

00343
1
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MECANISMOS DE SINCRONIZACIÓN
NO PARAMÉTRICA DEL RITMO CIRCADIANO
DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA DEL ACOCIL
DURANTE LA ONTOGENIA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA ANIMAL)
P R E S E N T A
OSCAR CASTAÑÓN CERVANTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

*Abuelita:
con todo mi amor,
respeto y el recuerdo más dulce y cariñoso,
te dedico este trabajo.*

¡GRACIAS!

POR TU TIEMPO...

Mamá: Lo más valioso que tiene un ser humano es su tiempo, y tú, me lo das todo, así, sin preguntar, con toda tu fe y confianza en esta locura que compartimos. No me imagino sin ti, tu orgullo es mi alimento. Lo que escogí para mi vida lo hago porque me gusta y eso es tu enseñanza. Es fácil perder la capacidad de soñar, pero si poco a poco los sueños se van tomando realidad, sueñas más y sabes que dondequiera que estés, en cualquier tiempo y espacio, hay alguien que sueña contigo y que comparte tus logros y ambiciones. Los sueños de ayer, son hechos de hoy, hechos que sin ti, seguirían siendo sólo sueños.

POR TU ESPACIO...

Universidad Nacional Autónoma de México: Mi punto de encuentro, mi refugio, mi sangre,mi padre. De ti he aprendido tantas cosas. Me hiciste quien soy, me diste tu espacio, tu gente, tus

árboles, tus libros. Tú también me has enseñado a ser crítico, tenaz, soñador, escéptico, honesto y comprometido. Hoy, ser universitario es además de un honor, un privilegio, una verdadera fortuna, y ante ti, me comprometo a dar lo mejor de mí para honrar a mi carrera y a mi institución. No son los grados o títulos los que enaltecen a las personas, son éstas, las que con sus actos dan prestigio y verdadero valor a su profesión.

POR TU ÉTICA...

María Luisa Fanjul: En estos tiempos difíciles para los que queremos dedicarnos a la ciencia, no hay nada que pueda agradecerse más que el apoyo y la fe. Más que un guía en el desarrollo profesional, eres ejemplo de cómo ser científico y no morir en el intento, con profesionalismo, honradez y un gran espíritu de lucha. Tu labor, no sólo nos muestra el camino, además, lo hace más sencillo.

POR TUS PALABRAS...

Elsa: Desde siempre, pero especialmente en estos últimos meses, tus palabras me ayudaron a romper el silencio, a percatarme de esos pequeños detalles. Qué bella es la amistad cuando hay diálogo con las miradas, cuando hay palabras, aun sin voz.

POR TU VALENTÍA...

Carolina: Las personas valen por lo que son, por lo que se atreven a pensar, decir y hacer sin importar lo que otros piensen o digan. Al ser tú, vives y gozas tus convicciones. Tienes razón, sigue siendo tú, eso es lo más importante y tienes el valor para lograrlo.

POR TU SOLIDARIDAD...

Manuel: Qué suerte contar con alguien con quien compartir metas y aspiraciones. El camino que nos lleva al conocimiento es duro, a veces injusto, pero siempre es más sencillo andarlo cuando alguien más va hacia él con la misma pasión y esperanza.

POR ESTAR AQUÍ...

Sonia: Sin esos bellos labios sonrientes y tu delicioso café capuccino, el laboratorio sería un lugar muy distinto. Tu buen humor se contagia, inspira, alimenta, llena nuestro espacio de buenos momentos, ...se extraña. Al seguir con nosotros, alimentas la esperanza de que todavía hay personas que creen en la investigación como una profesión. No por lo que pague, sino por lo que dé y podamos darle.

POR TUS IDEAS...

Julio: Tú que todo lo sabes, y lo que no, pues no, me ofreciste siempre una salida, un nuevo enfoque, una valiosa idea. Saber transmitir lo que se sabe y siempre estar dispuesto a ayudar es de gran valor, sobre todo, cuando hay que poner orden entre tal desorden.

POR PERDONARME...

A todos los olvidados: Gracias por dispensar mi pésima memoria, pero sobre todo, muchas, muchísimas gracias por poner su granito de arena para hacer mis sueños posibles.

OSCAR CASTAÑÓN CERVANTES

MECANISMOS DE SINCRONIZACIÓN NO PARAMÉTRICA
DEL RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA DEL ACOCIL
DURANTE LA ONTOGENIA

*Este trabajo se llevó a cabo en el
Laboratorio de Neurofisiología
Comparada de la Facultad de
Ciencias de la Universidad Nacional
Autónoma de México bajo la
dirección de la Dra. María Luisa
Fanjul Peña.*

ABREVIATURAS

CCE. Conectivo circunsofágico.

CRF. Curva de respuesta de fase.

ERG. Electrorretinograma.

FC. Fotoperiodo completo.

FE. Fotoperiodo esqueleto.

LO. Luz - oscuridad.

NMT. Noche mínima tolerable.

OO. Oscuridad constante.

RALM. Ritmo circadiano de actividad locomotora.

SNP. Sincronización no paramétrica.

SP. Sincronización paramétrica.

T. Periodo del sincronizador.

TAU. Periodo del oscilador circadiano.

TC. Tiempo del oscilador circadiano.

TE. Tiempo externo.

CONTENIDO

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	5
La ritmicidad: una característica fundamental de la materia viva.	6
El estudio de la ritmicidad circadiana.	8
III. ANTECEDENTES	9
Características generales de los ritmos circadianos.	10
Sincronización.	14
El control de las oscilaciones circadianas por ciclos de luz.	15
Ontogenia de los sistemas circadianos en invertebrados.	19
El ritmo de actividad locomotora en el acocil.	22
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
V. HIPÓTESIS	30
VI. OBJETIVOS	32
VII. MÉTODOS	34
Material biológico.	35
Registro de la actividad locomotora.	35

Diseño experimental.	37
Análisis de datos.	39
Evaluación de la sincronización.	39
VIII. RESULTADOS	43
Características generales de la actividad locomotora.	44
Selección de fase.	44
Evaluación de ajuste, control de fase y sincronización.	44
Grupo I.	48
Grupo II.	48
Grupo III.	51
Ángulo de fase y sincronización.	59
IX. DISCUSIÓN	62
Evidencia de un oscilador funcional desde los primeros estadios postembrionarios.	63
Sincronización no paramétrica.	65
Relación entre la fase del oscilador y la del sincronizador.	66
X. CONCLUSIONES	71
XI. REFERENCIAS	73

resumen

*Pasó, se fue. No obstante está aquí,
pero no es el mismo, ¿o sí?
Me han dicho que nunca vuelve,
es muy orgulloso.*

Con el propósito de investigar el curso temporal de la sincronización no paramétrica del ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii*, se llevaron a cabo registros del ritmo locomotor de 45 acociles juveniles divididos en tres grupos de edad, empleando 15 animales en cada uno. La primera parte del experimento constó de un registro de entre 10 y 20 días bajo uno de tres fotoperiodos esqueleto: 12:12, 8:16 y 20:4, utilizando 5 animales de cada grupo en cada fotoperiodo esqueleto. Al terminar el periodo de registro en fotoperiodo esqueleto se continuó un registro en condiciones de oscuridad constante durante 8 a 10 días más. Los resultados indican que existe al menos un oscilador circadiano funcional encargado del control rítmico de la actividad desde los primeros estadios postembrionarios.

Conforme avanza el desarrollo, aumenta la capacidad de sincronizar, siendo más factible la sincronización a los

fotoperiodos más asimétricos. En los animales de mayor edad, fue posible la sincronización a un periodo de oscuridad de 7 horas. Desde los primeros estadios del desarrollo, *Procambarus clarkii* es capaz de establecer claramente una noche subjetiva, comportándose como un animal nocturno, por lo que es claro que el oscilador circadiano que controla el ritmo locomotor del acocil es distinto del oscilador que guía la expresión del ritmo de amplitud del electroretinograma, ya que los tiempos de maduración de ambos ritmos son distintos. Se presenta evidencia de que el pico de actividad propuesto como exógeno, pudiera ser de naturaleza endógena. Se discute la posibilidad de que la sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil sea consecuencia de la interacción de un complejo sistema de osciladores y fotorreceptores retinianos y extrarretinianos.

introducción

*No entiendo, si se ha ido
¿cómo es que sigue aquí?,
aunque, ahora que recuerdo,
siempre ha estado aquí,
quizás desde el origen,
y dicen que se quedará
cuando todos hayamos muerto.*

LA RITMICIDAD: UNA CARACTERÍSTICA FUNDAMENTAL DE LA MATERIA VIVA.

La vida es una forma especial y quizá poco probable de organización de la materia. La definición comprueba que para los biólogos es más fácil estudiar y describir la vida que definirla. Sabemos que algo está vivo por nuestra experiencia previa, reconocemos la vida cuando ésta se organiza en células, cuando el ser vivo se alimenta, se reproduce y tiene ritmos. Es curioso, pero tanto la división celular como la alimentación y la reproducción han sido ampliamente descritos como procesos rítmicos^{17,41}. Así, reconocemos a la ritmicidad como una característica fundamental de la organización biológica, tan fundamental, que está presente a lo largo de toda la escala filogenética. Evidentemente, una característica tan conservada debe ser muy importante para la vida.

Comparativamente se ha dedicado poco tiempo al estudio de los ritmos biológicos, descuido que ha retrasado el campo muchos años. Por fortuna, en tiempos recientes esta tendencia comienza a revertirse y poco a poco comenzamos a entender qué es el sistema biológico de

medición del tiempo y cómo funciona, cómo se origina y organiza.

Hoy, la naturaleza endógena y genéticamente determinada de los ritmos biológicos está ampliamente reconocida, de la misma forma en que se reconoce la influencia que sobre ellos tiene el ambiente externo. Como un agente cambiante, el medio juega un papel fundamental en los sistemas biológicos, de entre estos cambios, quizá el más predecible es el asociado a los movimientos de rotación y traslación de la Tierra, el ciclo luz-oscuridad (LO). Es precisamente la influencia del ciclo LO sobre los ritmos biológicos lo que nos ha permitido abordar aspectos fundamentales de su estudio. De la forma y eficiencia con que los ritmos biológicos se acoplan a los geofísicos puede depender la salud y quizá la vida de un organismo.

Si es importante conocer el papel del ciclo LO sobre los osciladores biológicos, estudiar sus características durante el desarrollo del organismo proporciona información sobre el establecimiento del sistema de organización temporal, es decir, sobre la forma en que ésta cambia durante la ontogenia del individuo, desde su origen

hasta la adquisición del estado adulto.

Ambos aspectos, la influencia de los ciclos LO y el estudio de la ontogenia de los ritmos biológicos pueden abordarse empleando animales íntegros, sin la necesidad de utilizar técnicas invasivas, sobre todo en ritmos de conducta, como por ejemplo, la actividad locomotora. Los estudios en ontogenia, permiten abordar el funcionamiento de un sistema sin destruirlo, sin eliminar o dañar sus partes para observar los efectos de las lesiones, y esto es muy importante si estamos interesados en la salida de un sistema que se expresa a través de una conducta.

Los sistemas biológicos que nos permiten abordar el estudio de la ritmicidad pueden ser tan complejos como un mamífero, o tan "simples" como una bacteria. No obstante, si deseamos conocer aspectos relacionados con la ontogenia de los ritmos biológicos, conviene escoger un modelo relativamente simple, cuyo ciclo de vida no sea tan corto como el de una bacteria y que a la vez represente un grado de complejidad menor que por ejemplo, el de un mamífero. Además, los aspectos neurofisiológicos de los ritmos biológicos resultan más accesibles en modelos que

comparativamente tienen menos neuronas y que en general, despliegan comportamientos mucho más sencillos. Tal es el caso de los invertebrados, especialmente, los modelos del molusco *Aplysia*, de la cucaracha *Leucophea*, de la mosca de la fruta *Drosophila* y del acocil *Procambarus*. El estudio de los ritmos biológicos en los invertebrados ha sido la base para la comprensión del mecanismo de biocronometría como uno de los pilares más importantes que la vida ha desarrollado para adaptarse a un medio cambiante, pero a la vez, y hasta cierto punto, predecible.

Todos los aspectos del estudio de los ritmos biológicos anteriormente señalados (relación con los ciclos LO, desarrollo ontogénico y despliegue de conductas en invertebrados) representan un modo de abordar el problema central del funcionamiento y carácter adaptativo de la ritmicidad, una característica fundamental de la materia viva.

EL ESTUDIO DE LA RITMICIDAD CIRCADIANA

Un modelo ampliamente utilizado para el estudio de los ritmos que se presentan una vez aproximadamente cada 24 horas (ritmos circadianos) en los invertebrados es el acocil *Procambarus clarkii*. En este sistema, el análisis de la ontogenia del Ritmo Circadiano de Actividad Locomotora (RALM) ha puesto de manifiesto que el oscilador que controla la expresión de este ritmo se encuentra presente y funcional desde los primeros estadios postembrionarios. No obstante, la ritmicidad manifiesta resulta más evidente conforme avanza el desarrollo¹². De igual forma, la capacidad del RALM para ajustarse a ciclos LO muestra cambios en la ontogenia y posibles casos de enmascaramiento que podrían estar relacionados con cambios temporales en el desarrollo tanto del oscilador como de sus vías de sincronización y salida.

Debido a lo anterior, en este trabajo se estudiaron las características del RALM durante la ontogenia del acocil *Procambarus clarkii* tanto en oscilación espontánea (OO) como bajo fotoperiodos

esqueleto (FE). Se formaron tres grupos de acociles ordenados de acuerdo a la edad y en cada uno se analizó la capacidad del ritmo circadiano de actividad locomotora para establecer relaciones de fase estables con los pulsos de luz que simularon tres fotoperiodos completos (FC): LO 8:16, 12:12 y 20:4. De igual forma, se analizaron las características del RALM tales como periodo y fase durante la oscilación espontánea observando la posible relación entre los cambios que la expresión del ritmo manifiesta durante la ontogenia y los cambios en su capacidad de ajuste a los diferentes fotoperiodos esqueleto.

antecedentes

*¿Quién sabrá de él entonces?,
¿quién se preocupará por él?,
¿quién lo maldecirá
todas las mañanas frente al espejo?,
¿quién correrá tras él
como si realmente pudiera alcanzarlo?*

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Como se mencionó, los ritmos biológicos establecen relaciones de fase estables con diferentes señales ambientales externas, esto significa que al ser liberados de éstas, pueden manifestar su propio periodo. Es precisamente esta característica la que ha permitido establecer que los ritmos biológicos son de naturaleza endógena. Cabe señalar que son los ritmos circadianos los más frecuentes y tal vez los más estudiados en la actualidad, por lo que a continuación se describen algunas de sus características más importantes. No obstante, lo aquí señalado puede también ser útil para explicar ritmos biológicos de mayor o menor frecuencia que la circadiana.

Cuando un sistema circadiano es "aislado" de claves temporales externas (fotoperiodo, temperatura, contactos sociales, ruido, etc.), expresa su propio periodo con un valor cercano, pero siempre distinto de las 24 h conocido como **TAU**. Esto significa que aun en ausencia de señales de tiempo, el ritmo persiste, indicando que no depende de dichas señales ya que está genéticamente

determinado. A esta capacidad de oscilar libremente en condiciones constantes y manifestando un periodo propio se le llama **oscilación espontánea**.

Parece probable que en el origen, la ritmicidad biológica fue solamente una respuesta automática a los cambios ambientales derivados del movimiento de la Tierra en el espacio. El fotoperiodo, quizá la variable más estable en el planeta por lo menos desde el origen de la vida, pudo favorecer la incorporación de la capacidad de medir el tiempo astronómico -en particular el ciclo de 24 horas- al genoma de los seres vivos dando como resultado lo que hoy reconocemos como ritmos circadianos. Por lo anterior, parece evidente que el ciclo de 24 horas podría ser la unidad de cómputo para los ritmos biológicos. La oscilación espontánea es la expresión fenotípica de esta historia evolutiva con un significado funcional variando, en general, los ritmos biológicos ejercen una acción adaptativa de índole anticipatorio, que optimiza la relación temporal entre el nivel de la actividad fisiológica y las condiciones energéticas ambientales².

Al permanecer aislado, el oscilador circadiano continúa funcionando, sin

embargo, la manifestación de esta oscilación espontánea pierde amplitud y termina por desaparecer después de varios ciclos. Esto no significa que el oscilador se haya detenido, ya que una vez que el ritmo se ha amortiguado por completo, la aplicación de un estímulo aperiódico provoca la reaparición de la manifestación del ritmo en fase con dicho estímulo. La pérdida temporal de la señal rítmica medida puede interpretarse como un posible desfase debido a la pérdida de acoplamiento entre el oscilador biológico y los sistemas efectores del ritmo.

