

00343

5  
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“CAMBIOS EN INMUNORREACTIVIDAD  
A LA SEROTONINA EN LA RETINA DEL ACOCIL  
*Procambarus clarkii* DURANTE EL DESARROLLO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA ANIMAL)**

**P R E S E N T A :**

**ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA LUISA FANJUL PERA DE MOLES**

**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios  
de Posgrado

OF. NUM. P-902

**DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES  
PRESENTE.**

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(s) de Tesis del(a) alumno(a) ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulada: "CAMBIOS EN INMUNORREACTIVIDAD A LA SEROTONINA EN LA RETINA DEL ACOCIL Procambarus clarkii DURANTE EL DESARROLLO".

Así mismo, les comunico a los siguientes miembros que la Dirección de la Facultad, los ha designado como sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA ANIMAL).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES
PRIMER VOCAL	: M. EN C.	MARIA CRISTINA MARQUEZ OROZCO
SEGUNDO VOCAL	: DRA.	MARIA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES
TERCER VOCAL	: DRA.	ROCIO SALCEDA SACANELLES
SECRETARIO	: DRA.	MARIA GENOVEVA GONZALEZ MORAN
SUPLENTE	: DR.	PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ
SUPLENTE	: M. EN C.	PATRICIA RIVAS MANZANO

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un saludo cordial.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., a 16 de mayo 1997  
JEFE DE LA DIVISIÓN

DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

MCOIASR/cigs

"A LA MEMORIA DE MI MAMÁ"

"A LA MEMORIA DE JULIA"

"A LEÓN"

**A MI MAMÁ ELSA**, que siempre ha vivido en mi corazón.

**A LEÓN**, por todo el amor que me ha dado, compartir conmigo los buenos y malos momentos, levantarme el ánimo en momentos difíciles, apoyarme y echarme muchas porras para seguir superándome, y por tenerme tanta confianza.

**A TODA MI FAMILIA.** **Mis abuelitos:** Alberto, Cuquita ♡ y Stella. **Mis tíos:** Carmen ♡, Carlos, Irma, Jesús, Ignacio, Isabel, Maximino, Ricardo, Guadalupe, Laura, Julia ♡, Georgina, Mary Carmen, Magdalena, Alejandro y Karina. **Mi hermano** Jorge Alberto. **Mis primos:** Migue, Ernesto, Ricky, Hilda, Erandi, Estela y Zahzil. Por su apoyo moral, académico y económico que de alguna u otra forma en todo momento me dieron; gracias por permitirme superar, y espero que a mis primos esto les motive a seguir estudiando y superándose. Con mucho cariño.

**A LA DRA. MARÍA LUISA**, por ser mi directora de tesis, además de ser un ejemplo a seguir y una persona que en cualquier momento me ha dado su apoyo, comprensión y cariño.

**A LOS INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL Y SINODALES:**

DRA. MARÍA LUISA FANJUL DE MOLES.

DRA. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES.

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES.

M. EN C. VIKTOR JAVIER ROMERO DÍAZ.

DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN.

M. EN C. MARÍA CRISTINA MARQUEZ OROZCO.

DR. PEDRO NICOLÁS VELÁZQUEZ.

M. EN C. PATRICIA RIVAS MANZANO.

Por su valiosa asesoría en la investigación, sus aportaciones al trabajo, sus críticas constructivas y por compartir y transmitirme sus conocimientos, contribuyendo a mi formación profesional.

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por permitirme estudiar en ésta máxima casa de estudios, en donde he pasado mucho tiempo superándome y cosechando alegrías.

**A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO:** Julio, Manuel, Oscar, Carolina, Sonia, Aquiles e Inés, por su amistad, compañía y toda la ayuda técnica y académica que en todo momento me brindaron.

**AL LABORATORIO DE MORFOLOGÍA VEGETAL**, sobre todo a Marce y Arcelia, por permitirme realizar todos los cortes histológicos en sus instalaciones.

**AL LABORATORIO DE MICROCINE**, especialmente a Anabel y Antonio, por su asesoría en la toma de fotografías.

**AL PAPIIT, PROYECTO IN212795**, por el apoyo económico para la realización de este trabajo.

**AL DR. RENATO RIVERA**, por su colaboración en el material utilizado.

**A TODOS MIS DEMÁS FAMILIARES Y AMIGOS**, que de alguna forma me apoyaron y contribuyeron a la realización de mi tesis.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS USTEDES POR CONFIAR EN MÍ, ESPERO  
NUNCA DEFRAUDARLOS.**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL  
LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA  
COMPARADA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS,  
U.N.A.M.; BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA  
MARÍA LUISA FANJUL DE MOLES.**

## ÍNDICE.

I. RESUMEN.....	4
II. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Generalidades del acocil.....	5
1.1. Tagmosis.....	5
1.2. Crecimiento.....	7
1.3. Reproducción.....	7
1.4. Etapas del desarrollo postembrionario.....	8
1.4.1. Etapa postembrionaria I.....	8
1.4.2. Etapa postembrionaria II.....	8
1.4.3. Etapa juvenil.....	10
1.5. Sistema Nervioso.....	10
2. Morfología del lóbulo óptico del acocil adulto.....	13
2.1. Retina.....	17
2.1.1. Pigmentos accesorios.....	18
2.1.1.1. Pigmento distal.....	19
2.1.1.2. Pigmento proximal.....	21
2.2. Cambios estructurales en la retina durante el desarrollo de los decápodos.....	22
3. Ritmos biológicos.....	26
3.1. Ritmo circadiano.....	28
4. La serotonina en diversas funciones de los invertebrados.....	30
5. Sustrato anatómico-fisiológico del ritmo ERG en el acocil.....	33
6. Ontogenia.....	35

<b>III. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....</b>	<b>39</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>V. OBJETIVO.....</b>	<b>42</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>43</b>
1. Animales.....	43
2. Obtención y tratamiento de lóbulos ópticos.....	45
2.1. Fijación.....	45
2.2. Disección.....	45
3. Inmunohistoquímica.....	46
4. Digitalización de imagen.....	48
5. Análisis estadístico.....	49
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
1. Etapa postembrionaria I.....	51
1.1. Descripción de las estructuras.....	51
1.2. Área de la retina.....	55
1.3. Área de inmunorreactividad a serotonina.....	55
2. Etapa postembrionaria II.....	59
2.1. Descripción de las estructuras.....	59
2.2. Área de la retina a las diferentes horas del día.....	63
2.3. Área de inmunorreactividad a serotonina.....	63
3. Etapa juvenil.....	66
3.1. Descripción de las estructuras.....	66
3.2. Área de la retina.....	68
3.3. Área de inmunorreactividad a serotonina.....	68

<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
1. Etapa Postembrionaria I.....	72
2. Etapa Postembrionaria II.....	74
3. Etapa Juvenil.....	76
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>X. LITERATURA.....</b>	<b>78</b>

## **I. RESUMEN.**

En este trabajo se determinó la existencia de una variación en el área de inmunorreactividad a serotonina (5-HT) en la retina del acocil *Procambarus clarkii* en tres etapas postembrionarias, a tres diferentes horas del día (8:00, 15:00 y 20:00 hrs).

Para llevarlo a cabo se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas, las preparaciones se analizaron en un digitalizador de imágenes y análisis estadísticos.

Los resultados indicaron diferencias en el área de inmunorreactividad a serotonina en la retina del acocil, entre las tres edades investigadas. En la etapa postembrionaria I no hay diferencia estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre las tres horas del día. En el estadio postembrionario II y el animal juvenil hay diferencias significativas que muestran una mayor inmunorreactividad a las 15:00 hrs ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados sugieren la existencia de cambios rítmicos de naturaleza ultradiana a circadiana, en la retina durante el desarrollo postembrionario del acocil. Estos cambios son similares a los encontrados en los mismos estadios de desarrollo, en el estudio del ritmo de amplitud de la respuesta eléctrica a la luz.

## II. INTRODUCCIÓN.

### 1. GENERALIDADES DEL ACOCIL.

El acocil es un crustáceo, malacostráceo, perteneciente al Orden Decapoda. En México existen diferentes especies. Una es *Procambarus clarkii*, una especie introducida, que se ha adaptado para habitar en sistemas lénticos; con verano seco y lluvias periódicas abundantes. Esta especie posee una enorme capacidad de adaptación, tanto metabólica como conductual (Hogger, 1988).

#### 1.1. TAGMOSIS.

Dorsalmente el cuerpo del acocil se divide en dos regiones, la anterior, que es el cefalotórax, y la posterior, que es el abdomen (Fig. 1). Como todos los malacostráceos éste animal presenta 20 segmentos corporales; la tagmosis del acocil es la siguiente: un par de anténulas, un par de antenas, la mandíbula, maxílulas, maxilas, tres pares de maxilípedos, cinco pares de pereópodos, de los cuales los tres anteriores son quelados y los cuatro posteriores están adaptados para caminar, cinco pares de pleópodos, un par de urópodos y el telson, que es postsegmental, región en donde se localiza el ano; en los machos el primero y segundo par de pleópodos están modificados para la cópula (Holdich y Reeve, 1988).

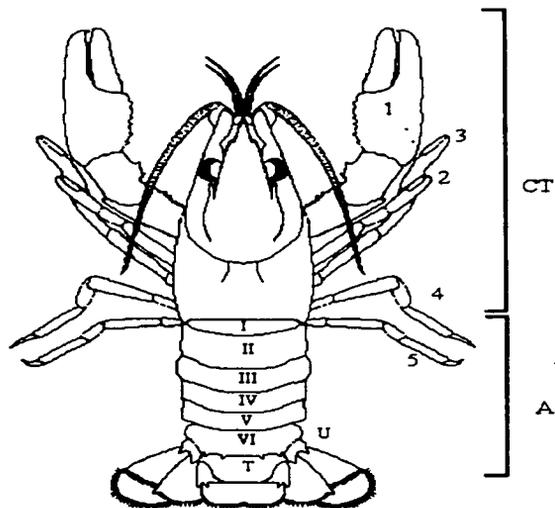


Figura 1.- Esquema de la tagmose del acocil. CT, cefalotórax; A, abdomen; U, urópodos; T, telson; 1 - 5, pereópodos; I - VI, apéndices abdominales debajo de los que se localizan los pleópodos.

## 1.2. CRECIMIENTO.

El acocil tiene un desarrollo directo, su desarrollo larval se manifiesta en la etapa embrionaria. Sin embargo, postembrionariamente presenta cambios morfológicos importantes. El crecimiento se da cuando el animal muda, ya que su cuerpo se encuentra cubierto por un exoesqueleto, el cual está formado por una epicutícula (compuesta por sales de calcio, proteínas y lípidos) y una procutícula (con quitina, sales de calcio y proteínas). Para alcanzar la etapa de madurez sexual el acocil pasa por once mudas. La temperatura del agua en la que se encuentran puede acelerar la frecuencia de la muda (Sukō, 1958).

## 1.3. REPRODUCCIÓN.

El apareamiento de esta especie se lleva a cabo en los meses de octubre y noviembre, en esta temporada las hembras presentan el ovario con óvulos abundantes y los machos presentan espermatozoides en un espermatóforo, en una masa de color lechoso. El macho introduce el espermatóforo en la hembra, llevándose a cabo la fertilización interna, se da la oviposición. Los huevecillos miden aproximadamente 2 mm y se encuentran unidos a los pleópodos gracias a una secreción adhesiva; cada hembra presenta entre 60 y 250 huevecillos dependiendo de la edad y el tamaño que ésta tenga. Tres semanas después de que la hembra oviposita, se produce la eclosión de los huevecillos. Los acociles recién nacidos miden entre nueve y once milímetros de largo, estos animales se encuentran cubiertos por el corion, el cual se abre longitudinalmente saliendo las crías de entre las dos mitades (Sukō, 1958).

#### 1.4. ETAPAS DEL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO.

##### 1.4.1. ETAPA POSTEMBRIONARIA I.

Al despojarse de la membrana embrionaria, el acocil se encuentra en la etapa postembrionaria I (POI). Esta etapa dura hasta 10 días después de la eclosión, tiempo en el que los acociles permanecen adheridos a los pleópodos de la madre. Los animales tienen el cefalotórax lleno de vitelo (Hafner *et al.*, 1982), por lo que éste es más grande que los ojos. Los ojos son sésiles y sólo el 25% de los fotorreceptores presentan pigmento. Las antenas y anténulas son curvas y no presentan receptores pilosos. El telson y los urópodos no están diferenciados como apéndices separados (Sandeman y Sandeman, 1990) (Fig. 2). En esta etapa, el animal es de hábitos diurnos. Este animal muda después de cinco u ocho días, si el agua tiene una temperatura de 22 °C.

##### 1.4.2. ETAPA POSTEMBRIONARIA II.

Al salir los animales de la primera muda, entran en la etapa postembrionaria II (POII). Los acociles que están en esta etapa tienen de 10 a 28 días de edad después de la eclosión, éstos empiezan a reptar en el sustrato, desprendiéndose y prendiéndose de la madre. En esta etapa, los acociles presentan menos cantidad de vitelo en el cefalotórax, por lo que se ven más delgados que en la etapa anterior. Los ojos son pedunculados y el 50% de los fotorreceptores poseen pigmento. Las antenas son más largas que en la etapa anterior, pero todavía no tienen pelos receptores; los animales ya se pueden mover libremente, pero no son muy activos y al final de este estadio el vitelo es muy poco (Sandeman y Sandeman, 1990) (Fig. 3). *Grosso modo* son muy

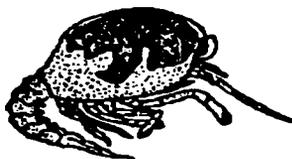


Figura 2.- Estadio postembrionario I (Tomado de Andrews, 1922).

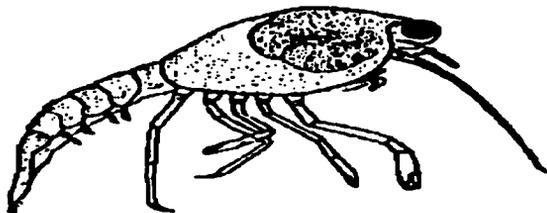


Figura 3.- Etapa del desarrollo postembrionario II (Tomado de Andrews, 1922).

parecidos al adulto (Hafner *et al.*, 1982). Posteriormente el animal muda para dar lugar al primer estadio juvenil (A1).

#### 1.4.3. ETAPA JUVENIL.

Después de la muda, por su morfología externa, el animal parece un adulto muy pequeño; ya no se prende de la madre. Los animales son de color café verdoso, tienen mucho movimiento y se alimentan de vegetales verdes, moluscos, larvas de insectos acuáticos, detritos y/o de posibles restos de vitelo (los que aún lo conservan), además se puede presentar canibalismo (Goddard 1988). Las antenas y las anténulas poseen ya receptores pilosos. Conforme avanza el desarrollo el acocil va adquiriendo hábitos nocturnos; este juvenil tardará alrededor de un año en alcanzar la etapa adulta (Sukò, 1954; Castañón-Cervantes *et al.*, 1995).

