya en la oscuridad, la amplitud máxima característica de esta etapa. En otras palabras: en esta situación experimental, en la que en un ciclo de 24 horas, sólo 2 son de iluminación, el ERG es sincronizado por el FPE aplicado pero muestra un ciclo muy deformado en el que, sin embargo, se puede identificar que la fase "diurna" se da de 7 a 17 horas y la "nocturna" de las 17 a las 6 horas. El regreso a la oscuridad constante produjo una oscilación de la amplitud del ERG con un periodo que fue un aumento (25.25 horas) hasta el término del registro y que mostró clara tendencia al amortiguamiento como se deduce de la reducción en la amplitud relativa mostrada (1.23).

El efecto de la aplicación del FPC 12:12 se muestra en la figura 6. Se puede comprobar que con mayor exactitud que en los registros anteriores, este fotoperiodo sincroniza con gran precisión al ritmo del ERG el cual muestra un periodo de 24 horas de las cuales 12 son de actividad alta coincidentes con la fase de oscuridad y 12 de actividad baja coincidentes con la fase de iluminación; esto significa que la relación  $\alpha:\rho$  es igual a 1. Sólo pequeñas oscilaciones en la etapa de actividad alta y baja, así como cierto ascenso en el nivel de actividad, hacen que el ritmo circadiano no tenga una sincronización perfecta con respecto al fotoperiodo impuesto. A partir de que se inicia la aplicación del FPE 12:12 (lo que significa que la primera hora de iluminación se aplico de 7 a 8 horas y la segunda de 18 a 19 horas), el ritmo del ERG, aunque con un periodo de 24 horas que pone de manifiesto su sincronización al FPE, muestra algunas modificaciones importantes; las más evidentes de las cuales son el aumento de la

relación  $\alpha:\rho$  (1.45) y el incremento que muestra el ERG durante la fase de oscuridad de 10 horas en cuanto acaba la primera hora de iluminación; También es evidente que las oscilaciones de alta frecuencia que se notaban ya desde el FPC, persisten con la aplicación del FPE. Otro hecho que hay que destacar del registro de la figura 6 es el comportamiento del sistema circadiano del ERG cuando el animal es dejado en oscilación libre: el ritmo retiene con toda claridad sus características circadianas sin mostrar amortiguamiento, muestra un incremento en su nivel de actividad (de acuerdo con lo esperado de un animal nocturno colocado en la oscuridad) y recupera el valor de 1 en la relación  $\alpha:\rho$ .

La figura 7 muestra el efecto que tiene el FPC 13:11 sobre el ritmo circadiano del ERG. Se puede comprobar que existe un alto grado de sincronización con el FPC lo que hace que el ritmo no sólo logre un periodo de 24 horas sino que, además, la fase de actividad se lleve a cabo durante las 11 horas de oscuridad y la de reposo durante las 13 horas de iluminación ( $\alpha:\rho=0.83$ ). Por otra parte también es claro que desde el primer ciclo en la oscuridad hay una caída en la amplitud del ERG cercana al 15% de la amplitud del ciclo que precede a la caída producida por la fase de iluminación del fotoperiodo y que pone de manifiesto lo que parece ser una "memoria" del sistema del horario al que le amanecía antes de que se le aplicaran los fotoperiodos. En la figura 6 también se incluyen los resultados de haber aplicado, a partir del cuarto y hasta el octavo día de registro, los FPE 13:11. Esto significó la llegada de un primer periodo de luz de 1 hora de duración de las 7 a las 8 horas y de un segundo periodo de iluminación, también de una hora, de las 19 a las 20 horas. Desde el inicio de esta etapa de la experimentación se pudo comprobar que el sistema circadiano sigue sincronizado con el periodo de 24 horas del FPE. Sin embargo, también resulta claro que la relación  $\alpha:\rho$  aumentó ( $\alpha:\rho= 1.15$ ), tal y como se esperaría de un organismo nocturno que, como en este caso, recibe mucho menos luz que antes. Las caídas de la amplitud de la respuesta durante el periodo de oscuridad son ahora más evidentes que durante el FPC y en los valles (los cuales necesariamente

coinciden con el periodo de oscuridad) aparece cierta tendencia al crecimiento que hace que cada ciclo tenga una  $\rho$  de corta duración, relativamente. Otro hecho que se evidencia en esta etapa del registro es el acortamiento de la amplitud relativa (1.54) que resulta de la drástica reducción del periodo total de iluminación durante el ciclo de 24 horas. Al regresar a la condición de oscilación libre (lo que sucedió a partir del noveno día de registro y hasta el término del experimento), se puede observar que el ciclo circadiano muestra irregularidades tanto en la fase de actividad como en la de reposo que recuerdan los "miniciclos" encontrados por Sánchez y Fuentes Pardo en 1977 en el registro del ERG del ojo aislado del acocil. También es claro un incremento en el nivel de actividad así como una reducción en la amplitud relativa de los ciclos.

Cuando se aplica un FPC 16:8, el ritmo circadiano del ERG se deforma de una manera notable. La figura 8 muestra los resultados de un experimento en el que se dio precisamente esta situación. Es evidente que aún hay sincronización al periodo de 24 horas. Sin embargo, la relación  $\alpha:\rho$  es muy baja ( $\alpha:\rho = 0.47$ ) y los ciclos en los que la fase de actividad coincide con el periodo de oscuridad (8 horas, de las 23 a las 7 horas) y la fase de reposo con el de la iluminación (16 horas, de las 7 a las 23 horas) muestran, en esta última etapa, una clara tendencia a aumentar su nivel de actividad desde que se inicia la fase de reposo y hasta el momento en que empieza la oscuridad a las 23 horas. A partir del cuarto y hasta el séptimo día, se aplica el FPE 16:8. Como resultado de la reducción del tiempo total de iluminación (ya que sólo se aplicaba 1 hora de luz de 7 a 8 y otra hora más de 22 a 23 horas en cada ciclo de 24 horas) el ritmo del ERG incrementó grandemente su nivel de actividad así como su relación  $\alpha:\rho$  la cual llega a tener valores de 2.58. La entrada del primer pulso de luz de las 7 a las 8 se vio siempre acompañado de la caída del ERG y precedía al inicio del corto periodo de reposo. La entrada del segundo pulso luminoso a las 22 horas también provocaba una reducción del ERG pero en esta ocasión había una recuperación inmediata hacia los valores de voltaje característicos de la fase de actividad, etapa en la que permanecía el acocil hasta las 7

horas del día siguiente. En la última etapa del experimento, el acocil es llevado a la condición de OO. En esta condición se observa que el nivel de actividad del ritmo circadiano del ERG muestra un incremento bien marcado, como corresponde a un animal nocturno colocado en oscuridad constante.