Otra característica muy importante de los osciladores circadianos es su capacidad de continuar oscilando sin cambios importantes en su velocidad angular ante variaciones constantes o tónicas en la temperatura. Este fenómeno de compensación de temperatura fue observado originalmente por Pittendrigh en el ritmo de eclosión de *Drosophila*. Este consiste en que TAU se mantiene relativamente constante aun a pesar de variaciones de temperatura capaces de afectar la cinética de procesos enzimáticos, lo cual sugiere que a nivel metabólico existen sistemas específicos que compensan los efectos de la variación de

temperatura¹. Un mecanismo como éste, posiblemente evolucionó ante la necesidad de mantener una cronometría precisa, la funcionalidad y coincidencia temporal entre la fase de los diferentes ritmos y las condiciones energéticas ambientales óptimas no deben ser afectadas por cambios en la temperatura. En otras palabras, y desde una perspectiva Darwiniana clásica, un buen sistema de medición del tiempo, no debe atrasarse o adelantarse si hace más frío o más calor.

Esta relativa falta de sensibilidad ante los cambios de temperatura contrasta notablemente con la característica más importante de los ritmos circadianos que es su sensibilidad diferencial a través del ciclo de 24 horas. Si los osciladores circadianos evolucionaron ante la presión de selección que significó un ciclo LO de 24 horas, no es raro pensar que las variaciones circadianas en el fotoperiodo y en otras variables asociadas, también quedaron incorporadas en el sistema endógeno de medición del tiempo. Durante la oscilación espontánea, la sensibilidad diferencial de los osciladores circadianos puede ponerse de manifiesto ante una perturbación (p. ej. un pulso de luz) aplicada a diferentes tiempos hasta explorar todo el ciclo de 24 horas y

midiendo los cambios de fase (avances o retrasos en el tiempo de ocurrencia de un punto dado en la oscilación) algunos ciclos después del pulso. Estos cambios de fase no se miden instantáneamente debido a la presencia de algunos ciclos transitorios de longitud variable, aunque como se verá más adelante, los cambios de fase en el oscilador circadiano son instantáneos. De la relación entre el tiempo interno del organismo y los cambios de fase ocasionados por la perturbación resulta una función que se conoce como la Curva de Respuesta de Fase (CRF). Como el periodo del oscilador es distinto del periodo del ciclo LO, el tiempo externo (TE) no necesariamente corresponde con el tiempo del oscilador circadiano (TC). Si queremos conocer la sensibilidad diferencial del oscilador, debemos referir el tiempo de aplicación de las perturbaciones en TC. Esto se logra al dividir el periodo del ritmo en oscilación espontánea (p. ej. 23.5 h) entre el periodo del TE (24 h), entonces: $23.5/24 = 0.98$ h. Para este ejemplo, una hora TC es igual a 0.98 h TE. Un ejemplo de una CRF se encuentra en la figura 1.

Ahora bien, se debe distinguir entre el oscilador que maneja las fluctuaciones circádicas del organismo el

cual está directamente acoplado al ciclo ambiental de luz (el oscilador A o maestro) y sus otros (osciladores B o esclavos) osciladores secundarios que ajustan su fase únicamente a través de su acoplamiento con el oscilador A. Los transitorios observados son precisamente los ciclos que requieren los osciladores B para acoplarse nuevamente con el oscilador A, el cual ajusta su fase inmediatamente después de la perturbación. Por lo tanto, la única medida operativamente disponible del cambio de fase que se desarrolla inmediatamente después de la perturbación en el oscilador A es la CRF³⁷.

Con estas bases, queda claro que las claves temporales externas tienen un papel importante en el comportamiento de un ritmo circadiano. De hecho, para comprobar que un fenómeno rítmico está bajo el control de un oscilador endógeno, el ritmo debe manifestar además de las características ya señaladas (oscilación espontánea, compensación de temperatura y sensibilidad diferencial a través del ciclo de 24 horas), capacidad de ajustar su fase y periodo a señales temporales periódicas, de entre las cuales, la luz y la temperatura son quizá las más importantes.

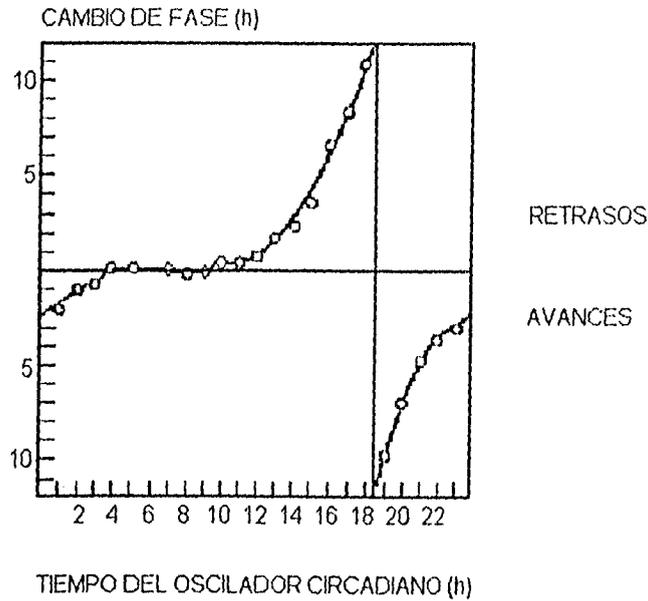


Figura 1. Curva de respuesta de fase (CRF) del oscilador circadiano que controla el ritmo de eclosión pupal de *Drosophila pseudobscura*. Los cambios de fase son consecuencia de pulsos de luz de 15 minutos de duración aplicados cada hora a través del ciclo de 24 horas. De Pittendrigh y Minis, 1964.

Así, queda claro que la ritmicidad circadiana existe independientemente de las señales externas, pero a su vez, que éstas, alteran notablemente su manifestación al imponerles su periodo. El acoplamiento entre los osciladores

circadianos y los ritmos geofísicos asociados al movimiento de rotación de la Tierra es la clave para la existencia de la organización temporal de los seres vivos.

El establecimiento de relaciones de fase estables entre los ritmos circadianos y los geofísicos ha llevado a la controversia más importante en el campo de la cronobiología. Esta se refiere a la acuñación del término "reloj biológico". Esta expresión ha sido y continúa siendo mal empleada, especialmente por algunos biólogos en la búsqueda de un reloj

maestro en algún lugar dentro del organismo³⁹. Desde un punto de vista estricto, algo que sirva para medir el tiempo, es un reloj, aunque de igual modo, un reloj implica a un relojero. Más allá de estas controversias el núcleo de la discusión está en que para algunos autores (p. ej. Aschoff y Pittendrigh) la búsqueda debe centrarse en estructuras discretas que cumplan con ciertas condiciones, como por ejemplo, posibilidad de sincronizar a cambios ambientales, capacidad de presentar ritmicidad *in vitro* y abolición de ésta tras su lesión o destrucción, mientras que para otros (p. ej. Halberg y Reinberg), se trata de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos¹. Lo cierto, es que en todos los casos, se trata del análisis de fenómenos que oscilan, por lo que para los fines de este trabajo se ha preferido emplear el término de "oscilador", ya que no se pretende demostrar ni desechar la presencia de entidades discretas funcionando como relojes, sino la capacidad de estos sistemas oscilatorios para ajustarse a ciclos de luz, así como estudiar éstas y otras de sus características durante la ontogenia.

Con todas las características antes señaladas, puede identificarse la presencia de un sistema oscilador circadiano. Una de estas características, la capacidad de establecer relaciones de fase estables con señales temporales externas, provee al sistema de un mecanismo que le permite medir el tiempo, sin el cual, los ritmos biológicos no tendrían valor adaptativo³⁷. Por lo tanto, resulta fundamental el estudio de los efectos de las señales de tiempo sobre los osciladores circadianos y de cómo éstos, utilizan la información del ambiente para mantener su propia organización temporal. En la siguiente sección se presentan los antecedentes sobre algunas de estas estrategias, como por ejemplo, la sincronización.

SINCRONIZACIÓN

La sincronización, es la capacidad de los ritmos circadianos, y de los ritmos biológicos en general, de ajustar su fase a la de fenómenos cíclicos ambientales, de tal forma que el tiempo biológico mantenga una adecuada correspondencia con el tiempo geofísico¹. Esto implica, que para cada ritmo biológico sincronizado, debe existir una variable ambiental cíclica a la cual se acople la oscilación biológica.

Para estas variaciones cíclicas en los factores ambientales, Aschoff³ acuñó el término "Zeitgeber" (dador de tiempo); Halberg y cols., acuñaron "sincronizador" y Pittendrigh³² propuso "agente sincronizante". En términos prácticos, estos tres términos son sinónimos, y se refieren a variables cíclicas como el fotoperiodo, la temperatura, los contactos sociales, el ruido, el alimento, etc. Debido a lo común de su uso, en adelante, cualquiera de estas variables será referida como "el sincronizador".

Como se mencionó, el mecanismo que permite a los osciladores biológicos medir el tiempo es una característica de gran valor adaptativo. Durante la evolución de la organización circadiana, los ciclos diarios de luz y temperatura impusieron cambios periódicos y predecibles sobre el medio interno de las células primitivas. Este orden, derivó de la variación inevitable en los coeficientes de las reacciones de los constituyentes celulares, y del cuello de botella creado por la temperatura y la oscuridad³⁵. En otras palabras, habría un tiempo preciso para algunas reacciones foto y termoquímicas, y este orden interno fue seleccionado como un programa temporal. Sin embargo, conforme la Tierra orbita al

Sol, las características de los sincronizadores varían, y por lo tanto, la señal de tiempo externo que el sistema requiere para sincronizarse debe ser lo más confiable y "libre de ruido" posible. Este sincronizador es sin duda, el ciclo luz-oscuridad, que de acuerdo con la hipótesis de Bünnig⁶ serviría no sólo como señal para medir el ciclo LO cada día, sino también el ciclo estacional. Esto significa, que las oscilaciones circadianas funcionarían también como relojes fotoperiódicos a través de la medición cotidiana de la duración del día y/o la noche. Esta hipótesis, que Pittendrigh considera esencialmente correcta^{35,37} fue el punto de partida para investigar el mecanismo por el cual la luz controla la fase (sincroniza).

EL CONTROL DE LAS OSCILACIONES CIRCADIANAS POR CICLOS DE LUZ

Aún no es del todo claro cuál es el mecanismo de acción de la luz para el control de las oscilaciones circadianas. Es claro que al menos habría dos posibles propuestas: la primera involucra una acción continua, tónica o paramétrica del sincronizador sobre el oscilador, es decir, la sincronización puede darse a través de

la acción continua de la luz sobre la velocidad angular del oscilador. De acuerdo con los modelos de sincronización paramétrica (SP), los ciclos de luz ejercen su efecto sobre el oscilador circadiano acelerándolo o frenándolo alternamente conforme la porción luminosa del ciclo cae en las regiones de avance o retraso de la CRF¹⁸. La segunda propuesta para explicar el mecanismo de acción de la luz sobre los osciladores biológicos sostiene que éstos podrían ajustarse abruptamente una o dos veces al día cuando el ambiente ofrece señales de tiempo como el crepúsculo o la aurora. Este mecanismo es conocido como sincronización discreta, fásica o no paramétrica^{8,36} (SNP). A este respecto, Pittendrigh³⁴ considera que ambas acciones pueden tener influencia sobre el oscilador. Estas propuestas proveen de explicaciones que pueden ayudar a entender la sincronización de los ritmos observados en animales de hábitos nocturnos y diurnos. En general, los animales nocturnos, como por ejemplo, el acocil, están expuestos a señales discretas de luz (SNP), mientras que animales diurnos como la mosca de la fruta, se exponen a un fotoperiodo completo (SP) con las correspondientes transiciones luz-oscuridad-luz.

No obstante, es posible sincronizar ritmos de animales diurnos bajo protocolos de SNP³⁷, así como ritmos de animales nocturnos en SP¹². Más importante aun, es el hecho de que un ritmo circadiano pueda ser sincronizado ante una sola perturbación discreta por ciclo (p. ej. 15 min de luz a 500 lx), independientemente de los hábitos del animal y del tiempo del oscilador en que se aplique la perturbación. Estas evidencias parecen sugerir, que la acción más importante de la luz para la sincronización de un ritmo es discreta. Daan⁸, señala que la influencia que pudiera ejercer la luz de una manera continua sobre la velocidad angular del oscilador sería muy poco significativa, ya que el día subjetivo, de TC 0 a TC 12 (la parte del ciclo que en estado estable sincronizado coincide con el periodo diario de luz) es frecuentemente caracterizado por su insensibilidad a la luz.

A partir de estas observaciones se plantea la posibilidad de que la luz corrija abruptamente la fase del ritmo para poder sincronizarlo cada ciclo. Es decir, un ritmo circadiano se sincroniza avanzando o retrasando su fase cada ciclo en una cantidad igual a TAU - T, donde TAU es

el periodo del oscilador que controla el ritmo manifiesto y T es el periodo del sincronizador.

Ejemplo: Suponiendo que

$$\text{TAU} = 23.5 \text{ h y}$$

$$T = 24 \text{ h}$$

$$\text{entonces } \text{TAU} - T = -0.5 \text{ h}$$

Por lo tanto, para sincronizar este ritmo, la luz debe ocasionar un cambio de fase en el oscilador retrasándolo 0.5 h cada día. Pittendrigh demostró que estos cambios de fase eran instantáneos y que estaban bien descritos por la CRF, una vez conociéndola, puede ubicarse claramente el TC en el cual, una señal sincronizadora ocasionará el cambio de fase observado. Para el ejemplo anterior, puede tomarse como referencia hipotética la CRF de la figura 1, en ella, se observa que un retraso de fase de 0.5 h, se presenta aproximadamente en el TC 12. Es decir, para que un pulso de luz aplicado cada 24 horas sincronice el ritmo circadiano en cuestión, la luz debe incidir sobre el oscilador en el TC 12 retrasándolo 0.5 horas por ciclo.

Estas observaciones sin embargo, no permiten entender cómo se sincroniza un ritmo circadiano en condiciones naturales, en donde el organismo no está expuesto a un pulso de luz breve, sino a dos (si se trata de un animal nocturno) o bien, a un fotoperiodo completo (si es diurno). Si se acepta que la acción de la luz sobre los osciladores es más bien discreta, puede explorarse la sincronización a través de la simulación de las señales de tiempo que reciben los organismos cada 24 h. Un fotoperiodo completo puede simularse empleando dos pulsos de luz en las correspondientes zonas de transición luz-oscuridad-luz, lo que se conoce como Fotoperiodo Esqueleto³⁴.

Por medio del uso de fotoperiodos esqueleto, Pittendrigh demostró que los cambios de fase evidentes en la CRF eran instantáneos, ya que el cambio de fase provocado por un primer pulso le permitió conocer exactamente el TC en el cual ese primer pulso había incidido sobre el oscilador. Si era cierto, él podría predecir el cambio de fase que un segundo pulso de luz produciría al conocer de antemano el TC en el que éste incidiría. En nuestro ejemplo hipotético, un primer pulso de luz que ocasionara un retraso de fase de 0.5

h, es decir en el TC 12 permitiría predecir que si este cambio fuera inmediato, un segundo pulso aplicado por ejemplo 3 horas después (TC 14.5) ocasionaría un retraso de fase de 3 horas (Fig. 1).

El uso de fotoperiodos esqueleto, también permitió entender cómo se sincroniza un ritmo circadiano ante dos señales de tiempo (aurora y crepúsculo) en cada ciclo de 24 h. En este caso, el cambio de fase ocasionado por el primer pulso más el provocado por el segundo ocasionan un cambio de fase (avance o retraso) que en conjunto es igual a $TAU - T$. En estas condiciones, los dos pulsos deben causar un cambio de fase de igual magnitud, pero en sentido contrario y la fase en el estado estable sincronizado es independiente del TC en que se presente el primer pulso. Explorando todos los FE posibles y todos los TC para comenzar los estímulos cíclicos se encuentra que el sistema siempre asume un día subjetivo único para un FE dado y éste siempre corresponde al intervalo más corto entre los pulsos³⁷. Esto llevó a los investigadores a plantear el concepto de *noche mínima tolerable* (NMT). Cuando la separación entre los dos pulsos de luz que constituyen el FE ofrece claramente un periodo corto y otro largo, el oscilador identifica sin

problemas al corto como el día subjetivo, y al largo como la noche subjetiva. Sin embargo, si los pulsos se van moviendo, de modo que ambos periodos de oscuridad cada vez se acercan más a la simetría, la sincronización se vuelve inestable hasta el punto en que la fase del ritmo salta, y el pulso que antes era identificado como el inicio del día subjetivo, ahora lo será como el inicio de la noche subjetiva y viceversa. A la zona en que la sincronización es inestable, pudiéndose presentar en alguno de los dos periodos de separación entre los pulsos de luz, se le llama zona de biestabilidad. Tanto la NMT como la zona de biestabilidad varían según el ritmo que se analice, y dependen tanto de TAU como de la relación avances/retrasos de la CRF.

