

0038 ²³ / 71



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

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

**EFFECTOS DE LA LUZ MONOCROMATICA SOBRE
EL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL
ACOCIL JUVENIL *Procambarus clarkii*.
PARTICIPACION DE VIAS RETINIANAS Y
EXTRARRETINIANAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A
MANUEL MIRANDA ANAYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES

1997



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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-1342

DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES.
PRESENTE

Por este conducto me ermito comunicarle que ha sido ratificada como Directora de Tesis del(a) alumno(a) M. EN C. MANUEL MIRANDA ANAYA, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulada: EFECTOS DE LA LUZ MONOCROMÁTICA SOBRE EL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL ACOCIL JUVENIL PROCAMBARUS CLARKII. PARTICIPACIÓN DE VIAS RETINIANAS Y EXTRARRETINIANAS.

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 DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	MAISIA LUISA FANJUL PEÑA DE MOLES
PRIMER VOCAL	: DR.	BALTAZAR BARRERA MEZA
SEGUNDO VOCAL	: DR.	MANUEL SALAS ALVARADO
TERCER VOCAL	: DR.	RAUL ANTONIO AGUILAR ROBLERO
SECRETARIO	: DR.	LEON FEDERICO CINTPA MCGLONE
SUPLENTE	: DR.	FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
SUPLENTE	: DR.	RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 25 de Junio de 1997.
JEFE DE LA DIVISION


DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

MCO\ASR\ipp&

A la memoria de mi madre.

A mi padre

A Theresta.

Agradecimientos

Dra. María Luisa Fanjul
Por tu invaluable guía en mi formación profesional,
maestra y amiga en mi desarrollo por la ciencia.

Compañeros del Laboratorio de Neurofisiología Comparada:
Carolina, Elsa, Sonia, Gisela, Inés, Oscar y Julio
Quienes hacen de un pequeño espacio
un lugar agradable y un gran equipo de trabajo.

A los amigos:
Silvia Espinoza, Anabel, Jesús Sáenz, Antonio Quintero e Isaías Reyes.
por brindar de manera incondicional, el apoyo necesario, su esfuerzo
y grata compañía.

y a todos aquellos que directa e indirectamente me apoyaron para concluir
este trabajo de tesis.....mil gracias.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE
NEUROFISIOLOGIA COMPARADA**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNAM

**Con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico
(DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIT) Proyecto IN212795.**

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
Generalidades sobre los Ritmos Circadianos	3
Características de los ritmos circadianos	4
Efectos de la luz sobre los ritmos circadianos	4
Mecanismos de sincronización	5
Sincronización no paramétrica o discreta	7
Sincronización paramétrica o continua	8
Otros efectos de la luz sobre los ritmos circadianos	9
Efecto de la luz monocromática sobre los ritmos circadianos	10
Sensibilidad retiniana en el acocil	12
Fotorreceptores extrarretinianos en el acocil	13
Ritmo de actividad locomotora en el acocil	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
III HIPÓTESIS	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	20
Obtención y mantenimiento de animales	20
Diseño experimental	21
Obtención de datos y análisis correspondientes	25
Lesiones e Histología	26
V. RESULTADOS	29
Grupo I. Control: Ritmo de actividad locomotora en acociles juveniles sin lesiones	29
Fotoperiodo esqueleto con luz azul	29
Fotoperiodo esqueleto con luz roja	31
Grupo II. Ritmo de actividad locomotora en acociles juveniles con ablación de retina-lámina ganglionaris (P-Lg)	36
Histología	36
Fotoperiodo esqueleto con luz azul	36
Fotoperiodo esqueleto con luz roja	39
Grupo III. Ritmo de actividad locomotora en acociles juveniles con lesión a nivel de retina-lámina ganglionaris y ablación de los conectivos entre el V y VI ganglio abdominal	44
Fotoperiodo esqueleto con luz azul	44
Fotoperiodo esqueleto con luz roja	45
Grupo IV. Ritmo de actividad locomotora de acociles con lesión en ganglio supraesofágico	51
VI. DISCUSIÓN	62
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. REFERENCIAS	73

RESUMEN

En el presente trabajo, se investigó la influencia de la luz monocromática azul y roja sobre el Ritmo de Actividad Locomotora (RALM) de acociles juveniles *Procambarus clarkii* de 16 a 20 semanas de edad, en condiciones no restringidas de registro. Se estudió de que manera participan en la sincronización al Fotoperiodo Esqueleto (FE) las posibles vías extrarretinianas. Se usaron cuatro grupos de acociles juveniles: I) animales intactos, II) animales sin retina ni lámina ganglionaris (R-Lg), III) Animales sin R-Lg además de la ablación de los nervios conectivos entre el quinto y sexto ganglio abdominal, y IV) animales con lesión electrolítica en el ganglio supraesofágico. Los animales de cada grupo fueron expuestos a un ambiente de oscuridad constante durante diez días; posteriormente fueron sometidos a un FE simétrico (12:12) con pulsos de 30 minutos de luz monocromática azul o roja de la misma irradianza. Finalmente fueron mantenidos en condiciones de oscuridad constante durante diez días más. La actividad locomotora se analizó cuantitativa y cualitativamente mediante actogramas y periodogramas de X². Los resultados obtenidos indican que los animales intactos muestran sincronización a ambos tipos de luz siendo capaces de adelantar o atrasar la fase para acoplarse al sincronizador externo. Los animales con lesiones en R-Lg, además de lesión en los conectivos al sexto ganglio, conservan la capacidad de sincronización. Las lesiones en el ganglio supraesofágico indican que la región protocerebral medial es necesaria para la expresión del ritmo circadiano de Actividad Locomotora.

ABSTRACT

The effect of monochromatic light upon the circadian locomotor activity rhythm of young crayfish *Procambarus clarkii* was studied. The retinal and extraretinal pathways involved in non parametric entraining mechanisms were investigated. Ninety six, 16 to 20 week-old crayfishes were used. All animals were divided in four experimental groups: 1) intact control animals; 2) Retina-Lamina ganglionaris (R-Lg) ablated animals, 3) animals R-Lg ablated plus connective sectionated between the fifth and sixth abdominal ganglion and 4) animals with an electrolitic lesion on the protocerebral ganglion. All animals were individually monitored with a recording activity system for 30 days. For the first ten days, the animals were mantained and keep in constant darkness (DD) and then submitted to 24-h skeleton photoperiod cycles (SP) consisting of 30 min red or blue light signals calibrated to the same irradiance (25Wm^{-2}) during the next ten days. Afterwards, they were left in DD for the last ten days of the experiment. Activity was quantitatively and qualitatively analyzed. Results show that all control animals entrained to blue or red light by exhibiting phase shifts, advances or delays. Retina ablated and connective sectioned animlas were able to maintain the entrain ability. Group 4 animals did not show a clear circadian rhythm but ultradian bouts able to entrain to the monochromatic SP. These results seem indicate the medial protocerebral neuropiles as importan structures in the locomotor activity rhythm expression in crayfish.

I. INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre los Ritmos Circadianos

A a lo largo de su evolución, los seres vivos han desarrollado la capacidad de expresar conductas cíclicas en respuesta a las variaciones ambientales. Generalmente un organismo puede presentar una cierta variedad de ritmos cuyo periodo varía desde unos cuantos minutos hasta varios días. Los ritmos biológicos observados en las diferentes especies se han categorizado con base en su frecuencia, clasificándose en ritmos ultradianos, los cuales presentan un periodo desde minutos hasta algunas horas, ritmos circadianos que tienen periodos aproximadamente de 24 horas y ritmos infradianos con periodos de varios días hasta meses (Moore-Ede et al, 1982).

Los ritmos circadianos han sido encontrados y estudiados desde organismos procariontes hasta vertebrados. La ritmicidad circadiana subyace en un mecanismo biológico endógeno el cual se ha caracterizado mediante el mantenimiento, observación y experimentación de los organismos en condiciones constantes de laboratorio. Estos ciclos circadianos se presentan aún después de cierto tiempo de que el organismo se mantiene en condiciones constantes y el periodo del ritmo es generalmente cercano a las 24 horas. En un ambiente constante, un ritmo circadiano presenta una oscilación espontánea con un periodo ligeramente mayor o menor a las 24 horas; el valor del periodo es variable entre las diferentes especies de organismos e inclusive entre los individuos de la misma especie (Hastings et al, 1992).

Características de los ritmos circadianos

Las características fundamentales que definen a un ritmo circadiano son: 1) el ritmo se presenta con un periodo cercano a las 24 horas en condiciones ambientales constantes; 2) el periodo del ritmo casi no varía ante cambios de temperatura dentro de límites fisiológicos, es decir que el ritmo es capaz de compensar los cambios de temperatura y 3) el ritmo circadiano es sincronizado por ciclos ambientales, principalmente fotoperiodos iguales o cercanos a las 24 horas, así como también por otros factores cíclicos. En el ambiente natural, los ritmos circadianos tienen un valor de periodo de 24 horas debido a su sincronización con los ciclos de luz; sin embargo si un animal es transferido a un laboratorio y sometido a condiciones constantes de luz u oscuridad, así como de temperatura; sus ciclos diarios, si son circadianos continuarán por varias semanas, meses e incluso hasta años manteniendo un periodo cercano a las 24 horas (Moore-Ede et al, 1982).

Cualquier agente ambiental capaz de sincronizar a un ritmo es denominando sincronizador o Zeitgeber (palabra en alemán cuyo significado directo es "dador de tiempo"). El nictémero está constituido por ciclos de luz-oscuridad que son el agente sincronizador universalmente efectivo para casi todos los ritmos circadianos.

Efectos de la luz sobre los ritmos circadianos

En condiciones experimentales la luz puede tener dos tipos de efectos sobre los ritmos circadianos: 1) efectos fásicos que consisten en cambios en la velocidad de oscilación del ritmo, debido a aplicaciones discretas de pulsos de luz u oscuridad a un ritmo en oscilación espontánea, y efectos continuos o tónicos sobre esta velocidad de oscilación, debido a variaciones en la intensidad de la luz durante la oscilación espontánea en luminosidad constante (Daan, 1977, Pittendrigh, 1981 y Aschoff, 1981).

La respuesta del ritmo circadiano a la luz depende del tiempo circadiano en que ésta incida. El tiempo circadiano (TC) define el tiempo en el que oscila el ritmo endógeno y está constituido por la duración de las 24 unidades que forman un ciclo completo en una oscilación espontánea circadiana. Se define como τ/T en donde τ es el valor del periodo del ritmo en oscilación espontánea y T el valor del periodo del ciclo exógeno (Aschoff, 1981). La relación entre la fase de exposición a la luz y la respuesta del sistema en forma de un cambio en la velocidad de oscilación, se manifiesta en un cambio de fase que es gráficamente representado por una Curva de Respuesta de Fase (CRF), (Pittendrigh, 1981).