También se mantiene una elevada relación  $\alpha:\rho$  (1.70), pero la amplitud relativa de los ciclos muestra una tendencia a la reducción. Otros aspectos que cabe destacar de esta etapa es la aparición de "miniciclos" sobrepuestos al ciclo circadiano. De hecho al final del registro muestran gran proporción con respecto a la amplitud total, hasta un punto tal que el ciclo circadiano se ve casi por completo anulado.

La figura 9 corresponde a un registro de ERG en que el acocil recibió, inicialmente, un FPC 20:4. De hecho, las características que anotábamos para el caso anterior (FPC y FPE 16:8) se muestra aquí en forma todavía más acentuada. Es decir que, durante la primera parte del experimento se mantiene la sincronización con el FPC de 24 horas. La luz se aplicaba de las 7 a las 3 horas; y la oscuridad empezaba a las 3 para acabar a las 7. Los periodos de actividad fueron sumamente cortos (4 horas) ya que coinciden con la etapa de oscuridad mientras que los de reposo son de 20 horas, y coinciden con la fase de iluminación. Probablemente debido a que el periodo de iluminación es muy largo, durante el mismo se muestran oscilaciones de alta frecuencia que sugieren una tendencia a la desorganización del sistema circadiano. El cambio de FPC a FPE 20:4 se llevó a cabo a partir del cuarto día de registro y significó la aplicación de un pulso de luz de las 7 a las 8 y otro de las 2 a las 3 horas. La entrada de estas dos señales significó la reducción en la amplitud del ERG, pero a diferencia del registro anterior (fig. 8) no es posible asociar a ninguna de ellas con el inicio de la fase de reposo, pues de un ciclo al siguiente quedan tan próximos uno de otro que parecen afectar la forma de los ciclos circadianos en los que aparecen oscilaciones bastante irregulares. Con todo y ello, sí se puede identificar el ritmo circadiano el que muestra una clara tendencia a incrementar su nivel de actividad y una relación  $\alpha:\rho$  relativamente elevada ( $\alpha:\rho$

= 4.0) ambas características propias de un animal nocturno que pasa de un fotoperiodo con mucha luz a una situación con sólo 2 horas de iluminación por día.

Un hecho que llama la atención en esta parte del registro es la inversión que muestra el ritmo del ERG. Esto se traduce en que su fase de máxima actividad se lleva a cabo hacia las 12 del día. De hecho llegar a esta inversión del ritmo parece ser el resultado de una etapa de transición que se dio durante los dos primeros ciclos de FPE (fig. 9) y que le permite al acocil ajustarse al mayor periodo de oscuridad (el que se da entre el pulso de las 7 a las 8 y el de las 2 a las 3 horas), al que interpreta como su "periodo nocturno". Cuando el acocil es reintegrado a la condición de oscuridad constante (última parte de la figura 8) muestra una oscilación de gran duración, como se comprueba en el registro ya que durante 2 ciclos de 24 horas, sólo se lleva a cabo una oscilación y parte de otra, lo que significa que el periodo circadiano medido de valle a valle fue de 32 horas, aproximadamente. Este incremento en el periodo de la oscilación completa puede traducirse en un mero ajuste del ritmo el que vuelve a poner en fase su máximo de actividad durante las horas de la noche.

La figura 10 muestra un resumen de los resultados que se describen en los párrafos anteriores. En ella se muestran, en negro, los periodos de oscuridad y con barras claras las etapas de iluminación, tanto las fracciones luminosas de los fotoperiodos completos en la parte izquierda de la figura como los pulsos luminosos de 1 hora de duración que correspondían a los fotoperiodos esqueleto, y que aparecen, de acuerdo con el horario en que se aplicaron, como barras cortas y claras dispuestas dentro de las fases de oscuridad. La zona que incluye a los fotoperiodos esqueleto se presenta dos veces con el fin de ver el intervalo que había entre pulso y pulso de luz no sólo dentro de un mismo ciclo sino, además, entre un ciclo y el siguiente.

Los círculos blancos con un punto oscuro en el centro representan el momento en el que se produjo el pico máximo de actividad promedio durante la aplicación de los FPC; los círculos

blancos con una cruz en el centro, representan los momentos en los que se presentó, por promedio, la actividad máxima del ERG durante la aplicación de los FPE.

Un primer hecho que se desprende de la observación de la figura 9 es que la actividad máxima del ERG durante la etapa de los FPC se fue presentando cada vez más tarde, conforme iba en aumento la duración de la fracción luminosa del FPC, pero siempre durante la fase de oscuridad.

Con la aplicación de los FPE correspondientes a cada FPC, se comprobó que desde el valor de 4:20 hasta el de 13:11, los máximos de actividad se presentaban a la misma hora que en los FPC. También se puede afirmar que hasta estos mismos valores de FPE (13:11) el máximo de actividad se presenta después del segundo pulso luminoso. Sin embargo con los FPE 16:8 y 20:4, la actividad máxima sufre un brusco cambio con respecto a la dirección en que se venía dando (ver figura 10) de tal manera que el acocil muestra ahora una actividad máxima, a pesar de sus hábitos nocturnos, hacia las 14 horas del día. Más aún, esta actividad no se lleva más a cabo después del segundo pulso, como se presentaba hasta el FPE anterior sino que se da entre el primero y el segundo de los pulsos luminosos (figura) lo que significó que en algún momento el animal dio un "salto de fase" con respecto a las etapas previas.