Ahora bien, existe evidencia de que la relación de fase estable entre el ritmo manifiesto y el sincronizador, no necesariamente es prueba de sincronización. En ocasiones, el sincronizador puede actuar directamente sobre los sistemas efectores de la ritmicidad sin afectar la velocidad angular del oscilador. Este fenómeno conocido como *enmascaramiento* ha sido propuesto en sí mismo, como otra estrategia adaptativa de los osciladores biológicos²⁴,

y para distinguirlo de la sincronización, basta suspender el estímulo sincronizador y observar la fase que el ritmo presente en el siguiente ciclo. Si al desaparecer el estímulo cíclico, la fase del ritmo presenta un salto, la nueva fase evidenciará el comportamiento real del oscilador que controla ese ritmo y que se encontraba enmascarado por dicho estímulo (Fig. 2). Por el contrario, si la ausencia del sincronizador no ocasiona un salto de fase en el ciclo inmediato posterior, entonces, el comportamiento observado durante su presencia es efectivamente, sincronización.

ONTOGENIA DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS EN INVERTEBRADOS

La ontogenia, es la historia de la vida de un individuo desde la fertilización del huevo hasta la adquisición del estado adulto. El estudio de la ontogenia de los sistemas circadianos, se refiere al conocimiento de los procesos anatómicos, neurofisiológicos y neuroendocrinos implicados en la maduración y activación de estructuras y funciones que proveen al organismo de un sistema de organización temporal durante su ciclo vital. Incluye los medios por los cuales las partes del sistema surgen y se organizan, los

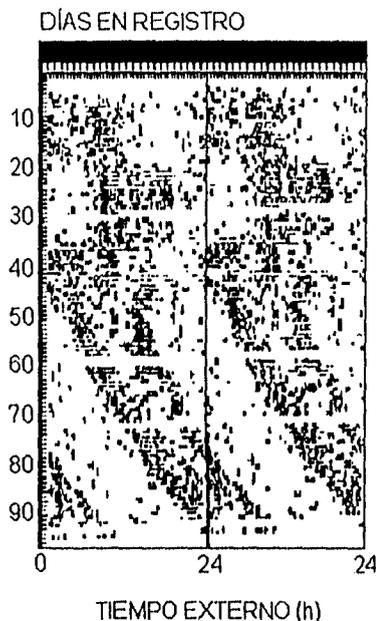


Figura 2. Enmascaramiento del ritmo de locomoción del criseto dorado inducido por un ritmo de temperatura ambiental. Se observa que al retirar el estímulo ambiental (día 35, aprox.), la fase, el inicio de actividad, muestra un salto súbito que corresponde a la fase previa al ritmo de temperatura. Modificado de Aguilar-Roblero, 1993.

mecanismos que guían esta emergencia, así como las causas y efectos de la pérdida de organización con la edad⁹.

Las distintas funciones de cualquier ser vivo se van organizando y manifestando a través del tiempo, es decir, todo el sistema biológico emerge y comienza a comunicarse poco a poco hasta alcanzar su grado de madurez, tanto en estructura como en función.

Para estudiar la forma en que surge una función ampliamente conservada en los seres vivos, es importante contar con modelos biológicos adecuados. Los invertebrados, como animales menos complejos estructuralmente resultan una buena opción. Como se mencionó, en estos animales es posible contar con sistemas nerviosos con un número menor de neuronas, y en ocasiones, de mayor tamaño que las de un vertebrado.

Al abordar el problema de la génesis de un sistema circadiano se plantea la posibilidad de que exista alguna memoria o código para que la información sobre el periodo o la fase de un ritmo circadiano persista de una generación a la siguiente. Al respecto, ha quedado plenamente demostrado que la ritmicidad es una característica endógena, y que la capacidad de generar ritmos circadianos se encuentra codificada en genes específicos⁴⁵.

Otro aspecto importante se refiere a la relación entre la aparición de un ritmo manifiesto y el desarrollo del oscilador que lo controla. En *Drosophila* por ejemplo, la emergencia del adulto desde la pupa es un evento del desarrollo controlado por un oscilador circadiano. La presencia de sincronizadores (luz y temperatura) durante el estado larvario determina la fase del ritmo de eclosión. Sin embargo, esta información no se expresa sino hasta el estado adulto, aunque se ha comprobado la presencia de una oscilación en los primeros estadios larvarios³⁹. En otras palabras, es probable que el oscilador circadiano que guía el ritmo no se encuentre acoplado con sus vías de salida, y que este acoplamiento ocurra posteriormente durante el desarrollo²². En este, como en otros ejemplos, ha quedado de manifiesto que la forma en que el (los) oscilador (es) se desarrolla (n) puede ser muy diversa. En estudios de la ontogenia del ritmo de amplitud del electroretinograma (ERG), en distintas especies de acocil, se ha demostrado que durante las primeras semanas de edad, los animales manifiestan un ritmo de amplitud de ERG con una frecuencia ultradiana con periodos de entre 15 minutos y 4 horas. Al avanzar el desarrollo, y cerca de los 30 días de edad,

ya es evidente un ritmo manifiesto con características circadianas, aunque distinto del de los adultos. La aparición gradual del ERG podría ser consecuencia del acoplamiento de osciladores ultradianos dependiente de la acción de neurosecreciones liberadas por el complejo Órgano X - Glándula Sinusal que a su vez es controlado por estructuras centrales, las cuales requerirían de cierto tiempo de maduración antes de ser funcionales¹⁰.

Si aceptamos que el sistema circadiano de organización temporal cambia durante el desarrollo, cabe ahora preguntarse qué es lo que ocasiona estos cambios, qué determina la estructura específica del sistema, qué determina, por ejemplo, que un animal sea diurno o bien nocturno. ¿Podemos asumir que la organización temporal de un adulto es propiedad emergente de un sistema determinado genéticamente, o acaso, el ambiente también influye al darle forma?. Sin duda, y al igual que sucede en el desarrollo anatómico, ambas partes dan forma final al sistema, pero hasta cierto punto, cambios en el ambiente pueden alterar el desarrollo de un oscilador circadiano. Esta es un área importante en el estudio de la ontogenia de los sistemas circadianos. La

presencia de estímulos sincronizadores durante la ontogenia proporciona evidencias de los posibles mecanismos de sincronización así como del tiempo que el sistema pudiese requerir para funcionar en forma acoplada con el ambiente.

En este sentido, se ha demostrado que la luz, puede tener efectos permanentes sobre algunas características esenciales de los osciladores circadianos. En el caso de la cucaracha *Leucophaea maderae*, para evidenciar ritmicidad circadiana no es necesario exponer a los animales a ciclos LO de 24 h., sin embargo, si durante el desarrollo, el sistema es expuesto a ciclos LO distintos de 24 h, el periodo del ritmo en oscilación espontánea dependerá de las condiciones de iluminación a las cuales haya estado expuesto durante el desarrollo²⁷.

En muchos animales, pero particularmente en los invertebrados, una característica importante es la adquisición de independencia locomotora prácticamente desde el momento del nacimiento. Debido a lo relativamente sencillo que resulta detectarla, esta conducta, ha sido ampliamente empleada en el estudio de los sistemas circadianos.

En este sentido, se han descrito algunas características de la ontogenia de los ritmos locomotores del grillo¹⁶, cucaracha^{26,28}, caracol⁵ y acocil¹², entre otros. El caso de la cucaracha *Leucophea maderae* merece especial atención, ya que se ha encontrado evidencia clara de que el oscilador circadiano que controla la actividad locomotora está diferenciado y es susceptible de sincronización desde etapas muy tempranas de la ontogenia. Ya que la fase del ritmo de actividad se ajusta a ciclos LO presentes antes de nacer, es evidente que existe en el embrión un oscilador que puede sincronizarse al menos desde una semana antes de la eclosión²⁶.

A partir de estos y otros estudios, es claro que los sistemas circadianos de los invertebrados tienen un desarrollo ontogénico variado, aunque comparten algunas características importantes. Un modelo tradicionalmente empleado para la investigación de algunos de estos problemas es el acocil. Como se mencionó, la ontogenia de ritmos como el ERG ha dado información importante sobre la hipótesis del acoplamiento de osciladores en la génesis de la ritmicidad circadiana. En relación con el RALM las primeras evidencias apuntan hacia la

presencia de un oscilador distinto que el que controla el ERG. Hasta ahora, parece claro que el oscilador que controla el ritmo de actividad locomotora está presente, y es funcional, desde los primeros estadios del desarrollo, aunque la capacidad de éste para acoplarse con sus vías de salida y con otros osciladores endógenos y exógenos parece depender de la maduración de distintas estructuras que requieren tiempos más largos para comenzar a funcionar adecuadamente¹².

EL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL ACOCIL

El ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil, ha sido objeto de estudio desde hace mucho tiempo. Desde un inicio, e incluso antes de que se comenzara a hablar de osciladores biológicos y ritmos circadianos, el mecanismo de control de la locomoción ha recibido gran atención de los investigadores. Es bien conocido, que el acocil es un animal nocturno, característica anteriormente atribuida a una supuesta intolerancia a las altas temperaturas y luz brillante durante el día. Sin embargo, en uno de los trabajos pioneros, y que describió una gran

cantidad de características de los acociles, T.H. Huxley²⁰ escribió: "En el acocil...no existe razón para dudar que toda acción tiene una causa física definida, y que lo que el animal hace en cualquier momento podría ser claramente inteligible con tan sólo conocer todas las condiciones internas y externas del caso, tal y como el funcionamiento de un reloj lo es para aquel que entienda de relojería". Desde entonces (1880) es claro que el sistema nervioso está, de algún modo, involucrado en la expresión de la actividad locomotora del animal¹⁸. Por su parte, Kalmus²¹ describió que el acocil continuaba activo durante la noche bajo condiciones de oscuridad constante y observó también que este ritmo aparentemente desaparecía al extirpar al animal los pedúnculos oculares, lo que lo llevó a concluir que estas estructuras eran los centros reguladores de la actividad rítmica del acocil.

No obstante, los pedúnculos oculares están constituidos por varias estructuras, entre ellas, los nervios ópticos y el complejo órgano X-glándula sinusal. De igual forma, hay evidencias de inhibición nerviosa de la actividad del acocil, por lo que entonces, como ahora, no está del todo claro, qué estructuras y

de qué forma controlan el ritmo circadiano de actividad locomotora del animal.

En el acocil adulto y en presencia de un ciclo LO natural, el RALM ha sido descrito como un ritmo que en algunos animales es unimodal⁴², y en otros bimodal^{29,30,31}. Aunque el tipo de ritmo es generalmente constante, el tiempo y duración de la actividad pueden variar de un día a otro, y hay casos en que un mismo animal puede presentar ambos tipos de ritmo⁴². En el acocil *Procambarus clarkii*, estas conductas locomotoras manifiestan diferente fase de inicio en relación a un ciclo LO^{29,31}. El primer pico de actividad (pico de encendido), podría ser un reflejo locomotor de evitación a la luz disparado por vía retiniana. El segundo (pico de apagado), generalmente ocurre alrededor de 30 minutos después del inicio del periodo de oscuridad y es un comportamiento guiado por un oscilador circadiano probablemente localizado en el cerebro y/o en los lóbulos ópticos¹⁶.

En la búsqueda del mecanismo que controla el ritmo locomotor, las lesiones y ablaciones han sido técnicas muy practicadas. Como se mencionó, la extirpación de los tallos oculares ocasiona

un notable incremento en la actividad del animal. Se pensó que si este efecto fuese debido a la glándula sinusal, o a alguna de sus secreciones, el ritmo debiera restituirse al reimplantarla o inyectar extractos de ella. Sin embargo, no hay cambios significativos en la actividad de animales sin tallos oculares inyectados con extracto de glándula sinusal ni en aquellos a los que se les reimplantó⁴². Si la glándula sinusal no influye directamente en la actividad locomotora del acocil, entonces el efecto observado tras la extirpación de los pedúnculos oculares podría deberse al corte de las fibras nerviosas presentes en el tallo ocular. Al lesionarlas, sin extirpar el tallo ocular o la glándula sinusal, Schallek⁴² observó el mismo incremento de la actividad locomotora que en los animales sin tallos oculares.

Con pocas excepciones, la evidencia ha demostrado que el oscilador circadiano encargado del control del RALM en el acocil, se encuentra en algún lugar en el ganglio cerebroide del animal. De acuerdo con Schallek, la actividad de los apéndices locomotores sería inhibida por fibras que pasando por el nervio óptico cruzaran la línea media del cerebro. En un trabajo posterior³¹ se observó que la ablación peduncular efectivamente ocasiona un

incremento en la actividad locomotora, sólo que en este aumento en amplitud sigue manifestándose un ritmo circadiano por varios días. Estos resultados son evidencia de al menos un posible oscilador circadiano más allá del pedúnculo ocular. Un poco más abajo, la lesión de los conectivos circunesofágicos (CCE) en el acocil *Procamburus clarkii* elimina totalmente tanto los ritmos unimodales como los bimodales, sugiriendo que los canales de información de ambas conductas locomotoras están confinados en estas fibras¹⁶.

Debido a que después de lesionar los CCE, la ablación peduncular sigue aumentando la cantidad de actividad, se ha propuesto que alguna de las secreciones del pedúnculo pudiera inhibir tónicamente la actividad de las extremidades locomotoras. La liberación rítmica de esta secreción estaría controlada por el conectivo circunesofágico, pero a su vez, podría ser mediada por fotorreceptores extrarretinianos. Prosser³⁸ descubrió que el sexto ganglio de la cadena nerviosa ventral de estos crustáceos presenta características fotorreceptoras, sin embargo, Page y Larimer³¹ demostraron que estos fotorreceptores extrarretinianos no son los

responsables de la sincronización del RALM, ya que éste aún se sincroniza (aunque de forma inestable) en animales sin tallos oculares y con cortes en los conectivos entre quinto y sexto ganglio abdominal. Del mismo modo, el corte de los conectivos entre estos ganglios no altera la expresión del RALM en oscuridad constante³⁰.

Cualquier modelo que intente explicar el control de la locomoción de este animal debe tener en cuenta la modificación de la expresión de las dos conductas (unimodal y bimodal) ante la presencia del sincronizador. En este sentido, el pico de encendido es temporalmente muy preciso, ya que ocurre con un retraso máximo de uno o dos minutos después del inicio del fotoperiodo y aparentemente es controlado vía retina²⁹. Mientras que el pico de apagado se enfazaría a través de sincronización extrarretiniana cerebral y sería controlado por un oscilador circadiano^{30,31}.

Después de varios intentos, finalmente se detectó la presencia de otros fotorreceptores extrarretinianos. Estos se encuentran en el cerebro del acocil. Sandeman⁴⁰ localizó estos fotorreceptores en el margen exterior del ganglio

cerebroide del acocil *Cherax destructor*. Estos podrían ser los centros principales, encargados de la sincronización del RALM., ya que las fibras de estas células terminan en el puente protocerebral, proyectando caudalmente a neurópilos en el proto y deutocerebro, en donde pudieran hacer sinápsis con fibras descendentes a los centros locomotores correspondientes²⁵.

Todo lo anterior sugiere que el oscilador que controla el RALM en el acocil, se encuentra en el ganglio cerebroide. Dentro de esta organización, el oscilador circadiano a través de al menos dos vías de entrada para la percepción de la luz (retina y cerebro/lóbulos ópticos) controla neuronas cuyos axones se encuentran en los conectivos circunesofágicos. Las interneuronas de estos conectivos controlarían los centros locomotores en los ganglios torácicos.

Las características del ritmo circadiano de actividad locomotora en el acocil hasta ahora descritas, corresponden a animales adultos, en los que se han llevado a cabo lesiones a los elementos presumiblemente encargados del control del ritmo observando cómo se desorganiza tras la perturbación.

Otra forma de abordar el problema, es observando la forma en que la expresión del RALM cambia durante el desarrollo. Es decir, mediante el uso de animales intactos, puede observarse la aparición y modificación gradual de las características del ritmo y a través de éstas, inferir el comportamiento del oscilador circadiano.

Con esta aproximación, Fanjul y cols., observaron que las características del RALM cambian durante la ontogenia, y que estos cambios pueden estar relacionados con la maduración gradual del propio oscilador circadiano, o bien de las vías de sincronización y/o expresión del ritmo¹². El periodo, la fase y la amplitud relativa, así como la capacidad de sincronización, son algunas de las características que pueden cambiar durante el desarrollo de un organismo⁹.

Mediante el análisis del RALM a través de la ontogenia puede explorarse la forma en que el oscilador circadiano se acopla con todos los elementos que hasta ahora se sabe, forman parte importante del sistema de organización temporal. En particular, el estudio de las características de la sincronización del ritmo durante el desarrollo podría aportar información

relevante sobre las formas de acoplamiento de los osciladores con sus vías de expresión.

planteamiento del problema

*¿Que nunca vuelve?,
no es verdad,
realmente nunca se ha ido.
No es orgulloso, al contrario,
es generoso, y a veces, muy paciente.
Siempre nos acompaña
para ser testigo de lo que hacemos.*

Como se mencionó, en algunos invertebrados se ha detectado la presencia de un marcapaso funcional y capaz de ajustarse a sincronizadores ambientales desde etapas muy tempranas del desarrollo. Se dice que la presencia de un oscilador, puede detectarse desde el momento en que aparece la función que controla. La actividad locomotora es un comportamiento presente en el acocil desde la eclosión. Durante un periodo de dos semanas los animales juveniles se mantienen adosados al abdomen de la madre hasta que adquieren total independencia locomotora. Es a partir de esta etapa que puede investigarse la presencia de un oscilador circadiano controlando la actividad rítmica del animal.