Cuando un ritmo es capaz de oscilar con un valor de periodo constante durante varios ciclos, de tal modo que la desviación estándar del periodo es muy cercana a cero, se dice que el ritmo se encuentra en estado estable. Cuando se aplica un pulso de luz a un ritmo en estado estable durante la oscilación espontánea, se observa un intervalo de reajuste mediante varios ciclos transitorios hasta que se vuelva a estabilizar a un nuevo estado estable. Al alcanzar nuevamente el estado estable después de los transitorios, el ritmo habrá sufrido un cambio en su velocidad lo cual originará un avance o un retraso en relación con la fase del estado estable original o bien, no originará cambio alguno., lo anterior depende del TC en que incida el pulso.

De manera general, los pulsos de luz aplicados cerca del inicio de la noche subjetiva de un animal (es decir cerca a la fase del inicio de la actividad en un animal nocturno y a la fase de inicio del reposo de un animal diurno), provoca retrasos de fase de tal manera que la fase del ritmo, una vez que alcanza el estado estable, se presenta después del tiempo esperado para el ritmo estable original; mientras que los pulsos de luz presentados cerca del final de la noche subjetiva

causan avances de fase. Los pulsos de luz presentados durante gran parte del día subjetivo tienen pocos o ningún efecto (Pittendrigh y Daan, 1976a y c).

Según Pittendrigh (1981), cuando un pulso de luz incide sobre un ritmo en oscilación espontánea, provoca un cambio de fase instantáneo en el marcapaso del ritmo, sin embargo, los ciclos transitorios que se manifiestan, representan el reajuste de otros sistemas osciladores secundarios o esclavos que gradualmente alcanzan la fase del estado estable.

Las CRF de diversas especies, se agrupan en dos tipos fundamentales: La CRF del tipo 1, en que los mayores cambios de fase son de unas cuantas horas (generalmente no más de seis) y la transición entre las zonas de avance y retraso son graduales en la curva. Cuando la nueva fase obtenida es graficada en relación a la fase previa al cambio, la pendiente promedio de la transición de fase es igual o cercana a 1; sin embargo, en algunas especies la forma de la CRF es modificada por la intensidad o la duración del pulso de luz, lo que puede producir un cambio de fase de hasta 12 horas. La CRF que presenta esta magnitud de cambio de fase se el conoce como CRF de tipo 0, ya que la pendiente promedio en la transición de fase es igual a cero. La CRF es una propiedad intrínseca del marcapaso circadiano y la respuesta de fase en el ritmo en oscilación espontánea, es una medida directa del estado del propio marcapaso (Pittendrigh, 1981).

Mecanismos de sincronización

Los ritmos circadianos en oscilación espontánea poseen un periodo de oscilación cercano a las 24 horas; cuando son sincronizados a ciclos diarios de luz-obscuridad (LO), los ritmos asumen un periodo de 24 horas y una fase estable en

relación al ciclo que los sincroniza. Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales la luz puede llevar a cabo la sincronización: paramétrica y no paramétrica.

Sincronización no paramétrica o discreta

La sincronización por ciclos LO es explicada por cambios de fase diarios y discretos causados por una exposición periódica a la luz. La magnitud de los cambios de fase es la diferencia que existe entre el valor del periodo del ritmo en oscilación espontánea (τ) y el periodo del ciclo LO con el que se presenta el pulso de luz (T).

En condiciones experimentales, la duración y cantidad de luz en el ciclo estudiado no necesita ser larga, su aplicación durante unos cuantos minutos es suficiente para sincronizar los ritmos en una gran diversidad de animales. Esta capacidad es clave en el modelo no paramétrico de sincronización de los ritmos circadianos. El modelo predice que la sincronización a un estado estable, se presenta cuando el pulso periódico de luz coincide con la fase del ritmo, en la cual se produce un cambio de fase igual al periodo en oscilación espontánea menos el periodo exógeno ($\tau - T$). El pulso de luz deberá ser siempre de la misma magnitud y duración (Pittendrigh y Daan, 1976b). Los ciclos de luz con periodos muy diferentes a las 24 horas no pueden sincronizar a los ritmos circadianos.

En condiciones naturales, la sincronización por los ciclos LO se lleva a cabo mediante la exposición de luz en las zonas de sensibilidad del ritmo a la luz, es decir, las que causan avances o retrasos de fase. El fotoperiodo puede ser simulado con la aplicación de dos pulsos breves de luz en un día; uno representa el amanecer y el otro el atardecer. Este tipo de fotoperiodo que se le conoce como fotoperiodo esqueleto (FE) y el cambio de fase final causado por los dos pulsos (determinado

por la CRF) es igual a τ -T. En general la sincronización es más estable con la aplicación de ciclos de dos pulsos que de uno solo (Pittendrigh y Minis, 1964, Pittendrigh y Daan 1976b).

Existen diferencias importantes entre los efectos de un FE y un fotoperiodo completo (FC). Cuando en un FE la distancia entre los dos pulsos es aproximadamente de 12 horas, cualquiera de los dos puede ser interpretado como una señal de amanecer o de atardecer. Esto depende de la relación de fase inicial entre los pulsos de luz y el ritmo. Si el intervalo entre estas dos señales se incrementa por arriba de cierto límite, a manera de un aumento en la longitud de la iluminación del día y un correspondiente acortamiento en la duración de la noche y el pulso de amanecer es interpretado como atardecer y viceversa, el ritmo observado presenta un cambio de fase a manera de un salto. Al intervalo mínimo entre dos pulsos en que se manifiesta la noche subjetiva se le conoce como noche mínima tolerable y es variable entre las diferentes especies de animales (Pittendrigh, 1981).

Sincronización paramétrica o continua

Los ritmos circadianos también pueden ser sincronizados por pulsos sinusoidales de luz, lo que sugiere que la sincronización puede efectuarse a través de la acción continua de la luz. De acuerdo con el modelo de sincronización paramétrica (Swade, 1969), los ciclos sinusoidales de luz ejercen un efecto continuo en el periodo del marcapaso circadiano, acortándolo y alargándolo conforme la brillantez de la luz coincide en las regiones de retraso y avance de la CRF respectivamente. La sincronización se presenta cuando el cambio en τ causado por el ciclo de luz es igual a la diferencia de τ -T.

Es posible que un ciclo sinusoidal de luz no pueda sincronizar a un ritmo pero si afectar su periodo. La capacidad de sincronización de un Zeitgeber, esta en función a la sensibilidad del sistema circadiano. Aunque la luz sea el agente sincronizador más efectivo, no significa que ante cualquier intensidad y duración del pulso haya una sincronización como respuesta; pero es posible que aunque el marcapaso no sincronice, si presente algún cambio en su periodo. A esto se le conoce como coordinación relativa (Hastings et al, 1992; Moore-Ede et al, 1982).

No es claro si la sincronización discreta y la continua representan dos mecanismos diferentes, o si son manifestaciones diferentes del mismo proceso; lo cierto es que no se trata de dos procesos mutuamente exclusivos y su importancia en ambientes naturales depende del patrón de actividad de los organismos en que se estudia (Hastings et al, 1992).

Otros efectos de la luz sobre los ritmos circadianos

Tanto las influencias fásicas como las tónicas de la luz contribuyen a la sincronización. En una variedad de organismos, la longitud de τ obtenida en iluminación constante, puede ser modificada en función a la intensidad de la luz. Conforme aumenta la intensidad de la luz, τ se alarga en organismos nocturnos y se acorta en organismos diurnos. Esta generalización tiene sus excepciones tanto en mamíferos diurnos como en algunos artrópodos (Aschoff, 1981).

Por otra parte, puede no existir sincronización del marcapaso, pero los ciclos de actividad manifiestos bajo fotoperiodos completos, pueden presentar actividad aparentemente sincronizada durante la fase luminosa (enmascaramiento positivo) o en la fase oscura (enmascaramiento negativo; Rietveld et al, 1993). Al suspender el protocolo del fotoperiodo, el ritmo aparece con una fase diferente a la esperada

después de una sincronización efectiva y mantiene la fase previa al fotoperiodo. La respuesta de enmascaramiento ha recibido poco interés hasta ahora en el estudio del sistema circadiano, sin embargo se ha discutido su importancia como una característica adaptativa significativa (Marques y Waterhouse, 1994; Page 1989).

Efecto de la luz monocromática sobre los ritmos circadianos

A pesar que la luz es un agente sincronizador importante, se ha explorado poco el efecto de su cualidad sobre los ritmos circadianos (Hastings et al. 1992). Los experimentos hechos con diversas especies de animales, han demostrado que existe sensibilidad diferencial del sistema fotorreceptor circadiano que permite la sincronización así como los cambios de fase del marcapaso. Algunos ejemplos en invertebrados son, el ritmo de bioluminiscencia en el alga unicelular *Gonyaulax*, que muestra cambios de fase de 3 horas cuando se le aplican por separado pulsos de luz monocromática de 475 y 650 nm, mientras que a 550 nm no se observan tales respuestas (Hastings et al. 1992). En esta alga, cuando se mantienen bajo luz constante, el cambio de τ aumenta conforme aumenta la intensidad de iluminación usando luz roja ($\lambda > 600$ nm) y disminuye usando luz azul de $\lambda = 400-500$ nm (Roenneberg, 1995). En el alga unicelular *Chlamidomona*, la mayor sensibilidad a los cambios de fase en el ritmo de fototaxis se obtiene usando pulsos de luz de 470 y 660 nm al mismo tiempo circadiano (TC), habiendo mayor sensibilidad a la región del azul (Hastings et al, 1987).

En el ritmo de eclosión de *Drosophyla*, se han reportado importantes cambios de fase cuando se aplican pulsos de 420 y 480 nm (Frank y Zimmerman, 1969). El ritmo de actividad locomotora en la cucaracha *Periplaneta americana*, presenta un umbral de sincronización con luz monocromática a los 495 nm, indicando sensibilidad del fotorreceptor al azul-verde (Mote y Black, 1981).

En el acocil *Procambarus bouvierii*, la aplicación pulsos de luz monocromática de 465, 565 y 632 nm sobre el ritmo circadiano de amplitud electroretinográfica (ERG), muestra tres tipos distintos de curva de respuesta de fase (CRF). Los estímulos con luz azul causan adelantos entre el TC 0 a TC 9 y atrasos entre TC 9 a TC 18. La forma de la CRF obtenida con pulsos de luz verde-amarilla (565 nm) es invertida en relación a la anterior; mostrando una notable zona de retrasos desde el tiempo circadiano (TC) 0 a TC 12 y adelantos desde TC 15 a TC24. La CRF obtenida con pulsos de luz roja, muestra una amplia zona de retrasos excepto entre TC 12 y TC 15. La respuesta de fase diferencial a la luz monocromática sugiere que existen al menos dos grupos de fotorreceptores funcionales: uno sensible a longitudes de onda corta y otro sensible a la onda larga (Inclán-Rubio, 1991).