#### 1.5. SISTEMA NERVIOSO.

El sistema nervioso central del acocil adulto es ganglionar, está formado por dos cordones nerviosos ventrales que unen a varios ganglios en forma de escalera, el ganglio cerebroide (ganglio supraesofágico), ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y cinco ganglios abdominales; de cada ganglio salen los nervios que inervan diferentes apéndices (Fig. 4). El ganglio cerebroide se divide en tres regiones: a) protocerebro, que inerva la región óptica; b) deutocerebro, que inerva anténulas; y c) tritocerebro, que inerva antenas e intestino; el ganglio cerebroide es considerado como una serie de ganglios fusionados (Maynard, 1965).

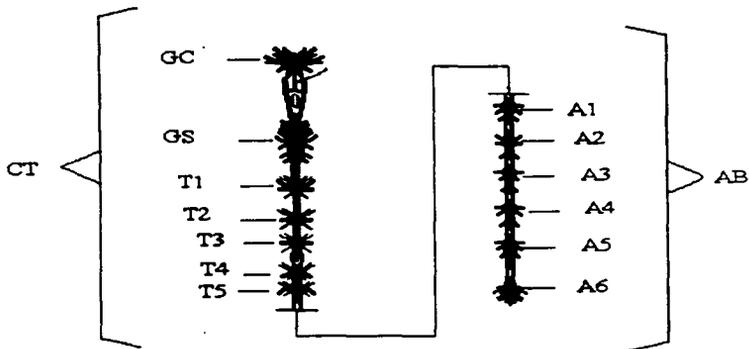


Figura 4.- Esquema de la cadena ganglionar en el acocil. CT, cefalotórax; AB, abdomen; GC, ganglio cerebroides; GS, ganglio subesofágico; T1 -T5, nervios torácicos 1 a 5; A1 -A6, nervios abdominales 1 a 6. (Redibujado de Sandeman, 1982).

En la etapa POI, el ganglio cerebroide presenta gran cantidad de cuerpos celulares en relación al espacio neuropilar, en él se presentan neuronas secretoras de gran tamaño. En POII y juvenil el neurópilo ocupa una mayor porción que la región celular; hay más vasos sanguíneos. En el juvenil los cuerpos celulares están mejor organizados. La organización sináptica en los neurópilos y el número de fibras en el quiasma central y en la comisura olfatoria son mucho menos en POI y POII que en el juvenil y adulto (Mendoza-González et al., 1995).

## 2. MORFOLOGÍA DEL LÓBULO ÓPTICO DEL ACOCIL ADULTO.

El acocil presenta ojos de tipo compuesto, pedunculados, localizados en posición anterodorsal del cuerpo y separados por el rostro. A partir de la etapa POII la superficie de cada ojo está cubierta por una córnea con pequeños cromatóforos (Hafner *et al.*, 1982). La córnea del adulto es de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de ancho. Posterior a ésta se localiza la retina, por debajo de la cual se encuentra un espacio vascular, al que le sigue un neurópilo no muy bien definido, la lámina ganglionaris. En seguida se encuentran tres neurópilos bien definidos, los cuales son: la médula externa, la médula interna y la médula terminalis (Mainard, 1962). En el adulto la lámina ganglionaris y las médulas están constituidas por una región fibrosa central formada por fibras nerviosas, glía y algunas neuronas, y una región periférica formada por células nerviosas con diferentes características, como las neurosecretoras de tipo 1 (presentan gránulos de 1000-1700 Å de diámetro), las neurosecretoras de tipo 2 (contienen gránulos de 1500-2000 Å), las neuronas que tienen gránulos de 600-1000 Å, y neuronas que no poseen gránulos, sólo presentan vesículas claras de 300-550 Å de diámetro (Shivers, 1967). En posición anterior y hacia un costado de la médula terminalis, aparece el cuerpo hemielipsoidal, que es un neurópilo glomerular. Hay dos quiasmas, el externo que se encuentra entre la médula externa y la interna, y el interno que se localiza entre la médula interna y la terminalis; entre la médula externa y la interna, hacia la región lateral externa, se encuentra un conjunto de terminales axónicas rodeada de senos venosos, la glándula sinusal, y hacia la región frontal lateral interna de la médula terminalis está el órgano-X

constituido por células neurosecretoras, cuyos axones terminan formando la glándula sinusal; por último, de la médula terminalis sale el tracto óptico, o también llamado nervio óptico, que llega al ganglio cerebroide, (Sandeman, 1982) (Fig. 5).

La médula interna, la terminalis y el cuerpo hemielipsoidal, derivan embriológicamente del ganglio cerebroide (Elofsson, 1969; Elofsson y Dahl, 1970), de la región que corresponde al protocerebro medio, podrían intervenir en la integración olfatoria (Sandeman, 1990). En la periferia de estas médulas se localizan neuronas; y en la región central, el principal constituyente de cada médula es el neurópilo, formado por senos venosos, células sanguíneas y glía. El tracto nervioso presenta células gliales, que se caracterizan por la forma alargada o irregular, su núcleo es elongado y tiene muy poco citoplasma.

Los quiasmas están constituidos por fibras nerviosas, ascendentes y descendentes, las que provienen de neuronas que se encuentran en diferentes partes del lóbulo óptico. Al parecer los quiasmas se formaron por el giro de los neurópilos que conforman las médulas durante el desarrollo (Elofsson y Dahl, 1970).

La glándula sinusal, es una estructura neurohemal muy vascularizada formada por proyecciones axónicas (neuritas) de la médula externa, interna, quiasma interno y del órgano-X, los cuales vierten sus secreciones, a una porción vascular. La glándula sinusal y el órgano-X, son el lugar de almacenamiento y de liberación, respectivamente, de las neurohormonas responsables de la regulación de las funciones metabólicas que permiten la adaptación ambiental; como la regulación de azúcar en la hemolinfa, la adaptación a la luz, la muda, etc.

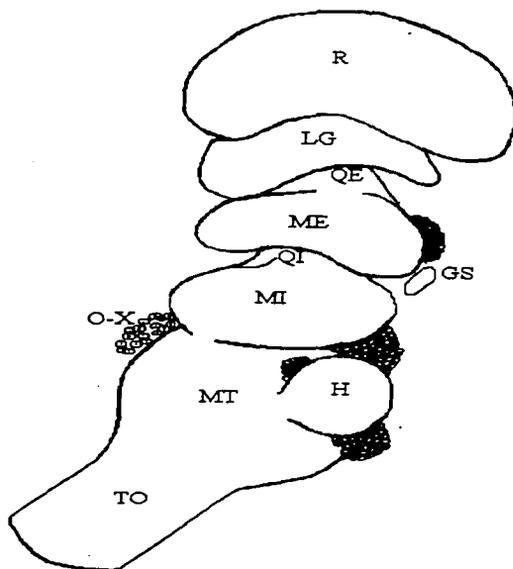


Figura 5.- Esquema del lóbulo óptico del acocil adulto. R, retina; LG, lámina ganglionaris; QE, quiasma externo; Me, médula externa; QI, quiasma interno; MI, médula interna; MT, médula terminalis; TO, tracto óptico; GS, glándula sinusal; O-X, órgano X; H, cuerpo hemielipsoidal (Redibujado de Sandeman *et al.*, 1988).

(Rudolph y Spaziani, 1990). Esta estructura se ha propuesto como una región fundamental para la regulación de la posición de los pigmentos retinianos y tegumentarios, así como de hormonas que intervienen en el ritmo de sensibilidad a la luz y el ritmo motor. Así también, participa en la regulación de los eritróforos (Aréchiga *et al.*, 1992) y tal vez al mantenimiento de los ritmos circadianos (Cooke y Sullivan, 1982), éstos autores identificaron el tracto que une a la glándula sinusal con el órgano-X.

El órgano-X está formado por células ganglionares neurosecretoras que presentan un gran núcleo (de 12 a 16  $\mu\text{m}$ ), y poco citoplasma. Al parecer es aquí en donde se secretan algunas hormonas que se almacenan en la glándula del sinus, como la hormona inhibidora de la muda (HIM), la hormona hiperglicemiante de crustáceos (CHH), la hormona dispersora del pigmento rojo (RPDH), etc. (Rudolph y Spaziani, 1990).

Shivers (1967) describió dos tipos de neuronas presentes en el órgano-X, sin embargo en el microscopio óptico no se pueden distinguir fácilmente una de la otra. Las neuronas que secretan una neurohormona, que pasa a lo largo de los axones y se libera al sistema vascular, al parecer están relacionadas con el desarrollo. El otro tipo de neuronas son las que sintetizan un producto que pasa a lo largo de los axones hacia el botón sináptico donde se libera como un transmisor, también llamado neurohumor. Las neuronas secretoras de neurotransmisores, se piensa que están involucradas en el control de los cromatóforos y en la actividad de los pigmentos de la retina.

## 2.1. RETINA.

Elofsson y Dahl (1970) propusieron una teoría que explica el desarrollo de la retina, los neurópilos y los quiasmas. Esta teoría sugiere que en el disco óptico, a partir del neuroectodermo se forma la zona de proliferación; de donde se desarrollan la retina, la lámina ganglionaris y las médulas externa, interna y terminalis. Esta zona abastece de células a éstas regiones, durante el desarrollo (Elofsson, 1969; Elofsson y Dahl, 1970).

La retina está compuesta por 2500 omatidias, que son las unidades básicas de la fotorrecepción, los fotorreceptores de una omatidia forman una vía óptica común; el campo de visión en todas las células de cada grupo puede ser idéntico (Fig. 6). Cada omatidia es un elemento óptico individual en el que las estructuras especializadas en la absorción de luz se encuentran en el centro (Shaw y Stowe, 1982). La superficie externa del ojo está cubierta por una córnea, ésta forma el límite óptico entre el medio ambiente líquido o gaseoso y el medio acuoso que constituye el cono cristalino, este cono es la estructura óptica que conduce la luz hacia las células fotorreceptoras. La córnea es secretada por pequeñas células corneágenas, dos por omatidia. Estas células se encuentran inmediatamente por debajo de la córnea. El cono cristalino es una estructura compuesta por porciones de varias células cuyas partes centrales son transparentes; en cada omatidia existen cuatro células del cono cristalino. La luz incidente, después de pasar a través de la córnea y el cono cristalino, es absorbida por cada rabdómero. Los rabdómeros están formados por miles de invaginaciones de la membrana de los fotorreceptores densamente empaçados, llamados microvilli o microvellosidades, éstas a su vez se componen de filamentos en las células R1,

R2, R5 y R6 las microvellosidades corren dorsoventralmente, con respecto al eje del cuerpo, y en las células R3, R4 y R7 se encuentran orientadas horizontalmente. Cada omatidia constituye una subunidad y comprende un número fijo de 8 células retinulares; las microvellosidades de 7 de éstas células (R1-R7) forman un rabdomo central constituido por la unión de rabdomeros individuales, la octava célula retinular no contribuye al rabdomo principal, sino que forma un rabdomo pequeño, que probablemente actúa como un filtro de luz, antes de que ésta llegue al rabdomo principal. El rabdomo es una estructura especializada en la captación de fotones (Nassel, 1992).

El rabdomo principal contiene altas concentraciones de un pigmento fotosensible, la rodopsina, el cual puede ser convertido por ciertas longitudes de onda (500 - 600 nm) a metarrodopsina, también fotosensible. El pigmento que se encuentra en el rabdomero accesorio presenta una sensibilidad espectral diferente (400 - 500 nm), sensibilidad que se ha asociado a la luz azul y particularmente al violeta (Goldsmith, 1972). Los axones de las células retinulares se extienden hacia la membrana basal, rodeando a estos axones se pueden localizar senos venosos. Debajo de la membrana basal se encuentra un área altamente vascularizada, que puede estar relacionada con el control neurohumoral de la actividad de los pigmentos de la retina (Shivers, 1967).

#### 2.1.1. PIGMENTOS ACCESORIOS.

El aparato de blindaje pigmentario básico, consiste de pigmentos oscuros, que en los crustáceos no se han estudiado del todo, y al parecer están formados por omocromos como la melanina y pterina (Ghidalia, 1985). Entre estos

pigmentos se encuentran: el pigmento proximal, que está en las células retinulares; el pigmento distal en las células pigmentarias distales; y un pigmento reflector de luz, en las células de pigmento reflejante. A estas últimas también se les llama células del pigmento secundario o células del tapetum, y están situadas en la membrana basal; en el acocil, el pigmento reflejante parece ser inmóvil, puesto que no se desplaza (Page y Larimer, 1975). Los cambios de sensibilidad a la luz-obscuridad de los componentes oculares son el resultado de procesos fotoquímicos, neurales y fotomecánicos. En las omatidias las adaptaciones fotoquímicas y neurales están intrínsecamente relacionadas con propiedades de las células retinulares y con otras células extrarretinulares. La adaptación fotomecánica principal incluye ciertos cambios morfológicos en células retinulares así como movimientos reversibles de gránulos de pigmento blindante. Cuando los animales están expuestos a la luz, los pigmentos se dispersan a lo largo de la omatidia blindando la entrada de luz, y cuando el animal se encuentra en obscuridad se agregan permitiendo su entrada. La redistribución de los pigmentos blindantes ayuda a controlar la apertura del campo de visión de la omatidia. Los pigmentos retinulares actúan como filtros de color; cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la luz el pico de sensibilidad espectral cambia hacia longitudes de onda más largas (Goldsmith, 1972).

#### 2.1.1.1. PIGMENTO DISTAL.

Entre las omatidias se encuentran las células esbeltas del pigmento distal, que contienen gránulos de pigmento denso, denominado pigmento distal (Fig. 6),

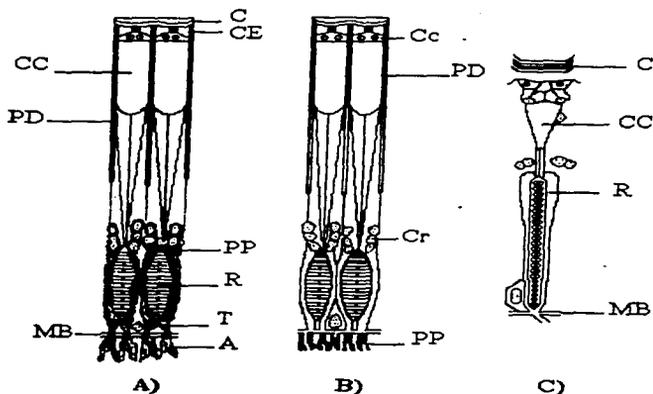


Figura 6.- **A)** Esquema de omatidias en adaptación a la luz, **B)** Esquema de omatidias en adaptación a la oscuridad, **C)** Esquema de una omatidia fijada, en donde se observa la diferencia morfológica con respecto a las omatidias sin fijar. C, córnea; CE, células corneáneas; Cc, células del cono cristalino; CC, cono cristalino; Cr; núcleos de las células retinulares; R, rabdomo; T, células del tapetum; MB, membrana basal; A, axones de las células retinulares; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal (Redibujado de Waterman, 1961 ).

el cual se mueve dependiendo del grado de adaptación a la luz que tenga el ojo. Estas células también llamadas células del pigmento primario, del pigmento distal, células oscuras o células pigmentarias absorbentes, se encuentran rodeando al cono cristalino y se extienden apicalmente hacia la córnea y subapicalmente hacia la membrana basal. Durante la adaptación a la luz éste pigmento se mueve proximalmente, formando una cubierta alrededor del cono y tracto cristalino. Durante la adaptación a la oscuridad, el pigmento migra distalmente hacia la córnea. La migración de éste pigmento no es causada por una acción directa de la luz en las células del pigmento distal, sino que es mediada por factores humorales. La hormona dispersora del pigmento distal actúa sobre él produciendo la dispersión de los gránulos durante la iluminación, en tanto que la hormona concentradora de eritróforos desplaza el pigmento distal en oscuridad (Aréchiga *et al.*, 1992)

#### 2.1.1.2. PIGMENTO PROXIMAL.

En el citoplasma de las células retinulares R1 a R7, existen gránulos de pigmento blindante, llamado pigmento proximal (Fig. 6); estos generalmente se encuentran ausentes en la célula accesoria R8; son de color café o negro, compuestos de omocromos. En el microscopio electrónico se pueden detectar como gránulos densos, limitados por una membrana que puede ser de tamaño uniforme o diferente, y miden de 0.1 a 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro. El pigmento proximal durante la adaptación a la luz rodea al rabdomo, en tanto que durante la adaptación a la oscuridad se mueve hacia abajo de la membrana basal. Este

pigmento migra como una respuesta directa a la luz de las células retinulares. Se ha propuesto que en las células retinulares del acocil, la luz induce el incremento de la concentración de iones de calcio libre, que parece ser el detonante de la migración de los pigmentos (Frixione y Aréchiga, 1981).