## DISCUSION

El modelo experimental con el que se trabajó muestra grandes ventajas aunque también tiene algunas desventajas. Entre las ventajas destaca el que el acocil es un animal del que se obtienen fácilmente registros a largo plazo, ya que suele sobrevivir aun en condiciones alejadas de lo que se considera óptimo sin que ello afecte, de manera detectable, su capacidad de respuesta. Evidentemente, esta gran resistencia del acocil resulta muy valiosa para registrar y manipular cualquier ritmo circadiano. Otra ventaja de nuestro modelo experimental es la relativa facilidad, desde el punto de vista técnico, para obtener y registrar la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales por medio del electrorretinograma, lo que aunado al hecho de que en éste no hay otra participación ajena a la de los fotorreceptores mismos, asegura una relativa facilidad para interpretar los resultados en forma adecuada.

Entre las desventajas, destaca, por otra parte, el hecho de que el ritmo circadiano que se analiza es un ritmo que se obtiene justamente de estructuras fotosensibles. Si se considera que la luz es la señal externa de la que se propone que posee la mayor fuerza como señal sincronizadora, es inevitable utilizarla cuando se quiere estudiar el fenómeno de la sincronización, pero no es fácil interpretar sus acciones sobre el ritmo de amplitud del ERG, ya que éstas pueden quedar enmascaradas por la evidente e inmediata acción que tiene la luz sobre las células fotorreceptoras. Es probable que por esta razón, no hayamos encontrado en la literatura a nuestro alcance, muchos trabajos en los que se analice la participación de la luz en sistemas similares, aunque, por otra parte, quizá también sea importante hacer notar que en realidad hay gran escasez de datos referentes a la acción sincronizadora de las señales fotoperiódicas sobre cualquier ritmo circadiano. En otras palabras, en la literatura abunda la información referente a la participación de las señales fotoperiódicas en la inducción de fenómenos únicos como la floración (Oda, 1969; Hillman, 1964; Nanda y Hamner, 1958; Nanda y Hamner, 1959; Hamner, 1940; Vince-Prue, 1981; Hamner, 1960;

Bünning, 1960; Hoshizaki y Hamner, 1969),.. la eclosión (Pittendrigh, 1966; Pittendrigh y Minis, 1964) y la diapausa (Pittendrigh y Minis, 1971; Adkisson, 1964; Saunders, 1974) , etc. fenómenos en los que se puede establecer o no la presencia de un sustrato circadiano para que tales señales fotoperiódicas actúen, pero casi no hay información relativa a la acción de las mismas señales sobre ritmos circadianos correspondientes a actividades que los organismos desarrollan constantemente, a excepción del trabajo sobre actividad de vuelo de los mosquitos de Taylor y Jones (1969).

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo confirman la existencia de un ritmo circadiano en la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil. En efecto, el registro del electrorretinograma a largo plazo y en condiciones ambientales constantes, pone de manifiesto la presencia de cambios periódicos en la amplitud del ERG con valores cercanos a 24 horas, así como una coincidencia de la fase de mayor amplitud durante la noche y una relación entre los periodos de actividad y de reposo (relación  $\alpha:\rho$ ) mayor de 1, características todas ellas que corresponden al ritmo circadiano de un animal nocturno (Aschoff, 1960). (Figura 2).

Una vez comprobada la existencia del ritmo circadiano del ERG se está en condiciones de someter a la prueba experimental su capacidad para ajustarse a las condiciones ambientales que se le impongan, sabido como es que una característica esencial de los ritmos circadianos es la de ser sincronizados por señales externas, en particular, por la alternancia de periodos de luz con periodos de oscuridad. Fue por ello que los acociles se colocaron bajo distintos regimenes de luz y oscuridad (los fotoperiodos completos, FPC, seguidos de los correspondientes fotoperiodos esqueleto, FPE). Un hecho que reviste particular importancia es el que la luz siempre se haya encendido a la misma hora , lo que significa que al acocil siempre le "amanece" a las 7 de la mañana. Un poco más adelante se discutirá el efecto que tuvo esta maniobra experimental así como una posible interpretación del mismo.

En todos los casos se comprobó el grado de ajuste que

muestra el ritmo circadiano a las distintas fases de luz y oscuridad que le son aplicadas (ver figuras 3 a 9), tomando como referencias básicas los cambios de periodo, de relación  $\alpha:\rho$  y de amplitud relativa que muestra el ritmo. Sin embargo, es necesario hacer una aclaración importante referente al significado de este ajuste ya que el ritmo circadiano con el que se trabaja se registra de estructuras sensibles a la luz como son los fotorreceptores visuales. Esto significa que siempre que haya luz en el ambiente se tiene derecho a esperar que la amplitud del ERG sea baja, y que cuando haya oscuridad ésta se incrementa lo que, evidentemente, puede enmascarar la posible participación de la luz en los fenómenos de sincronización del correspondiente ritmo circadiano (Aschoff y von Goetz, 1988). El criterio que se aplicó para distinguir entre los cambios de amplitud del ERG debidos a la sensibilidad a la luz propia de los fotorreceptores o a una verdadera sincronización del ritmo circadiano a la frecuencia de la alternancia luz-oscuridad, consiste en medir los efectos de los FPC y de los FPE sobre las características del ritmo circadiano no sólo durante los días en que son aplicados, sino también una vez que el animal ha sido regresado a condiciones ambientales constantes. Es decir que en el caso de que los FP hubieran actuado como señales sincronizadoras tendríamos derecho a esperar que el organismo retuviera o "recordara" los efectos de la aplicación de los FPs a los que se vio recientemente sometido. Otro criterio para detectar una posible acción sincronizante de los FPs, particularmente de los FPE, se basa en la naturaleza misma de éstos. En efecto, cuando se aplica un par de señales luminosas de corta duración al principio y al final de lo que correspondería al tiempo de iluminación del respectivo fotoperiodo completo, se produce siempre una disminución en la amplitud del ERG consecutiva al estímulo luminoso. Sin embargo el periodo comprendido entre una y otra señales luminosas es de oscuridad, lo que necesariamente lleva a un incremento en la amplitud del ERG. El criterio al que aludimos consiste en medir qué tanto aumenta el ERG durante el lapso de oscuridad entre los dos estímulos, de tal manera que si el voltaje del ERG no alcanza los valores a los que llega durante "la fase nocturna", es decir,