En 1992, Fanjul-Moles et al, reportaron que durante la ontogenia del acocil, el desarrollo asimétrico de los fotorreceptores retinianos influye sobre las características del ritmo de amplitud del ERG; dichas características muestran notables diferencias cuando el ritmo del ERG es obtenido con estímulos luminosos de color azul, blanco y rojo. Cuando el ERG es obtenido con pulsos de luz blanca, manifiesta un ritmo de tipo ultradiano, mientras cuando se obtiene con luz monocromática azul o roja, el ritmo circadiano emerge mostrando diferencias de periodo en una u otra circunstancia. Estos autores proponen la existencia de al menos dos grupos de fotorreceptores circadianos, relacionados con dos sistemas independientes (por las características de los parámetros básicos como periodo, actividad reposo y amplitud relativa) involucrados en la expresión del ritmo de la amplitud del ERG. Cuando se aplican pulsos de luz azul directamente en el sexto ganglio abdominal, el ritmo ERG de acociles juveniles presenta cambios de fase diferentes a los obtenidos con luz blanca (Bernal-Moreno et al, 1996).

En el pez *Couesius plumbeus*, la sincronización del ritmo de actividad locomotora puede llevarse a cabo mediante vías extrarretinianas usando ciclos LO de luz roja, (Kavaliers, 1980). En el murciélago *Hipposideros speoris*, se han reportado adelantos máximos de fase con pulsos de luz de 520 nm y atrasos máximos de fase con luz de 430 nm en TC 14 y en TC 18 respectivamente; lo que sugiere un claro antagonismo entre dos clases de fotorreceptores en la retina que median los avances y retrasos de fase (Joshi y Chandrasherkan, 1985).

La actividad locomotora en el conejo silvestre, puede ser sincronizada mediante la variación en la composición espectral en un régimen de iluminación. Los incrementos en la intensidad de luz azul son más efectivos para el avance del inicio de actividad, así como los decrementos en la intensidad de luz amarilla (Nuboer et al, 1983).

La respuesta a la luz monocromática en los diversos tipos de ritmos circadianos de los animales, sugiere que los pigmentos que median las vías de sincronización son diferentes a aquellos que se encuentran en otro tipo de respuestas a la luz como en la fotosíntesis, la fototaxis y la visión, además de que al parecer más de un pigmento fotorreceptor, o la vía que lo incluye afecta a los ritmos circadianos de manera diferente (Hastings et al, 1992; Foster y Menaker, 1993).

Sensibilidad retiniana en el acocil

Para el acocil adulto, se ha reportado que la máxima sensibilidad visual es a los 570 nm, lo que al parecer es consecuencia de un pigmento parecido a la rodopsina. Existe también sensibilidad al rojo y el pigmento responsable es al parecer un tipo de iodopsina (Bruno y Kennedy, 1962). Posteriormente, Wald (1967) reportó la presencia de receptores al azul con un pico de sensibilidad a los

445 nm cuando el acocil es previamente adaptado a luz roja. Mediante técnicas electroretinográficas, las respuestas a 570 y 440 nm son debidas a rodopsinas (Wald, 1967; Goldsmith y Fernández, 1968) mientras que una porfirropsina, el cromóforo 3-dehidroretinal, permite mayor absorción a 600 nm. Este cromóforo disminuye cuando se mantiene al animal en luz constante así como a temperaturas mayores a los 25°C (Suzuki et al, 1985).

Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo, (1988) han reportado cambios durante al ontogenia en la sensibilidad retinal en el acocil *Procambarus bouvieri*, proponiendo el que existan tres posibles grupos de fotorreceptores en el animal adulto que se desarrollan de forma asimétrica durante la ontogenia, pues en este trabajo, los animales de los primeros estadios de desarrollo mostraron mayor sensibilidad a longitudes de onda corta (azul, UV) y esta sensibilidad cambia a longitudes de onda larga (verde, rojo) cuando el animal se aproxima a la edad adulta.

Al parecer existe una fuerte influencia de la glándula sinusal sobre la sensibilidad espectral. En adultos sinusotomizados, la sensibilidad espectral a la luz azul y la luz roja es semejante a la mostrada por los organismos juveniles (Fanjul-Moles et al, 1991).

Fotorreceptores extrarretinianos en el acocil

Además de los fotorreceptores responsables de la visión, se han reportado la existencia de fotorreceptores extrarretinianos en diversos invertebrados (Wolken, 1988). Para los crustáceos decápodos, se han descrito: un fotorreceptor extrarretiniano que consiste en un par de neuronas fotorreceptivas en el sexto ganglio abdominal (Prosser, 1934; Wilkens y Larimer, 1976). Se ha descrito fotosensibilidad en motoneuronas del segundo ganglio abdominal (Edwards, 1984)

y se ha reportado que existe un fotorreceptor extrarretiniano en el ganglio supraesofágico del acocil australiano *Cherax destructor* (Sandeman y col, en 1990).

Ha sido muy discutida la función del fotorreceptor del sexto ganglio abdominal del acocil, también llamado fotorreceptor caudal (Wilkins, 1988). La principal función de esta estructura se ha relacionado con la conducta fototáctica negativa, sin embargo se ha estudiado su relación con los diversos ritmos circadianos tales como el ritmo de amplitud del ERG (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Bernal-Moreno et al, 1996) así como en el ritmo de actividad locomotora (Page y Larimer, 1976).

La respuesta del fotorreceptor caudal a la luz monocromática muestra una sensibilidad espectral desde los 425 a los 600 nm, con una máxima respuesta a los 500 nm; usando una intensidad de 5×10^{-4} W/cm². Esta respuesta a la luz monocromática difiere de la obtenida por las estructuras retinales. La curva de sensibilidad de la retina esta desplazada a la zona de onda larga (sensibilidad máxima a 570 nm) por lo que se sugiere que el pigmento fotorreceptor responsable sea diferente al de la retina pero semejante a la absorción de la rodopsina de otros crustáceos (Bruno y Kennedy, 1962).

En el acocil *P. clarkii* aún no se ha descrito ningún fotorreceptor que se encuentre en el ganglio cerebral; sin embargo como se mencionó anteriormente, Sandeman et al, (1990) reportaron que en el acocil *Cherax destructor*, existen dos grupos de células pigmentadas en el margen anterior del ganglio cerebral. Estas células presentan gránulos de opsina típicas del ojo compuesto y sus membranas asemejan estructuras en forma de rbdoma. Las células responden a los estímulos luminosos mediante un potencial de receptor y su sensibilidad espectral abarca desde los 440 nm hasta los 620 nm con una sensibilidad máxima en los 540 nm. Los

axones de estas células proyectan hacia el puente protocerebral y a neuropilos en el deutero y tritocerebro, donde podrían hacer sinápsis con fibras descendentes a los centros locomotores.

Ritmo de actividad locomotora en el acocil

El Ritmo de Actividad Locomotora (RALM) en el acocil, es típico de un animal nocturno, su periodo en oscilación espontánea es menor a las 24 horas y durante la sincronización a un régimen de luz-obscuridad (LO) 12:12 muestra dos picos de actividad, el primero, corto y de respuesta inmediata al encendido de la luz, y el segundo más largo, que aparece poco después del apagado de la luz. Este segundo pico es el considerado como representativo para la oscilación endógena, mientras que el primer pico se considera como una respuesta exógena a la luz y desaparece en condiciones de oscuridad constante, así como en fotoperiodos aplicados a animales sin pedúnculos oculares (Page y Larimer 1975).

La sincronización del RALM a un fotoperiodo, puede llevarse a cabo mediante vías retinianas y extrarretinianas. Se ha reportado que después de la ablación de la retina, permanece la capacidad de sincronización del ritmo (Page y Larimer, 1976). La ablación de los conectivos al sexto ganglio tampoco la evita, mientras que la ablación de los conectivos circunesofágicos hace que el ritmo desaparezca completamente. Por lo anterior se ha propuesto que el marcapaso del RALM en el acocil esta probablemente ubicado en el ganglio supraesofágico (también conocido como cerebroide), y que las vías de sincronización al fotoperiodo son tanto retinianas como extrarretinianas. Estas últimas no descartan la presencia de fotorreceptores extrarretinianos en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1976).

Por otra parte, Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981) reportaron que existe correlación entre el ritmo de amplitud del ERG y el RALM en el acocil *Procambarus bouvieri*. Estos autores sostienen que la ablación del ganglio cerebroide no provoca la desaparición del ritmo locomotor y que posterior a la ablación se observan cambios inestables entre la fase del ritmo ERG y el RALM, por lo que sugieren la posibilidad de diferentes mecanismos conductores para ambos ritmos que operan bajo una coordinación central, probablemente de naturaleza neuroendócrina. En este estudio, se propone que al menos dos osciladores diferentes pero directamente acoplados, son responsables de las variaciones circadianas en el acocil adulto, es decir que la expresión del RALM podría ser originada por los pedúnculos oculares y/o por el ganglio cerebroide.

Mediante otro tipo de análisis, se encontró que el RALM del acocil presenta variaciones en sus características de periodo, actividad-reposo (α/p) y fase (ϕ) durante la ontogenia (Fanjul-Moles et al, 1996). Aunque no muestra la misma evolución en su maduración que el ritmo ERG, pues parece estar presente desde la eclosión, o al menos desde que alcanza motilidad propia (2º estadio), se observa una tendencia a la estabilización hasta aproximadamente las 20 semanas de edad, lo que demuestra un desarrollo más lento en comparación al ritmo ERG. Sin embargo un bajo porcentaje de los organismos más jóvenes muestran un ritmo circadiano de actividad locomotora, lo que hace suponer que los sistemas marcapasos responsables de su generación son funcionales desde los primeros días de eclosión y lo que varía es el grado de maduración de las vías que lo manifiestan. Lo anterior ha sido reportado para otros invertebrados como la cucaracha *Leucophaea maderae* (Page, 1990) y en el grillo *Griecus bimaculatus* (Yagi y Loher, 1986).

El ritmo de actividad locomotora en el animal adulto es influido por los elementos neurohumorales que son secretados en el tallo ocular, aunque no son los

responsables de su origen, las estructuras del tallo ocular (excepto la retina y la lámina ganglionaris) presentan una influencia importante en los aspectos de locomoción. Un ejemplo de ello es que la ablación del pedúnculo ocular provoca en algunos organismos una incapacidad para lograr la sincronización a fotoperiodo, mientras que otros mostraron una clara sincronización aunque, con características de fase distintas a las de los acociles adultos (Page y Larimer, 1975). La CRF descrita para el ritmo de actividad de las patas ambulatorias del acocil adulto es bimodal y muestra poca sensibilidad a los pulsos de luz blanca. Durante la mayor fracción del tiempo circadiano se aprecian retrasos y una zona muy estrecha de adelantos alrededor de TC 17 (considerando como TC 0 al 50% del incremento en la curva de actividad relativa); los autores sugieren la posibilidad de que el marcapaso responsable del ritmo del ERG y del RALM sean el mismo (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los trabajos realizados sobre los procesos circadianos del acocil, se ha reportado que tanto la calidad como la cantidad de la luz, parecen tener efectos importantes sobre los parámetros de los ritmos. El efecto de la luz monocromática en la expresión del ritmo de amplitud del ERG durante la ontogenia del acocil, muestra un efecto diferencial entre la longitud de onda corta y la longitud de onda larga sobre los parámetros de este ritmo (Fanjul-Moles et al, 1992), lo que ha llevado a proponer a los autores la existencia de dos grupos de fotorreceptores circadianos con una sensibilidad diferencial a estos dos tipos de longitud de onda. Estos fotorreceptores, además de presentar un desarrollo asimétrico durante la ontogenia estarían incidiendo sobre al menos dos sistemas osciladores distintos.