## 2.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LA RETINA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS DECÁPODOS.

En estudios realizados con el camarón *Penaeus duorarum*, que es un malacostráceo al igual que el acocil *Procambarus clarkii*, se observó que conforme progresa el desarrollo postembrionario, hay un incremento del número de omatidias así como un alargamiento pronunciado de los neurópilos ópticos. La orientación y estructura de las médulas cambia, la médula externa gira 90 grados de la posición original formándose el quiasma, lo anterior origina que el incremento en el desarrollo del quiasma sea muy evidente. En estos malacostráceos, a diferencia del resto de los crustáceos se presenta una médula más, proponiéndose a la médula interna como una especialización de la médula terminalis (Elofsson, 1969).

En la etapa POI, los ojos del acocil *Procambarus clarkii* son sésiles, los lóbulos ópticos parecen estar unidos por la parte central; la lámina ganglionaris, y las médulas externa, interna y terminalis ya están presentes aunque no se encuentran bien diferenciadas una de la otra. Todas presentan senos venosos en la región central de sus neurópilos, los cuales son de forma circular, excepto el de la lámina ganglionaris; el quiasma externo ya se puede observar y el interno no es muy claro; los tractos ópticos son muy cortos y delgados en comparación con el

POII y juvenil, éstos presentan células gliales. En el POII las médulas van adquiriendo una posición longitudinal una con respecto a la otra; el tracto óptico es más largo que en POI; los neurópilos van ocupando mayor área que la región celular y tienen forma ovalada. En la etapa juvenil las médulas adquieren una posición completamente longitudinal una con respecto a la otra; la lámina ganglionaris y médula externa tienen forma arriñonada, la médula externa es ovalada, y la terminalis tiene una forma piramidal invertida; toda la forma y características del pedúnculo ocular en el juvenil son similares a las del adulto, únicamente que en el juvenil son mas pequeñas (García-Rivera et al., 1994).

Hafner y colaboradores (1982) realizaron estudios morfológicos en la retina del acicil durante el desarrollo, proponiendo una división del disco óptico en dos, la porción anterior y la porción posterior. En la etapa POI, la porción anterior se encuentra en actividad mitótica y/o en diferenciación celular, siendo una fuente de nuevas células retinulares; en la porción posterior se encuentran los racimos proto-omatidiales, los largos rabadómeros se extienden hacia la membrana basal y los axones de las células retinulares se extienden por debajo de la membrana basal, subdividiendo el espacio vascular (Fig. 7). La formación de pigmentos blindantes en las células retinulares es más notoria en la región posterior. No es clara la separación de los pigmentos proximal y distal.

En POII, en la porción anterior continúan diferenciándose los elementos celulares; en la posterior se da un alargamiento del cono cristalino, hacia los rabadómeros (Fig. 8). En adaptación a la obscuridad, se observa una clara separación del pigmento distal y proximal.

Se ha sugerido que hay un aumento en los paquetes de microvellosidades

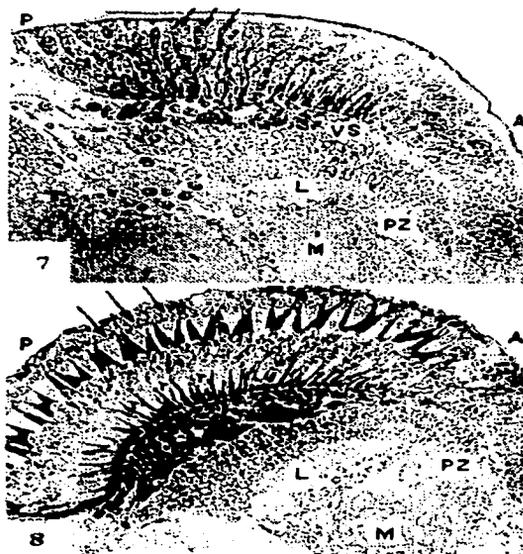


Figura 7.- Retina del acocil en la etapa POI.

Figura 8.- Retina del acocil en la etapa POII.

P, porción posterior; A, porción anterior; L, lámina ganglionaris; PZ, zona de proliferación; M, médula externa; r, rabdomos; las flechas indican el cono cristalino bien diferenciado (Tomado de Hafner *et al.*, 1982).

que forman al rabdomo durante el desarrollo, aunque el número de filamentos, que forman las microvellosidades, decrecen en un 50% (Hafner et al., 1991).

Es mínimo el trabajo de investigación que se ha llevado a cabo en el desarrollo del ojo compuesto de los crustáceos y particularmente en el acocil. Hafner ha sido de los pocos autores, si no es que el único, que recientemente ha estudiado el desarrollo postembrionario de la retina del acocil. Debido a ello es de suma importancia continuar realizando estudios de los pedúnculos oculares del acocil durante la ontogenia, para incrementar el conocimiento en ésta área de investigación.

### 3. RITMOS BIOLÓGICOS.

Un ritmo biológico es un fenómeno de la materia viva que se presenta en el tiempo mostrando una periodicidad constante. Gracias a estos ritmos, los seres vivos pueden detectar cambios de humedad, de luz, de temperatura y disponibilidad de alimento, produciendo variaciones cíclicas entre predadores y depredados. Ejemplos de ritmos biológicos son: la menstruación, el ciclo estral, la hibernación, la migración, la floración, la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardiaca, etc.

La mayoría de los seres vivos han tenido la necesidad de detectar claramente las estaciones del ciclo anual, presentando así una gran capacidad de adaptación para poder identificar los cambios en los periodos de día-noche, que están relacionados con los movimientos de rotación y traslación de la Tierra (Pitendrigh y Minis, 1964). Los cambios cíclicos ambientales pueden sincronizar algunos de éstos ritmos endógenos, entre ellos están la temperatura y la luz que es considerada como la señal más importante, estos grandes cambios determinan la actividad de los distintos organismos (tanto depredadores como depredados), que se ve afectada por esas variaciones periódicas. Los sistemas biológicos son capaces de mantener su ritmicidad, aún en condiciones ambientales constantes, lo cual indica que los mecanismos generadores de éstos son de naturaleza endógena. Hay evidencias de ritmos biológicos en el comportamiento de algunos seres vivos. Alejandro el Grande (siglo IV A.C.), reportó movimientos diarios de las hojas y pétalos de las flores, Andróstenes (siglo IV A.C.) reportó que el tamarindo *Tamarindus indigus*, abre sus hojas en el día y las cerraba durante la

noche, aunque en esos tiempos éstos ritmos sólo se interpretaban como una respuesta pasiva al ciclo ambiental. Uno de los primeros registros formales que se realizaron con respecto a los ritmos y a su endogenicidad, fueron hechos por el astrónomo Mairan, en 1729; él estudio el movimiento de las hojas de una planta (*Mimosa pudica*), y observó que esta planta abría sus hojas en el día y las cerraba en la noche, posteriormente se colocó a la planta aislada de la luz solar y seguía presentando el mismo comportamiento. En 1910 el físico suizo August Forel observó que durante el desayuno llegaban abejas a ese lugar, a la misma hora y durante varios días, aun cuando no hubiera desayuno. Por lo anterior, Forel sugirió que las abejas podrían tener una memoria para el tiempo (zeitgedächtnis). Posteriormente se trató de poner alimento cada 19 o 48 hrs y las abejas no tuvieron capacidad para reconocer éste patrón. También Erwin Bünning (1935) demostró que el ritmo circadiano en plantas e insectos era genéticamente heredado (Citados en Moore-Ede et al., 1982).

Los ritmos biológicos se clasifican, dependiendo de la frecuencia o el periodo con el que se presentan en: ultradianos, circadianos e infradianos (Aschoff, 1981B). El ritmo ultradiano define un fenómeno que se presenta recurrentemente en periodos menores a 19 horas; el circadiano, corresponde a un ritmo con un periodo de aproximadamente 24 horas; y el infradiano es un ritmo con una frecuencia mayor a 29 horas. Además de éstos, también existen otros ritmos, como los circa-anales, que se presentan cada año, los tidales (mareales), etc.

### 3.1. RITMO CIRCADIANO.

La palabra circadiano proviene del latín *Circa* que significa cerca de y *dies* que significa días. Este término fue utilizado por Franz Halberg en 1959 (citado en Aschoff 1981A), para describir ciclos de aproximadamente 24 horas, que son generados endógenamente por un organismo. Desde los 1950's Colin Pittendrigh (citado en Pittendrigh y Minis 1964) ha realizado estudios sobre los ritmos circadianos demostrando que el ritmo no es un fenómeno aprendido. Se ha comprobado la endogenicidad y sincronización de este tipo de ritmos con factores externos que también se repiten una vez cada 24 horas, como por ejemplo los cambios nictamerales (día-noche).

Existe un reloj biológico interno constituido entre otros elementos por uno o varios marcapasos capaces de sincronizar a éstos ritmos endógenos. El marcapaso circadiano, seguramente en todos los organismos, es sincronizado por los cambios externos cíclicos en el día.

En *Procambarus clarkii* se ha observado que el movimiento de los pigmentos retinianos, proximal y distal presentan un ritmo circadiano (Page y Larimer, 1975; Larimer y Smith, 1980). Lo anterior va acompañado por una variación circadiana en la sensibilidad retiniana, la cual se puede determinar mediante los cambios en la amplitud del electrorretinograma (ERG). La amplitud del ERG, es mayor cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la obscuridad y es menor cuando están en posición de adaptación a la luz (Rao, 1985). Sin embargo existe cierta ritmicidad del ERG que puede ser independiente de la migración de pigmentos.

Recientemente se han descubierto cambios anatómicos circadianos en el

lóbulo óptico de la mosca *Musca domestica*. El tamaño de las células y de los axones aumenta en el día y disminuye por la noche, mostrando una densidad sináptica mayor durante la noche (Meinertzhagen y Pyza, 1996). En el lóbulo óptico de este animal existen dos tipos de interneuronas monopolares, L1 y L2, estas interneuronas se encuentran en la lámina, el primer neurópilo del lóbulo óptico. Estas interneuronas presentan axones que sufren cambios cíclicos en su diámetro; al parecer estos cambios son de naturaleza circadiana debido a que los axones son de gran tamaño al iniciar el día, y muy pequeños en la noche, cuando la mosca se mantiene en periodos de 12 horas de luz y 12 de obscuridad. En condiciones de luz constante, los axones incrementan su tamaño, pero no muestran cambios cíclicos a lo largo de las 24 hrs; y cuando los axones se encuentran en obscuridad constante, las células L2 vuelven a mostrar cambios cíclicos en su tamaño. Al parecer, la exposición a la luz u obscuridad puede iniciar los cambios circadianos. Los mecanismos mediante los cuales se producen estos cambios aún no son claros, aunque se han propuesto tres posibilidades que: 1) estén involucrados flujos iónicos, 2) sea un efecto secundario de cambios osmóticos, o 3) estén involucrados por lo menos dos procesos independientes (Pyza y Meinertzhagen, 1995).

#### 4. LA SEROTONINA (5-HT) EN LAS DIVERSAS FUNCIONES DE LOS INVERTEBRADOS.

La serotonina (5-HT) es una monoamina que se forma a partir del aminoácido triptofano, que por la enzima triptofano hidroxilasa, se convierte en 5-hidroxitriptofano, éste a su vez, mediante la acción de la enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilasa forma la 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina (Nicholls et al., 1992). En los invertebrados, las aminas funcionan tanto como neurotransmisores, como neuromoduladores y como neurohormonas. La serotonina se ha encontrado en varios ganglios del sistema nervioso central, los pedúnculos oculares y hemolinfa de los crustáceos (Sandeman et al., 1988; Beltz y Kravitz, 1983).

Hay evidencias de que las aminas regulan funciones motoras, y son moduladoras de la función sensorial y de la actividad interneuronal en los anélidos, artrópodos y moluscos al igual que en los vertebrados (Walker y Holden-Dye, 1989).

En *Aplysia*, la serotonina facilita la entrada sensorial del reflejo de retracción branquial y los reflejos alimenticios. En los ofiuridos, influye en el aumento del nado de las larvas y la concentración de ésta aumenta conforme avanza el desarrollo embrionario y larval, presentando mayor concentración de serotonina en el momento de la eclosión. En la langosta, modula la programación motora y central para la flexión mediando así la postura extensora (de defensa) y la flexora (de agresión). La serotonina también participa en los procesos visuales, cambiando la fase del ritmo circadiano de la actividad del nervio óptico en ojos

aislados de *Aplysia*, (Eskin et al., 1982) e incrementa la sensibilidad visual en *Limulus* (Barlow et al., 1977).

Goldberg y colaboradores (1986) y Goldberg y Karter (1989) demostraron que la serotonina está presente en el sistema nervioso de embriones del molusco *Helisoma* y puede actuar como un regulador del desarrollo. Estos autores encontraron que hay un aumento en la expresión a serotonina en diferentes neuronas en las etapas postembrionarias.

En el acocil, la serotonina incrementa la frecuencia de los potenciales de acción neuromuscular en las terminales motoras y parece que afecta la actividad de las motoneuronas en los ganglios centrales, y la transmisión neuromuscular periférica.

En el cerebro del acocil *Cherax destructor*, tanto en el adulto como en las fases juveniles, se han encontrado células que contienen serotonina; unas están asociadas con los sistemas aferentes, como las que se encuentran en los lóbulos accesorio y olfativo; otras están asociadas con los sistemas neuropilares, como las neuronas de la porción anterior de la médula terminalis y puente protocerebral así como las del cuerpo central; por último, hay otras relacionadas con los sistemas motores, como las neuronas de la porción caudal de la médula terminalis y las de la red protocerebral dorsal con sus proyecciones hacia deutocerebro y tritocerebro (Sandeman et al., 1988). En este acocil, cuando está el 75 % desarrollado se presenta una inmunorreactividad a serotonina en las neuronas del ganglio cerebroide, incrementándose en las dos etapas postembrionarias y presentando una inmunorreactividad similar a la del acocil adulto. La presencia de neuronas serotoninérgicas desde etapas tempranas y su

persistencia durante el desarrollo parece indicar una acción neuromoduladora de esta monoamina sobre varios sistemas neurales, estando muy relacionada con la habilidad de este animal para regenerar apéndices y receptores (Sandeman y Sandeman, 1990). Elofsson y colaboradores (1982) encontraron serotonina en la hemolinfa de la forma juvenil del acocil *Pacifastacus leniusculus*, esto sugiere que la serotonina actúa como una hormona en los crustáceos después de que eclosionan. En el acocil *Procambarus clarkii* también se ha encontrado serotonina en los pedúnculos oculares y ganglio cerebroide, desde la etapa POI hasta el adulto (García-Rivera et al., 1994).