En un trabajo anterior¹² se demostró que en el acocil, el RALM en condiciones constantes, aparece como un ritmo circadiano evidente a partir de los primeros estadios postembrionarios, aunque la probabilidad de manifestación en estos estadios es baja. Al ir avanzando el desarrollo del animal la probabilidad de manifestación de este ritmo aumenta, alcanzando un 90% de probabilidad a los 140 días de edad. Sin embargo los parámetros del ritmo: periodo, amplitud y

relación alfa/rho son notablemente constantes a través de la ontogenia si se comparan con los parámetros y características de otro ritmo bien estudiado durante la ontogenia de este animal, el ritmo de amplitud del electrorretinograma (ERG)¹⁰. Lo anterior parece indicar un oscilador autosostenido responsable del RALM desde el inicio de la vida postnatal del acocil, oscilador que debido a las características de maduración de ambos ritmos podría ser diferente al responsable del ritmo de amplitud del ERG¹².

Durante la ontogenia tanto la función del oscilador como la expresión de los ritmos preceden a la capacidad de sincronización a las claves temporales externas⁹. Lo anterior parece ser cierto para el ritmo de amplitud del ERG¹⁵, una forma de analizar las características del sistema de organización temporal del acocil es investigar si el establecimiento de la sincronización del RALM sigue un curso similar al del ERG. Los mecanismos de sincronización del RALM durante la ontogenia no han podido ser dilucidados¹² puesto que este sistema presenta mecanismos complejos de enmascaramiento positivo y negativo durante y después de la utilización de

regímenes LO con fotoperiodos completos atribuidos a cambios en la sensibilidad durante el desarrollo.

Con este propósito se decidió emplear un protocolo de sincronización no paramétrica, en donde a través del uso de fotoperiodos esqueleto se puedan disminuir y evaluar los efectos del enmascaramiento. Por otra parte, el estudiar los aspectos de la sincronización discreta permite evaluar, a través del desarrollo del acocil, la interacción entre el marcapaso y los dos cambios de fase del ritmo que se deben producir durante el crepúsculo y la aurora en una especie que en estado adulto se comporta como nocturna, y que tendrá que adaptar su noche subjetiva a los cambios estacionales en el foto y escotoperiodo.

Los cambios temporales en la capacidad de sincronización del RALM podrían estar relacionados con cambios durante el desarrollo en las estructuras neurohumorales relacionadas con el acoplamiento entre el sincronizador ambiental y el marcapaso, o bien, que pudiesen funcionar como vías para la sincronización y manifestación rítmica de la actividad locomotora.

hipótesis

*Todos tenemos uno propio,
no obstante, podemos compartirlo
con todo el mundo.
En realidad como es nuestro
y no reclama, podemos hacer con él
lo que nos plazca.*

Si la capacidad de sincronización de un ritmo, es una propiedad que depende del grado de maduración del marcapaso que lo controla, entonces, al avanzar la edad de los animales, y por lo tanto, el grado de funcionalidad del sistema controlador del ritmo locomotor, aumentará también la capacidad de sincronización del mismo.

Si la aparición del RALM en oscilación espontánea¹² está representando un oscilador circadiano funcional, el ritmo locomotor debe tener la capacidad de sincronizarse a las claves temporales externas desde los primeros estadios postembrionarios, a menos que estructuras que posiblemente funcionan como vías de sincronización (fotorreceptores circadianos y vías aferentes al marcapaso) no estén maduras, o no se encuentren acopladas con el o los osciladores.

Por otra parte, las variaciones en las características del sincronizador ocasionarán cambios en la fuerza de acoplamiento entre éste y el ritmo. Lo anterior permitiría investigar las relaciones entre los sistemas de detección y las señales externas, además de algunas propiedades del sistema como la

biestabilidad, ángulo de fase, noche mínima tolerable y establecimiento de la noche subjetiva desde las primeras etapas de la ontogenia.

objetivos

*Como siempre,
solemos abusar de lo que
aparentemente tenemos en abundancia,
entonces, muchos lo desperdician,
lo gastan en tonterías. A veces,
se le culpa de lo que no hicimos o
hicimos mal.*

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la sincronización no paramétrica del ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil durante la ontogenia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar las relaciones entre el sincronizador y el sistema circadiano durante la ontogenia.
 2. Caracterizar el efecto de dos pulsos de luz (amanecer y crepúsculo) sobre la naturaleza exógena y endógena del ritmo locomotor del acocil.
 3. Evaluar la capacidad del ritmo locomotor del acocil para sincronizarse a periodos de oscuridad de duración distinta desde los primeros estadios postembrionarios.
 4. Investigar la eficiencia del uso de protocolos de sincronización no paramétrica como una herramienta para dilucidar los mecanismos de sincronización en *Procambarus clarkii*.
-

métodos

*Cuando realmente se va,
cuando ya no estará más con nosotros,
lo vemos desde lejos
con nostalgia y arrepentimiento.
A pesar de que nos aprovechamos
de su compañía y de desperdiciar
las oportunidades otorgadas,
le pedimos que se quede,
que no nos cobre tan caro
lo que hicimos o no hicimos con él.
Pero la culpa no es suya,
él no es rencoroso,
simplemente no tiene opción,
tiene que irse para siempre.*

MATERIAL BIOLÓGICO

En este trabajo se utilizaron acociles *Procambarus clarkii*. Se seleccionó un grupo de reproductores previamente colectados en el campo y mantenidos en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Los adultos se instalaron en acuarios con aireación continua y buena calidad del agua en proporción de dos a tres hembras por macho bajo un ciclo LO 12:12 con una intensidad luminosa de 200 lx y temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ para reducir el tiempo de desarrollo embrionario. Se llevó a cabo una revisión periódica de las hembras para detectar la oviposición, una vez ocurrida ésta, cada hembra ovígera fue aislada y revisada constantemente. A partir del momento de la eclosión de los huevecillos se consideró el día cero de edad. Por lo tanto, todos los animales empleados en esta investigación eclosionaron en el laboratorio bajo condiciones controladas.

Debido a las características en el desarrollo de estos crustáceos, fue necesario esperar dos semanas después de la eclosión, durante las cuales, los juveniles permanecieron adosados al

abdomen de la madre pasando por un par de mudas y adquiriendo independencia locomotora. Una vez libres, los acociles juveniles se mantuvieron bajo el mismo ciclo LO 12:12 hasta el inicio de los experimentos.

REGISTRO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

La actividad de los animales fue monitoreada mediante el dispositivo que se ilustra en la figura 3. Cada animal fue registrado en condiciones de movimiento no restringido en cámaras de actividad locomotora construídas especialmente para ello. Cada cámara de acrílico negro de 25x10x15 cm estaba provista de cuatro fotodiodos con un pico de emisión de 900 nm -lo que está lejos de la sensibilidad visual del acocil¹¹- colocados cada 5 cm sobre la pared lateral de mayor tamaño y aproximadamente a 0.5 cm del fondo de la cámara de registro. Frente a ellos, se encontraban cuatro sensores infrarrojos que recibían el haz de luz emitido por los fotodiodos respectivos. Al reptar, el acocil interrumpía el haz infrarrojo, lo que determinaba que el sensor enviara una señal hacia una computadora en donde dicha señal se capturaba como un movimiento. Cada vez que el acocil

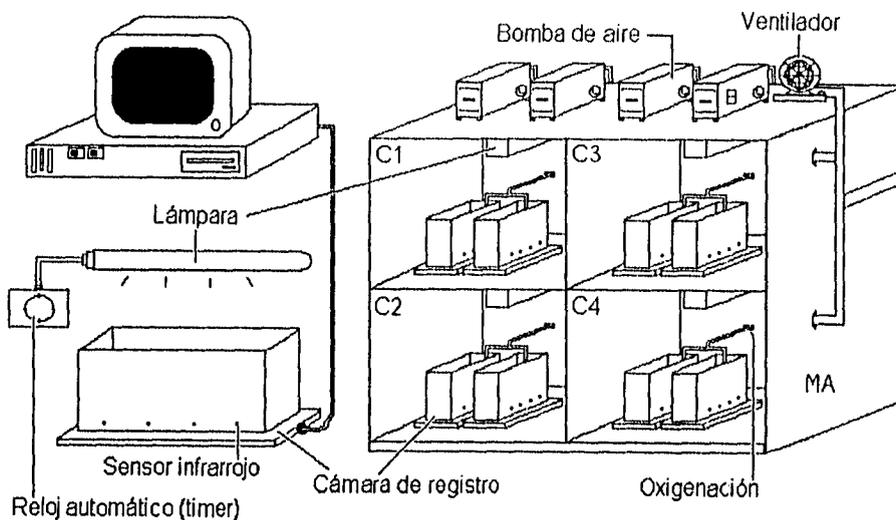


Figura 3. Dispositivo de registro de la actividad locomotora del acocil. Las cámaras de registro se colocaron por pares en los cubículos correspondientes (C1 a C4 del mueble aislante (MA).

caminaba a lo largo de la cámara de registro se contaban cuatro movimientos. Si por algún motivo el animal se detenía en el paso de un haz infrarrojo, el movimiento no era contabilizado como tal, hasta que la interrupción del haz de luz terminara. El número de movimientos de cada animal se colapsó en bloques de tiempo (bins) de 20 minutos y/o una hora.

Las cámaras de registro se colocaron por pares, en cubículos dentro de un mueble aislante con espacio para 8 cámaras (Fig. 3). Cada cubículo contaba con una lámpara de luz blanca de 9 watts (Philips PL*9) colocada a 30 cm de altura, una bomba de aire (Optima pump) con dos salidas para mangueras de plástico que se dirigían a las cámaras de registro y una conexión a un sistema de ventilación que controlaba la temperatura.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Tanto la sensibilidad espectral del ojo del acocil como la expresión de la actividad locomotora cambian durante la ontogenia^{11,12}. De estos trabajos se infiere que puede haber una etapa crítica en el desarrollo del sistema circadiano de estos animales alrededor de las primeras seis semanas de edad. Entre las 8 y 10 semanas, parece manifestarse un importante cambio de fase en el ritmo de amplitud del ERG del acocil que lo lleva a presentar finalmente las características propias de un animal nocturno. Enseguida, parece que se lleva a cabo una etapa final de maduración en donde terminan por aparecer las propiedades del sistema circadiano del adulto. No es sino hasta los 10 o 12 meses de edad que en condiciones naturales esta especie alcanza el estado adulto¹⁴. Tomando en cuenta lo anterior y con base en las fechas de eclosión, los acociles juveniles eclosionados en el laboratorio fueron divididos en los siguientes grupos de edad:

Grupo	n	edad (semanas)
I	15	2 a 6
II	15	7 a 12
III	15	13 a 18

Con el propósito de analizar las características de la sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotora, los animales de cada grupo de edad fueron registrados bajo tres fotoperiodos esqueleto (FE), correspondientes a los fotoperiodos completos LO 8:16 (extremo moderado), 12:12 (equinoecial) y 20:4 (extremo latitudinal), empleando 5 de los 15 animales de cada grupo de edad para cada FE. Cada fotoperiodo esqueleto constó de dos pulsos de luz de 50 lx y 30 min de duración (Fig. 4).

El encendido y apagado de la luz proporcionada por las lámparas ya señaladas, era controlado por un reloj interruptor automático (Micronta, Mod. E10694) de la siguiente manera:

Fotoperiodo completo simulado	Hora del primer pulso	Hora del segundo pulso	Fotoperiodo esqueleto
8:16	7.0	14.5	30':7:30':16
12:12	7.0	18.5	30':11:30':12
20:4	7.0	2.5	30':19:30':4

El uso de protocolos de sincronización no paramétrica permite estudiar la respuesta del RALM del acocil con una cantidad mucho menor de luz que la empleada en trabajos anteriores, por lo que algunos de los posibles efectos de enmascaramiento antes observados pueden eliminarse o reducirse. Al utilizar estos protocolos se tiene además otra ventaja ya que cada fotoperiodo esqueleto está abierto a dos interpretaciones. Por ejemplo, un fotoperiodo esqueleto LO 10:14, también puede ser interpretado por el animal como LO 14:10.

Antes de entrar en registro, los animales se encontraban bajo un régimen LO 12:12 (Fig. 4) en donde el fotoperiodo comenzaba a las 7:00 y terminaba a las 19:00 horas. Siempre se montó registro durante las últimas horas de la fotofase, por lo que el pulso de las 7.0 h fue la primera señal de tiempo que todos los animales recibieron, esto quiere decir que dicho pulso podría ser considerado como de amanecer.

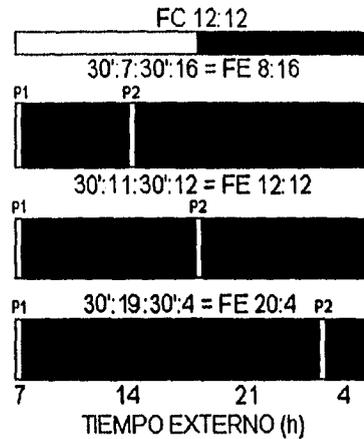


Figura 4. Protocolo experimental. Para cada fotoperiodo esqueleto (FE) se registraron 15 animales, 5 por grupo de edad. Cada pulso de luz fue de 30 min. de duración y 50 lx de intensidad. El primer pulso (P1) siempre se aplicó a las 7.0 h., mientras el segundo (P2), se aplicó a diferente hora de acuerdo con el FE correspondiente. Antes del registro, los animales se mantuvieron en un fotoperiodo completo (FC) 12:12. Después de 10-20 días en FE se continuó el registro en oscuridad constante durante 10 días más.

Una vez en la cámara de registro, los animales eran introducidos en el cubículo correspondiente del mueble aislante para comenzar el protocolo experimental bajo uno de los FE. El periodo de registro en fotoperiodo esqueleto duró un mínimo de 10 y un máximo de 20 días. Al terminar éste se continuó el registro durante 8 a 10 días más en condiciones de oscuridad constante. Durante todo el experimento, la temperatura se mantuvo controlada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) y una vez cada ocho días se oxigenó el agua y se alimentó a los animales con una rodaja de zanahoria cocida.

ANÁLISIS DE DATOS

Para analizar los cambios de actividad en el tiempo, se construyeron actogramas de doble gráfica empleando para ello el programa de cómputo TAU (Minimitter, Co., Inc. EUA). Los actogramas (Fig. 2) consisten en graficar en las abscisas la actividad de los animales a lo largo del día y en las ordenadas, los días sucesivos en registro. Se les llama actogramas de doble gráfica debido a que en las abscisas se grafica dos veces el ciclo de 24 horas, pero con un desfaseamiento

de un día. Así, en un mismo renglón del actograma está graficada la actividad para el día uno y dos, en el siguiente renglón, los días dos y tres, tres y cuatro, y así sucesivamente.

Tanto en FE como en oscilación espontánea, se calculó el periodo del RALM mediante el periodograma⁴³ de X^2 en el que se consideraron como periodos significativos, sólo las espigas por encima del nivel de significancia del 99% ($P < 0.01$) en una ventana de entre 10 y 30 horas. Para la evaluación de bimodalidad en el ritmo se utilizó la curva promedio de actividad calculada con el mismo programa de cómputo. Esta curva representa la media estadística de los datos ordenados con base en el periodo calculado por el periodograma.

EVALUACIÓN DE LA SINCRONIZACIÓN

El grado de ajuste del ritmo al fotoperiodo esqueleto se basó en el valor de periodo obtenido mediante el periodograma, en el que se consideró un valor crítico entre 23.9 y 24.1 h. Para seleccionar una fase, se marcaron y evaluaron tres posibilidades a partir de los actogramas: 1) el inicio de la actividad; 2)

la barra de actividad que representara aproximadamente el 50% de la amplitud máxima, y 3) la barra de actividad de mayor amplitud. De estas tres fases, se escogió aquella que fuese más estable, es decir, la de menor varianza. Con esta fase se calculó la regresión lineal para cada registro mediante el método de mínimos cuadrados y con la ecuación de la recta correspondiente, se obtuvo el valor de la fase para el último día en fotoperiodo esqueleto (F1). Se empleó el mismo método para el cálculo de la fase para el primer día en oscilación espontánea (F2). Entonces, para evaluar el control de fase se compararon F1 y F2 tomando además en cuenta el valor del periodograma para ambos periodos de registro. Se consideró control de fase cuando:

$$\text{TAU1} - \text{TAU2} = \text{F1} - \text{F2} \pm 1 \text{ h}$$

(ecuación 1)

donde:

TAU1 = periodo del ritmo en fotoperiodo esqueleto

TAU2 = periodo del ritmo en oscilación espontánea después del FE

F1 = fase para el último día en fotoperiodo esqueleto

F2 = fase para el primer día en oscilación espontánea

La banda de confianza de ± 1 h se determinó evaluando los límites de confiabilidad de las regresiones lineales sólo en los registros con ajuste exitoso, es decir, en aquellos en donde la relación de fase entre el ritmo y el sincronizador fue más estable. Si bien este parámetro no tiene antecedentes en los métodos empleados para evaluar control de fase, su uso resulta de la necesidad de encontrar apoyo en un análisis matemático del comportamiento del ritmo más allá de una determinación arbitraria mediante la sola observación del actograma. Adicionalmente debe recordarse que los valores de fase calculados, corresponden al resultado de una regresión lineal, y no a la observación directa de la fase en el actograma, que en ocasiones no es posible debido a la irregularidad de este ritmo, por lo que no existe una correspondencia entre la fase real y la fase calculada, hecho que hace necesario el uso de esta banda de confianza de ± 1 hora.