Por otra parte se ha encontrado que la expresión del RALM durante la ontogenia, no presenta modificaciones tan importantes en sus parámetros como sucede en el ritmo de amplitud ERG y sus características temporales de maduración son diferentes (Fanjul-Moles et al, 1996). Algunos autores han propuesto al ganglio cerebroide como la estructura en la cual se encontraría un marcapaso común a los ritmos de actividad locomotora y de amplitud electroretinográfica en el acocil adulto (Page y Larimer, 1972, 1975). Sin embargo esta idea ha sido refutada por otros autores (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981).

Los estudios sobre la acción de la luz monocromática durante la ontogenia de estos ritmos podrían dilucidar estas contradicciones y aclarar algo más sobre el desarrollo neural del acocil. Las características ontogénicas de la expresión de ambos ritmos y el comportamiento del ritmo ERG ante longitudes de onda diferentes, abre un campo de estudio y una hipótesis de trabajo:

III HIPÓTESIS

Si la luz monocromática que produce cambios diferenciales sobre los parámetros del ritmo de amplitud electroretinográfica ERG, y tuviera un efecto semejante sobre el ritmo de actividad locomotora (RALM) en las edades en que existe un cambio en la manifestación de las características de ambos ritmos, entonces se aclararía si las vías y centros de sincronización para el RALM y el ERG son semejantes, así como si en la expresión del RALM están involucrados osciladores asociados a fotorreceptores con diferente sensibilidad espectral.

Objetivo general

- El objetivo general de esta tesis es el estudio del ritmo de actividad locomotora de acocil juvenil *Procambarus clarkii*, durante la exposición al Fotoperiodo Esqueleto simétrico (FE) 12:12 con luz monocromática azul y roja.

Objetivos particulares

- Analizar la capacidad de sincronización del Ritmo de Actividad Locomotora de acociles juveniles, mediante vías extrarretinianas así como la sensibilidad espectral de las mismas a longitudes de onda corta y onda larga.
 - Dilucidar la relación entre las vías de sincronización entre el ritmo ERG y el Ritmo de Actividad Locomotora en acociles juveniles.
-

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y mantenimiento de animales

Se obtuvieron acociles adultos de la especie *Procambarus clarkii* colectados en Parral, Chihuahua; se trasladaron al laboratorio y se mantuvieron en acuarios de 70 x 37 x 30 cm. Cada acuario tenía acondicionado un sistema de iluminación cuyo fotoperiodo de luz blanca (Intensidad 150 Lux) encendía a las 07:00 hs y apagaba a las 19:00 hs. El agua de los acuarios se mantuvo a 20°C ± 2°C. En cada acuario se distribuyeron los animales por sexo, con una proporción de tres hembras por cada macho.

Los acuarios se construyeron con filtros biológicos a base de grava y aireación, además de diversos resguardos donde los animales podían permanecer en penumbra durante las horas de iluminación. El burbujeo en todos los acuarios fue aplicado mediante una bomba de aire Sweetwater mod K-37JXGZ. Bajo estas condiciones, los animales fueron mantenidos hasta que se llevó a cabo su reproducción.

Una vez obtenidas las hembras ovígeras, fueron aisladas en acuarios con las mismas condiciones. Se observó la fecha de eclosión de los huevecillos la cual se consideró como el tiempo cero para determinación de la edad. Los animales juveniles fueron mantenidos en acuarios similares. Todos los acociles fueron alimentados tres veces por semana con verduras cocidas y pescado.

Diseño experimental

Se usaron 92 acociles juveniles con edad de 16 a 20 semanas. Los animales se separaron en cuatro grupos:

- **Grupo I:** Control, incluye acociles juveniles sin lesiones experimentales. (n=26).
- **Grupo II:** Acociles juveniles con lesión en pedúnculo ocular que incluyó ablación de Retina y Lámina Ganglionaris (n= 22).
- **Grupo III:** Acociles juveniles con lesión semejante al grupo II y además ablación de los conectivos entre el quinto y el sexto ganglio abdominal, (n=20).
- **Grupo IV:** Acociles juveniles con lesión electrogénica en el ganglio supraesofágico, (n=24).

Las lesiones correspondientes a los grupos II al IV se muestran esquemáticamente en la figura 1.

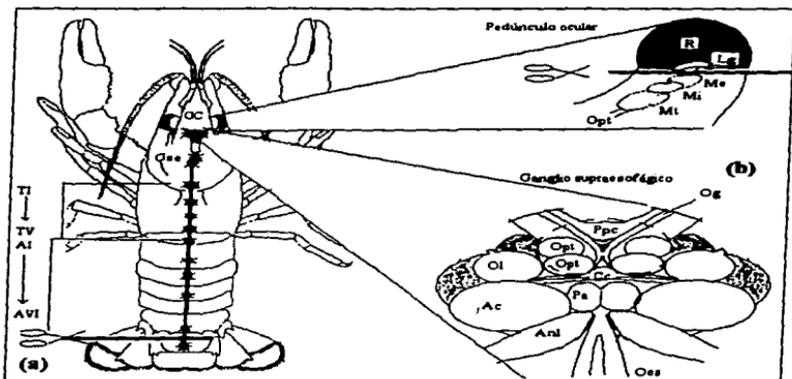


Figura 1

En (a): Representación de la distribución del sistema nervioso en el acicil *P. clarkii*. Desde la región rostral a la región caudal se observa la ubicación del Ganglio supraesofágico o cerebroide (GC), Ganglio subesofágico (Gse), Ganglios torácicos I al V (TI-TV). En la región abdominal-caudal se presentan seis ganglios (AI al AVI). La línea negra que presenta una tijera, indica la lesión en los conectivos entre el 5° y 6° ganglio abdominal.

En (b) se esquematizan el pedúnculo ocular y el Ganglio cerebroide de arriba hacia abajo: Retina (R), Lámina Ganglionaris (Lg), Médula externa (Me), Médula interna (Mi), Médula terminalis (Mt). La línea negra que presenta una tijera, indica la lesión entre Lg y Me.

En el Ganglio cerebroide se aprecian regiones como: Tracto olfatorio-globular (Og) Neurópilos ópticos (Opt), Puente protocerebral (Ppc), Nervio antenular (Anl), Lóbulo olfatorio (Ol) Lóbulo accesorio (Ac), conectivos esofágicos (Oes), lóbulo paraolfatorio (Pa) Tomado de Sandeman et al 1988.

Los organismos de cada grupo se colocaron individualmente en acuarios de registro y se sometieron durante 10 días a condiciones constantes de oscuridad (OO1); posteriormente se les aplicó un FE implementado por un pulso de luz de 30 min a las 07:00 h y un segundo pulso a las 19:00 h. Finalmente se regresó a cada uno de los animales durante 10 días a oscuridad constante (OO2). Cada grupo experimental, se dividió en dos tratamientos, uno se sometió a FE simétrico 12:12 con luz monocromática azul (25 Wm^{-2} , $\lambda = 460 \text{ nm}$) y otro a FE con luz monocromática roja (25 Wm^{-2} , $\lambda = 640 \text{ nm}$). La luz fue aplicada mediante fibra óptica (Dolan Jenner, mod 170.2) cuya fuente de iluminación (lámpara de halógeno) estuvo fuera del sistema de aislamiento como se muestra en la figura 2. La luz monocromática azul fue obtenida con el uso de filtros Schott mod BC28 y los de luz roja con filtros de gelatina Kodak Wratten (cat 1494178). La intensidad de la luz, fue calibrada con la ayuda de un Cuantómetro-Radiómetro-Fotómetro Li-Cor modelo LI 180; y con un piranómetro como sensor Li-Cor modelo PY-17197.

Los acuarios de registro fueron elaborados con vidrio de 0.5 cm de espesor, y las dimensiones correspondientes fueron de 20 x 8 x 10 cm. Cada uno presentaba en su base cuatro diodos emisores de luz infrarroja ($\lambda = 900 \text{ nm}$) y sus respectivos sensores del lado opuesto, con una separación lateral de 3 cm entre cada uno. Los animales colocados dentro de estos acuarios se pudieron mover libremente de tal manera que cada interrupción del circuito era considerada como un evento de actividad locomotora el cual se almacenaba en una computadora. En un extremo del acuario, se puso comida adherida al fondo con cera, en el extremo opuesto, el acuario presentaba un resguardo de plástico opaco.

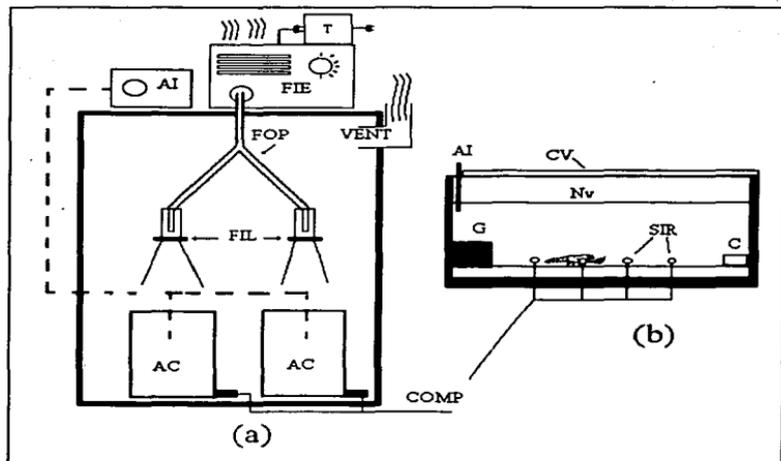


Figura 2.

Diagrama general del sistema de registro de actividad locomotora.

En (a) se muestra el diseño del gabinete en el que se encuentran los acuarios de registro (AC), Ventilación del gabinete (VENT), Sistema programable de encendido y apagado de la luz (T), Fibras ópticas (FOP), Fuente de iluminación externa (FIE), Aireación del acuario (AI), Conexión a la computadora de captura (COMP).

En (b) se muestran las características del acuario de registro. Sensores infrarrojos (SIR), Guarida (G), Comida (C) Nivel del agua (Nv) Cubierta de vidrio (CV).

Los acuarios de registro fueron colocados por pares en cubículos independientes hechos de madera de 2 cm de espesor y con el interior negro como se muestra en la figura 2. Cada cubículo presentaba una fuente de aireación, y un sistema de ventilación, conexión a un sistema analógico-digital de captura, un par de fibras ópticas con los filtros de luz correspondientes (se usó únicamente un tipo de filtro para cada cubículo). Los cubículos se mantuvieron en un cuarto oscuro con ventilación y temperatura controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Obtención de datos y análisis correspondientes

Los acociles fueron monitoreados individualmente mediante el sistema de registro previamente descrito. La actividad locomotora fue colectada a manera de la suma total de interrupciones a los circuitos durante cada veinte minutos (bin=20 min) y colectada y almacenada por una microcomputadora XT Printaform para su análisis posterior. Los valores de actividad se graficaron mediante un actograma convencional de doble gráfica con la ayuda del programa TAU (Minimiter Co. Inc.). El análisis de la actividad locomotora se basó en los grupos más claros de actividad, discriminando aquellos cuya amplitud era mayor a la media más la desviación estándar.