Estudios fisiológicos, sobre el pedúnculo ocular, han demostrado que la serotonina es una neurohormona y/o neurotransmisor que modula la secreción y liberación de las neurohormonas producidas por el órgano-X y liberadas por la glándula sinusal; como ejemplo de ello está la hormona hiperglicémica de crustáceos (CHH) (Van Herp y Strolenberg, 1980), la hormona inhibidora de la muda (MIH), y la hormona dispersora del pigmento rojo (RPDH) (Rudolph y Spaziani, 1990).

En estudios realizados con técnicas de microscopía electrónica, llevados a cabo *in vitro*, en pedúnculos aislados de *Procambarus clarkii* adulto, así como en estudios *in vivo* sobre éste mismo animal, se demostró un incremento nocturno de la serotonina, y con ello un aumento de la sensibilidad de los fotorreceptores. Lo anterior parece ser debido a que influye en la retracción del pigmento proximal (Aréchiga et al., 1990). Estos autores han propuesto que la serotonina juega un papel de modulador, en la fase nocturna, del ciclo circadiano en la retina del acocil.

## 5. SUSTRATO ANATÓMICO-FUNCIONAL DEL RITMO ERG EN EL ACOCIL.

En muchos estudios sobre la sensibilidad del ojo del acocil a la luz se han utilizado registros de electroretinograma (ERG) para analizar las respuestas de los fotorreceptores. El ERG constituye una herramienta útil para éste tipo de estudios pues no es agresivo para la superficie corneal y permite hacer estudios crónicos en animales íntegros y a largo plazo.

El electroretinograma (ERG) es la respuesta extracelular del ojo a la luz, producida por la diferencia de potencial eléctrico; esta es la diferencia de voltaje entre las estructuras visuales del ojo y el electrodo de referencia. El voltaje registrado en los animales adultos, en condiciones constantes cambia a lo largo del día, habiendo una diferencia en la magnitud del ERG de entre 600 y 700  $\mu\text{V}$  de la mañana a la noche. A ésta diferencia se le denomina ritmo de amplitud del ERG, y presenta un ritmo circadiano (Aréchiga y Fuentes, 1970).

En animales adultos, se ha propuesto que la amplitud del ERG, a un pulso de intensidad constante, depende de la actividad fisiológica de tres estructuras (Aréchiga et al., 1992). Una es la capacidad de los propios fotorreceptores para captar la luz; otra es la posición del pigmento proximal; por último, la posición del pigmento distal. Estos ritmos se presentan tanto en la obscuridad constante como en la luz-obscuridad (Welsh, 1930).

Lo anterior indica que la capacidad de los fotorreceptores a la luz puede ser regulada por cambios en los componentes oculares pigmentarios. El pigmento proximal migra como respuesta directa de los fotorreceptores a la luz y a la obscuridad, y el pigmento distal es sensible a las neurohormonas liberadas, como una respuesta a la luz y a la obscuridad (Aréchiga, 1977). La hormona dispersora del pigmento distal se libera en la iluminación y promueve la dispersión de este pigmento; la hormona concentradora de eritróforos mueve el pigmento distal hacia la córnea durante la obscuridad constante; las dos hormonas se producen en el pedúnculo ocular (órgano X - glándula sinusal). En los crustáceos, se ha asumido que el pedúnculo ocular es un lugar de generación de ritmicidad circadiana. En estudios realizados con el acocil *Potamobius astacus*, al ablacionar los pedúnculos oculares, desaparece el ritmo diurno de locomoción y de movimiento de pigmentos tegumentarios; por otra parte, en el acocil *Procambarus clarkii* los pedúnculos oculares aislados son capaces de generar un ritmo circadiano autosostenido de secreción de la hormona concentradora del pigmento rojo (Rodríguez-Sosa et al., 1994).

La serotonina tiene un efecto directo sobre la retina, actuando en las células fotorreceptoras, aumentando la respuesta a la luz y promoviendo la retracción de los pigmentos de los fotorreceptores retinianos. La presencia de serotonina en la noche determina la retracción del pigmento e incrementa la sensibilidad del fotorreceptor (Aréchiga et al., 1990).

## 6. ONTOGENIA.

La ontogenia es el estudio de la historia de vida de los organismos, desde que se lleva a cabo la fertilización hasta que se da la maduración funcional de todos los aparatos y sistemas. Algunos autores consideran que el proceso continúa hasta la muerte del organismo (Davis, 1981). Los seres vivos presentan muchos ritmos, en su comportamiento, fisiología y bioquímica. Todos estos ritmos se relacionan de alguna manera, unos con otros así como con el medio ambiente, mediante uno o varios marcapasos. La ontogenia de los ritmos biológicos constituye el estudio de los procesos mediante los cuales se produce la organización temporal de un organismo.

Para que un ritmo circadiano pueda expresarse, es necesario que se haya dado la madurez del sustrato anatómico-funcional, en donde se origina el ritmo circadiano, y además que se hayan producido las relaciones funcionales necesarias entre los elementos que participan en la expresión del ritmo (Rensing, 1965; Davis, 1981). Por lo tanto las características de los ritmos cambian durante la ontogenia de los organismos.

En los seres vivos las propiedades de los marcapasos, tales como las características del ritmo en oscilación espontánea y los mecanismos de sincronización al medio ambiente, han sido estudiados durante el desarrollo de los vertebrados, y particularmente en los mamíferos. Al parecer la manifestación evidente de un ritmo, en los mamíferos es un fenómeno postnatal, la ausencia del ritmo prenatal aparente, puede deberse a que no se han hecho investigaciones formales para descubrirlo, ya que el embrión y el feto en diferentes animales, no sólo están influenciados por la ritmicidad interna de actividad y temperatura de la

madre adulta, sino también por los niveles hormonales en la placenta. Por lo tanto, el ritmo parece estar influido por fenómenos ambientales y la maduración de estructuras durante el desarrollo (Davis, 1981).

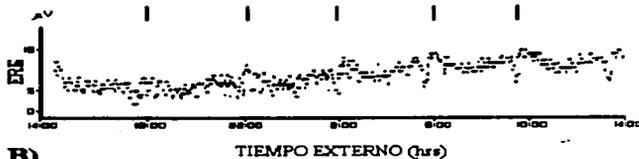
En los invertebrados son pocos los estudios que se han llevado a cabo en este campo, entre ellos están los de Hernádi (1994) realizados en el caracol *Helix pomata* en los que detectó que el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) se limitaba a ser un neurotransmisor del sistema nervioso central en los gasterópodos; y las fibras nerviosas periféricas en las que se encontró GABA, pueden jugar un papel importante en los procesos de integración de este animal. Y los de Stengl (1995) realizados en grillos *Teleogryllus commodus* y *Grillus bimaculatus*, a los que se les hicieron lesiones en el ojo compuesto, así como técnicas de inmunohistoquímica, para examinar si los procesos del cerebro medio de los grillos estaban relacionados con los procesos de la actividad circadiana; en ellos observaron que hay un oscilador circadiano en el cerebro medio y que hay un marcapaso circadiano en los lóbulos ópticos.

Estudios relativamente recientes en los crustáceos, particularmente en el acocil, (Fanjul-Moles et al., 1987; Fanjul-Moles et al., 1992; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 1996), han reportado cambios en la amplitud del (ERG), respuesta electrofisiológica a la luz, del ritmo de sensibilidad visual en el acocil. Estos trabajos han evidenciado que durante el desarrollo postembrionario cambian las características del ritmo ERG. En los acociles *Procambarus clarkii* de la etapa POI el ritmo es ultradiano pues se manifiesta con características de un periodo de 15 min a 4 hrs, conforme avanza el desarrollo del acocil, el periodo del ritmo aumenta, presentándose un ritmo circadiano evidente a los 30 días de edad,

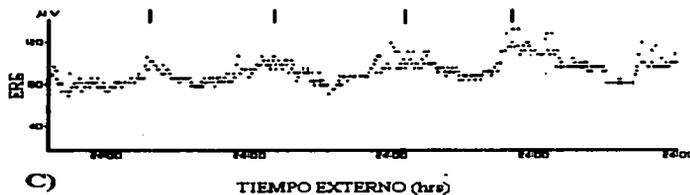
aunque este periodo tiene un ritmo circadiano de ERG bien establecido hasta los 90 días postnatales (Fig. 9).



**A)**



**B)**



**C)**

Figura 9.- Muestra los registros de amplitud del electroretinograma (ERG). **A)** Etapa POI, muestra periodos cercanos a 4 hrs, es decir un ritmo ultradiano. **B)** Etapa POII, presenta periodos de 4 hrs, ritmo ultradiano. **C)** Etapa juvenil, el animal empieza a presentar un ritmo de 21 hrs, ritmo circadiano (Tomado de Fanjul-Moles *et al.*, 1987)

### III. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

Se han propuesto dos estructuras marcapaso para la génesis y la sincronización del ritmo de ERG, una es el pedúnculo ocular, para la sincronización unilateral, y la otra es el ganglio cerebroide, para la bilateral (Page y Larimer, 1975).

También se proponen dos vías mediante las cuales se produce la sincronización bilateral; una es la hormonal, en donde podría intervenir la serotonina, y la otra es neural; en los axones que corren del ganglio cerebroide y de las fibras eferentes, que van por el nervio óptico hacia la retina, las cuales presentan serotonina. Estos axones establecen contacto con los axones de los fotorreceptores retinianos (Aréchiga et al., 1990).

La serotonina afecta los ritmos circadianos relacionados con el tamaño de la pseudopupila y la amplitud del ERG, en el acocil (Hernández-Falcón et al, 1987). La expresión tardía de estos ritmos parece estar relacionada con el desarrollo postembrionario del sistema neuroendócrino que regula la maduración del sistema circadiano (Fanjul-Moles et al., 1987). La expresión de un ritmo circadiano podría estar relacionada con modificaciones de la modulación de la serotonina sobre los diferentes efectores del ritmo.

Algunos estudios han propuesto que en los acociles adultos existen células serotoninérgicas que modulan la sensibilidad del ritmo ERG, determinantes de que haya mayor sensibilidad en la noche que en el día. La serotonina se ha identificado en varios ganglios del sistema nervioso central y en los pedúnculos oculares, aunque en esta región parece tener variaciones, dependientes de un

ciclo de 24 horas; esto se ha detectado por medio de la cromatografía líquida de alta precisión, por inmunohistoquímica y por fluorescencia (Aréchiga et al., 1990).

Una forma de determinar ésta posible interacción es estudiar las características de inmunorreactividad a la serotonina en los elementos esenciales para el ritmo, esto es receptores, marcapasos y efectores, durante el desarrollo del mismo. Los elementos celulares que constituyen la retina del acocil participan como sistemas osciladores eferentes fundamentales para el ritmo. Por lo anterior es de gran importancia realizar estudios inmunohistoquímicos, en estos elementos, durante las etapas postembrionarias del acocil; realizando la fijación de organismos a diferentes horas del día, para poder determinar si hay cambios cíclicos en la concentración de serotonina, que pudieran estar relacionados con la respuesta cíclica de éstos organismos.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

Si entre las primeras etapas postembrionarias, del acocil *Procambarus clarkii*, se producen diferencias rítmicas diarias en la exposición de la inmunorreactividad a la serotonina, ésta podría ser un factor fundamental para la expresión y regulación del ritmo ERG.

## **V. OBJETIVOS:**

- Determinar la inmunorreactividad a la serotonina en las estructuras retinianas, en diferentes etapas del desarrollo postembrionario del acocil *Procambarus clarkii*, a tres diferentes horas del día, en condiciones de luz-obscuridad 12:12 hrs.
- Corroborar los cambios morfológicos que presenta la retina utilizando un anticuerpo contra actina.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODO.**

### **1. ANIMALES.**

Acociles adultos de ambos sexos, de la especie *Procambarus clarkii*, fueron colectados en el Río Conchos en Saucillo, Chihuahua. Una vez aclimatados al laboratorio, se colocaron tres machos con seis hembras por acuario, para que se llevara a cabo la reproducción y contar con las etapas necesarias para la experimentación. Los animales nacieron y crecieron en el laboratorio, fueron alimentados tres veces por semana con verdura cocida y pescado crudo, mantenidos en un fotoperiodo de luz-obscuridad 12:12 hrs.

Se utilizaron 27 acociles de la especie *Procambarus clarkii*, 9 organismos POI, 9 organismos POII y 9 juveniles de dos meses de edad, los cuales se distribuyeron en 3 acuarios; un acuario para cada etapa. Se trabajó con animales procedentes de la misma madre, para disminuir la variabilidad genética.

Los animales se colocaron en acuarios que medían 70 X 40 X 33 cm., tenían un filtro biológico formado con una placa de acrílico con dos orificios por los cuales se les colocó un tubo y una manguera para la aireación del agua; toda la placa tenía pequeños orificios, a cada 2.5 cm. Esta placa se cubrió con una capa de grava, después una capa de arena gruesa y posteriormente una de arena fina. Para darles a los organismos una fuente de carbonato de calcio, se colocaron pedazos de coral, pues el calcio es fundamental para su crecimiento (Fig. 10). Los acuarios contaban con una lámpara controlada por un "timer", la cual proporcionaba 145 lx, para controlar el fotoperiodo.

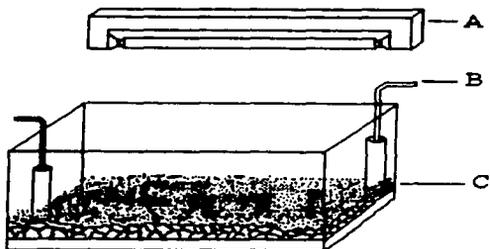


Figura 10.- Esquema de un acuario: A) lámpara, B) tubo de aireación C) capas de grava y arena.

## 2. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LÓBULOS ÓPTICOS.

### 2.1. FIJACIÓN.

A tres diferentes horas del día (8:00, 15:00 y 20:00 hrs), los acociles se anestesiaron con frío, durante 30 minutos, tiempo en el que permanecieron en completa oscuridad, para corroborar si se presentaba o no el reflejo fotomotor, esto se hizo para cada una de las etapas, POI, POII y juvenil. Posteriormente se llevó a cabo la fijación de los organismos en formol al 10%, los POI durante 6 horas; los POII y juveniles durante 2 horas. Posteriormente a los animales de estas dos etapas (POII y juvenil) se les hizo la disección de pedúnculos oculares, los cuales continuaron 4 horas más en formol.

### 2.2. DISECCIÓN.

Las disecciones se hicieron con un microscopio Olympus SZ SCTU1. En el caso de la etapa POI, se fijó, deshidrató, incluyó y cortó al organismo completo. A los animales de la etapa POII se les despojó del caparazón en la región del cefalotórax. A los acociles juveniles se les hizo la disección para extraer los pedúnculos oculares, y fueron desprovistos de quitina.