ya que junto con el ajuste del periodo circadiano a las 24 horas que dura cada uno de estos regimenes de luz y oscuridad, se encuentran los incrementos en la relación  $\alpha:\rho$  y en la amplitud relativa del ritmo correspondientes a la duración que tiene la fase de iluminación de los correspondientes fotoperiodos. Evidentemente, los incrementos a los que se alude son mayores con los fotoperiodos esqueleto que con los fotoperiodos completos, lo que refuerza la interpretación del seguimiento de la regla de Aschoff para los animales nocturnos, por parte del acocil. También en estos dos casos se debe destacar el hecho de que con todo y que el ajuste a los FPC y FPE es muy claro, el ritmo parece expresarse en forma independiente de las condiciones de iluminación y seguir su propia trayectoria ya que es frecuente observar caídas en la amplitud del ERG durante las fases de oscuridad e incrementos en la misma durante las fases de iluminación este hecho es particularmente evidente en los experimentos con FP 11:13 en los que se ve con toda claridad un aumento en la amplitud del ERG inmediatamente después de la aplicación del estímulo luminoso, aumento que persiste hasta en momento en que vuelve a aplicarse el siguiente estímulo. A pesar de este aumento del ERG en la oscuridad comprendida entre las dos señales que delimitan el FPE el acocil está en etapa de reposo ya que la amplitud del ERG queda claramente por abajo de la que se obtiene durante el periodo de oscuridad propiamente dicho. Un hecho que llama la atención de los registros de los acociles estimulados con estos dos fotoperiodos, una vez que han regresado a oscilación libre, es la tendencia del animal a ir cambiando su fase de actividad máxima hacia las horas del día, como si fuera modificando poco a poco sus hábitos de nocturnos a diurnos. No es fácil dar una interpretación clara a este hecho y sólo lo consignamos por ahora, para regresar a él un poco más adelante.

Los fotoperiodos completo y esqueleto 12:12, son los fotoperiodos ante los cuales el comportamiento del sistema circadiano se aproxima más a lo que se espera de un ritmo endógeno totalmente sincronizado por una señal exógena, es decir, que no sólo su periodo es exactamente de 24 horas, sino que su relación  $\alpha:\rho$  es de 1 y la amplitud relativa del ritmo no difiere

mayor cosa de los valores que muestra en oscilación libre (si se excluye la caída del ERG asociada con la entrada del estímulo luminoso). Su actividad máxima coincide con las horas comprendidas entre la 17 y las 6 horas y la mínima se presenta entre las 7 y las 17 horas. Sólo la presencia de oscilaciones de alta frecuencia sobrepuestas en la actividad de 24 horas, así como la tendencia a que se presente gran nivel de actividad una vez que se ha terminado la aplicación de cada una de las dos horas de iluminación correspondientes al FPE, acusan un cambio entre lo que sería un ritmo circadiano bien ajustado a una señal externa y la expresión de un ritmo circadiano en oscilación libre. Un hecho que cabe la pena resaltar de estos resultados es el que se refiere a las características que muestra el ritmo circadiano una vez que el animal ha regresado a las condiciones constantes de iluminación (que en todos los casos fue de oscuridad constante). En este caso el animal retiene las características que muestra su ritmo circadiano durante la estimulación fotoperiódica previa en lo que se refiere al periodo y la relación  $\alpha:\rho$ . Sólo el nivel de actividad muestra el aumento que se esperaría de un animal nocturno colocado en oscuridad. Estos cambios mínimos durante y después de la aplicación de los FPC y FPE 12:12 sugieren que los FP 12:12 representan una condición externa óptima para la sincronización de los ritmos circadianos. En línea con esta interpretación está el hecho de que durante el regreso a la condición de oscilación libre el animal parece "recordar" algunos fenómenos que se presentan durante la aplicación de los fotoperiodos citados como es el caso de una actividad alta que se presenta a intervalos determinados coincidentes con lo que era el momento siguiente a la aplicación de la hora de iluminación de los fotoperiodos esqueleto (figura 6)

Ante los FPC y FPE 13:11 el ritmo circadiano muestra también gran estabilidad y junto con un seguimiento claro de ambos FPs, en oscilación libre sólo parece haber una pequeña reducción de la relación  $\alpha:\rho$  con respecto a la que muestra el animal durante la estimulación fotoperiódica. También en este caso el animal parece "recordar" el momento en que terminaba la estimulación con

la señal luminosa de 1 hora (la que provoca una caída del ERG seguida por un incremento en éste), ya que cuando el animal ha sido regresado a la oscuridad constante muestra cierta reducción del ERG seguida de un pequeño incremento en el mismo, a la misma hora en que esto sucedía durante la estimulación fotoperiódica. También es evidente que 13 horas de iluminación en un ciclo de 24 horas inducen cierta tendencia a una disminución en la organización que mantienen los osciladores que subyacen al ritmo del ERG, la cual se hace palpable en la condición de oscuridad constante durante la cual emergen oscilaciones de relativamente alta frecuencia sobrepuestas a las circadianas, disminuye la amplitud del ritmo y, como ya se mencionó, se reduce la relación  $\alpha:\rho$ .