Ejemplo:

Se tiene el registro de un ritmo de actividad que en fotoperiodo esqueleto tiene un valor de periodo de 24.1 h (TAU1) y que en oscilación espontánea, el periodograma arrojó un valor de 23.6 h

(TAU2). Por el método de mínimos cuadrados se calculó que la fase para el último día en FE (F1) se colocó a las 20.3 h y que la fase para el primer día en oscilación espontánea (F2) se presentó a las 18.9 h.

Aplicando la ecuación 1 tenemos que:

$$\text{TAU1} - \text{TAU2} = 24.1 - 23.6 = 0.5 \text{ h}$$

$$F1 - F2 = 20.3 - 18.9 = 1.4 \text{ h}$$

Para que haya control de fase TAU1 - TAU2 debe ser igual a $F1 - F2 \pm 1$ h. En este ejemplo $F1 - F2 \pm 1$ h es igual a $1.4 + 1 = 2.4$ y $1.4 - 1 = 0.4$. Por lo tanto se considera que la igualdad se cumple, es decir, hay control de fase si la diferencia entre TAU1 y TAU2 (0.5) está entre 0.4 y 2.4 h. En este ejemplo la ecuación 1 se cumple.

Por lo tanto, para determinar la proporción de registros en donde el RALM se *sincronizó* fue necesario que además de un ajuste exitoso (valor de periodo entre 23.9 y 24.1 h) y la fase más estable, el ritmo presentara control de fase. Los casos donde el ajuste fue exitoso pero falló el control de fase fueron considerados como *enmascaramiento*. El

resto de los registros se consideró como de *no ajuste*.

La interpretación que el sistema circadiano haga de los distintos FE depende del intervalo de oscuridad en donde se encuentre la fase del ritmo y del pulso de luz que lo haya sincronizado. Para determinar lo anterior se calculó el ángulo de fase (diferencia entre la hora del pulso de luz y la hora en que se presentó la fase) para cada pulso de luz. Se estableció como el pulso sincronizador del ritmo, al más cercano a la fase, es decir, aquel con el que hubiese un ángulo de fase menor. Así mismo, el periodo de oscuridad en donde se colocó la fase fue considerado como el intervalo que el animal identificó como noche. Tanto la fase como el ángulo de fase, representan el promedio calculado para todos los días de registro en fotoperiodo esqueleto una vez que el ritmo se sincronizó, es decir, después de los ciclos transitorios. Así, a partir de los actogramas, la fase y el ángulo de fase se calcularon para cada día y después se obtuvo el promedio.

Finalmente, se intentó investigar si la fase en que incidieron los pulsos de luz que sincronizaron el ritmo determinó la forma (avances o retrasos de fase) en que éste se sincronizó. Para ello se empleó como referencia la CRF para el RALM del acocil adulto. Para la evaluación estadística de la tendencia de distribución de la fase promedio en fotoperiodo esqueleto en los ritmos que se sincronizaron se aplicaron dos pruebas de estadística circular, las pruebas de Rayleigh y Rao.

resultados

*Pero no todos lo tiran por la borda,
para muchos es el mejor amigo,
el mejor compañero,
el único que no te deja solo.
Y es que con él se puede hacer tanto,
se pueden crear cosas tan maravillosas.
¡Qué sería de esta Tierra,
de la vida en ella sin su ayuda!*

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA

La actividad locomotora del acocil *Procambarus clarkii* cambia durante el desarrollo. En general, desde edades muy tempranas los animales manifiestan ritmicidad circadiana, ya que en fotoperiodo esqueleto y oscilación espontánea, los 45 animales empleados en este estudio presentaron ritmos de actividad con periodos circadianos significativos al 99%.

La actividad se presenta en bloques que pueden tener una duración variable desde 1 hasta 6 horas. Además del periodo de reposo del ritmo (día), dentro del principal bloque de actividad (noche) hay pequeños periodos de inactividad, igualmente, hay algunos bloques de actividad presentes en el periodo de reposo. Al avanzar el desarrollo, la capacidad del sistema para ordenar y restringir la actividad a un solo periodo (noche) aumenta, persistiendo la actividad fraccionada, pero desapareciendo durante el periodo de reposo.

SELECCIÓN DE FASE

Siguiendo el método descrito para evaluar sincronización se seleccionó como fase el valor de máxima amplitud, ya que de las tres fases calculadas ésta fue la más estable. Los valores de varianza \pm error estándar calculados en los periodos de registro bajo fotoperiodo esqueleto fueron:

Fase	Var \pm error estándar
a. inicio de actividad	14.8 \pm 3.2
b. 50% de la amplitud máxima	12.6 \pm 2.9
c. valor de amplitud máxima	11.9 \pm 2.1

Con esta fase se calculó la regresión lineal por mínimos cuadrados para todos los registros tanto en fotoperiodo esqueleto como en oscilación espontánea.

EVALUACIÓN DE AJUSTE, CONTROL DE FASE Y SINCRONIZACIÓN

Para investigar el significado de los cambios observados se evaluó la capacidad de ajuste, control de fase y sincronización del RALM a los fotoperiodos esqueleto.

Como se mencionó en la sección de métodos, cuando se combinaron dos eventos (ajuste al fotoperiodo esqueleto y control de fase), se consideró que el ritmo locomotor efectivamente se había sincronizado. El número de casos de ajuste exitoso al FE (valor de periodo entre 23.9 y 24.1 h) aumentó con la edad (Tabla I), mientras que el control de fase está presente desde el primer grupo de edad y en todos los fotoperiodos esqueleto investigados (Tabla II).

Tabla I. Casos de ajuste exitoso* al fotoperiodo esqueleto.

FE	8:16	12:12	20:4	T
Grupo I	0	0	2	2
Grupo II	2	4	2	8
Grupo III	4	4	4	12
T	6	8	8	

* Valor de periodo entre 23.9 y 24.1 h. FE = fotoperiodo esqueleto. T = total

Tabla II. Casos con control de fase

FE	8:16	12:12	20:4	T
Grupo I	3	2	2	7
Grupo II	3	2	4	9
Grupo III	2	4	3	9
T	8	8	9	

FE = fotoperiodo esqueleto. T = total

A partir de estos resultados fue posible obtener el número de registros que había cumplido con las condiciones señaladas para considerar sincronización. Desde una perspectiva general, podemos decir que la sincronización aumenta con la edad. Una medida del grado de funcionalidad de las vías de sincronización del RALM es su capacidad de respuesta al estímulo sincronizador, ya sea a través de sincronización o enmascaramiento, en este estudio, el ritmo circadiano de actividad locomotora del acicil respondió de una u otra forma a la presencia del sincronizador y los casos en que no hubo respuesta (no ajuste) también disminuyeron al avanzar la edad de los animales (Fig. 5).

De estos resultados se desprende que de los 45 registros iniciales, son 15 - 33.3%- los que mostraron un valor de periodo entre 23.9 y 24.1 h, y además, control de fase, es decir, sincronización real al fotoperiodo esqueleto (Tabla III).

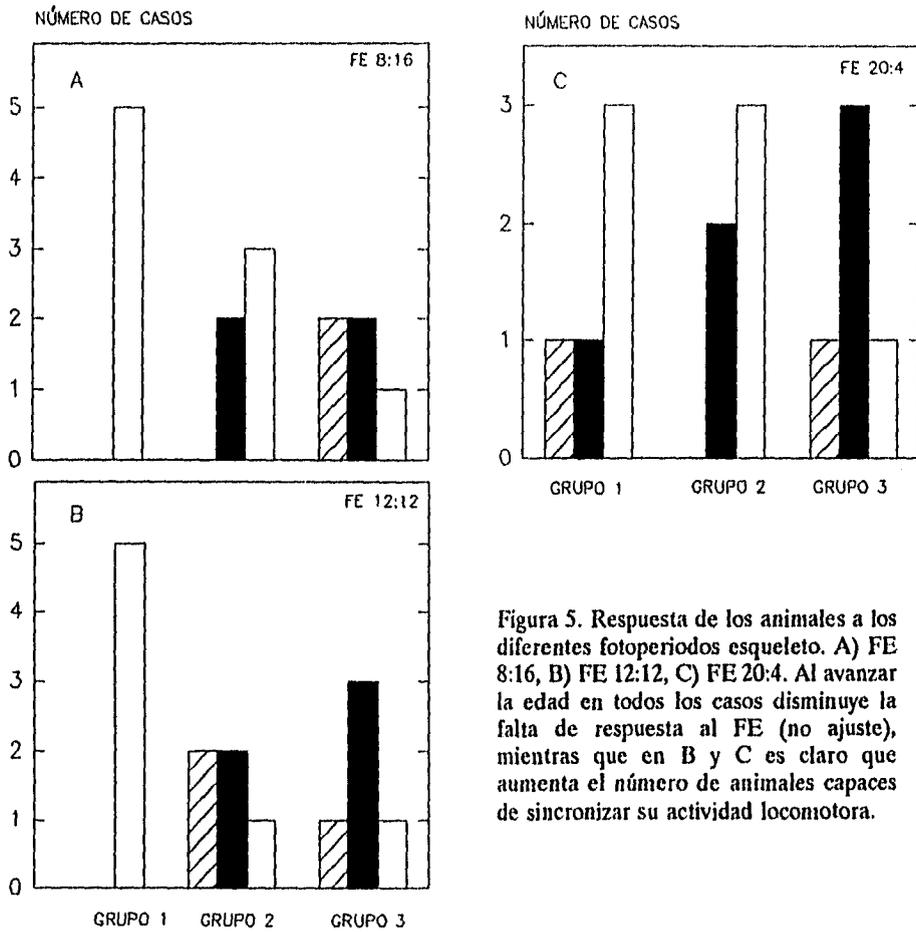
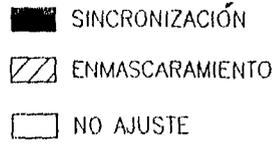


Figura 5. Respuesta de los animales a los diferentes fotoperiodos esqueleto. A) FE 8:16, B) FE 12:12, C) FE 20:4. Al avanzar la edad en todos los casos disminuye la falta de respuesta al FE (no ajuste), mientras que en B y C es claro que aumenta el número de animales capaces de sincronizar su actividad locomotora.

Tabla III. Sincronización del RALM a diferentes fotoperiodos esqueleto.

No. reg.	Gpo	FE	tau 1 (h)	tau 2 (h)	F1 (h)	F2 (h)	Fase (h)	Psip1 (h)	Psip2 (h)	noche (h)
34	1	20:4	24.0	23.9	19.7	20.6	20.3	10.7	6.2	19
7	2	8:16	24.0	24.5	14.3	12.8	15.6	-8.6	-1.1	16
9	2	8:16	23.9	25.2	10.8	11.6	15.8	-8.8	-1.3	16
21	2	12:12	24.0	24.2	4.3	4.0	3.9	3.1	-9.4	12
25	2	12:12	24.0	23.9	12.9	12.0	11.3	-4.3	7.1	11
37	2	20:4	23.9	24.7	13.4	14.4	20.5	10.5	6.0	19
40	2	20:4	24.1	22.4	20.6	21.8	20.2	10.8	6.3	19
11	3	8:16	24.0	22.0	18.0	18.1	14.1	-7.1	0.4	7
12	3	8:16	23.9	22.5	14.3	12.9	14.2	-7.2	0.3	7
27	3	12:12	24.0	25.4	16.1	14.8	18.1	-11.1	0.4	11
28	3	12:12	24.0	25.3	21.0	19.4	19.9	11.1	-1.4	12
30	3	12:12	24.0	25.1	18.9	17.0	19.0	12.0	-0.5	12
42	3	20:4	24.0	21.5	7.5	8.6	8.0	-1.0	-5.5	19
43	3	20:4	23.9	23.5	7.1	8.1	7.0	0.0	-4.5	19
44	3	20:4	23.9	25	9.9	10.4	23.8	7.2	2.7	19

tau 1=periodo del ritmo en FE, tau 2=periodo del ritmo en oscilación espontánea. Hora del primer pulso para todos los FE= 7.0 h. Hora del segundo pulso= 14.5 h para FE 8:16, 18.5 h para FE12:12 y 2.5 h para FE 20:4. F1=Fase para el último día en FE, F2=Fase para el primer día en oscilación espontánea. Fase=Valor promedio de la barra de máxima amplitud para todos los días en FE después de los ciclos transitorios. Psip1=Ángulo de fase con el primer pulso, Psip2=Ángulo de fase con el segundo pulso.

GRUPO I

En este grupo ($n = 15$), la actividad locomotora manifestó ritmicidad circadiana evidente en el 100% de los casos. No obstante, la capacidad de sincronización todavía no está claramente desarrollada, ya que como se observa en la figura 6, la luz no es capaz de poner en fase al ritmo y sólo se produce un ligero cambio de periodo en la transición a oscuridad constante. De los dos registros que en este grupo presentaron ajuste exitoso, sólo uno (Reg. 34) correspondió a sincronización real. Se trata de un animal bajo FE 20:4 en donde la fase promedio se presenta a las 20.3 horas, es decir, dentro del intervalo de oscuridad más largo. No obstante, el ritmo tiene un ángulo de fase de 6.2 horas con respecto al segundo pulso de luz y de 10.7 h con el primero, por lo que este ritmo se sincronizó al segundo pulso, es decir, al pulso de las 2.5 h. La relación de fase entre el ritmo y el sincronizador (ángulo de fase) es estable durante al menos ocho ciclos a pesar de establecerse relativamente lejos del pulso de luz (Fig. 7).

GRUPO II

En el grupo II ($n=15$), hay ocho casos de ajuste exitoso al FE. Es decir, la capacidad de respuesta al sincronizador aumenta notablemente en relación al grupo anterior. De igual forma, aumenta la capacidad de sincronización, ya que 6 de esos 8 casos de ajuste exitoso también presentaron control de fase. En total, en este grupo hay dos casos de sincronización para cada fotoperiodo esqueleto (Tabla III). Los dos registros de esta edad que sincronizaron su actividad al FE 8:16 (Regs. 7 y 9) colocaron su fase a las 15.6 y 15.8 horas, es decir, dentro del periodo de oscuridad más largo entre los pulsos de luz, estableciendo una relación de fase muy cercana con el pulso de luz de las 14.5 h. En este grupo de edad, los dos casos de sincronización al FE 12:12 establecieron el menor ángulo de fase con el primer pulso de luz, es decir, el de las 7.0 h. En un caso (Reg. 21), la fase se presentó 3.1 horas antes del pulso, y en el otro (Reg. 25), 4.3 horas después, por lo que el primero identificó como noche al intervalo de 12 horas de oscuridad, y el segundo, al de 11 horas. En FE 20:4, ambos registros sincronizados (Regs. 37 y 40) colocaron su fase promedio (20.5 y

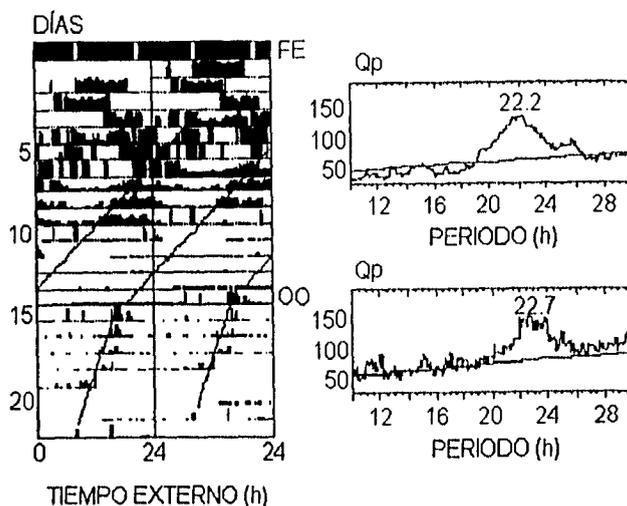


Figura 6. Registro de la actividad de un acocil del grupo I (2 a 6 semanas de edad). En FE 12:12 se manifiesta un ritmo circadiano con un periodo de 22.2 h., que no es capaz de acoplarse al sincronizador. No obstante, al terminar el FE (día 14) el ritmo continúa oscilando libremente manteniendo la fase previa y con un ligero cambio de periodo. Bloques de actividad (bins) de 20 minutos.