Una vez fijados los tejidos se deshidrataron en alcoholes graduales: al 50% 24 hrs, al 70% 24 hrs, al 96% 12 hrs y al 100% 12 hrs. Se aclararon con xileno durante 30 min, y posteriormente se incluyeron en Paraplast (Oxford Labware), dentro de una estufa a 59 °C durante 12 hrs.

Mediante un microtomo (American Optical 820), se realizaron cortes

longitudinales (sagitales) de 4  $\mu\text{m}$  de espesor. De cada pedúnculo ocular se obtuvo una serie de 40 cortes aproximadamente.

Los cortes se desparafinaron con xileno, durante 30 min y se rehidrataron con alcoholes graduales: al 100% 10 min, al 96% 10 min, al 70% 5 min y al 50% 5 min. Enseguida se colocaron en agua destilada y se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica.

### 3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

- \* 1.- Lavado con amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.6, durante 5 min.
- \* 2.- Bloqueado de proteínas (suero normal de cabra) por 20 minutos, quitando el exceso. Este bloqueador reduce la tinción de fondo que se presenta por los enlaces no específicos de los anticuerpos, primario y secundario, con el tejido.
- \* 3.- Aplicación del anticuerpo policlonal primario (de conejo) contra serotonina, ó contra actina, en diluyente común para anticuerpo PBS 1:80, por 30 min.
- \* 4.- Lavado con PBS, 5 min.
- \* 5.- Aplicación del anticuerpo secundario de inmunoglobulinas de conejo, rata y/o ratón, biotilado (Multilink), de 1 a 2 gotas por tejido, 20 min de incubación.
- \* 6.- Lavado con PBS, 5 min.
- \* 7.- Aplicación de fosfatasa alcalina (marcador) conjugada con estreptavidina de 1 a 2 gotas por tejido; incubando 20 min.
- \* 8.- Lavado con PBS, 5 min.
- \* 9.- Se reveló la reacción con el cromógeno rojo rápido (sales de 4-cloro2-

metilbenzenediazonium) una tableta, diluida en 5 ml de amortiguador de fosfato naftol, agregándole dos gotas de solución de levamisole para evitar la reacción de fondo detectada por el sistema de la fosfatasa alcalina, inhibiendo la fosfatasa alcalina endógena en los tejidos. Se incubó por 40 min.

\*10.- Lavado con PBS.

\*11.- Se colocó la hematoxilina de Mayer de 1 a 5 min, para contrastar la reacción.

12.- Lavado con agua corriente, para parar la tinción de la hematoxilina.

13.- Lavado con agua amoniacal por 10 seg, para virar la reacción de la hematoxilina.

Se limpiaron los tejidos. Finalmente se llevó a cabo el montaje en medio acuoso Vikel (Romero-Díaz, en experimentación).

\* Todos estos pasos se llevaron a cabo en una cámara húmeda, a temperatura ambiente.

Los reactivos utilizados fueron procedentes de la casa comercial BioGenex; excepto el Vikel, que fue donado por el M. en C. Viktor J. Romero Díaz.

Se llevaron a cabo los correspondientes controles negativos, aplicándose suero normal de conejo en lugar del anticuerpo primario.

Posteriormente se analizaron las preparaciones en un microscopio Nikon Labophot-2 HFX-DX.

#### 4. DIGITALIZACIÓN DE IMAGEN.

Las mediciones y el conteo, se llevaron a cabo en un digitalizador de imágenes Hamamatsu modelo C5510-01 (Japón), con cámara Nikon Fx-35DX, obteniendo así los datos cuantitativos.

Las distancias de los cortes se determinaron mediante el análisis de toda la serie de cortes, eligiendo el corte central que presentaba las estructuras de interés.

Al tener las series de cortes con la técnica de inmunohistoquímica de cada uno de los organismos, se procedió a realizar el análisis del área que corresponde a la retina, utilizando tres cortes por cada sujeto experimental, el del corte central y los cortes de 50  $\mu\text{m}$  hacia la región dorsal y 50  $\mu\text{m}$  hacia la ventral.

Para estudiar la retina, se dividió ésta en tres regiones establecidas arbitrariamente: la proximal, la media y la distal, realizando las mediciones de cada área, además del área total, tanto de la estructura como de la inmunorreactividad a serotonina. Para ello la imagen del corte seleccionado se delimitó con el señalador (ratón) y automáticamente el digitalizador calculó el área de la región marcada. También se cuantificó el número de núcleos celulares y el área de cada núcleo, con el objeto de determinar si existía una variación que pudiera estar relacionada con los cambios del área de la retina.

Además, para corroborar si había movimiento celular y que debido a esto pudiera haber o no diferencia en el área de retina a diferentes horas del día, a los cortes correspondientes a las etapas POI y POII, se les aplicó un anticuerpo contra actina.

Los microfilamentos de actina son componentes citoesqueléticos evidentes de células neuroepiteliales, células gliales y neuronas, funcionan en conjunto con otros elementos citoesqueléticos para determinar la forma y el movimiento celular. En las células no musculares, la actina está presente en una red de microfilamentos. En las células migrantes los microfilamentos se encuentran con frecuencia formando una red, la cual también está asociada con las proteínas que determinan la superficie celular y representan la parte principal de los procesos migratorios. Estos microfilamentos desempeñan un papel en la movilización de los componentes citoplásmicos (Alberts et al., 1989).

#### 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se aplicó una prueba de Bartlett, para verificar la homogeneidad de las varianzas de la muestra, de los tres lotes experimentales, y determinar la prueba estadística a seguir. Bartlett presenta una distribución  $X^2$  con  $k-1$  grados de libertad (Bartlett, 1937; Aguilar-García, 1981). La prueba demostró que las varianzas dentro de cada grupo a las tres horas investigadas eran homogéneas. Por lo tanto se decidió aplicar una prueba de análisis de varianza, ANOVA de una vía, seguida de una prueba de contrastes de Scheffé con el objeto de determinar la diferencia de inmunorreactividad a serotonina y/o en las estructuras de la retina entre los lotes experimentales, POI, POII y juvenil a tres diferentes horas. A los cortes que se trataron con actina no se les aplicó ninguna prueba estadística debido a la falta de casuística.

La ANOVA es un procedimiento estadístico que determina si hay o no diferencia entre dos o más grupos de varianzas homogéneas sujetos a uno o más factores. La prueba de Scheffé permite hacer comparaciones entre las medias de dos o más muestras (Dawson-Saunders y Trapp, 1993).

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el paquete SIGMA PLOT U.S.

## **VII. RESULTADOS.**

En las tres etapas del desarrollo postembrionario, se lograron diferenciar las estructuras que conforman los pedúnculos oculares de los acociles, como son la retina, la lámina ganglionaris, la médula externa, la médula interna, la médula terminalis y el tracto óptico. Conforme progresa el desarrollo estas estructuras van tomando una posición más longitudinal, una con respecto a la otra, encontrándose mejor delimitadas entre ellas. En los tres estadios postembrionarios, la inmunorreactividad a la serotonina es muy intensa en las fibras que forman los neurópilos de la lámina ganglionaris y de las médulas externa, interna y terminalis, así como en los pigmentos (distal y proximal) en la retina. Los núcleos celulares, en las tres etapas del desarrollo, presentan afinidad por la hematoxilina (Fig. 11).

Las preparaciones control, mostraron una inmunorreactividad negativa.

### **1. ETAPA POSTEMBRIONARIA I.**

#### **1.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.**

En el estadio POI la retina se está desarrollando, pues en ella existe una gran cantidad de núcleos celulares de diversos tamaños que van de 11.9 a 50.8  $\mu\text{m}^2$  de área, habiendo un notable aumento en el tamaño del núcleo. La cromatina se observa diferente en los núcleos; en algunos de éstos se observan dos pequeños gránulos que posiblemente sean los centriolos, todo lo anterior

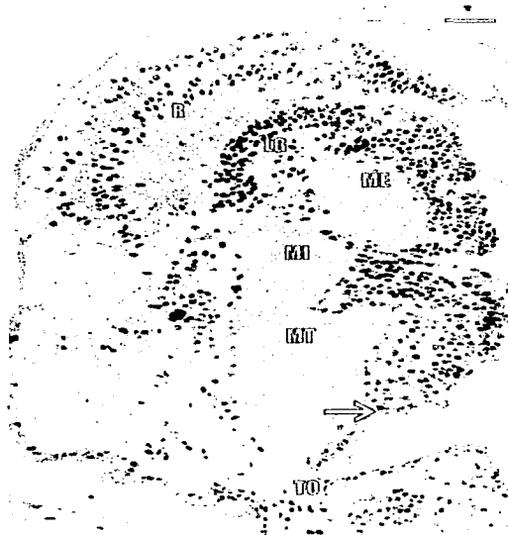


Figura 11.- Corte longitudinal del pedúnculo ocular del acocil. Panorámica de la etapa POI. R, retina; LG, lámina ganglionaris; ME, médula externa; MI, médula interna; MT médula terminalis; TO, tracto óptico. La flecha indica las granulaciones inmunorreactivas a serotonina, que se encuentran en las fibras del lóbulo óptico. Escala de barra 100  $\mu$ m. Ih (Inmunohistoquímica)-Serotonina.

puede estar indicando que se encuentran en mitosis y en proliferación, en la retina anterior. En la retina posterior se encuentran células estructuralmente mejor conformadas que las de la retina anterior. Los núcleos de las células corneágenas no se logran observar en esta etapa; los de las células del cono cristalino se localizan en la mitad distal de la retina, como se puede observar en la figura 12A; el tracto cristalino no se ve claramente; posteriormente se encuentran los núcleos de las células retinulares, estos son los más abundantes en comparación con los otros tipos de células. En contacto con éstos, están los rabdomos parcialmente diferenciados, adheridos a la membrana basal, que se observa claramente. Por debajo de ésta se pueden distinguir los axones de las células retinulares; también se encuentran hemocitos granulados y muy pocas células gliales (Fig. 12B). El pigmento distal está presente en las células que rodean al cono cristalino, y el pigmento proximal dentro del citoplasma de las células retinulares que rodean al rabdomo, aunque no se puede apreciar una separación de los dos pigmentos, presentan una distribución difusa, por lo que se pensaría que no hay reflejo fotomotor en esta etapa (Fig. 12C). Las características morfológicas de la retina no parecen variar a las tres diferentes horas del día, pues son muy semejantes las estructuras que la conforman (Fig. 12).

El número de núcleos celulares encontrados en la retina, muestran una variación a las tres horas del día; a las 8:00 hrs hay un promedio de 201 núcleos con  $22.96 \mu\text{m}^2$  de área por núcleo, a las 15:00 hrs hay 215 núcleos de  $27.30 \mu\text{m}^2$  de área y a las 20:00 hrs se encuentran 142 núcleos de  $28.9 \mu\text{m}^2$ .

Figura 12.- Fotografías de la retina del acocil de la etapa POI, de los animales fijados a tres diferentes horas: **A)** 8:00 hrs, **B)** 15:00 hrs y **C)** 20:00 hrs. P, porción posterior; A, porción anterior; R rabdomos; MB, membrana basal; Cc, núcleos celulares del cono cristalino; Cr, núcleos de las células retinulares; Hg, hemocitos granulados; la flecha indica las granulaciones positivas a serotonina. Escala de barra 20  $\mu$ m. Ih-Serotonina.

A



B



C



En los cortes que se les aplicó un anticuerpo contra actina (Fig. 13), también se pueden observar las diferentes estructuras que forman la retina en la etapa POI. La inmunorreactividad a la actina fue muy poca, algunos gránulos se localizaron en los núcleos de las células, principalmente en los cortes de los acociles fijados por la noche.

### 1.2. ÁREA DE LA RETINA.

En promedio el área total de retina es de  $30851.30 \mu\text{m}^2$ .

No se encontró diferencia significativa en cada una de las regiones, la proximal, la media y la distal de la retina, a las tres diferentes horas del día (Fig. 14; tabla 1), el promedio del área proximal fue de  $15.94\% \pm 0.43 \text{ DS}$ , el de la región media es de  $21.92\% \pm 1.08 \text{ DS}$  y la distal fue de  $62.04\% \pm 0.77 \text{ DS}$ . Se obtuvo una  $F = 9.999$ .

### 1.3. ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA.

Los gránulos de inmunorreactividad a serotonina se pueden observar en todas las estructuras que forman la retina, como son: cono cristalino, rbdomos, membrana basal, axones de las células retinulares, pigmento distal, pigmento distal y muy poco en los núcleos celulares (Fig. 12).

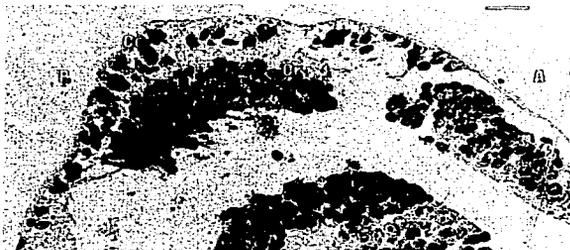
No hubo diferencia significativa por regiones ni total del área retinal, a las tres diferentes horas en que se fijaron a los animales (Fig. 14). Los porcentajes de positividad total a serotonina a las diferentes horas no varían mucho (Tabla 1). La  $F = 4.609$ .

**Figura 13.-** Fotografía de la retina de la etapa POI, **A)** fijada a las 8:00 hrs, **B)** fijada a las 15:00 hrs y **C)** fijada a las 20:00 hrs. P, porción posterior; A, porción anterior; Cc, núcleos celulares del cono cristalino; Cr, núcleos de las células retinulares. Escala de barra 20  $\mu$ m. I $\alpha$ -Actina.

A



B



C



Figura 14.- Gráfica en la cual se muestra el porcentaje del área de la retina del acocil en la etapa POI, a las tres horas del día. La retina se dividió en tres regiones: la proximal, la media y la distal. Se puede observar el área total de cada región, así como el área de inmunorreactividad a serotonina, por regiones y a nivel total. T, área por región; S, área de inmunorreactividad por región; y T\*, área total de positividad a serotonina en toda la retina. La media está representada  $\pm$  su desviación estándar ( $p > 0.05$ ).

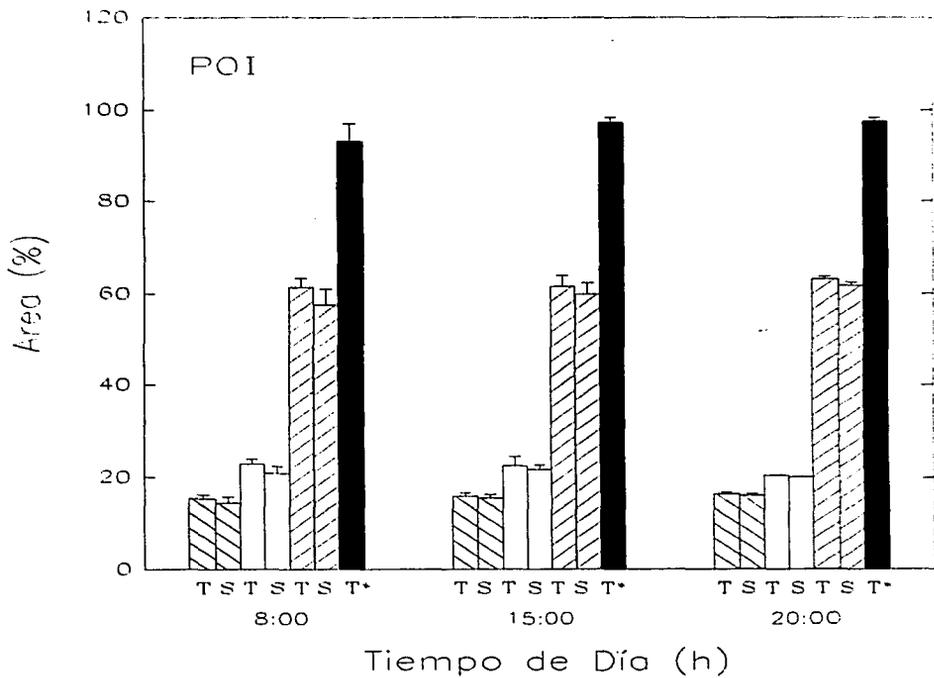


TABLA 1.  
 PORCENTAJE DEL ÁREA DE LA RETINA Y DEL ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA EN LA  
 ETAPA POI DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*.