El ritmo de actividad locomotora del acocil no es tan claro como el de otras especies de animales, por lo que se usaron métodos estadísticos para determinar si el ritmo era significativamente estadístico. Los datos de cada 10 días de actividad se graficaron en unidades de 20 minutos y se analizaron mediante el periodograma de X^2 a intervalos de 10 a 30 horas. Únicamente se consideraron los registros que rebasaron nivel de significancia $p < 0.01$ (Sokolove y Bushell, 1978). Las diferencias de los valores de periodo entre la oscilación espontánea inicial y la final en oscuridad constante (OO) se analizaron mediante estadística no paramétrica con la

prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar el punto de referencia de fase en cada actograma, se usó el valor máximo de actividad de cada ciclo. Para la determinación del TC se consideró la curva promedio de los tres últimos días para cada condición. La referencia del inicio de actividad fue considerado a partir del momento en que la curva rebasa la media de cada ciclo, lo que representó el TC 12. El periodo obtenido por el periodograma, se comparó con el obtenido mediante el uso de regresión lineal por mínimos cuadrados, tomando como la referencia la fase de máxima actividad en cada ciclo. Las fases obtenidas durante el FE fueron analizadas mediante estadística circular con las pruebas de Rayleigh y Rao para no aleatoriedad (Batchelet, 1981).

Lesiones e Histología.

Todas las lesiones se hicieron en animales anestesiados con frío (4°C) bajo un microscopio estereoscópico Olympus modelo SZ-STB1. La ablación de retina se llevó a cabo con una tijera oftalmológica, eliminando la zona retinular y la lámina ganglionaris; la ablación de los conectivos al sexto ganglio abdominal se llevó a cabo mediante un corte entre el quinto y sexto segmento ventral (Figura 1). Posteriormente, para disminuir la pérdida de hemolinfa, los animales se enfriaron a 10°C durante 10 minutos más.

Para lesionar el ganglio cerebroide se utilizó una referencia estereotáctica previamente establecida y mediante una serie de disecciones se elaboró el diagrama de referencia mostrado en la figura 3.

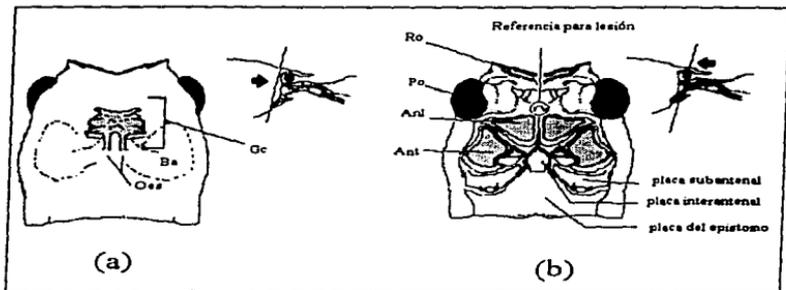


Figura 3.

Referencia anatómica de la región rostral del acocil. Se muestra la ubicación del ganglio supraesofágico en referencia a las estructuras externas. En (a) se muestra la posición anatómica del ganglio cerebroide en la cara interna del róstrum y en (b) las estructuras de referencia anatómica externa y la región en que se insertó el electrodo para lesión electrolytica, en los dibujos superiores a cada esquema se muestra la referencia lateral y las líneas representan el corte al que se presenta el plano. Ganglio supraesofágico (Gc), Conectivos circumesofágicos (Oes), Antenas (Ant), Anténulas (Anl), Pedúnculo ocular (Po), Róstrum (Ro), Bóveda antenal (Ba).

El protocerebro se encuentra entre la base de la conexión de los pedúnculos oculares y el tope superior de la inserción antenular. La lesión al ganglio supraesofágico, se hizo mediante el corte del róstro a nivel de la base de los pedúnculos oculares. Una vez referido, se insertó un electrodo de acero con una punta de 50 μm de espesor, con la ayuda de un soporte con micromanipulador Narishige, modelo 11902, para después pasar una corriente de 10 mA durante 5 segundos mediante un estimulador Hewlett Packard modelo 6217-A.

Después de la lesión, los animales se mantuvieron en recuperación durante una semana antes de pasar al sistema de registro. Al final de cada experimento se llevó a cabo el control histológico. Los animales lesionados fueron fijados en formaldehído al 10% y disecados los pedúnculos oculares y el cerebro para verificar la lesión. Las muestras fueron incluidas en paraplast y cortadas con un microtomo a 10 μm de espesor. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina y fueron observados y fotografiados con el uso de un microscopio de luz Nikon Labophot 2.

V. RESULTADOS

Grupo I Control: Ritmo de Actividad locomotora en acociles juveniles sin lesiones

Fotoperiodo esqueleto con luz azul

La actividad locomotora de los acociles sin lesiones durante la oscilación espontánea, muestra las características descritas en trabajos anteriores para los animales de este intervalo de edad. El ritmo frecuentemente es unimodal y los niveles de actividad son variables (Fanjul-Moles et al. 1996).

La figura 4 muestra un actograma representativo de un acocil juvenil. Durante los 9 primeros días de registro en la condición inicial de oscuridad constante, el animal manifiesta un ritmo con un valor de periodo de $\tau = 24.6$ horas. La actividad está presente durante casi todo el día, de tal manera que los periodos de reposo (ρ) son muy cortos. Los picos de máxima actividad permiten apreciar la oscilación del ritmo. La línea de regresión muestra para esta condición un valor de periodo de $\tau = 24.4$ hs. Cuando pasa a FE con luz azul del día 10 al día 20, el RALM se sincroniza y muestra dos grupos de actividad, uno de corta duración y baja amplitud que se presenta simultáneo al primer pulso de luz (07:00 hs) y un segundo grupo de actividad que se sincroniza con el segundo pulso de luz (19:00 hs). El ajuste al fotoperiodo se da mediante tres ciclos transitorios y un adelanto de 3.8 hs.

El periodograma correspondiente muestra dos picos significativos de 12 y 23.8 horas, el valor del periodo calculado por la línea de regresión mostró un valor igual al obtenido mediante el análisis del periodograma. Durante los últimos cinco días de registro en oscuridad constante, se observa un ritmo unimodal en oscilación espontánea con un valor de periodo de $\tau = 24.8$ hs, la línea de regresión representa un $\tau = 25.2$ hs.

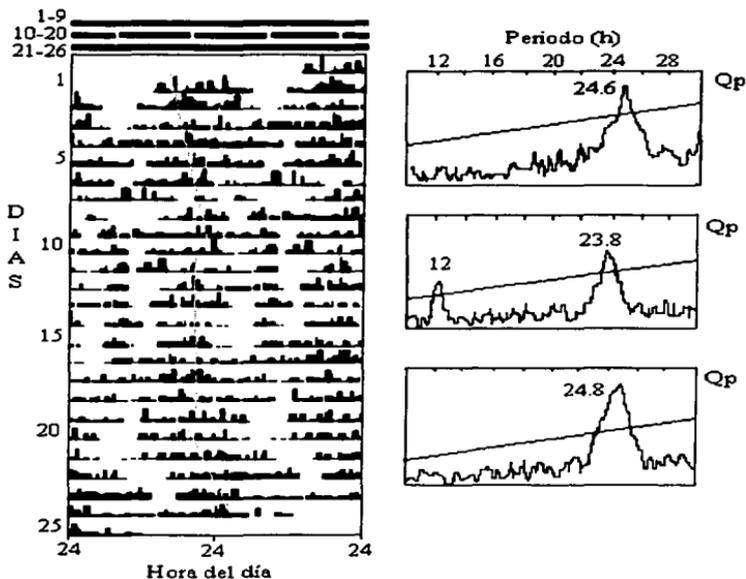


Figura 4

Actograma de doble gráfica que muestra el ritmo de actividad locomotora de un acocil juvenil sin lesiones. Del día 1 al 9 en condiciones de OO1, se observa un $\tau = 24.6$ hs, del día 10 al 20 en condiciones de FE con luz azul y del día 21 al 26 en OO2. A la derecha del actograma se presentan los periodogramas correspondientes. En el actograma se presenta la línea de regresión en tono gris correspondiente a cada condición.

Fotoperiodo esqueleto con luz roja

La figura 5 muestra el RALM de un animal juvenil que durante los 10 primeros días oscila con un periodo de $\tau = 23.0$ hs ($p < 0.01\%$); el ritmo es unimodal y la intensidad de la actividad es variable. En este registro se aprecia que los intervalos entre α y ρ son claros. La línea de regresión dio un valor de periodo de $\tau = 22.8$ hs. Desde el día 11, cuando se aplica el FE con luz roja se observa que la actividad se sincroniza al pulso de las 19:00 hs. En el primer día en FE, el primer pulso coincide con TC 7 y mediante retrasos se sincroniza al segundo pulso de luz. El ritmo locomotor presenta dos grupos de actividad, el primero de corta duración y amplitud aparece simultáneo al pulso de luz correspondiente a las 07:00 hs. y el segundo de mayor amplitud y duración está sincronizado alrededor del segundo pulso de luz. El periodograma correspondiente muestra picos de 12 y 23.7 hs, la línea de regresión equivale a un periodo de 24.1 hs. A partir del día 23 de registro, el animal se mantuvo nuevamente en oscuridad constante, el ritmo presenta una oscilación unimodal con un valor de periodo de $\tau = 23.5$ hs. En la condición post-sincronización se aprecia claramente el control de fase a partir del último día en FE, la línea de regresión representa un periodo de $\tau = 23.45$ hs.

La tabla 1, muestra el resumen de los resultados para este grupo experimental.

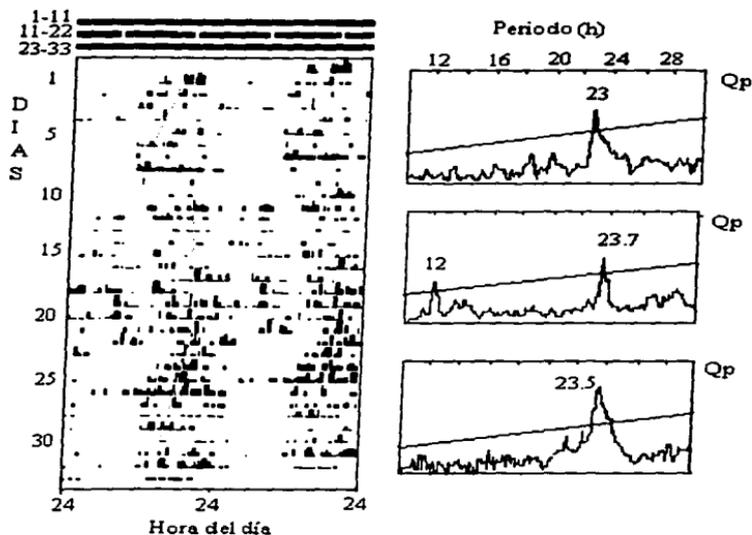


Figura 5.