20.2 h), dentro del intervalo más largo de oscuridad identificándolo como noche, además, se repitió lo ocurrido con el ritmo sincronizado a este FE en el grupo I, ya que en ambos casos, el menor ángulo de

fase se estableció con el pulso de luz de las 2.5 h. La figura 8 es un ejemplo de uno de los ritmos sincronizados en este grupo de edad.

En este grupo, los componentes del ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil tuvieron un comportamiento peculiar. De todos los animales de los diferentes grupos, durante el FE, sólo el 40% de los registros (18), tuvieron un comportamiento bimodal. La bimodalidad se presentó con más frecuencia en los animales del grupo II (7 a 12 semanas) con 8 casos. En algunos casos el RALM

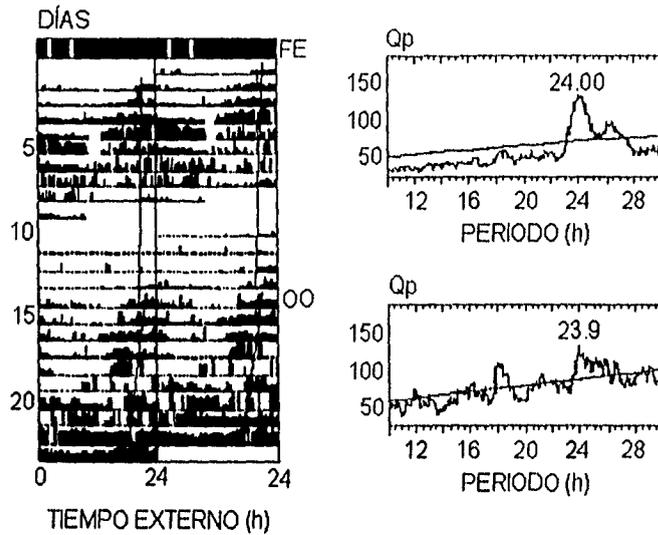


Figura 7. Único caso de sincronización en el grupo I. El ritmo locomotor estableció una relación de fase más cercana con el pulso de luz de las 2.5 h (Ángulo de fase = 6.2 h.), y la fase promedio (20.3 h.) se colocó dentro del intervalo de oscuridad de 19 horas.

se ajusta al FE sin ser bimodal, pero durante la oscilación espontánea aparecen los dos picos de actividad. La figura 9a es un ejemplo de un ritmo bimodal en FE, mientras que en la Figura 9b puede verse un ritmo unimodal en FE, pero bimodal en oscilación espontánea.

La presencia de algunos casos de enmascaramiento en todos los grupos de edad y con mayor frecuencia en el FE 12:12 se ilustra en la figura 10. Se trata de un animal del grupo II en donde al retirar el sincronizador la fase del ritmo salta. A pesar de que el comportamiento del ritmo durante el FE no es del todo claro, el periodograma muestra un pico conspicuo y estadísticamente significativo de 24.00 horas evidente al menos durante 6 ciclos en los primeros 10 días de registro.

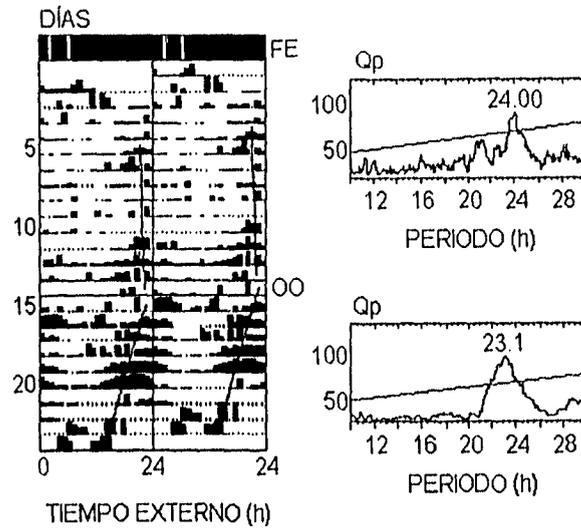


Figura 8. Sincronización del RALM al FE 20:4 en un acocil del grupo II. El ritmo se sincronizó estableciendo el menor ángulo de fase con el pulso de luz de las 2.5 h. La fase promedio (20.2 h.) se colocó en el intervalo de oscuridad de 19 horas, identificándolo como noche. En OO el ritmo mantiene la fase previa. Bins de actividad de 60 minutos.

GRUPO III

La mayor frecuencia de casos de ajuste exitoso (12) se presenta en este grupo de edad ($n = 15$). Además 9 de los 15 registros en esta edad manifestaron la presencia de un oscilador funcional. De los 12 registros con ajuste exitoso, 8 corresponden a casos de sincronización, 2 para el FE 8:16, 3 para FE 12:12 y 3 en FE 20:4 (Tabla III). Como en el grupo II, en este grupo de edad la sincronización al FE 8:16 establece una relación de fase

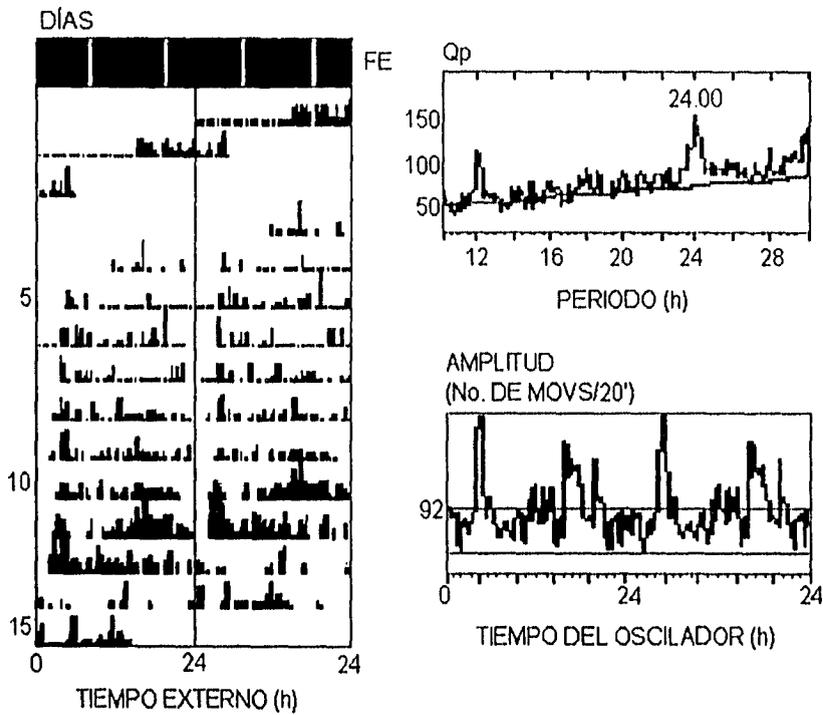


Figura 9a. Actograma del ritmo motor de un animal del grupo II (7 a 12 semanas) ajustado a un FE 12:12. En el periodograma y la curva promedio aparecen claramente dos picos de actividad. Bins de 20 minutos.

más cercana con el pulso de las 14.5 h. No obstante, en ambos casos (regs. 11 y 12), la fase se coloca ligeramente antes de este pulso -14.1 y 14.2 h-, es decir, dentro del intervalo de 7 horas (Fig. 11). Los tres casos de sincronización al FE 12:12 establecieron el menor ángulo de fase con

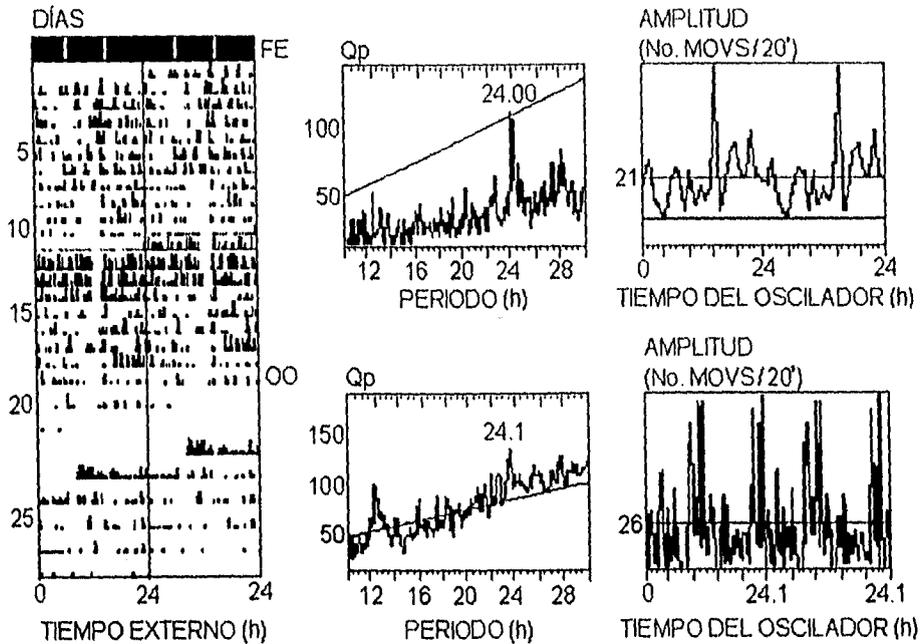


Figura 9b. Sincronización del ritmo circadiano de actividad locomotora al FE 8:16 como un ritmo unimodal. En oscuridad constante (OO) el periodograma y la curva promedio muestran un ritmo bimodal.

En otras palabras, fue evidente el fenómeno de biestabilidad consecuencia de la simetría de los dos periodos de oscuridad del FE 12:12.

el pulso de luz de las 18.5 h., aunque, la fase se movió alrededor de él para colocarse una vez dentro del periodo se oscuridad de 11 horas (Fig. 12a), y dos veces dentro del de 12 horas (Fig. 12b).

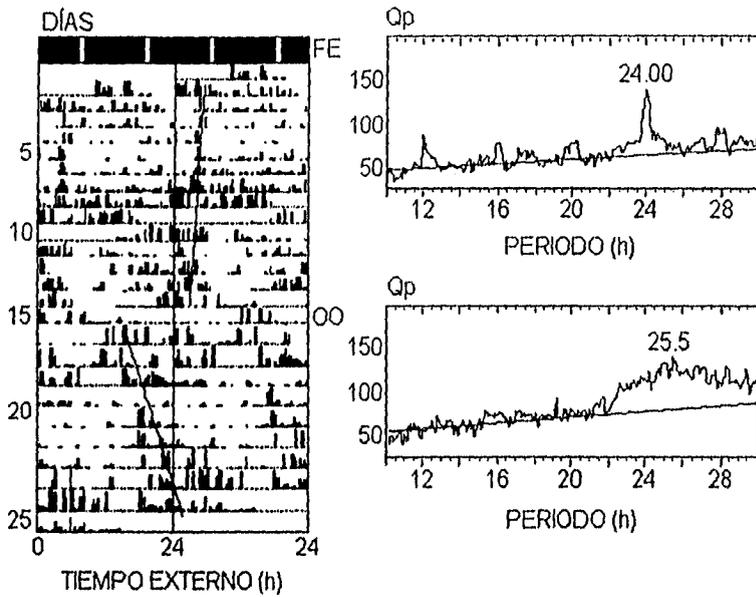


Figura 10. Enmascaramiento del ritmo de actividad locomotora del accochil en un animal del grupo III (13 a 18 semanas de edad) bajo un FE 12:12. En FE (días 1 a 14) el ritmo aparentemente se sincroniza al ajustar su periodo al del sincronizador. No obstante, al ser liberado en oscuridad constante (día 15) la fase del ritmo salta. Bins de 20 minutos.

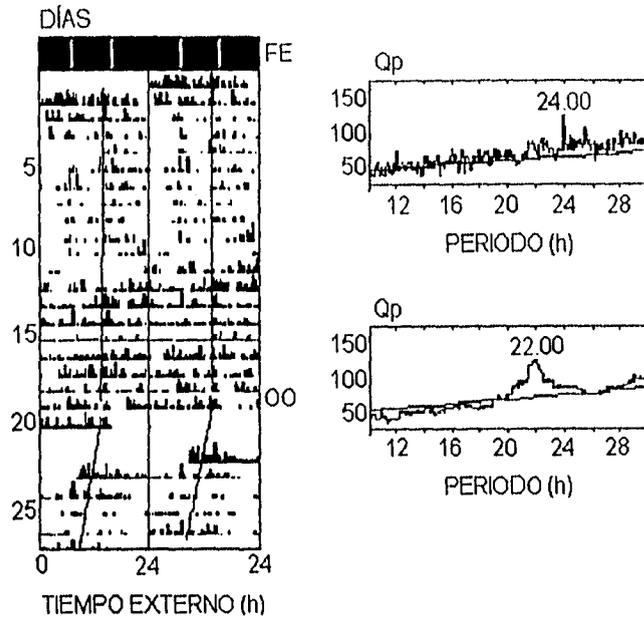


Figura 11. Ritmo de actividad locomotora de un animal del grupo III bajo FE 8:16 (días 1 a 19) y oscilación espontánea (día 20 en adelante). En FE, la fase promedio (14.2 h.) se colocó dentro del intervalo de oscuridad de 7 horas.

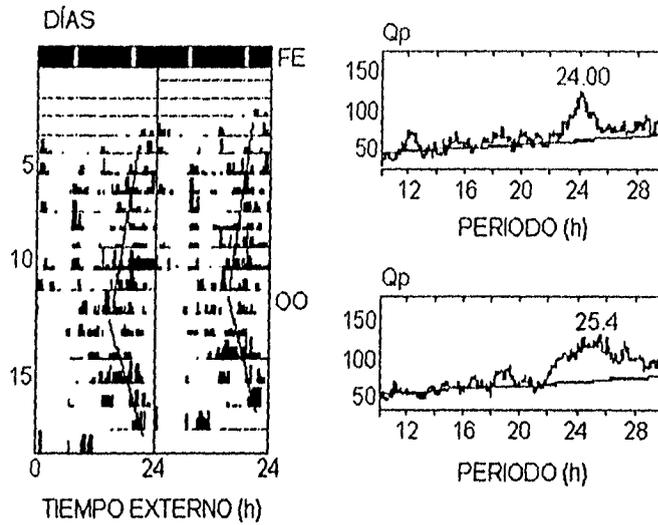


Figura 12a. Actividad de un animal del grupo III bajo FE 12:12. La fase promedio tiende a colocarse dentro del periodo de oscuridad de 11 horas. Compárese con la fase de la figura 12b. Bins de 20 minutos.

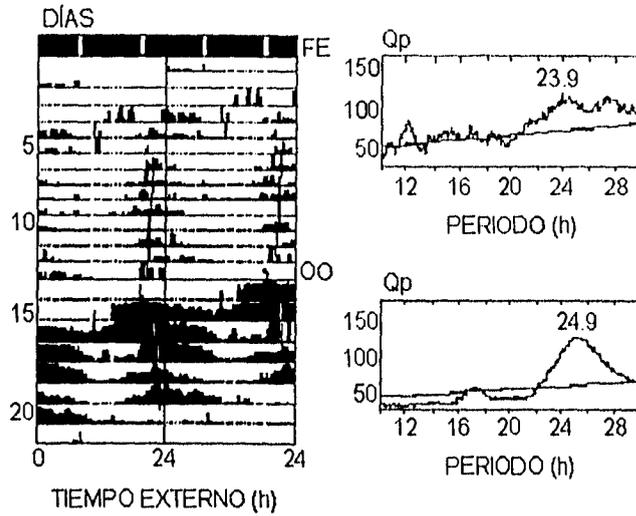


Figura 12b. Registro de la actividad de un animal del grupo III bajo FE 12:12. Bajo el mismo FE que el animal de la figura anterior, ahora la fase promedio se encuentra dentro del intervalo de oscuridad de 12 horas. Este fenómeno de biestabilidad es consecuencia de la simetría del fotoperiodo esqueleto.

Finalmente, los tres casos de sincronización del grupo III al FE 20:4 tuvieron un comportamiento distinto. Dos de ellos (Regs. 42 y 43), establecieron una relación de fase más cercana con el pulso de las 7.0, mientras que el otro (Reg. 44) lo hizo con el pulso de las 2.5 h.

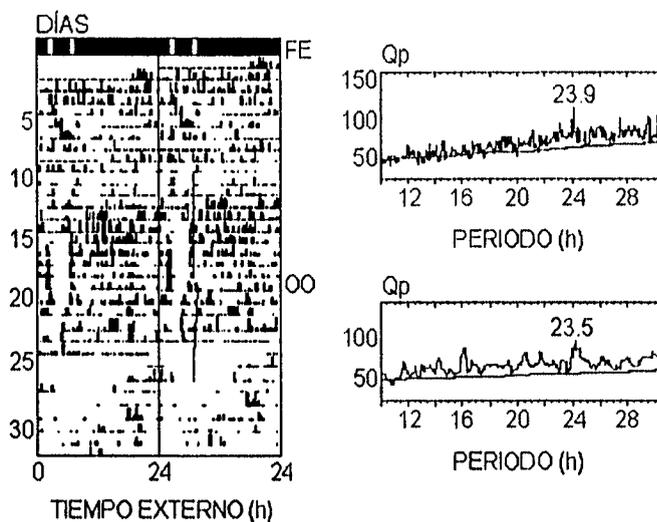


Figura 13. Ritmo circadiano de actividad locomotora sincronizado (días 13 a 19) al FE 20:4 en un animal del grupo III. El ritmo estableció el menor ángulo de fase con el pulso de luz de las 7.0 h. En oscuridad constante (día 20 en adelante) el ritmo mantuvo la fase previa durante al menos cinco ciclos.