HORA	ÁREA	RP%	RM%	RD%	TR%
8:00	TOTAL	15.4 ±0.86	22.86 ±1.05	61.4 ±2.0	100 0
	IR	14.5 ±1.3	20.9 ±1.4	57.6 ±3.4	93.07 ±3.9
15:00	TOTAL	15.97 ±0.7	22.5 ±20.1	61.6 ±2.4	100 0
	IR	15.6 ±0.77	21.7 ±1.5	59.9 ±2.5	97.3 ±1.16
20:00	TOTAL	16.44 ±0.4	20.4 ±0.14	63.13 ±0.53	100 0
	IR	16.15 ±0.4	20.12 ±0.17	61.81 ±0.66	97.5 ±0.76

RP.- Región proximal.

RM.- Región media.

RD.- Región distal.

IR.- Área de inmunorreactividad a serotonina.

TR.- Área total de la retina.

La media está representada ± la desviación estándar.

El área proximal presenta un promedio de 15.42%  $\pm$  0.69' DS de inmunorreactividad, la región media un 20.91%  $\pm$  0.65 DS, y la distal un 59.77%  $\pm$  1.72 DS. El total de inmunorreactividad a serotonina en la retina tiene un valor de 95.96%  $\pm$  2.04 en esta etapa (Fig. 14).

## 2. ETAPA POSTEMBRIONARIA II.

### 2.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.

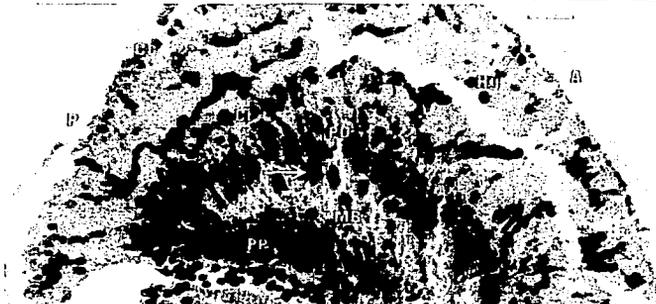
En el POII las estructuras que conforman el pedúnculo ocular ya están más diferenciadas y delimitadas en comparación con el POI. En la retina se pueden observar las omatidias completas; se ven varios núcleos de las células corneágenas y del cono cristalino, el tracto cristalino se observa claramente; posteriormente se encuentran los núcleos de las células retinulares que siguen siendo bastantes, debajo de éstas se presentan los rabdomos bien formados. En esta etapa se empiezan a distinguir algunos núcleos de las células del tapetum, que se encuentran sobre la membrana basal (Fig. 15A). Hay hemocitos granuloso con algunas granulaciones inmunorreactivas, éstos se encuentran hacia la córnea (Figs. 15B y 15C). Los axones de las células retinulares se distinguen con mayor facilidad en la retina de los acociles que se fijaron a las 20:00 hrs (Fig. 15C). En este estadio se pudo observar un desplazamiento del pigmento distal hacia la córnea y del pigmento proximal hacia la membrana basal (Fig. 15B). Por otra parte se encontraron diferencias en la morfología de las estructuras retinianas a las tres horas del día registradas. En los animales que se

Figura 15.- Fotografía de la retina del acocil en la etapa **POII**, **A)** fijada a las 8.00 hrs, **B)** fijada a las 15:00 hrs y **C)** fijada a las 20:00 hrs. P región posterior; A, región anterior; CC, cono cristalino; Tc, tracto del cono cristalino; R, rabdomos; MB, membrana basal; AC, axones de las células retinulares; Ce, núcleos de las células corneágenas; Cc, núcleos celulares del cono cristalino; Cr, núcleos de las células retinulares; Ct, núcleos de las células del tapetum; Hg, hemocitos granulosos; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; la flecha indica inmunorreactividad a serotonina. Escala de barra 20  $\mu$ m. Ih-Serotonina.

A



B



C



fijaron a las 8:00 y 20:00 hrs la morfología de la retina es semejante entre ellas y un tanto diferente a la de los acociles fijados a las 15:00 hrs, en estos animales el cono cristalino se ve difuso, los rbdomos se observan menos delimitados así como la zona que corresponde a los axones de las células retinulares; sin embargo se ve con mayor claridad la adaptación a la obscuridad, encontrándose el pigmento distal desplazado hacia la córnea y el pigmento proximal hacia la membrana basal. Por el contrario, en los animales que se fijaron por la mañana y por la noche, las estructuras están más delimitadas, pudiéndose observar con mejor cada una de las omatidias, pero no es muy claro el desplazamiento de los pigmentos distal y proximal.

En la porción anterior pueden distinguirse, un poco mejor que en POI, los elementos que forman la retina, los rbdomos se observan claramente; en la porción posterior el tracto cristalino está más alargado (Fig. 15).

El número de células, al igual que en POI, varía a través del día, pues se encontró que a las 8:00 hrs hay un promedio de 312 núcleos con un área promedio de  $37.9 \mu\text{m}^2$ , a las 15:00 hrs hay 239 núcleos con un área de  $30 \mu\text{m}^2$  y a las 20:00 hrs hay 274 núcleos con  $31.6 \mu\text{m}^2$  de área, habiendo un decremento a las 15:00 hrs, aunque en el área nuclear los cambios son más notables a las 8:00 hrs. El área de la retina disminuye a las 15:00 hrs coincidente con el decremento en el número y el área promedio de los núcleos celulares.

En los cortes a los que se les aplicó el anticuerpo contra actina, se observaron muy pocos gránulos positivos a actina, principalmente en los de los acociles fijados a las 15:00 hrs (Fig. 16).

Figura 16.- Fotografía de la retina de la etapa POII del acocil, **A)** fijada a las 8:00 hrs **B)** fijada a las 15:00 hrs y **C)** fijada a las 20:00 hrs. P, porción posterior; A, porción anterior; Cc, núcleos celulares del cono cristalino; Cr, núcleos de las células retinulares; Ct, núcleos de las células del tapetum; Hg, hemocitos granulosos. Escala de barra 20  $\mu$ m. Ih-Actina.

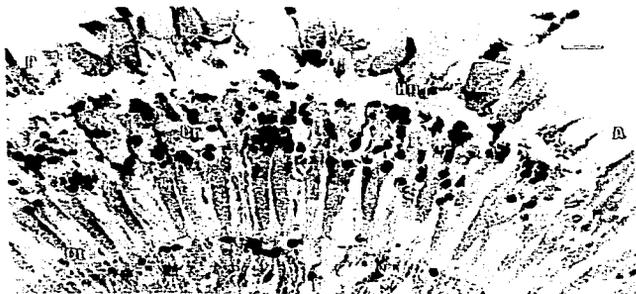
A



B



C



## 2.2. ÁREA DE LA RETINA A LAS DIFERENTES HORAS DEL DÍA.

El promedio del área total de la retina en ésta etapa es de  $84100 \mu\text{m}^2$ .

Hubo diferencia significativa en la región proximal entre las 8:00 y 15:00 hrs y en la distal entre las 8:00 hrs y las 15:00 hrs y entre las 15:00 hrs y las 20:00 hrs (Fig. 17; tabla 2). En promedio la región proximal ocupó el  $24.11\% \pm 2.5$  DS, la media el  $28.54\% \pm 1.11$  DS y la distal el  $47.2\% \pm 3.7$  DS. La  $F = 144.264$ .

## 2.3. ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA.

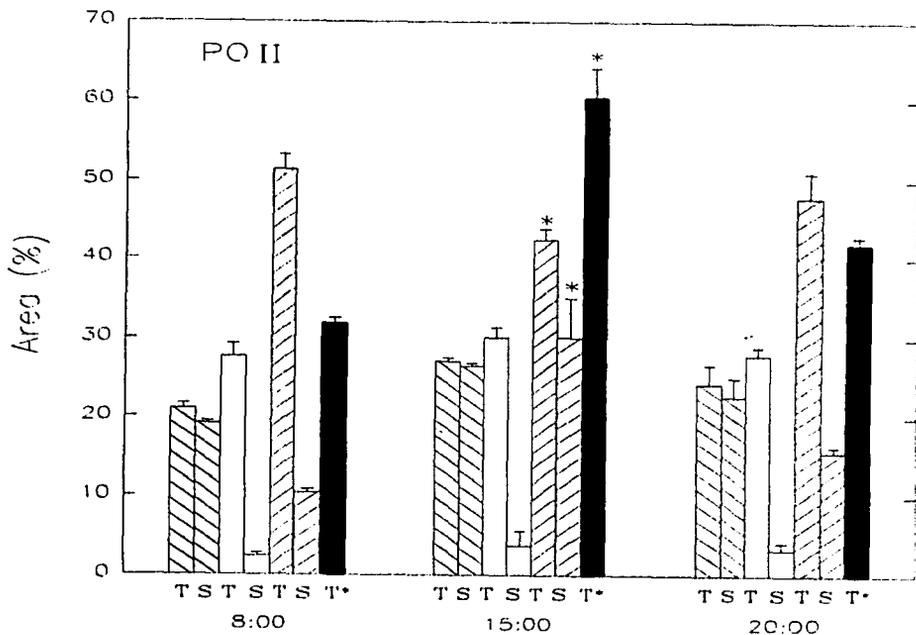
Los gránulos de inmunorreactividad a serotonina se observan con mayor claridad en la región donde se encuentran los pigmentos distal y proximal, en los rbdomos, en la membrana basal, en los axones de las células retinulares, observándose muy pocos gránulos en los núcleos celulares (Fig. 15).

En los organismos POII se encontró que la positividad a serotonina, en general, era mayor en los organismos fijados a las 15:00 hrs, (Fig. 15B), aumento notable en comparación con los resultados de los acociles que fueron fijados por la mañana y por la noche, habiendo diferencia significativa entre éstas tres mediciones (Fig. 17; tabla 2)).

Se encontró diferencia significativa en la región distal así como a nivel total de retina a las tres diferentes horas en las que se llevó a cabo la fijación, en las regiones proximal y media, no hubo diferencia significativa. La  $F = 140.066$ .

La región proximal presentó  $\bar{x} = 22.75\% \pm 3.04$  DS de positividad a serotonina, la región media  $\bar{x} = 3.12\% \pm 0.56$  DS, notablemente menor que las otras regiones, la distal  $\bar{x} = 18.64\% \pm 8.37$  DS y a nivel de retina total  $\bar{x} = 44.7\% \pm 11.8$  DS.

**Figura 17.- Gráfica en la que se muestra el porcentaje del área de la retina del acocil de la etapa POII. Se puede observar el área total que ocupó cada región, así como el área de positividad a serotonina tanto por regiones como el total de inmunorreactividad en la retina. La T es el área total de cada región, la S es el área de inmunorreactividad a serotonina por región y la T\* es el área total de inmunorreactividad en toda la retina, esto se puede observar a las tres diferentes horas. La media está representada  $\pm$  la desviación estándar. \*  $P < 0.05$ .**



Región Proximal



Región Media



Región Distal



Total de Inmunorreactividad

**TABLA 2.**  
**PORCENTAJE DEL ÁREA DE LA RETINA Y DEL ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA EN LA ETAPA POII DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*.**

HORA	ÁREA	RP%	RM%	RD%	TR%
8:00	TOTAL	20.95 ±0.73	27.63 ±1.61	51.4 ±1.85	100 0
	IR	19.06 ±0.32	2.36 ±0.41	10.33 ±0.45	31.84 ±0.72
15:00	TOTAL	27.07 ±0.45	30.1 ±1.32	42.4 ±1.35	100 0
	IR	26.5 ±0.37	3.7 ±1.9	29.3 ±5.	57.8 ±3.7
20:00	TOTAL	24.32 ±2.4	27.9 ±0.99	47.8 ±3.2	100 0
	IR	22.7 ±2.4	3.3 ±0.92	15.5 ±0.7	41.8 ±0.98

RP.- Región proximal.

RM.- Región media.

RD.- Región distal.

IR.- Área de inmunorreactividad a serotonina.

TR.- Área total de la retina.

La media está representada ± la desviación estándar.

### 3. ETAPA JUVENIL.

#### 3.1. DESCRIPCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.

La retina está bien formada, puesto que las estructuras que la forman están completamente diferenciadas, es más pequeña que la retina del adulto; pero es mayor que la de POI y POII. Se pueden identificar las omatidias; el cono cristalino está desarrollado, los rabdomos se observan claramente. La mayoría de los núcleos celulares pertenecen a las células retinulares, los cuales se pueden distinguir perfectamente en la retina de los acociles que se fijaron por la mañana. Hay hemocitos granulados así como núcleos de las células del tapetum (Fig. 18A y 18C). En la retina de los animales fijados a las 15:00 hrs se presenta una gran cantidad de células gliales, tal cantidad no se había presentado en las otras etapas ni a otras horas en este mismo estadio (Fig. 18B). Entre los axones de las células retinulares se encuentran grandes núcleos. La morfología de la retina no se ve diferente a lo largo del día. El cono cristalino ocupa una proporción mayor de área. El reflejo fotomotor es más claro que en POII y se observa con bastante claridad en los acociles fijados a las tres diferentes horas (Fig. 18).

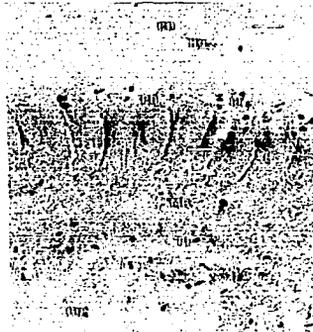
El número promedio de núcleos y el área promedio de cada uno también cambia, a las 8:00 hrs hay 171 núcleos con  $52.6 \mu\text{m}^2$  de área, a las 15:00 hrs son 281 núcleos con  $30.5 \mu\text{m}^2$  y a las 20:00 hrs hay 214 con  $24.8 \mu\text{m}^2$  de área, a las 8:00 hrs es en donde se encuentran menos núcleos con más área, y a las 15:00 hrs hay más cantidad de núcleos de menor área.

Figura 18.- Fotografía de la retina en el estadio juvenil del acocil, **A)** fijada a las 8:00 hrs, **B)** fijada a las 15:00 hrs y **C)** fijada a las 20:00 hrs. CC, cono cristalino; R, rabdómos; MB, membrana basal; AC, axones de las células retinulares; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; Cr, núcleos de las células retinulares; Ct, núcleos de las células del tapetum; Hg, hemocitos granulosos; Cg, núcleos de las células gliales; la flecha indica granulaciones positivas a serotonina. Escala de barra 10  $\mu$ m. 1h-Serotonina.