Actograma de un acicil juvenil sometido a condiciones constantes de oscuridad y a FE con luz roja. El actograma muestra claramente que durante el FE aparece un pico de actividad que coincide con el pulso de las 07:00 hs y otro que se presenta alrededor del pulso de las 19 hs. El periodograma muestra dos picos significativos en esta parte del registro.

Tabla 1

	Respuesta a FE	n	τ OO1 < 24 (n)	τ en FE	τ OO2	τ OO1 > 24 (n)	τ en FE	τ OO2	# Ci Trans.
FE azul n=13	Sincroniza	9	22.68 ± 0.75 (6)	24.04 ± 0.25	24.74 ± 1.72	27.13 ± 0.3 (3)	24.03 ± 0.23	26.7 ± 1.4	4.25 ± 1.8
	No Sincroniza	4	22.46 ± 1.8 (3)	25.3 ± 1.5	24.1 ± 3.7	25.00 (1)	22.55 ± 0.38	22.8	--
FE rojo, n= 13	Sincronizan	13	22.7 ± 0.8 (7)	24.05 ± 0.39	26.93 ± 1.5	24.2 ± 0.81 (6)	23.96 ± 0.36	23.4 ± 0.32	4.0 ± 0.4

Variaciones en el periodo promedio obtenido en los diferentes tratamientos con animales sin lesiones. Se muestra el periodo en oscuridad constante, antes (OO1) y después (OO2) del FE. En esta tabla se muestran agrupados, según el valor promedio del periodo. La última columna (# Ci. Trans) representa el número de ciclos transitorios para la sincronización al FE.

De los 26 animales utilizados en este grupo, 13 fueron sometidos a FE con luz azul y 13 a FE con luz roja. Los animales que fueron expuestos a FE con luz roja mostraron en su totalidad capacidad de sincronización; mientras que de los expuestos a FE azul, solamente 9 lograron sincronizarse, lo que sugiere una mayor sensibilidad de los fotorreceptores circadianos a la longitud de onda larga.

El periodo del ritmo en oscilación espontánea, puede ser afectado por las condiciones de fotoperiodo previas a las que estuvo sujeto el animal, este fenómeno ha sido definido por Pittendrigh y Daan (1976a) como "post-efecto". En el caso de los acociles del grupo I, se observó que el periodo previo al tratamiento con FE fue diferente al obtenido después de la sincronización. La figura 6 muestra la variación en el periodo en los dos tratamientos recibidos por cada animal que fueron mencionados en la Tabla 1. Cuando en oscuridad constante inicial (OO1) $\tau < 24$ h, después del FE, el valor de τ aumenta y cuando el ritmo tiene un periodo inicial mayor a 24 horas, el valor de τ posterior al FE parece disminuir en ambos tratamientos. Los asteriscos en la gráfica representan que existen diferencias significativas mediante el análisis de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0.043$ para luz roja y $p < 0.03$ para luz azul, $D = 1$ en ambos casos).

La capacidad de sincronización del RALM es similar para las dos longitudes de onda utilizadas. La distribución de fases de los animales que mostraron sincronización está representada en la figura 7. En ambos tratamientos, la distribución de la fase puede presentarse en cualquiera de los dos pulsos de luz representados con las flechas en cada círculo. En ambos tratamientos la fase del ritmo se encuentra sincronizada a uno de los dos pulsos de luz, agrupándose con una distribución bimodal. La prueba de Rao mostró que la distribución bimodal es significativa ($U=186.8$ con luz azul y $U=259$ con luz roja, $p < 0.05\%$).

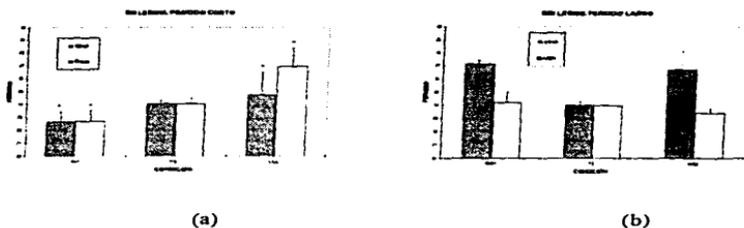


Figura 6

Cambios en el valor de τ previo y posterior a la sincronización al FE con luz monocromática. En (a) se presentan los casos con un valor inicial de periodo promedio menor a 24 hs y en (b) mayor a 24 hs. Las barras claras representan los casos en FE con luz roja y las oscuras en FE con luz azul. Se presenta la desviación estándar correspondiente a cada grupo y los asteriscos representan diferencias significativas entre los grupos.

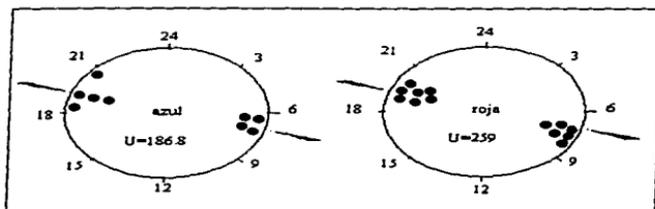


Figura 7.

Fases estimadas del ritmo de actividad en los acociles que sincronizaron al FE. Las flechas representan el momento en que se aplica cada pulso. Es clara la tendencia bimodal en ambos grupos. El valor de U es el correspondiente a la prueba de Rao para doble tendencia.

Grupo II. Ritmo de actividad locomotora en acociles juveniles con ablación de retina-lámina ganglionaris (R-Lg).

Histología

La figura 8a, muestra la fotomicrografía de un corte de 10 μm de espesor, correspondiente a un pedúnculo ocular de un acocil juvenil sin lesión. Se pueden observar las estructuras típicas como la Retina, la Lámina ganglionaris (Lg), la Médula externa (Me), la Médula intema (Mi) y la Médula terminalis (Mt). La lesión correspondiente en este grupo experimental se puede observar en la fotomicrografía 8b, en que únicamente se eliminan R y Lg. Después de 30 días de la lesión, el tejido dañado muestra cicatrización en la zona de lesión sin haber regeneración de los fotorreceptores.

Fotoperiodo esqueleto con luz azul

La ablación de R-Lg no evita la capacidad de expresión del RALM. En la figura 9 se presenta el actograma típico de un acocil juvenil de este grupo experimental. Desde el día 1 al 10, el ritmo oscila espontáneamente con un periodo de 25.1 hs, a partir del día 8 se acorta el periodo y disminuye el nivel de actividad. Durante los siguientes 10 días en que es sometido a FE con luz azul, el primer pulso cae cerca de TC 12 y mediante avances sincroniza al pulso (19:00 hs) mediante 2 ciclos transitorios. Durante este tratamiento, el valor del periodo fue $\tau = 23.9$ hs y con un inicio de actividad 5 horas antes del pulso de las 19:00 hs. El breve bloque de actividad que se relaciona con el encendido de la luz no aparece. Durante los últimos días en OO2 el ritmo muestra un control de fase respecto al último día en sincronización y oscila con un periodo de 26 hs; sin embargo aparecen otros picos significativos que no estuvieron presentes en la condición inicial de oscuridad. Los periodos calculados mediante regresión lineal para cada condición son: OO1 $\tau = 24.53$, FE $\tau = 24.18$ y OO2 $\tau = 26.0$ hs.

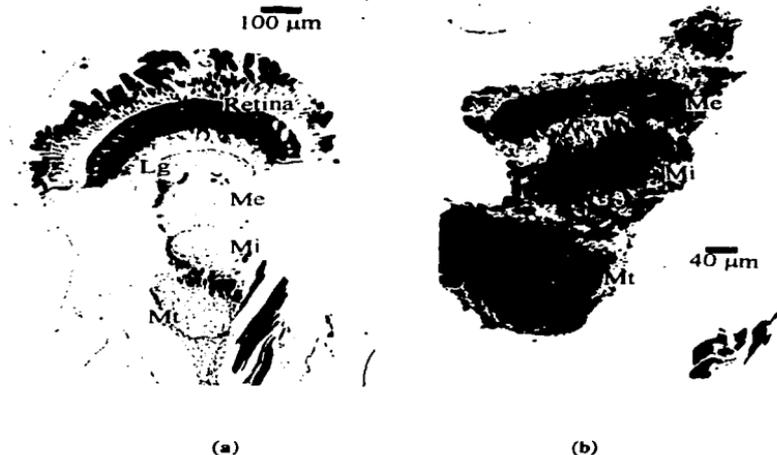


Figura 8

Fotomicrografías de un pedúnculo ocular de un acocil sin lesión (a) en el cual se aprecian claramente los neurópilos: Lámina ganglionaris (Lg) Médula externa (Me), Médula interna (Mi) y Médula terminalis (Mt). La lesión en R-Lg se observa aumentada en (b), no parece haber regeneración de las células retinulares.

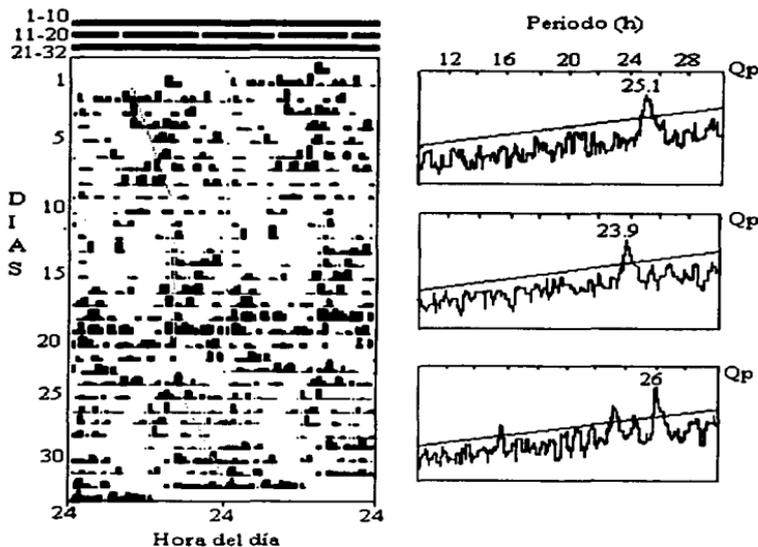


Figura 9

Ritmo de actividad locomotora correspondiente a un animal sin retina ni lámina ganglionaris. A pesar de la lesión, se mantiene la capacidad de sincronización al FE con luz azul. A la derecha se muestran los periodogramas correspondientes a cada condición.

Fotoperiodo esqueleto con luz roja

La figura 10 muestra el actograma de un acocil juvenil sin R-Lg, que durante los primeros 9 días en OO, presenta un ritmo claramente unimodal con un periodo de 25.8 hs. La actividad es variable entre cada ciclo, de tal manera que se observan días con muy poca actividad, sin embargo se mantiene la fase de la oscilación. Durante el FE con luz roja, el primer pulso de luz cae aproximadamente en TC 3 y mediante avances el ritmo se sincroniza al segundo pulso de luz. Durante esta condición, un segundo pico aparece con periodo variable y al final se acopla al FE, sincronizándose al pulso de las 19:00 hs. El periodograma correspondiente muestra un pico a las 23.9 hs ($p < 0.01\%$). En la condición final en OO2, el ritmo mantiene un control de fase y oscila con un periodo de 25.2 horas, los niveles de actividad varían nuevamente de tal manera que la máxima actividad presenta el periodo circadiano significativo y además aparece un pico de 15 hs. Los valores de los periodos calculados mediante regresión lineal para cada condición son: OO1 $\tau = 26.25$, FE $\tau = 23.74$ y OO2 $\tau = 25.87$ hs.