Con el FP 16:8 el ERG muestra cambios en la amplitud de acuerdo con la entrada y la salida de luz (los que pueden corresponder a un seguimiento pasivo de la luz por parte de los fotorreceptores, como ya se discutió en otro momento), modificaciones en la relación  $\alpha:\rho$  cuando son transferidos del FPC al FPE, de acuerdo con lo esperado de un animal nocturno al que se le cambia la condición de iluminación de 16 horas a sólo 2 en 24, y, sobre todo, dos momentos de gran actividad durante la aplicación del FPE. El que se muestre este fenómeno que se conoce como de "biestabilidad" (Pittendrigh y Minis, 1964, 1971) se traduce, necesariamente en una alteración muy grande del sistema circadiano durante la llegada de los FPE ya que el animal parece no reconocer cuál de los dos intervalos de oscuridad (el que se da entre las 8 de la mañana y las 11 de la noche o el que hay entre las 12 de la noche y las 7 de la mañana) corresponde realmente a lo que es su tiempo de actividad lo cual lleva al acocil a presentar dos fases en las que es muy alto el voltaje del ERG. El regreso a la condición de oscilación libre muestra pequeñas alteraciones en el ritmo que sugieren una tendencia a recuperar las características esperadas del ritmo circadiano de un animal nocturno libre ya de señales exógenas que le perturban. Como es de esperarse cuando el FP es de 20:4, el ritmo circadiano se muestra altamente deformado con respecto al ajuste que muestra ante otros fotoperiodos en los que la fotofracción del ciclo de

24 horas es menor. Una de esas alteraciones es el bajo valor de la relación  $\alpha:\rho$  que se reduce notablemente durante el FPC para incrementarse hasta mostrar un valor de más de 4 cuando se pasa al acocil al FPE. De hecho en esta etapa ocurre algo particularmente importante: el acocil invierte por completo su fase de amplitud máxima y se comporta como si fuera un animal diurno ya que los valores de mayor voltaje se presentan hacia el medio día. Este hecho corresponde, en realidad a un "salto de fase" de acuerdo con la denominación de Pittendrigh (Pittendrigh, 1960; Pittendrigh y Minis, 1964; Pittendrigh y Minis 1971) y pone de manifiesto que ante la aplicación de fotoperiodos esqueleto en los que la duración de la etapa de oscuridad del inicio al término del fotoperiodo es menor que la de término de un fotoperiodo e inicio del siguiente, el animal escoge este último intervalo de oscuridad para expresar su máxima respuesta asegurando de esta manera el que sus noches tengan una "duración mínima". El poner al acocil en oscilación libre confirma las predicciones que se podrían adelantar acerca del comportamiento de un animal nocturno que regresa a la oscuridad después de haber pasado por dos etapas de sucesiva reducción de luz: inicialmente el ritmo muestra un incremento en la amplitud relativa y en la relación  $\alpha:\rho$  mientras que la oscilación libre se acompañó de un reajuste de la fase de actividad que volvió a presentarse por la noche después de que la oscilación mostró un periodo muy largo, cercano a las 32 horas.

## CONCLUSIONES

En resumen, los datos que se presentan en este trabajo permiten asegurar que en el acocil, el ritmo circadiano de amplitud de la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales: 1) es susceptible de ser sincronizado por la aplicación de señales fotoperiódicas externas en las que la duración de la fracción luminosa puede ser desde 4 hasta 20 horas; 2) es susceptible de ser sincronizado por los fotoperiodos esqueleto correspondientes a los fotoperiodos señalados en el inciso anterior; 3) durante la detección de los fotoperiodos esqueleto, el acocil cambia su fase de actividad máxima cuando recibe un fotoperiodo esqueleto en el que el tiempo de oscuridad es mayor de término de un fotoperiodo a inicio de otro que de inicio a término de un mismo fotoperiodo. El cambio de fase se suele presentar en forma de salto y asegura para el acocil que su noche tenga una duración mínima (Figura 9)

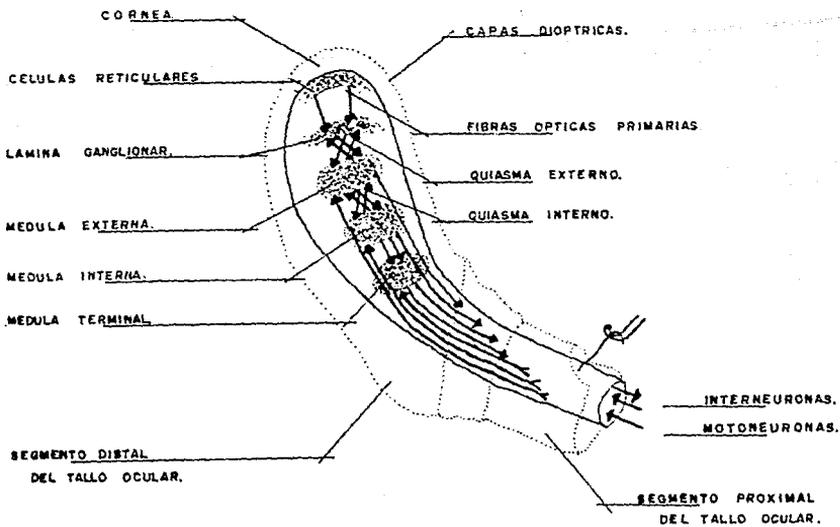


Fig. 1. Esquema que representa la estructura anatómica del ojo compuesto de un crustáceo, así como la relación entre sus diferentes elementos estructurales.

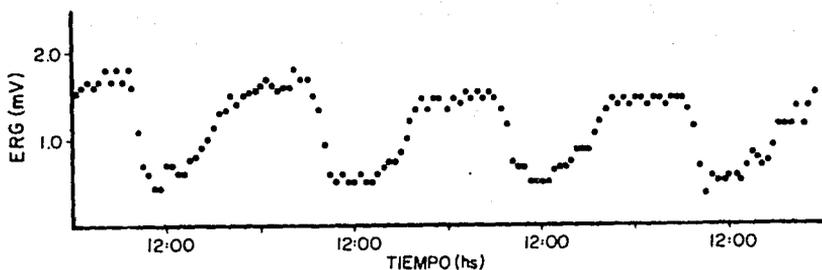


Fig. 2. En esta figura se muestra un registro a largo plazo de la actividad electroretinográfica del acocil. Se representa el curso temporal de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (ERG), durante 5 días consecutivos, en condiciones constantes de oscuridad y temperatura ( $13 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). El eje de las ordenadas corresponde al valor de la amplitud del ERG en milivoltios (mV) y el eje de las abscisas al tiempo externo (en horas).