A



B



C



### 3.2. ÁREA DE RETINA.

En promedio el área total de la retina en la etapa juvenil es de 470593.23  $\mu\text{m}^2$ .

En los juveniles no se encontró diferencia significativa entre las regiones a las tres diferentes horas (Fig. 19; tabla 3). El área proximal, en promedio ocupa el 12.82%  $\pm 0.6$  DS, la media ocupa el 10.2%  $\pm 0.52$  DS y la distal de 77.12%  $\pm 1.21$  DS.

### 3.3. ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA.

La mayor inmunorreactividad se presentó en la región que corresponde a los pigmentos distal y proximal, así como en los rbdomos y en los axones de las células retinulares, en los núcleos celulares hay muy pocas granulaciones reactivas a serotonina (Fig. 18).

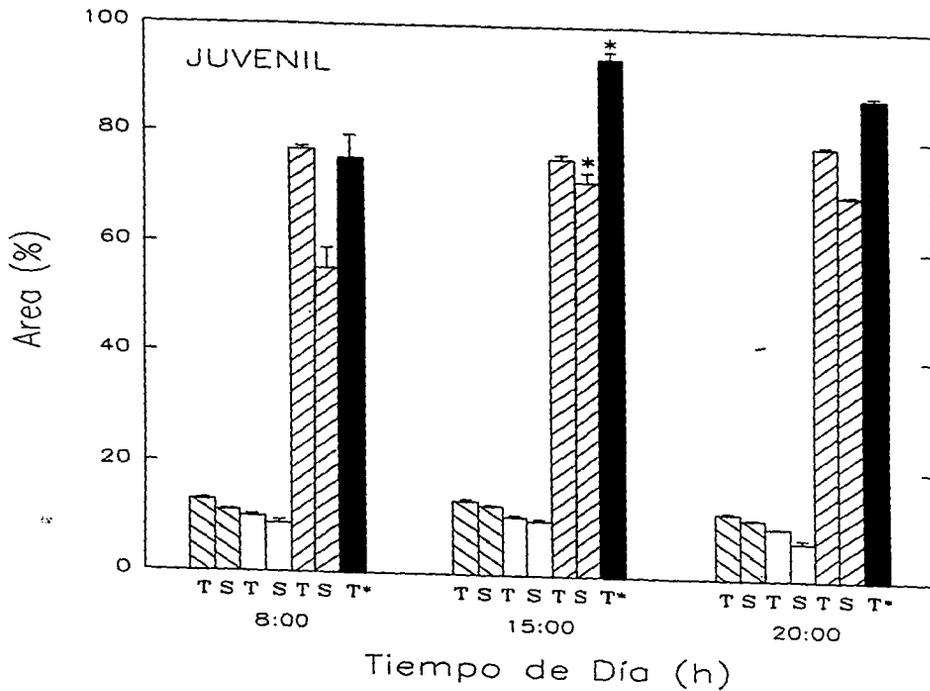
En los animales juveniles a nivel total es mayor la positividad a serotonina a las 15:00 hrs (Fig. 19) comparada con las 8:00 hrs y de las 20:00 hrs, habiendo diferencia significativa a las tres horas reportadas (Fig. 19; tabla 3).

En cuanto a las regiones únicamente hay diferencia significativa en la zona distal entre las 8:00 hrs y las 15:00 hrs y entre las 8:00 hrs y las 20:00 hrs; en las regiones proximal y media no se encontraron diferencias significativas (Tabla 3). Se obtuvo una  $F = 29.92$ .

En promedio por regiones, la proximal presenta un 11.56%  $\pm 0.7$  DS, la media un 8.5%  $\pm 1.31$  DS, y la distal un 65.75%  $\pm 7.3$  DS.

En total la retina presenta un 85.8%  $\pm 7.8$  DS de positividad a serotonina.

**Figura 19.- Gráfica en la cual se representa el porcentaje del área de la retina del acocil en el estadio juvenil. En esta se puede observar el área de la retina, por regiones y el área de positividad a serotonina por regiones y a nivel total de la retina. La T corresponde al área total de cada región, la S corresponde al área de positividad a Serotonina por regiones y la T\* es el área total de inmunorreactividad a serotonina en toda la retina, esto se puede ver para las tres horas en las que se fijo a los animales. La media está representada  $\pm$  la desviación estándar. \*  $P < 0.05$ .**



 Región Proximal     Región Media  
 Región Distal     Total de Inmunoreactividad

**TABLA 3.**  
**PORCENTAJE DEL ÁREA DE LA RETINA Y DEL ÁREA DE INMUNORREACTIVIDAD A SEROTONINA EN LA ETAPA JUVENIL DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*.**

HORA	ÁREA	RP%	RM%	RD%	TR%
8:00	TOTAL	13.7 ±0.26	10.05 ±0.35	76.91 ±0.58	100 0
	IR	11.13 ±0.19	8.83 ±0.65	55.48 ±3.7	75.42 ±4.2
15:00	TOTAL	13.39 ±0.36	10.64 ±0.32	75.75 ±0.87	100 0
	IR	12.58 ±0.22	9.92 ±0.37	71.76 ±1.72	94.27 ±1.37
20:00	TOTAL	11.99 ±0.25	9.37 ±0.13	78.7 ±0.36	100 0
	IR	10.96 ±0.12	6.76 ±0.66	70 ±0.21	87.72 ±0.59

RP.- Región proximal.

RM.- Región media.

RD.- Región distal.

IR.- Área de inmunorreactividad a serotonina.

TR.- Área total de la retina.

La media está representada ± la desviación estándar.

A nivel total, en las tres etapas del desarrollo que se estudiaron, se observó la etapa POI con un 95.96%  $\pm$ 2.04 DS, la etapa POII presenta una inmunorreactividad total de 44.7%  $\pm$ 11.8 DS y la etapa juvenil presenta un 85.8%  $\pm$ 7.8 DS.

## VIII. DISCUSIÓN.

El hecho de haber encontrado inmunorreactividad a serotonina en las tres etapas tempranas del desarrollo, concuerda con lo reportado por Sandeman y Sandeman (1990), para el acocil *Cherax destructor*. Estos autores encontraron que se presentaban neuronas serotoninérgicas en los lóbulos ópticos, durante los primeros tres estadios de desarrollo de éste crustáceo.

### 1. ETAPA POSTEMBRIONARIA I.

La morfología de las estructuras de la retina que se observaron en los resultados del presente trabajo concuerdan con los reportados por Hafner y colaboradores (1982); quienes encontraron, en el acocil, diferencias en cuanto al grado de desarrollo en la porción anterior y posterior de la retina, en la anterior predominan los núcleos celulares, y en la posterior las omatidias, lo cual también se observó en nuestros resultados.

El hecho de que se haya encontrado una variación en el número de células y no en el área total de la retina, a las tres diferentes horas, podría deberse al aumento del área de los núcleos y la disminución en la cantidad de los mismos por la noche, para mantener un equilibrio en cuanto al área total, dando la impresión de que existe un ligero cambio en las estructuras de ésta región; como ocurre en el caso de algunos vertebrados; como en los teleósteos que presentan cambios rítmicos moleculares, celulares y movimiento de los elementos mioides

de los conos en la retina (McCormac y McDonnell, 1994), cambios en los niveles de opsina en los conos y bastones (Korenbrodt y Fernard, 1989), en la síntesis de fosfolípidos (Dudley et al., 1984), en la expresión de la transducina (Brann y Cohen, 1987), y en la autofagia de los organelos celulares, que en periodos de luz-obscuridad 12:12 hrs, el pico de autofagia se da a la mitad de la fase de luz (Remé et al., 1991).

El significado de la variación en el número de núcleos a las diferentes horas en una misma etapa de desarrollo parece ser similar a los cambios encontrados por otros autores en *Pacifastacus leniusculus*; hay una zona de proliferación común de la cual se van a formar la retina, la lámina ganglionaris, la médula externa la interna y la terminalis (Elofsson y Dahl, 1970), por lo tanto las células se desplazan hacia éstas regiones del lóbulo óptico lo que produce cambios en la cantidad de células. Por otra parte Hafner y colaboradores (1982) propusieron que, en *Procambarus clarkii*, las células que pasan a formar parte de la retina se encuentran en la porción anterior en donde tendrán una nueva diferenciación, siendo esta la zona en la cual sigue habiendo mitosis. Posteriormente estas células migran hacia la región posterior en donde se encuentran las células más viejas, como ocurre en el caso de la retina de la cucaracha (Nowel, 1981; citado en Hafner et al., 1982). Al haber movimiento de las células (lo cual lo confirman los cortes que presentaron positividad al anticuerpo contra actina), hay algunas que tal vez ya se desplazaron y antes estaban ocultas entre muchas otras células, esto aunado a que hay mitosis, y a que con la técnica utilizada sólo se detectan núcleos y no citoplasma, podrían ser las razones por las cuales la cantidad de

núcleos celulares que se observan varía a las diferentes horas del día.

Las granulaciones positivas a serotonina se encontraron difusas en toda el área que conforma la retina, puesto que se presentó en rdbdomos, células retinulares, células pigmentarias, así como en el cono cristalino y las fibras de los axones de células retinulares. Otros autores (Hernández *et al.*, 1987; Aréchiga, 1977), reportaron que en el animal adulto sólo había serotonina en las células retinulares (pigmento proximal). En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró positividad a serotonina en otras estructuras además de las células retinulares. Esto podría deberse a que los animales estudiados por los autores antes mencionados, no fueron fijados a la misma hora, ni fueron de la misma etapa que los utilizados en el presente estudio. El hecho de encontrar positividad a serotonina en los tres estadios postembrionarios puede deberse a que la serotonina está actuando como una neurohormona induciendo el desarrollo de las estructuras, como lo propusieron Goldberg y Karter (1989) para *Helisoma*.

## 2. ETAPA POSTEMBRIONARIA II.

Antes de la fijación, los acociles se mantuvieron en condiciones de obscuridad. En esta etapa se observó la diferenciación de los pigmentos proximal y distal, puesto que se presentó la migración del distal hacia la córnea y del proximal hacia membrana basal, por lo tanto se estaría presentando el reflejo de adaptación a la obscuridad, reflejo fotomotor (Aréchiga, 1992). Lo anterior parece estar de acuerdo con lo reportado por Hafner y colaboradores (1982). Estos

investigadores detectaron el reflejo fotomotor a partir del estadio POII. Las observaciones morfológicas de la retina, concuerdan con los hallazgos de Hafner y cols. (1982), pues en efecto las estructuras son parecidas a las del acocil adulto, aunque en este caso son de menor tamaño y la distribución de éstas no es frontal como en los adultos. La diferencia en la morfología de la retina, que se presenta en esta etapa del desarrollo, dependiente de la hora del día, podría deberse a cambios en el número de filamentos y microvellosidades que conforman a cada rabdómero (Hafner *et al.*, 1991). No se descarta el que las estructuras podrían variar a lo largo del día, como es el caso de *Musca domestica*, en la cual se han encontrado cambios cíclicos de células y axones a diferentes horas del día (Meinertzhagen y Pyza, 1996). En esta etapa encontramos cambios en el número de núcleos a las tres horas del día, disminuyendo a las 15:00 hrs. Este cambio es proporcional al encontrado con el área de retina, lo cual también se debe a los cambios en el número de filamentos y de microvellosidades, así como posiblemente al movimiento celular como en el caso del POI, aunque los núcleos celulares de los cortes a los que se les aplicó el anticuerpo contra actina presentan muy pocos gránulos positivos, lo cual indica una migración celular.

En este estadio la inmunorreactividad a serotonina, al parecer empieza a presentar un cambio cíclico, encontrándose un pico a las 15:00 hrs, inversamente proporcional al encontrado en su morfología. Al analizar estos cambios, pareciera haber un ciclo ultradiano que tiende a desaparecer en el estadio juvenil, cambio que concuerda con las variaciones de amplitud del ERG, encontrados en otros trabajos, los cuales se pueden observar en las figuras 9 y 14.

### 3. ETAPA JUVENIL.

En la etapa juvenil los cambios estructurales que se presentaron en comparación con la etapa POII son el aumento del tamaño y definición en sus estructuras, y la distribución de éstas es frontal como en el caso de los adultos.

La diferencia que se presentó en el número de núcleos es inversa a la que se encontró en el área promedio de los núcleos celulares, tal vez a esto se deba que a nivel de área total de retina, no hubo cambios a las tres horas a las que se llevó a cabo la fijación de los animales.

En cuanto a la positividad a serotonina al parecer persiste una variación diaria, haciéndose más evidente una tendencia hacia un ritmo de 24 hrs; a nivel total la diferencia de inmunorreactividad entre el medio día y la noche es mayor que entre la mañana y el medio día. La variación de serotonina sugiere una tendencia en paralelo con la ritmicidad de la respuesta eléctrica del ojo a la luz, como se puede observar en las figuras 9 y 19. Desde luego esta posibilidad debe investigarse más a fondo en experimentos posteriores. El reflejo fotomotor se expresa con mayor claridad, sin importar la hora del día.

El porcentaje de positividad a serotonina fue mayor en ésta etapa que en POII, como lo reportado por Goldberg y Kater (1989) para *Helisoma*, en donde se encontró un aumento a serotonina conforme avanza el desarrollo postembrionario.

## **IX. CONCLUSIONES.**

- 1.- En la etapa POI no hay cambios significativos de inmunorreactividad a serotonina en la retina, a las tres diferentes horas del día, por lo que aparentemente no hay un ritmo de inmunorreactividad a serotonina.
- 2.- No hay cambios en el área total de la retina en el estadio POI.
- 3.- En POII hay diferencia significativa en los cambios de positividad a la serotonina en la retina, dependiendo de la hora del día. Los datos muestran un aumento a las 15:00 hrs; lo que pudiera indicar la existencia de una modulación cíclica mediada por la serotonina. Parece haber un ritmo de serotonina que sugiere una tendencia ultradiana.
- 4.- Aparentemente existe un cambio cíclico en la área de la retina, en la etapa POII, que tal vez es crucial en el desarrollo, tanto anatómico, como de maduración del sistema serotoninérgico para la expresión de la ritmicidad circadiana.
- 5.- En los animales juveniles la presencia de la inmunorreactividad es parecida a la de los organismos del estadio POII, aunque en porcentaje total hay un aumento. La variación en la positividad a serotonina sugiere una tendencia rítmica cercana a las 24 hrs.
- 6.- Los resultados de éste trabajo parecen indicar que en la ontogenia del acocil existe un ritmo de inmunorreactividad a serotonina, con un curso temporal similar al del ritmo de sensibilidad a la luz reportado en trabajos anteriores.