A pesar de las diferencias señaladas en este FE, en los tres registros la noche se identificó como el periodo de oscuridad más largo, ya que la fase se colocó dentro del intervalo de oscuridad de 19 horas. La figura 13 es un ejemplo de sincronización en este grupo de edad.

ÁNGULO DE FASE Y SINCRONIZACIÓN

Tomando en cuenta únicamente los 15 registros que se sincronizaron en todos los grupos de edad, el comportamiento del ángulo de fase parece depender del fotoperiodo esqueleto presente.

Usualmente, y quizá debido a lo extremo del fotoperiodo y a la dificultad del ritmo para sincronizarse a él, bajo FE 20:4 la fase siempre se colocó aproximadamente 6 horas antes del pulso de luz más cercano, no obstante, en el grupo III, el avance promedio fue menor a una hora, lo que tal vez se deba al mayor grado de desarrollo de la vía de sincronización en este grupo de edad. La respuesta al FE 12:12 fue variable, ya que en el grupo II la fase siempre se retrasó menos de una hora con respecto al pulso que estaba más cerca de ella y en el grupo III se adelantó ligeramente. Bajo FE 8:16 la fase se retrasa en el grupo II y se adelanta en el grupo III (Fig. 14).

Por lo tanto, la distribución de la fase en los ritmos sincronizados parece ser función del tiempo de aplicación de los pulsos. En general, la fase está fuertemente asociada con alguno de los

dos pulsos de luz y generalmente establece una relación de fase mucho más estrecha con el segundo pulso de luz, es decir, con el pulso de crepúsculo.

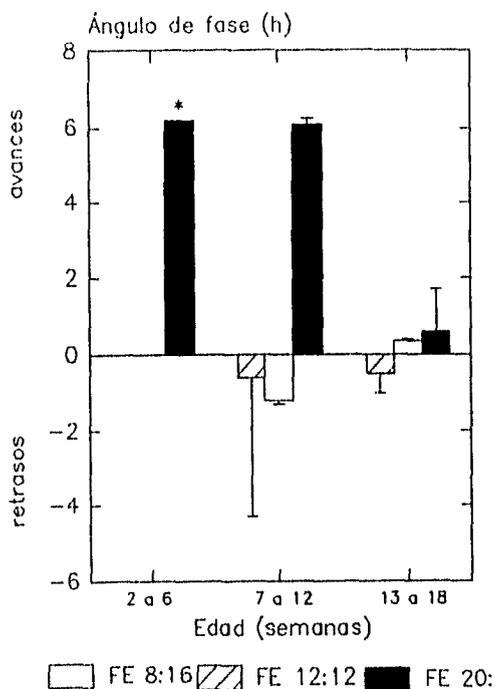


Figura 14. Ángulo de fase con el pulso de luz más cercano en los ritmos sincronizados a los FE. Las barras representan el promedio de dos o tres casos \pm error estándar. *Único caso de sincronización en el grupo I.

Sólo cuatro registros (21, 25, 42 y 43) colocaron su fase más cerca del pulso de amanecer (7.0 h). Estas diferencias se evaluaron por medio de estadística circular aplicando la pruebas de Rayleigh y de Rao. La prueba de Rayleigh para evaluar la tendencia de la fase para dirigirse hacia una dirección específica dentro del ciclo de 24 h señaló que la muestra no difiere significativamente de una distribución aleatoria, es decir, que no hay una dirección preferida ($r=0.3$, $P>0.05$). Por su parte, la prueba de Rao que también permite detectar si existe un tendencia uni o bidireccional en la fase de los eventos cíclicos igualmente mostró que en este caso la tendencia en la distribución de fases de los ritmos sincronizados no es estadísticamente significativa ($U=139.5$, $P>0.05$).

No obstante, es significativo que la fase se asocie fuertemente con el pulso de luz del crepúsculo, esto indica que probablemente la mayoría de los animales se comportan como nocturnos. Una forma indirecta de evaluar lo anterior es posible mediante el análisis de la forma en que el ritmo tiende a sincronizarse con los pulsos de luz, es decir, a través del movimiento del ritmo por medio de avances o retrasos durante varios ciclos transitorios hasta el

establecimiento de una relación de fase estable con el sincronizador. En este sentido fue posible observar que el número de ciclos transitorios a la sincronización aumenta con la edad y es menor cuando el ritmo se sincroniza al FE 12:12 (Fig. 15).

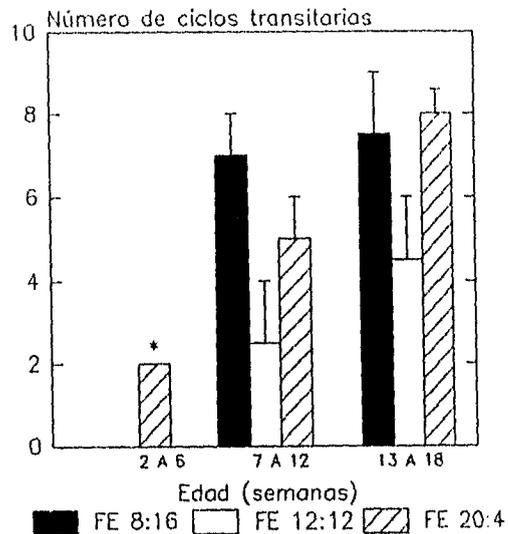


Figura 15. Número de ciclos transitorios a la sincronización. Las barras representan el promedio de dos o tres casos \pm error estándar. Apparently el número de transitorios aumenta con la edad y es menor bajo FE 12:12. * Único caso de sincronización en el grupo I.

El movimiento del ritmo hacia adelante o hacia atrás (avances o retrasos de fase) para conseguir la sincronización, podría ser función del tiempo circadiano en que incidan los pulsos de luz sobre el oscilador. Al comparar los cambios de fase provocados por pulsos de luz blanca de 15 minutos de duración sobre el ritmo de actividad del acocil adulto *Procambarus digueti*⁴⁷ se observó que algunos de los pulsos de luz del FE pudieron haber incidido en la zona de mayor sensibilidad de la CRF ocasionando principalmente avances de fase ya que de los 15 ritmos sincronizados, 11 mostraron avances de fase durante los ciclos transitorios a la sincronización. No obstante, cabe aclarar que debido a la falta de un periodo de registro en oscilación espontánea previo al FE no es posible determinar con exactitud el TC en que incidió cada pulso de luz.

discusión

*Qué bonito es
cuando él es tu amigo,
cuando ves a un niño
y miras en su rostro
la felicidad del momento,
la felicidad de la inocencia.
Quizás son los niños
sus mejores amigos,
ellos hacen con él
lo que más les gusta,
lo viven al máximo
y lo disfrutan cada momento.*

EVIDENCIA DE UN OSCILADOR FUNCIONAL DESDE LOS PRIMEROS ESTADIOS POSTEMBRIONARIOS

Los resultados aquí expuestos parecen confirmar que algunas de las características del sistema circadiano que controla el ritmo locomotor del acocil, aparecen gradualmente durante la ontogenia. Tanto la capacidad de sincronización, como el establecimiento de un periodo de actividad bien definido cambian con la edad. Al avanzar el desarrollo, y por ende, el grado de madurez del sistema circadiano, el ritmo locomotor manifiesta mayor capacidad de sincronización y una noche subjetiva claramente discernible del día subjetivo. Por otra parte, el que el 100% de los animales registrados haya mostrado un ritmo circadiano evidente en condiciones de oscilación espontánea parece confirmar hallazgos de trabajos anteriores¹² en relación con la presencia, en esta especie, de un oscilador circadiano funcional desde los primeros estadios postembrionarios, hecho similar a lo reportado para otras especies de invertebrados²⁶.

No obstante, algunas de las características reportadas para este ritmo de actividad en el animal adulto no

podieron ser claramente observadas en este estudio. Page y Larimer^{30,31} reportaron que en el acocil adulto y bajo condiciones de sincronización, el ritmo locomotor es bimodal, presentando picos de actividad asociados con las señales de encendido y apagado de la luz, mientras que Schallek⁴² señala que tanto en oscilación espontánea como en presencia de un sincronizador, el RALM en ocasiones es bimodal y en otras unimodal. Como se mencionó, en este estudio la presencia de ritmos de actividad bimodales en FE fue sólo del 40%. Por lo tanto, el pico de encendido reportado por Page y Larimer sólo fue observado en algunos casos, y fue mucho más frecuente en los animales del grupo II y bajo FE 12:12 (55%). La presencia de algunos casos en los que el RALM se sincronizó al FE como un ritmo unimodal y en oscilación espontánea se comportó como bimodal no parece apoyar la hipótesis de un pico exógeno (el pico de encendido), pues de ser así, éste se presentaría en todos los casos y desaparecería inmediatamente al primer día en condiciones de oscuridad constante. En otras ocasiones, el ritmo bimodal en FE es liberado en oscilación espontánea y el llamado pico exógeno disminuye en amplitud poco a poco hasta que desaparece.

Otros autores^{13,14} han señalado la presencia de ritmos bimodales de actividad en algunas especies de caracoles terrestres y han presentado argumentos que apoyan la hipótesis de dos picos de actividad de naturaleza endógena. Este podría ser el caso del acocil en el cual, el pico que desaparece gradualmente o que aparece en oscuridad constante podría ser evidencia de un oscilador secundario que en FE se desacopla del oscilador primario y que en OO poco a poco se vuelve a acoplar con el componente principal de la actividad.

Los resultados de este trabajo indican que la sincronización no paramétrica mediante la utilización de señales luminosas de corta duración es una buena herramienta para dilucidar los mecanismos de sincronización en *Procambarus clarkii*, como lo es para otras especies nocturnas³⁶. En este sentido, la capacidad de respuesta del ritmo locomotor a los diferentes FE se incrementó con la edad. El hecho de que la capacidad de ajuste al FE aumente con la edad (Tabla I), posiblemente habla de la maduración gradual de las vías de sincronización y/o de los fotorreceptores. Como se ha reportado, el desarrollo de algunas de las estructuras relacionadas con la entrada de información fótica pasa por

cambios durante el desarrollo¹¹. Así, el ojo y sus fotorreceptores, al igual que sus osciladores circadianos²³ tal vez formarían parte importante del control de la actividad locomotora. Al avanzar el desarrollo, y por lo tanto, el grado de madurez de estas estructuras aumentaría la capacidad de respuesta al sincronizador.

Independientemente de la edad y del fotoperiodo esqueleto, un alto porcentaje de los animales (55.6%) mostró la capacidad de control de fase en la transición a la oscilación espontánea (Tabla II). Esto podría apoyar la idea de que parte del sistema circadiano que controla el RALM es funcional desde la eclosión, ya que a pesar de carecer de la capacidad de sincronizarse, el ritmo mantiene la fase al desaparecer el sincronizador, y por lo tanto, el ritmo circadiano evidente durante el FE es la expresión de un oscilador circadiano funcional. Es probable que el cambio en la velocidad del oscilador que se observó durante el FE haya sido causado por la luz, en ocasiones el sincronizador no tiene la potencia adecuada para sincronizar el ritmo⁴, o bien, la incapacidad para sincronizar puede ser evidencia de la falta de acoplamiento entre el oscilador circadiano y las vías de sincronización y de salida del sistema.

Como se observa en la figura 5, la probabilidad de que el ritmo locomotor se sincronice aumenta con la edad, e igualmente disminuye el número de casos sin respuesta aparente al FE. El enmascaramiento tiene un comportamiento irregular, aunque siempre estuvo presente en el grupo de mayor edad, por lo que es probable que esté asociado a esta variable. Es importante notar, que uno de las razones principales que llevó al uso de fotoperiodos esqueleto, fue intentar disminuir o eliminar el enmascaramiento. Es posible que los pocos casos de enmascaramiento presentes se deban a que en ciertos animales, 50 lx y/o 30 minutos de duración del pulso de luz todavía son capaces de provocar enmascaramiento. A través de observación directa en el campo, se sabe que algunas especies de acociles están expuestas a intensidades mucho menores a 50 lx durante el crepúsculo y la aurora.

SINCRONIZACIÓN NO PARAMÉTRICA

En general, parece que es más fácil la sincronización al FE 20:4 que a 12:12 y a 8:16 (Fig. 5). La posibilidad, al menos en un caso del grupo I (Fig. 7), de sincronizar a un fotoperiodo tan asimétrico como el 20:4 demuestra una

posible maduración temprana de las vías de sincronización. Así, la probabilidad de sincronizar al fotoperiodo esqueleto más asimétrico fue siempre mayor. Como se ha reportado para este tipo de sincronización en roedores nocturnos³⁶, la sincronización no paramétrica siempre es más estable cuando los dos periodos de oscuridad se alejan de la simetría. En el caso del FE 20:4 no se presentó ningún caso en el que el ritmo identificara una noche de 4 horas ya que siempre la mayor cantidad de actividad y la fase de referencia se colocaron dentro del intervalo de oscuridad de 19 horas. No obstante, el protocolo utilizado en este trabajo no permite explorar las características del salto de fase involucrado en este proceso.

Un alto porcentaje de los ritmos sincronizados -73.3%-, identificó al periodo de oscuridad de mayor duración como noche, ya que colocó en él la fase de referencia. Aun sin tener plena seguridad de que los animales sean nocturnos, desde las primeras etapas del desarrollo, el acocil tiende a presentar su actividad dentro del periodo de oscuridad de un fotoperiodo completo¹². No es hasta que se alcanza el desarrollo del grupo III (13 semanas de edad) que los organismos estudiados, sometidos a un FE 8:16 fueron capaces de sincronizar a una noche de

sólo 7 horas (Fig. 11). Los animales representativos del grupo II siempre sincronizaron acomodando su máxima actividad dentro del periodo de 16 horas por lo que lo anterior, podría indicar el establecimiento de la noche mínima tolerable³⁷, la cual en la naturaleza se debe encontrar entre 8 y 7 horas, pues esta especie en países templados llega a estar sometida a noches muy cortas durante el verano en las latitudes extremas¹⁹. No obstante, el establecimiento de esta noche mínima tolerable requiere aún de un estudio mayor.

Como se esperaba, el FE 12:12 ocasiona una sincronización poco estable debido a la similitud entre las longitudes de los periodos de oscuridad del FE. Pittendrigh^{34,36,37} señaló que en situaciones en que la duración de dos intervalos oscuros en un fotoperiodo esqueleto simétrico es cercana a la mitad del periodo del ritmo en oscilación espontánea (TAU/2), el ritmo puede mostrar dos estados estables para el sincronizador. Esta región cercana a TAU/2 se denomina zona de biestabilidad y de acuerdo con estos resultados parece existir en esta especie desde al menos, el segundo grupo de edad. Este fenómeno de biestabilidad se presentó tanto en el grupo II como en el III. En total, en tres

ocasiones los animales interpretaron una noche de 12 horas y en dos más, una noche de 11 horas (Tabla III). Es interesante señalar la importancia de la región de biestabilidad en los procesos de medición del tiempo estacional en los que está involucrado un sustrato circadiano⁴¹. En un trabajo anterior⁷ se propuso que durante el desarrollo de *Procambarus clarkii* podría existir una fase fotoinducible como responsable de la inducción fotoperiódica del desarrollo gonadal. Los hallazgos de una zona de biestabilidad temprana parecen corroborar esta hipótesis.

RELACIÓN ENTRE LA FASE DEL OSCILADOR Y LA DEL SINCRONIZADOR

Los cambios en el ángulo de fase reportados en este trabajo (Fig. 14) parecen indicar que la sincronización se lleva a cabo a través de estos cambios de velocidad en los animales de los diferentes grupos, demostrando la sensibilidad diferencial del sistema circadiano al sincronizador desde las edades más tempranas. El hecho de que el número de ciclos transitorios aumente con la edad (Fig. 15) podría ser indicativo de los cambios por los que el sistema pasa durante el desarrollo involucrando cada

vez más elementos. Es preciso hacer notar que el número de ciclos transitorios a la sincronización es menor bajo FE 12:12, lo que no apoyaría la hipótesis de una mayor sincronización a fotoperiodos más asimétricos si partimos de la hipótesis de que un menor número de transitorios implica mayor facilidad para sincronizar.

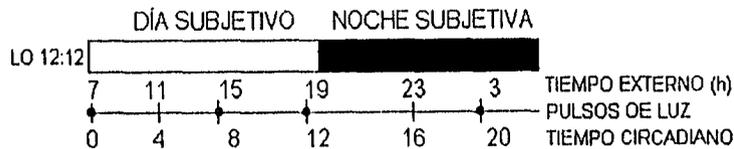
Si se asume que el primer pulso de luz (7.0 h) fue el pulso de amanecer, un alto porcentaje de los animales -73.3%- sincronizaron su ritmo locomotor con la señal que indicaría el inicio de la noche, es decir, como animales nocturnos. No obstante, es prudente aclarar que esto sólo podría ser comprobado con el registro del comportamiento del ritmo durante un periodo en oscilación espontánea antes del fotoperiodo esqueleto.