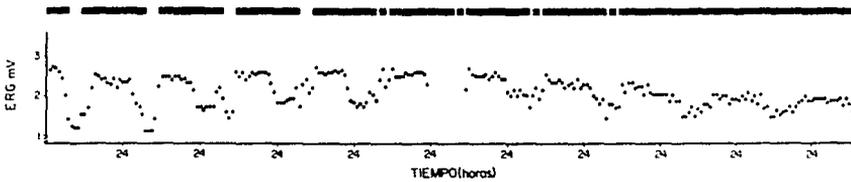


Fig. 3. Se observa el curso temporal del ritmo circadiano del ERG bajo condiciones de sincronización con el fotoperiodo completo (FPC) 4:20, representado por espacios claros (luz) y barras oscuras (oscuridad) ,seguido del fotoperiodo esqueleto correspondiente representado por dos líneas claras (que indican 1 hora de luz cada una) separadas por un espacio oscuro que señala la oscuridad; con una duración de 3 y 4 ciclos respectivamente. La barra oscura continua indica la condición de oscilación libre (oscuridad).

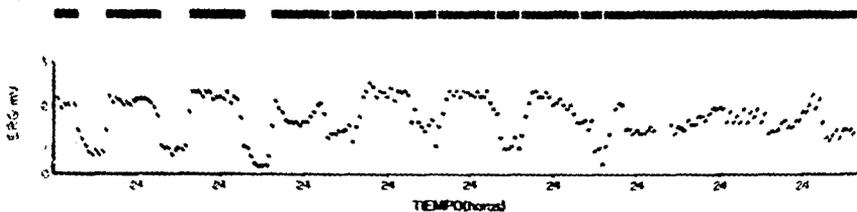
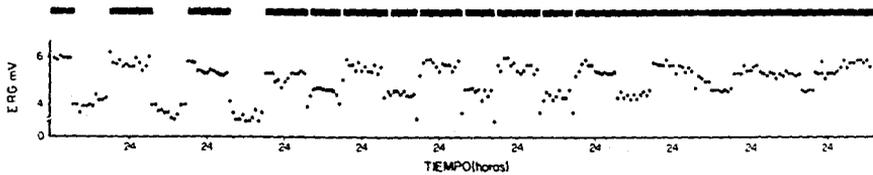


Fig.4. Corresponde al registro del ERG bajo el efecto de la sincronización con el fotoperiodo 8:16 y el fotoperiodo esqueleto correspondiente.



**Fig. 5.** Se representa la sincronización con el fotoperiodo completo 11:13, seguido del correspondiente fotoperiodo esqueleto y finalmente la oscilación libre.

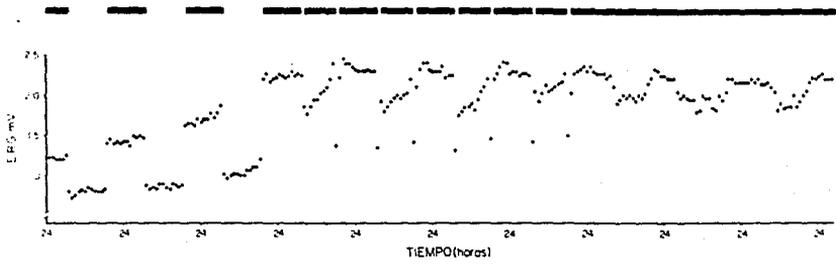


Fig. 6. En esta figura se representa el efecto del fotoperiodo completo 12:12 ,se observa claramente la tendencia del nivel de actividad a incrementarse durante esta fase aunque se mantiene constante durante la aplicación del FPE correspondiente.

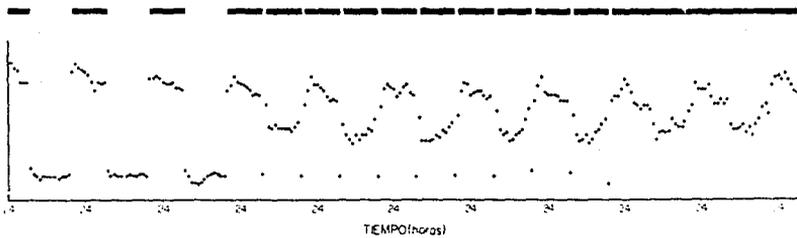


Fig. 7. Efecto de la sincronización con el FPC 13:11 y su correspondiente PFE seguido de oscilación libre. Se puede comprobar que existe un alto grado de sincronización con el FPC y que se mantiene durante el PFE.

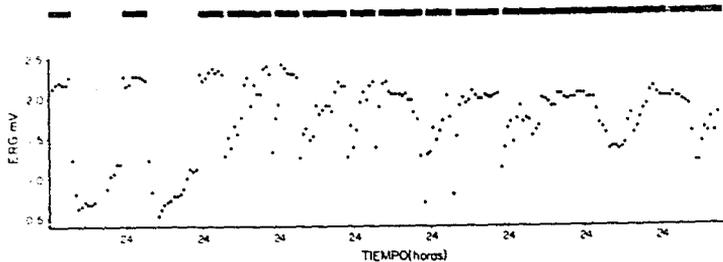


Fig. 8. Sincronización con el fotoperiodo 16:8. Se observa que a pesar de ser sincronizado al periodo de 24 horas hay una clara tendencia en el nivel de actividad a aumentar desde el inicio de la iluminación. Durante el FPE en el primer ciclo hay una clara ambigüedad en cuanto a la fase de máxima actividad que solo se puede distinguir hasta el tercer ciclo, quedando ahora definida en el espacio mayor de oscuridad.