## X. LITERATURA CITADA.

- AGUILAR-GARCÍA A. La suposición de Homocedasticidad en el Modelo de la Regresión Lineal. (Tesis). 1981.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF LM, ROBERTS K, WATSON JD. *Molecular Biology of the Cell*. 2ª ed. Ed. Garland Publishing, Inc New York. 1989.
- ANDREWS EA. (1922). "The Attached Young of the Crayfish *Cambarus clarkii* y *Cambarus diogenes*". *Am Nat*, 41, pp. 253-271.
- ARÉCHIGA H, BAÑUELOS E, FRIXIONE E, PICONES A, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1990). "Modulation of Crayfish Retinal Sensitivity by 5-Hydroxytryptamine". *J Exp Biol*, 150, pp. 123-143.
- ARÉCHIGA H, FERNÁNDEZ-QUIRÓZ F, FERNÁNDEZ DE MIGUEL F, RODRÍGUEZ-SOSA L. (1992). "The Circadian System of Crustaceans". *Cronobiol Int*, 9(6), pp. 001-019.
- ARÉCHIGA H, FUENTES B.(1970). "Correlative Changes Between Retinal Shielding Pigments Position and Electroretinogram in Crayfish". *Physiologist*, 13, pp. 137.
- ARÉCHIGA H. (1977). Modulation of Visual Input in the Crayfish. En: *Identified Neurons and Behavior in Arthropods*. Ed. Hoyle G. Plenum Press, New York, pp. 387-403.
- ASCHOFF J. (1981A). A Survey on Biological Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4 Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press, New York and London, pp. 3-10.

- ASCHOFF J. (1981B). Free-Running and Entrained Circadian Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4 Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press, New York and London, pp. 81-92.
- BARLOW RB, BOLANOWSKI SJ, BRACHMAN ML. (1977). "Efferent Optic Nerve Fibers Mediate Circadian Rhythms in *Limulus* Eye". *Science* 197, pp. 86-89.
- BARTLETT MS. (1937). "Some Examples of Statistical Methods of Research in Agriculture and Applied Biology". *J Roy Stat Soc Suppl* 4, pp. 121.
- BELTZ BS, KRAVITZ EA. (1983). "Mapping of Serotonin-Like Immunoreactivity in the Lobster Nervous System". *J Neuroscience*. 3(3), pp. 585-602.
- BENNET RR. (1983). "Circadian Rhythm of Visual Sensivity in *Manduca sexta* and its Development from an Ultradian Rhythm". *J Comp Physiol*, 150, pp. 165-174.
- BRANN MR, COHEN LV. (1987). "Diurnal Expression of Transducine in Rods of Rat Retina". *Science*, 235, pp. 585-587.
- CASTAÑÓN-CERVANTES O, LUGO C, AGUILAR M, GONZALEZ-MORAN G, FANJUL-MOLES ML. (1995). "Photoperiodic Induction on the Growth Rate and Gonads Maturation in the Crayfish *Procambarus clarkii* During Ontogeny". *Comp Biochem Physiol*, 110A, pp. 139-146.
- COOKE IM, SULLIVAN RE. (1982). Hormones and Neurosecretion. En: *Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. Bliss, D. E., Atwood, H. L. Sandeman, D. C. Academic Press, New York, pp. 205-290.
- DAVIS FC. (1981). Ontogeny of Circadian Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology, Biological Rhythms*. Ed. Aschoff J., Plenum, New York, pp. 257-274.

- DAWSON-SAUNDERS B, TRAPP RG. Bioestadística Médica. El Manual Moderno, S. A. Trad. QFB Ma. del Rosario Carsolio Pacheco. México, D. F. 1993.
- DUDLEY PA, ALLIGOOD JP, O'BRIEN PJ. (1984). Biochemical Events Related to Circadian Photoreceptor Shedding. En: *Molecular and Cellular Basis of Visual Activity: Cell and Developmental Biology of the Eye*. S. R. Hilfer and J. B. Sheffield. Springer Verlag. New York, pp. 13-30.
- ELOFSSON R. (1969). "The Development of the Compound Eyes of *Penaeus duorarum* (Crustacea: Decapoda) With Remarks on the Nervous System". *Z Zellforsch*, 97, pp. 323-350.
- ELOFSSON R, DAHL E. (1970). "The Optic Neuropiles and Chiasmata of Crustacea". *Z Zellforsch*, 107, pp. 343-360.
- ELOFSSON R, LAXMYR L, ROSENGREN E, HANSSON CH. (1982). "Identification and Quantitative Measurements of Biogenic Amines and Dopa in the Central Nervous System and Haemolymph of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea)". *Comp Biochem Physiol*, 71C(2), pp. 195-201.
- ESKIN A, LIN C, McADOO J. (1982). "Mechanisms of Shifting the Phase of a Circadian Rhythm by Serotonin: Involvement of cAMP". *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, pp. 660-664.
- FANJUL-MOLES ML, MIRANDA-ANAYA M, FUENTES-PARDO B. (1992). "Effect of Monochromatic Light upon the ERG Circadian Rhythm During Ontogeny in Crayfish *Procambarus clarkii*". *Comp Biochem Physiol*, 102A(1), pp. 99-106.

- FANJUL-MOLES ML, MORENO-SAENZ E, VILLALOBOS-HARIART N, FUENTES-PARDO B. (1987). "ERG Circadian Rhythm in the Course of Ontogeny in Crayfish". *Comp Biochem Physiol*, 88A(2), pp. 213-219.
- FANJUL-MOLES ML, PRIETO-SAGREDO J. (1996). "Effect of the Temperature upon Ultradian and Circadian ERG Amplitude Rhythms During Ontogeny of Crayfish *Procaambarus clarkii*". *Biol Estud Méd Biol, Méx*, 44, pp. 12-19.
- FRIXIONE E, ARÉCHIGA H. (1981). "Ionic Dependence of Screening Pigment Migrations in Crayfish Retinal Photoreceptors". *J Comp Physiol*, 144, pp. 35-43.
- GARCÍA-RIVERA CC, ESCAMILLA-CHIMAL EG, AGUILAR-MORALES M, ROMERO-DÍAZ V, FANJUL-MOLES ML. (1994). "Cambios en la Inmunorreactividad a la Serotonina Durante las Diferentes Etapas del Desarrollo del Acocil *Procambarus clarkii*". *Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*. XXXVII Congreso Nacional. Mérida, Yucatán, México. Res. O62.
- GHIDALIA W. (1985). Structural and Biological Aspects of Pigments. En: *The Biology of Crustacea Vol. 9. Integument, Pigments, and Hormonal Processes*. Dorothy E. Bliss y Linda H. Mantel. *Academic Press Inc*, New York, pp. 301-394.
- GODDARD JS. (1988). Food and Feeding. En: *Freshwater Crayfish. Biology Management and Exploitation*. Part I: General Biology. Holdich D. M. y Lowery R. S. Timber Press, pp. 145-166.

- GOLDBERG JI, KARTER SB. (1989). "Expression and Function of the Neurotransmitter Serotonin During Development of the *Helisoma* Nervous System". *Developmental Biology*, 131, pp. 483-495.
- GOLDBERG JI, NATVIG P, KATER SB. (1986). "Embryonic and Postembryonic Development of the Serotonine Phenotype in *Helisoma*". *Soc Neurosci Abstr*, 12, pp. 1163.
- GOLDSMITH TH. (1972). The Natural History of Invertebrate Visual Pigments. En: *Handbook of Sensory Physiology*. H. J. A. Dartnall. Springer-Verlag, Berlin and New York, 7, Part. I. pp. 685-719.
- HAFNER GS, TOKARSKI T, HAMMOND-SOLTIS G. (1982). "Development of Crayfish Retina: a Light and Electron Microscopic Study". *J Morphology*, 173, pp. 101-120.
- HAFNER GS, TOKARSKI T, KIPP J. (1991). "Changes in the Microvillus Cytoskeleton During Rhabdom Formation in the Retina of the Crayfish *Procambarus clarkii*". *J Neurocytology*, 20, pp. 585-596.
- HARIYAMA T, TSUKAHARA Y. (1988). "Seasonal Variation of Spectral Sensitivity in Crayfish Retinula Cell". *Comp Biochem Physiol*, 91A(3), pp. 529-533.
- HERNÁDI L. (1994). "Distribution and Anatomy of GABA-Like Immunoreactive Neurons in the Central and Peripheral Nervous System of the Snail *Helix pomata*". *Cell Tissue Res*, 277, pp. 189-198.
- HERNÁNDEZ-FALCON J, MORENO-SAENZ E, FARAS JM, FUENTES-PARDO B. (1987). "Role of the Sinus Gland in Crayfish Circadian Rhythmicity I. Pseudopupil Circadian Rhythm". *Comp Biochem Physiol*, 87A, pp. 111-118.

- HOGGER JB. (1988). Ecology, Population Biology and Behaviour. En: *Freshwater Crayfish. Biology, Managment and Exploitation*. Part I: General Biology. Holdich D. M. y Lowery R. S. Timber Press, pp. 114-144.
- HOLDICH DM, REEVE ID. (1988). Functional Morphology and Anatomy. En: *Freshwater Crayfish. Biology, Managment and Exploitation*. Part I: General Biology. Holdich D. M. y Lowery R. S. Timber Press, pp. 11-51.
- KORENBRODT JI, FERNARD RD. (1989). "Circadian Rhythm and Light Regulate Opsin mRNA in Rod Photoreceptors". *Nature*, 337, pp. 454-457.
- LARIMER JL, SMITH TF. (1980). "Circadian Rhythm of Retinal Sensitivity in Crayfish: Modulation by the Cerebral and optic Ganglia". *J Comp Physiol*, 136, pp. 313-326.
- MAYNARD DM. (1965). "Integration in Crustacean Ganglia". *Symp Soc Exp Biol*, 20, pp. 111-149.
- MAYNARD DM. (1962). "Organization of Neuropil". *Zoologist*, 2, pp. 79-96.
- McCORMAC CHA, McDONNELL MT. (1994) "Circadian Regulation of Teleost Retinal Cone Movements *in vitro*". *J Gen Physiol*, 103, pp. 487-499.
- MEINERTZHAGEN IA, PYZA E. (1996). "Daily Rhythms in Cell of the Fly's Optic Lobe: Taking Time Out From the Circadian Clock". *Trends Neurosci*, 19(7), pp. 285-291.
- MEIER T, REICHERT H. (1990). "Neuronal Development in the Crustacean Nervous System Studied by Neuron-Specific Antibody Labelling". *Frontiers in Crustacean Neurobiology*, pp. 523-529.

- MENDOZA-GONZÁLEZ G, AGUILAR-MORALES M, FAJUL-MOLES ML. (1995) "Morfología del Ganglio Supraesofágico del Acocil *Procambarus clarkii* Durante los Primeros Estadios Postembrionarios". *Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas XXXVIII Congreso Nacional*. Acapulco, Guerrero, México.
- MOORE-EDE MC, SULZMAN FM, FULLER CHA. . The Clocks That Time Us. Physiology of the Circadian Timing System. *Harvard University Press*. Cambridge, Massachusetts and London England 1982.
- NASSEL DR. (1992). "The Retina and Retinal Projection on the Lamina Ganglionaris of the Crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana)". *J Comp Neurol*, 167, pp. 341-360.
- NICHOLLS GJ, MARTIN AR, WALLACE BC. . From Neuron to Brain. 3ed. *Sinaver Associates, Inc*. Suderland, Massachusetts U.S.A., 1992.
- PAGE TL, LARIMER JL. (1975). "Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. II. The Locomotor Activity Rhythm". *J Comp Physiol*, 97, pp. 59-80.
- PITTENDRIGH CS, MINIS DH. (1964). "The Entrainment of Circadian Oscillations by Light and Their Role as Photoperiodic Clocks". *Am Nat*, 98(902), pp. 261-294.
- PYZA E, MEINERTZHAGEN IA. (1995). "Monopolar Cell Axons in the First Optic Neuropil of the Housefly, *Musca domestica* L., Undergo Daily Fluctuations in Diameter That Have a Circadian Basis". *Neuroscience*, 15(1), pp. 407-418.

- RAO KR. (1985). Pigmentary Effectors. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 9 Integument, Pigments, and Hormonal Processes. Bliss D. E., Mantel L. H. Academic Press, New York, pp. 395-463.
- REMÉ CHE, WIRZ-JUSTICE A, TERMAN M. (1991). "The Visual Input Stage of the Mammalian Circadian Pacemarking System: I. There a Clock in the Mammalian Eye?. *J Biol Rhythms*, 6(1), pp. 5-29.
- RENSING L. (1965). Circadian Rhythms in the Course of Ontogeny. En: *Circadian Clocks*. Ed. Aschoff J. pp. 399-405.
- RODRÍGUEZ-SOSA L, VEGA MT, ARÉCHIGA H. (1994). "Circadian Rhythm of Content of Red Pigment-Concentrating Hormone in the Crayfish Eyestalk". *Comp Biochem Physiol*, 109C(1), pp. 101-108.
- RUDOLPH PH, SPAZIANI E. (1990). "Distribution of Serotonergic Neurons in the Eyestalk and Brain of the Crab, *Cancer antennarius*". *Comp Biochem Physiol*, 97C(2), pp. 241-245.
- SANDEMAN DC. (1982). Organization of the Central Nervous System. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. Bliss D. E., Atwood H. L. y Sandeman D. C. Academic Press, New York, pp. 1-62.
- SANDEMAN DC, SANDEMAN RE, AITKEN AR. (1988). "Atlas of Serotonin-Containing Neurons in the Optic Lobes and Brain of the Crayfish *Cherax destructor*". *J Comp Neurol*, 269, pp. 465-478.
- SANDEMAN RE, SANDEMAN DC. (1990). "Development and Identified Neural System en the Crayfish Brain". *Frontiers in Crustacean Neurobiology*, pp. 498-508.

- SANDEMAN DC. (1990). "Structural and Functional Levels in the Organization of Decapod Crustacean Brains". *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science*, pp. 223-239.
- SHAW SR, STOWE S. (1982). Photoreception. En: *The Biology of Crustacea*. Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function. Bliss D. E., Atwood H. L. y Sandeman D. Academic Press, New York, pp. 292-356.
- SHIVERS RR. (1967). "Fine Structure of Crayfish Optic Ganglia". *The University of Kansas Science Bulletin*, XLVII(10), pp. 677-733.
- STENGL M. (1995). "Pigment-Dispersing Hormone-Immunoreactive Fibers Persist in Crickets Which Remain Rhythmic After Bilateral Transection of the Optic Stalks". *J Comp Physiol*, 176, pp. 217-228.
- SUKÔ T. (1954). "Studies on the Development of the Crayfish. II The Development of Eggs-Cell Before Fertilization". *Sci Rep Saitama Univ*, 1(2), pp. 77-96.
- SUKÔ T. (1958). "Studies on the Development of the Crayfish. VI. The Reproductive Cycle". *Sci Rep Saitama Univ*, 3 (2), pp. 79-91.
- VAN HERP F, STROLENBERG GECM (1980). "Functional Aspects of the Neurosecretory System in the Eyestalk of the Crayfish *Astacus leptodactylus* Whit Special Reference to the Hyperglycemic Hormone". *Gen Comp Endocrinol*, 40, abs 364 .
- WALKER RJ, HOLDEN-DYE L. (1989). "Commentary on the Evolution of Transmitters, Receptors and Ion Channels in Invertebrates". *Comp Biochem Physiol*, 93A(1), pp. 25-39.

- WATERMAN TH. (1961). Light Sensitivity and Vision. En: *The Physiology of Crustacea*. Vol. II. *Sense Organs, Integration, and Behavior*. Waterman T. H. Academic Press Inc, New York, San Francisco, London, pp. 1-53.
- WELSH JH. (1930). "Diurnal Rhythms of the Distal Pigment Cell in the Eyes of Certain Crustaceans". *Proc Nat Acad Sci*, 16, pp. 386-395.