En este grupo fueron usados 22 acociles, de los cuales 11 fueron sometidos a FE con luz azul y 11 a FE con luz roja. De los expuestos a FE roja el 73 % sincronizaron ($\tau = 23.95, \pm 0.05$ hs), mediante una serie de 3.88 ± 2.6 ciclos transitorios; mientras que de los expuestos a FE azul, solamente 9 (80%) lograron un ajuste de periodo muy cercano a las 24 horas ($\tau = 24.06 \pm 0.17$ hs) mediante 3.7 ± 2.4 ciclos transitorios.

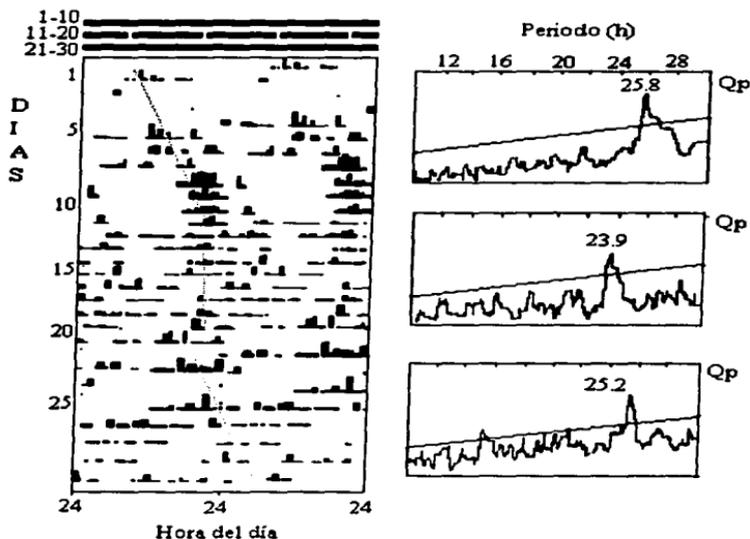


Figura 10

Actograma que muestra el ritmo de actividad locomotora de un acocil con lesión en R-LG. En condiciones de FE con luz roja, la actividad se sincroniza al pulso de las 19:00 hs y que después del fotoperiodo, el ritmo oscila con un periodo menor al mostrado en OOI.

La variabilidad en el periodo anterior y posterior al FE se observa en la figura 11. Los animales con periodo corto en OO1, después del FE presentan un $\tau > 24$ hs, mientras que aquellos que presentaron inicialmente $\tau > 24$ hs mostraron un decremento en el periodo únicamente bajo luz azul. Las diferencias en el periodo de estos grupos no fueron significativas.

La tabla 2 muestra el resumen de los periodos obtenidos en este segundo grupo experimental.

La fase de máxima actividad para cada uno de los animales que sincronizaron en ambas condiciones se representa en la figura 12. Al igual que en los animales intactos, las fases se distribuyen en cualquiera de los dos pulsos de luz, excepto para los sometidos a FE con luz roja en que existe preferencia por el pulso de las 19:00 horas ($U = 254.9$ y $U = 173.35$ respectivamente).

Tabla 2.

	Respuesta a FE	n	τ OO1<24 (n)	τ en FE	τ OO2	τ OO1>24 (n)	τ en FE	τ OO2	# Ci Tran
FE azul n= 11	Sincroniza	9	22.81 ±0.31 (4)	24.09 ±0.47	25.63 ±2.32	26.5 ±1.4 (5)	24.06 ±0.17	24.06 ±1.36	3.7 ±2.4
	No Sincroniza	2	23.07 (1)	25.98 ±2.9	26.8	28.8 (1)	25.7 ±1.7	29.0	---
FE rojo, n= 11	Sincronizan	8	23.5±0.08 (3)	23.81 ±0.38	25.0 ±0.71	27.3 ± 0.7 (5)	23.95 ±0.05	27.5 ±1.59	3.88 ±2.6
	No Sincroniza	3	-----	-----	-----	27.42 ±0.91 (3)	27.02 ±0.62	27.43 ±1.61	---

Resumen de los promedios de los periodos obtenidos de acociles con lesión en R-Lg.

La ablación de R-Lg, reduce la capacidad de sincronización de los acociles expuestos a luz roja, mientras que con luz azul, la proporción de acociles que sincronizan al FE, es similar al grupo I. En los animales sin retina ni Lg, no se observa la tendencia del post-efecto en el valor del periodo promedio, observada el grupo I.

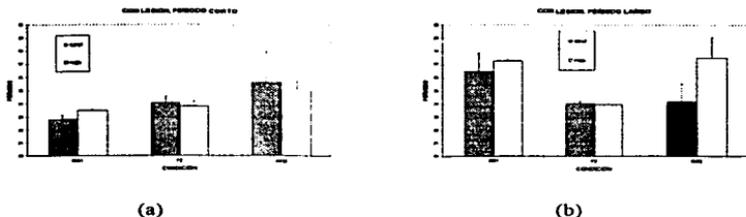


Figura 11.

Cambios en el periodo del ritmo de actividad locomotora en oscilación espontánea de acociles con lesión en R-Lg. En (a) se presentan los casos con un valor inicial de periodo promedio menor a 24 hs y en (b) mayor a 24 hs. Las barras claras representan los casos en FE con luz roja y las oscuras en FE con luz azul.

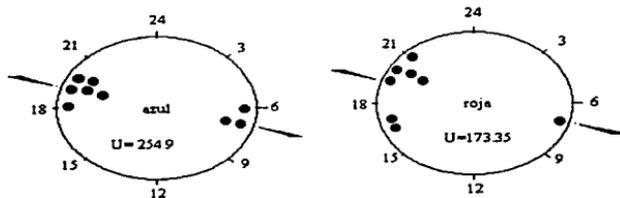


Figura 12.

Fases estimadas del RALM durante el FE en acociles con lesión en R-LG. Se aprecia que con luz azul la respuesta es bimodal y que con roja es mas clara la tendencia al pulso de las 19:00 hs.

Grupo III. Ritmo de actividad locomotora en acociles con lesión a nivel de R-Lg y ablación de los conectivos entre el V y VI ganglio abdominal

La ablación de la retina y de los conectivos correspondientes no modifica la capacidad de expresión del ritmo de actividad locomotora durante la condición de oscuridad constante. El periodo del ritmo en oscilación espontánea es variable y frecuentemente mayor de 24 hs ($\tau = 26.28 \pm 1.8$ hs).

Fotoperiodo esqueleto con luz monocromática azul

En la figura 13 se muestra un actograma del RALM obtenido de un acocil juvenil, que durante los primeros 9 días estuvo en oscuridad constante. El periodograma correspondiente muestra tres picos entre las 24 y la 27.5 hs, la tendencia general de la fase esta señalada con la línea de regresión ($\tau = 26.55$ hs), el análisis espectral para esta condición presentó valores de 20.6 y 29.52 hs. Desde el día 10 al 19 el ritmo presenta de manera más clara dos componentes, uno de los cuales se sincroniza al pulso de las 19:00 hs y otro componente del ritmo se mantiene en oscilación espontánea. El periodograma muestra para esta condición dos picos en 24.2 y 29.0 hs. La línea de regresión representa un periodo de $\tau = 24.23$ hs. En este grupo experimental no se aprecia el pico exógeno característico de los animales intactos. En este registro, el primer pulso cae aproximadamente en TC 11 y mediante retrasos se sincroniza al FE a través de 2 ciclos transitorios. El periodograma muestra además tres picos ultradianos de baja amplitud que pueden estar relacionados con los episodios de alta frecuencia que aparecen durante los últimos días en FE, el análisis espectral presentó como periodos relevantes de 29.52 y 7.94 hs. Durante la condición final en oscuridad constante, la amplitud de la actividad disminuye, la tendencia del ritmo no es clara y

el periodograma muestra dos picos de 24.5 y 27 hs respectivamente; la línea de regresión representa un periodo de 27.1 hs.

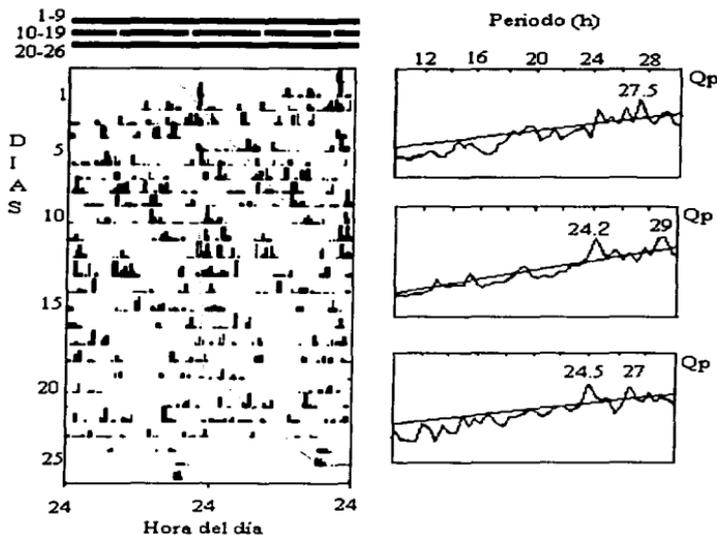


Figura 13.

Actograma de doble gráfica que muestra el RALM de un acicil juvenil sin retina ni conexión al sexto ganglio abdominal. Durante el FE con luz azul se ve que parte de la actividad se sincroniza al pulso de las 19:00 hs y otra parte parece continuar con el periodo inicial de oscilación.

Fotoperiodo esqueleto con luz roja

La figura 14 muestra un actograma representativo de un acocil juvenil que durante los primeros 10 días en oscuridad constante presenta actividad dispersa, la línea de regresión considera los picos de máxima actividad asociados a bloques de larga duración ($\tau = 26.42$ hs). El periodograma muestra un periodo de 25.6 hs.

En FE con luz roja, la actividad locomotora se fracciona en un grupo que sincroniza al pulso de las 07:00 ($\tau = 24.2$), mientras que otro grupo se mantiene en oscilación espontánea con un periodo de 26 hs; la línea de regresión muestra un periodo de 24.17 hs, el periodograma muestra además un pico ultradiano de 13 hs. Esta tendencia es más clara que la observada en animales sometidos a luz azul.

Durante la condición final desde el día 26 al 35, los periodos de los componentes circadianos cambian respecto a la condición inicial. El periodograma muestra picos de 24.6, 25.4 y 26.2 hs, lo que posiblemente representa un post-efecto. La línea de regresión trazada en el diagrama representa un periodo de 24.6 hs.

El análisis espectral mostró para la condición inicial un periodo de 25.8 hs además de uno de 13.7 hs, durante el FE presentó periodos de 24.67 y 10.46 hs y en la condición final en oscuridad constante, un periodo de 24.91 hs.