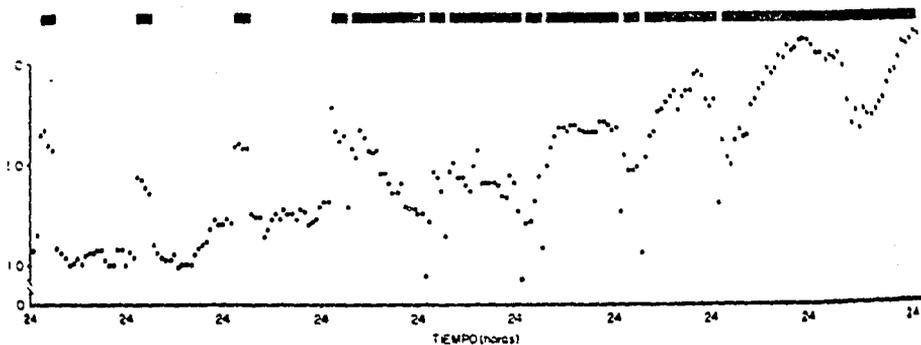


Fig. 9. Corresponde a la sincronización con el FPC 20:4. Las características señaladas para la fig. anterior son aquí todavía más marcadas, el periodo de actividad está muy reducido ( $\alpha:\rho=4$ ). Durante el FPE el reajuste del ritmo es más rápido presentándose la inversión de la fase de actividad hacia el espacio mayor de oscuridad desde el segundo ciclo, con una tendencia marcada a incrementar el nivel de actividad.

tiempo externo (hora del día)

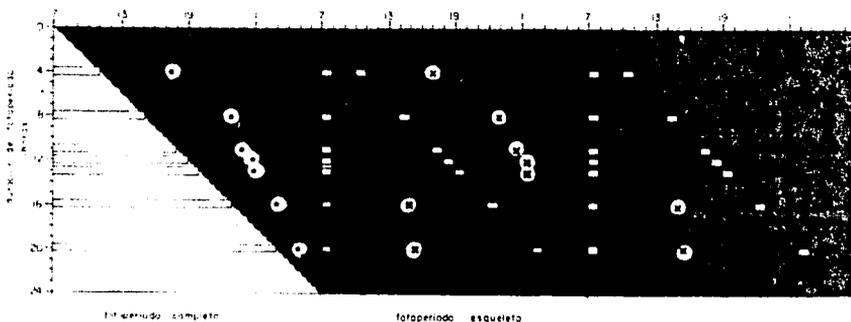


Fig 10. Representa a manera de resumen los resultados descritos en las figuras anteriores. Se incluye solamente el promedio de la fase de máxima actividad del ritmo durante la aplicación del FPC (círculos blancos con un círculo oscuro en el centro) en la parte izquierda de la figura y la fase de máxima actividad durante la aplicación del FPE (círculos blancos con una cruz en el centro) en la parte central y derecha de la figura. De aquí se desprende la equivalencia de los fotoperiodos esqueleto con respecto a los FPC hasta el fotoperiodo 13:11 y el "salto de fase" para los fotoperiodos mayores que permite ajustar el ritmo hacia la noche subjetiva mayor.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Adkisson, P. L.,(1964). Action of the photoperiod in controlling insect diapause. *Amer. Nat.* 98: 357-374.

Aréchiga, H. and Wiersma, C. A. G.,(1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.*1, 71-85.

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

Aréchiga, H. y B. Fuentes-Pardo, (1974). Influencias hormonales sobre el sistema nervioso del invertebrado. En: Simposio sobre problemas actuales de la Fisiología. Editado por la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. pp. 261-285.

Aréchiga, H., B. Fuentes-Pardo and Barrera (1973). Circadian rhythms of responsiveness in the visual system of the crayfish. En: Sálánky.(Ed.), *Neurobiology of invertebrates.*Tihany, Hungary. pp. 403-421.

Aréchiga, H.,B. Fuentes-Pardo and Barrera-Mera, (1974). Influence of retinal shieldings pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latino Amer.* 24: 601-611.

Aschoff, J.(1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. En : *Biological clocks.* Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., 25: 11-28.

Aschoff, J.(1989). Temporal orientation: circadian clocks in animals and humans. *Anim. Behav.*, 37: 881-896.

Aschoff, J. and von Goetz, C., (1988). Masking of circadian activity rhythms in hamsters by darkness. *J. Comp. Physiol.* 162 A: 559-562.

- Bennett, R., (1924). The migration of the retinal pigment in crustaceans. *J. Exp. Zool.* 40: 381-384.
- Bennett, R., (1932). Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. *Physiological Zool.* 5: 65-72.
- Bullock, T. H. and Horridge, G. A., (1965). Structure and function in the nervous systems of invertebrates, Vol. II. San Francisco: Freeman.
- Bünning, E., (1960). Opening address: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. On Quant. Biol. 25: 1-9.
- Bünning, E. (1931). Untersuchungen über die autonomen tagesperiodischen Bewegungen der primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. *Jb. Wiss. Bot.*, 75: 439-480.
- Bünning, E. (1936). Die endonome tagesrhythmitz als grund lage der photoperiodischen reaktion. *Ber.deutsch. bot. Ges.* 54:590.
- Bünning, E., (1960). Circadian rhythms and the time measurement in photoperiodism. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 25: 249-256.
- Day, M. F., (1941). Pigment migration in the eye of the moth *Ephestia kuchanniella* Zeler. *Biol. Bull.* 80: 275.
- DeCoursey, P.J., (1960). Phase control of activity in a rodent. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 49-54.
- Exner, S., (1891). Die pysiologie der fecettirten augen von krebsen und insecten. Leipzig und Wien Deuticke. (citado por Bullock y Horridge, 1965).
- Fanjul-Moles M. L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. and Fuentes-Pardo, B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A: 213-219.

- Fuentes-Pardo B. and Inclán-Rubio V., (1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 68 A: 477-485.
- Fuentes-Pardo B. and Ramos-Carbajal J., (1983). The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74 A: 711-714.
- Fuentes-Pardo B., Hernández-Falcón, J. and Nogueron, I. (1984). Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty four hour cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 723-727.
- Fuentes-Pardo, B. and Moreno-Sáenz E. (1986). Effect of polarized light on the ERG circadian rhythm in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A: 307-310.
- Fuentes-Pardo, B. and Inclán-Rubio, V. (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. I. synchronization of the erg and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A: 523-527.
- Fuentes-Pardo, B. and Moreno-Sáenz, E. (1988). Action of deuterium oxide upon the ERG circadian rhythm in crayfish *Procambarus bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 90A: 435-440.
- Hamner, K.C., (1940). Interrelation of light and darkness in photoperiodic induction. *Bot. Gaz.* 101: 658-687.
- Hamner, K. C., (1960). Photoperiodism and circadian rhythms. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 269-277.
- Hamner, K. C. and Takimoto, H. (1964). Circadian rhythm and plant photoperiodism *Amer. Natur.* 98: 295-322.