Como se señaló en la sección de métodos, los animales bajo estudio siempre fueron transportados a la cámara de registro desde la fotofase del fotoperiodo completo previo a la experimentación (aproximadamente a las 6 PM, la luz se debía apagar a las 7 PM), esto significa que el animal debió identificar al primer pulso del fotoperiodo esqueleto como el amanecer y al segundo pulso como el crepúsculo. La mayoría de los animales de las diferentes edades con ritmos sincronizados colocaron su fase más cerca del pulso de crepúsculo, circunscribiendo su mayor actividad a la

noche subjetiva. En FE 20:4 debió ocurrir un salto de fase que ocasionó que la actividad se colocara en el día subjetivo. Este salto de fase sería consecuencia de la gran asimetría del fotoperiodo, ocasionando que la interpretación del mismo cambiara. Así, estos animales interpretaron el pulso de amanecer como crepúsculo, y viceversa. La selección que hace el animal del intervalo oscuro en el que manifieste su máxima actividad debe depender de la fase del ritmo en relación al tiempo externo en el cual se encienda el segundo pulso. En este trabajo no se llevó a cabo un registro previo del ritmo en oscilación espontánea que permitiera calcular el tiempo circadiano en el cual inciden los pulsos de luz para producir los cambios de velocidad necesarios para la sincronización, no obstante, la condición de sincronización anterior, fotoperiodo completo LO 12:12, permite sugerir que los pulsos deben caer en la noche subjetiva tardía (2.5 h), la noche subjetiva temprana (18.5 h) y el día subjetivo (7.0 y 14.5 h). De acuerdo con lo reportado para el acocil adulto⁴⁷, los pulsos que inciden en la primera mitad de la noche subjetiva causarían fuertes avances de fase, mientras que en la segunda mitad de la noche subjetiva y en el día subjetivo prevalecerían los retrasos. En este trabajo, la sincronización se llevó a cabo principalmente mediante avances de fase,

ya que 11 de los 15 registros que mostraron sincronización aumentaron la velocidad de oscilación, por lo tanto, no fue posible establecer una correspondencia clara entre la supuesta hora circadiana en que incidieron los pulsos (Fig. 16) y los cambios de velocidad del oscilador.

En los primeros estadios postembrionarios, la luz podría ocasionar el enmascaramiento a través de respuestas reflejas tanto de los fotorreceptores retinianos como de los extrarretinianos. Al avanzar el desarrollo, el establecimiento de nuevas conexiones desde los



Todos estos resultados parecen indicar que el oscilador que controla el ritmo circadiano de actividad locomotora es distinto de aquel encargado del ritmo de amplitud del ERG, ya que los tiempos de maduración de ambos ritmos son distintos. Para el ritmo ERG, Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo¹¹ reportaron que en los primeros estadios postembrionarios, la noche subjetiva del acocil no está claramente establecida.

Figura 16. Probable tiempo circadiano de incidencia de los pulsos de luz de los fotoperiodos esqueleto con base en el estado de sincronización previo al protocolo experimental (LO 12:12).

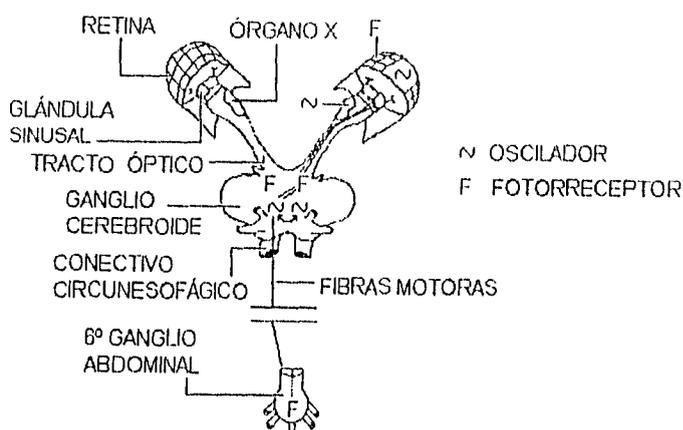
fotorreceptores hacia el oscilador, o bien, la adquisición de funcionalidad de éstas, como consecuencia de la posible síntesis de nuevos agentes humorales o

neurohumorales daría como consecuencia que la expresión rítmica de la actividad locomotora finalmente fuera capaz de establecer una adecuada correspondencia entre el tiempo biológico y el geofísico. Esta sincronización parecería ser más estable en fotoperiodos más asimétricos prefiriendo el tiempo de oscuridad para colocar el periodo de actividad y siendo capaz de sincronizarse hasta al menos, un periodo de oscuridad de 7 horas. El mecanismo para llevar a cabo la sincronización (a través de cambios de fase instantáneos en respuesta a cada señal de tiempo) debería ser el mismo independientemente del fotoperiodo presente ocasionándose posibles saltos de fase (no observados en este estudio) cuando la noche subjetiva no pueda ajustarse al periodo de oscuridad corto y entonces, se desplace hacia el de mayor duración.

En síntesis, el sistema circadiano responsable del control del RALM podría constar de varios grupos de osciladores y fotorreceptores (Fig. 17) en donde la sincronización por luz blanca sería consecuencia de la compleja interacción entre todos los componentes del sistema. Como se ha demostrado³¹, los fotorreceptores extrarretinianos del ganglio cerebroide serían los principales

responsables de la sincronización, sin embargo, tanto sus contrapartes en sexto ganglio abdominal, como los fotorreceptores de retina, podrían jugar un papel muy importante en la regulación de la actividad locomotora. Hasta ahora, el papel de los fotorreceptores del sexto ganglio es oscuro y requiere de mayor estudio. Por otra parte, la observación en este trabajo, de ritmos de actividad bimodales en oscilación espontánea sugiere que el pico de actividad frecuentemente asociado al encendido de la luz no es una respuesta puramente refleja, sino que podría estar asociada al posible control del oscilador circadiano descrito en la retina del acocíl²³, un posible oscilador secundario. El pico de actividad de encendido estaría fuertemente asociado con la presencia de un ciclo LO, y al desaparecer éste, el oscilador secundario poco a poco acoplaría esta actividad de muy baja amplitud al principal componente del ritmo guiado por el oscilador presente en ganglio cerebroide (Fig. 17).

Otra evidencia en favor de que el principal elemento sincronizador del ritmo se encuentra en el ganglio cerebroide es el hecho de que la ablación peduncular a pesar de incrementar notablemente la actividad de las patas, no abole la



ritmicidad, y además, ésta puede ser sincronizada por luz²¹, por lo que es probable que el oscilador circadiano propuesto para el ERG en el órgano X²³ regule la secreción de alguna hormona encargada del control tónico del movimiento de los apéndices locomotores¹⁶. Esta hormona también podría ser controlada por el oscilador circadiano del ganglio cerebroide, y ante su ausencia al extirpar los pedúnculos oculares, el ritmo seguiría siendo capaz de sincronizar mediante los fotorreceptores de cerebro.

Es preciso aclarar que este sistema complejo, compuesto al menos de tres pares de osciladores acoplados y dos pares

Figura 17. Componentes que podrían ser los principales responsables de la sincronización por luz blanca del RALM del acocil. Los fotorreceptores (F) del ganglio cerebroide parecen ser indispensables para la sincronización. Modificado de Larimer y Smith, 1980.

de fotorreceptores es aún incompleto en varios aspectos. El modelo carece de datos basados en procedimientos de lesión a estructuras muy pequeñas y sobre un sistema cuya anatomía y fisiología todavía no está muy bien entendida. No obstante, creemos que el modelo tiene utilidad, pues además de guiar parte de esta discusión, invita a posterior experimentación.

conclusiones

*Es lo más valioso
que tiene un ser humano,
o para ser preciso,
es lo único que realmente es suyo.
Cuando se va para siempre,
en realidad es para siempre.
Mientras tanto, está con nosotros
y cada mañana
nos envía un mensaje breve, pero claro:
"puedes hacer conmigo lo que tú quieras,
pero recuerda que debes hacerlo bien,
y sobre todo,
debes hacerlo porque te hace feliz,
porque es lo que te gusta hacer.
No dejes que me vaya en vano,
sólo tengo el valor que tú me des,
el valor que des a tu felicidad y a ti mismo,
soy tuyo, tu amigo, tu compañero,
...tu tiempo".*

O.C.C.

1. El uso de protocolos de sincronización no paramétrica es una buena herramienta para dilucidar los mecanismos de sincronización en *Procambarus clarkii*.

2. Existe al menos un oscilador circadiano funcional encargado del control rítmico de la actividad desde los primeros estadios postembrionarios.

3. La maduración gradual de estructuras relacionadas con la recepción de información fótica podría ser causa del aumento en la capacidad de sincronización al avanzar la edad. En otras palabras, madura primero el oscilador, y después la vía de sincronización.

4. Aparentemente aumenta la probabilidad de sincronizar cuando el fotoperiodo ofrecido es más asimétrico, siendo capaz de ajustar la actividad dentro de un periodo de oscuridad hasta de 7 horas.

5. Desde los primeros estadios del desarrollo, *Procambarus clarkii* es capaz de establecer claramente una noche subjetiva, comportándose como un animal nocturno, por lo que es claro que el oscilador circadiano que controla el RALM es distinto de aquel encargado del ritmo de amplitud del ERG, ya que los tiempos de maduración de ambos ritmos son distintos.

referencias

*Los libros son maestros
que nos instruyen sin palmetazos ni castigos,
sin palabras ásperas y sin ira.
Si se acerca uno a ellos,
nunca están dormidos.
Si se les interroga, no ocultan nada.
Si se les interpreta mal, no protestan.
Si no se les entiende, no se ríen de uno"*

Richard de Bury.

1. Aguilar Roblero, R. 1993. Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 2:121-132.
2. Aréchiga, H. 1976. La problemática de los ritmos circádicos. *Bol. Estud. Med. Biol. Mex.*, 29:1-17.
3. Aschoff, J. 1954. Zeitgeber der tierischen tages-periodik. *Naturwissenschaften* 41:49-56.
4. Aschoff, J. 1981. Free running and entrained circadian rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4, Biological rhythms. Ed. J. Aschoff. Plenum Press, N.Y. pp. 81-93.
5. Blanc, A. 1993. Ultradian and circadian rhythmicity of behavioral activities in the young snail *Helix aspersa maxima* (Gastropoda, Helicidae). *Can. J. Zool.* 71:1506-1510.
6. Bünning, E. 1936. Die endonome tagesperiodik als grundlage der photoperiodischen reaktion. *Berichte deutsches Botanisches Gesellschaft* 54:590-607.
7. Castañón-Cervantes, O., Lugo, C., Aguilar, M., González-Morán, G. y Fanjul-Moles, M.L. 1995. Photoperiodic induction on the growth rate and gonads maturation in the crayfish *Procambarus clarkii* during ontogeny. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A:139-146.
8. Daan, S. 1977. Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 290:51-59.
9. Davis, F.C. 1981. Ontogeny of circadian rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4, Biological rhythms. Ed. J. Aschoff. Plenum Press, N.Y. pp. 257-274.
10. Fanjul-Moles, M.L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. y Fuentes-Pardo, B. 1987. Circadian rhythm in the course of the ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A:213-219.
11. Fanjul-Moles, M. L. y Fuentes-Pardo, B. 1988. Spectral sensitivity in the course of the ontogeny of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A:61-66.
12. Fanjul-Moles, M.L., Miranda-Anaya, M. y Prieta, J. 1996. Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol. Int.* 13:15-26.
13. Flari, V. y Lazaridou-Dimitriadou, M. 1995. The locomotor activity of the edible snail, *Helix lucorum* L., in symmetrical skeleton photoperiod regimes. *Anim. Behav.* 50:635-644.
14. Flari, V. y Lazaridou-Dimitriadou, M. 1995. The impact of nocturnal light pulses on the activity pattern of terrestrial snails (*Helix lucorum*) entrained to 12L:12D photoperiods. *Can. J. Zool.* 73:1214-1220.

-
15. Fuentes-Pardo, B., Fanjul-Moles, M.L. y Moreno- Sáenz, E. 1992. Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 23:81-89.
16. Gordon, W. H., Larimer, J. L. y Page, T.L. 1977. Circumoesophageal interneurons required for reflexive and circadian locomotor behaviors in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 116:227-238.
17. Goto, K. y Johnson, C.H. 1995. Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 129:1061-1069.
18. Guyselman, J. B. 1957. Solar and lunar rhythms of locomotor activity in the crayfish *Cambarus virilis*. *Physiol. Zool.* 30:70-87.
19. Huner J.V. 1988. *Procambarus* in North America and elsewhere. En: *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*. Eds. D.M. Holdich y R.S. Lowery. Timber Press, pp. 239-261.
20. Huxley, T.H. 1880. *The crayfish*. D. Appleton y Co. N.Y. pp. 13-39.
21. Kaimus, H. 1938. Das actogram des flusskrebsses und seine beeinflussung durch organextrakte. *Z. Vergl. Physiol.* 25:784-802.
22. Konopka, R.J. 1981. Genetics and development of circadian rhythms in invertebrates. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4, Biological rhythms. Ed. J. Aschoff. Plenum Press, N.Y. pp. 173-181.
23. Larimer, J.L. y Smith, J.T.F. 1980. Circadian Rhythm of retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* 136:313-326.
24. Marques, M.D. y Waterhouse, J.M. 1994. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiol. Int.* 11:146-155.
25. Miranda-Anaya, M. 1994. Estudio ontogénico de la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora en el acocil *Procambarus clarkii*. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 2-13.
26. Page, T.L. 1990. Circadian rhythms of locomotor activity in cockroach nymphs: free running and entrainment. *J. Biol. Rhythms* 5:273-289.
27. Page, T.L. y Barret, R.K. 1989. Effects of light on circadian pacemaker development. II. Responses to light. *J. Comp. Physiol. A* 165:51-59.
28. Page, T.L. y Block G.D. 1980. Circadian rhythmicity in cockroaches: effects of early postembryonic development and aging. *Physiol. Entomol.* 5:271-281.
-

-
29. Page, T.L. y Larimer, J.L. 1972. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 78:107-120.
30. Page, T.L. y Larimer, J.L. 1975. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:59-80.
31. Page, T.L. y Larimer, J.L. 1976. Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.* 23:245-251.
32. Pittendrigh, C.S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:119-182.
33. Pittendrigh, C.S. 1966. The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 54:275-307.
34. Pittendrigh, C.S. 1981. Circadian systems: entrainment. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. Vol. 4, Biological rhythms. Ed. J. Aschoff. Plenum Press, N.Y. pp. 95-123.
35. Pittendrigh, C.S. 1993. Temporal organization: reflections of Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55:17-54.
36. Pittendrigh, C.S. y Daan, S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents IV. Entrainment: Pacemaker as a clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291-331.
37. Pittendrigh, C.S. y Minis D.H. 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Am. Nat.* 98:261-294.
38. Prosser, C.L. 1934. Action potentials in the nervous system of the crayfish. II. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. *J. Cell. and Comp. Physiol.* 4:363-377.
39. Reinberg, A. y Smolensky, M. 1993. Introduction to chronobiology. En: *Biological rhythms and medicine*. Eds. A. Reinberg y M. Smolensky. Springer-Verlag, N.Y. pp.1-21.
40. Sandeman, D.C., Sandeman, R.E. y de Covet, H.G. 1990. Extraretinal photoreceptors in the brain of crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21:619-629.
41. Saunders, D.S. 1981. Insect photoperiodism: entrainment within the circadian system as a basis for time measurement. En: *Biological clocks in seasonal reproductive cycles*. Eds. B.K. Follet y D.E. Follet. Bristol-Scientechica, N.Y. pp 58-67.
42. Schallek, W. 1942. Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. *J. Exp. Zool.* 91:155-166.
43. Sokolove, P.G. y W.N. Bushell. 1978. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72:131-160.
-

44. Sukô, T. 1958. Studies on the development of the crayfish VI. The reproductive cycle. Sci. Rep. Saitama Univ. 3:79-91.

45. Takahashi, J.S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. Annu. Rev. Neurosci. 18:531-553.

46. Tomioka, K. y Chiba, Y. 1982. Post embryonic development of circadian rhythm in cricket *Grillus bimaculatus*: a rhythm reversal. J. Comp. Physiol. 147:299-304.

47. Viccon-Pale, J.A. y Fuentes-Pardo, B. 1994. Synchronization by light of the circadian rhythm of motor activity in the crayfish. Biol. Rhythm Res. 25:267-276.

48. Woodland Hastings, J., Rusak, B. y Boulos, Z. 1992. Circadian Rhythms: The physiology of biological timing. En: Neural and integrative animal physiology. Ed. C.L. Prosser. Wiley-Liss, N.Y. pp. 435-546.