- Hasting, J. W., (1960). Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 131-143.
- Hellbrügge, T., (1960). The development of circadian rhythms in infants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 311-323.
- Hernández-Falcón, J., Moreno-Sáenz E. Fariás J.M. and Fuentes-Pardo B., (1987). Role of the sinus gland on crayfish circadian rhythmicity. I. Pseudopupil circadian rhythm. Comp. Biochem. Physiol. 87 A :111-118.
- Hillman, W.S. (1964). Circadian rhythms and the response of *Lemna perpusilla* to skeleton photoperiods. Amer. Natur. 98: 323-328.
- Hoshikazi, T. and Hamner K. C. (1969). Interaction between light and circadian rhythms in plant photoperiodism. Photochem. Photobiol., 10: 87-96.
- Kleinholz, L.H., (1961). "Pigmentary effectors". En: Waterman, T.H. (Ed.). The physiology of crustacea. Acad. Press. New York. II: 133-169.
- Krebs, W., (1972). The fine structure of the compound eye of *Astacus fluviatilis*. Z. Zellforsch. 133: 399-414.
- Loockwood. (1968). Aspects of the physiology of crustacea. Oliver and Boyd, Edinburg and London. 8: 242.
- Moreno-Sáenz E., Hernández-Falcón J., and Fuentes-Pardo B., (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity. II. Comp. Biochem. Physiol. 87 A : 119-125.
- Nanda, K.K., and Hamner, K. C., (1958). Studies on the nature of the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean. Bot. Gaz 120: 14-25.

- Nanda, K.K., and Hamner K.C., (1959). Photoperiodic cycles of different lengths in relation to flowering in Biloxi soybean. *Planta*, 53:45-52.
- Naka, K. and Kuwabara, M., (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 36:51-61.
- Oda, Y., (1969). The action of skeleton photoperiods on flowering in *Lemna perpusilla*. *Plant and Cell Physiol.* 10: 399-409.
- Parker, G. H., (1891). The compound eyes in crustaceans. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 21: 45-140.
- Parker, G. H., (1895). The retina and optic ganglia in Decapods, especially in *Astacus*. *Mitth. Zool. Station neapel* 12: 1-73, pl. 1-3.
- Parker, G. H., (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment cells of *Palaeomonetes*, and their relation to the central nervous system. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 30: 273-300.
- Parker, G. H., (1932). The movements of the retinal pigment. *Ergeb. Biol.* 9: 239-291.
- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia in Quantitative Biology*, 25, 159-184.
- Pittendrigh, C. S. (1965). On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: J. Aschoff (Ed.), *Circadian Clocks*. Amsterdam: North-Holland Pub. Co. Press, pp. 277-297.
- Pittendrigh, C. S. (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: A model for the photoperiodic clock. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 54: 275-307.

Pittendrigh, C. S., and Daan, S.,(1976a). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents.I. stability and lability of spontaneous frequency. Journal of Comparative Physiology. 106: 233-252.

Pittendrigh, C.S., and Daan, S.,(1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents.IV. Entrainment: Pacemaker as clock. Journal of Comparative Physiology. 106: 291-331.

Pittendrigh, C. S., and Minis, D. H.,(1964). The entrainment of circadian oscillation by light and their role as photoperiodic clocks. Amer. Nat., 98: 261-294.

Pittendrigh, C. S.,and Minis, D. H.,(1971). The photoperiodic time measurement in *Pectinophora gossypiella* and its relation to the circadian system in that species. En: M. Menaker (Ed.), Biochronometry. National Academy of Sciences Press.,Washington.212: 250.

Pittendrigh, C. S., (1981). Circadian systems : Entrainment. In: Handbook of Behavioral Neurobiology. 4 Biological Rhythms.J. Aschoff (Ed.). Plenum Press. New York 95-124.

Sánchez, J.A. and Fuentes-Pardo, B.,(1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 56: 601-605.

Saunders, D. S.,(1974). Evidence for dawn and dusk oscillators in the *Nasonia* photoperiodic clock. J. Insect Physiol. 20: 77-87.

Schallek, W., (1942). Some mechanism controlling locomotor activity in crayfish. J. Exp. Zool. 91: 155-166.

Stavenga, D. G. (1979). Pseudopupils of the compound eye. In: Handbook of sensory physiology VII/6A, Vision in

- invertebrates (Autrum, H. Ed.), pp 3576-439, Springer, Berlin.
- Sweeney, B. M., (1960). The photosynthetic rhythm in single cells of *Gonyaulax polyedra*. Cold Spring Harbor Symp. of Quant. Biol. 25: 145-148.
- Taylor, B. and Jones, M. D. R., (1969). The circadian rhythm of activity in the mosquito *Aedes aegypti* (L.): The phase setting effects of light-on and light-off. J. Exp. Biol. 51: 59-70.
- Tyshchenko, V.P. (1966). Two-oscillatory model of the physiological mechanism of insect photoperiodic reaction. Zhur. obshch. Biol. 27: 209-222.
- Vince-Prue, D., (1975). Photoperiodism in plants. McGraw-Hill. London.
- Wald, G. (1968). single and multiple visual systems in arthropods. J. Gen. Physiol., 51: 125-156.
- Waterman, T. H., (1961). The physiology of crustacea. Sense organs integration and behaviour. Vol. II. Academic Press. New York. Lond.
- Wever, R., (1974). The influence of self-controlled changes in ambient temperature on autonomus circadian rhythms in man. P. Flügers Arch. 352: 257-266.
- Welsh, J. H., (1930a). The mechanics of migration of the distal pigment cells in the eyes of *Palaemonetes*. J. Exp. Zool. 56: 459-494.
- Welsh, J.H., (1930b). Diurnal rhythms of the distal pigment cells in the eyes of certain crustacea. Proc. Nat. Sci. 16: 386-395.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Welsh, J.H.,(1939). The action of the eyestalk extracts on  
retinal pigment migration in the crayfish *Cambarus bartoni*.  
Biol. Bull. 77:119-125.

Welsh, J. H..(1941). The sinus gland 24 hours cycles of retinal  
pigment migration in the crayfish. J. Exp. Zool. 86: 35-49.