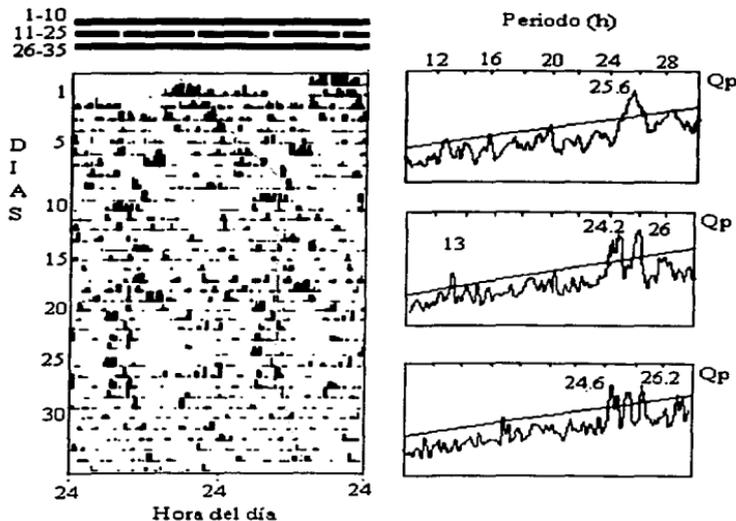


Figura 14.

Actograma del RALM presentado por un acocil sin retina y con ablación en los conectivos al sexto ganglio. El FE con luz roja, permite la expresión de un pico de actividad que sincroniza al pulso de las 07:00 hs mientras que otro continúa oscilando libremente.

De los 20 animales de este grupo, 12 fueron registrados bajo FE con luz roja y 8 bajo FE con luz azul. Al compararlo con los dos grupos anteriores, la capacidad de sincronización en este grupo es menor (58.3 y 62.5 % respectivamente). En algunos registros, a pesar de que el ritmo en OO es unimodal, durante el FE el ritmo se fracciona en diversos componentes con periodos variables, es posible observar al menos un pico de actividad se sincroniza al fotoperiodo, pero que otros componentes mantienen un periodo de oscilación diferente a 24 hs.

La tabla 3, muestra las principales características de los registros observados en este grupo experimental.

En la Figura 15a se muestra el promedio del valor del periodo de los ritmos que mostraron sincronización al FE, las barras que representan la desviación estándar en cada caso muestran la variabilidad del ritmo y no hay diferencias significativas en el periodo posterior al FE ($p= 0.7$ y $p= 0.8$). La Figura 15b indica el periodo promedio en los animales que no sincronizaron. En estos casos se observó que a pesar de no sincronizar a 24 hs, el FE provocó cierto cambio en el periodo del ritmo. Ninguno de los casos de esta figura mostraron diferencias significativas entre el periodo previo y el posterior al FE.

La figura 16 muestra la distribución de la fase de aquellos animales que sincronizaron al FE. El número de casos es bajo por lo que ambos tratamientos se agrupan en la misma gráfica. No existen tendencias significativas por las fases presentadas tanto en el tratamiento con luz roja (círculos rellenos) como en el de luz azul (círculos vacíos), $U=128.87$ y $U=136.58$ respectivamente.

Tabla 3.

	Respuesta al FE	τ en OO1 (n)	τ en FE	τ fraccionados (n)	Transitorio a FE	τ en OO2
FE azul, n= 8	Sincroniza	26.35 \pm 2.15 (5)	24.24 \pm 0.43	28.0 (1)	4.8 \pm 1.6	24.85 \pm 1.64
	No sincroniza	28.33 \pm 0.67 (3)	26.13 \pm 0.70	-----	-----	26.5
FE roja n=12	Sincroniza	24.7 \pm 1.61 (7)	24.12 \pm 0.28	26.77 \pm 1.23 (4)	3.2 \pm 1.4	24.17 \pm 2.3
	No sincroniza	25.96 \pm 0.71 (5)	25.48 \pm 2.33	-----	-----	24.15 \pm 1.21

Variación en los periodos observados en los acociles del grupo III, sin R-Lg ni conectivos al 6º ganglio abdominal. La columna referente a "fraccionados", representa aquellos periodos significativos que aparecen además del correspondiente a 24 horas, lo que implica componentes de actividad locomotora que no sincronizaron al FE.

De los resultados obtenidos en este grupo, se considera que tanto la retina y la lámina ganglionaris así como el fotorreceptor caudal juegan un papel sino exclusivo, si importante en la sincronización del ritmo de actividad locomotora. A pesar de que en ambos tratamientos con luz monocromática se presentaron pocos casos de sincronización, no parecen existir diferencias entre el efecto de la luz monocromática azul y roja aplicadas mediante FE.

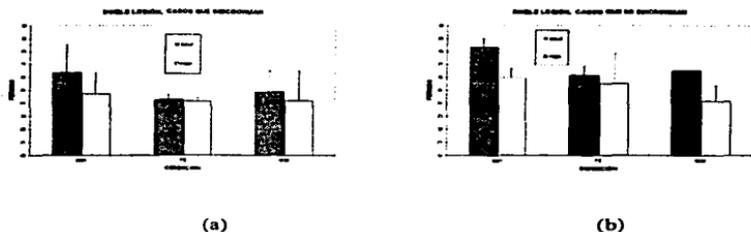


Figura 15.

Promedio del periodo observado en los animales con lesión en retina y en lámina ganglionaris, así como en los conectivos al 6° ganglio abdominal. En (a) están los casos en que se observa sincronización de la actividad locomotora al FE y en (b) de aquellos que no sincronizaron. Las barras oscuras representa los casos en FE azul y las claras en FE rojo.

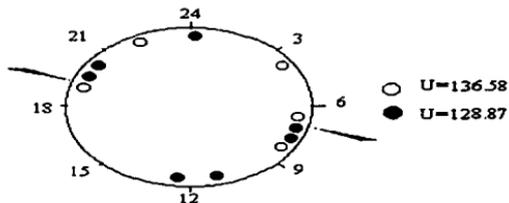


Figura 16.

Distribución de la fase del ritmo durante FE en animales con lesión R-LG y conectivos al 6° ganglio. Los círculos rellenos representan la fase obtenida en la sincronización a luz roja y los vacíos a la obtenida con luz azul.

Grupo IV. Ritmo de actividad locomotora de acociles con lesión en ganglio cerebroide.

Para este grupo experimental se lesionaron 24 animales de los cuales solo 18 mostraron un ritmo circadiano significativo (64.3%, $\tau = 24.7 \pm 1.78$ hs). De estos animales solamente 9 lograron la sincronización al FE ($\tau = 24.0 \pm 0.21$ hs). El resto, presentó periodos variables durante la condición de FE ($\tau = 25.94 \pm 2.28$ hs).

Los 9 animales lesionados que mostraron ritmo y sincronizaron al FE, presentaron un patrón de actividad locomotora semejante al de los animales intactos. El control histológico mostro que en los animales que presentó esta expresión del ritmo, la lesión no alcanzó al ganglio cerebroide y las estructuras afectadas corresponden a la glándula subantenal. En la figura 17a se presenta una micrografia correspondiente al control histológico de este caso. De todos los casos analizados para este subgrupo el registro histológico no se completó, sin embargo, de los casos en que hubo ritmo y sincronizó al FE, se observó que la histología correspondiente (n= 3) no hubo lesión en el ganglio cerebroide.

La figura 17b muestra el actograma representativo de un acocil lesionado en forma ineficiente, el cual muestra un ritmo en oscilación espontánea con un periodo de 23.4 hs. Es notable que a comparación de los registros de los animales intactos, el nivel de actividad de baja amplitud se distribuye a lo largo de todo el ciclo. Después del día 10 es sometido a condiciones de fotoperiodo esqueleto con luz roja y se observa un decremento general en los niveles de actividad, manifestándose dos grupos, uno de los cuales es simultáneo al pulso de las 07:00 hs y el otro muy cercano al pulso de las 19 hs. El periodograma correspondiente muestra dos picos claros de 12 y 24 hs. Finalmente en la oscuridad constante a partir del día 21, el ritmo gradualmente pierde amplitud, el periodo de actividad no es claro sin embargo

parte de la fase corresponde al pulso de las 19:00 hs, por lo que no se considera como enmascaramiento. El periodograma para la condición final en OO2 no fue significativo.

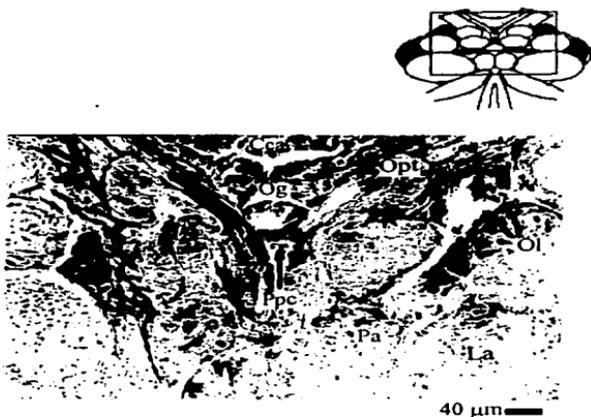


Figura 17a

Fotomicrografía de un corte de ganglio cerebroides en el que la lesión no fue exitosa. Tracto olfatorio-globular (Og), Lóbulo paraolfatorio (Pa), Lóbulo accesorio (La), Cúmulo celular anterior (Cca) Neurópilo óptico (Opt) Neurópilo olfatorio (Ol). El recuadro incluido en la figura superior derecha muestra el área que incluye la fotografía respecto al todo el ganglio.

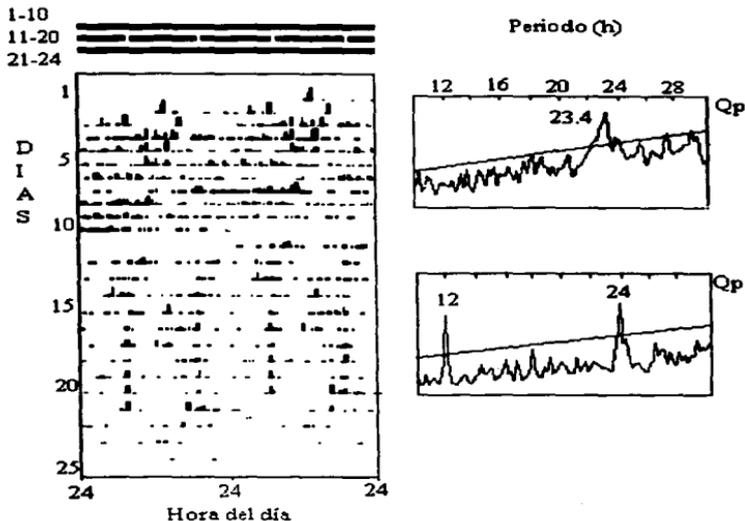


Figura 17b.

Actograma de un acicil juvenil, en el cual la lesión no alcanzó el ganglio supraesofágico. Las características del ritmo son semejantes a las observadas en los animales intactos, ya que durante el FE, en este caso con luz roja, la actividad es bimodal y el pico exógeno es claro.

De estos 9 animales, 5 animales se registraron bajo FE rojo y 4 bajo FE con luz azul. La tabla 4, resume la variabilidad en los periodos observados en este grupo experimental.

Tabla 4.

	Tipo de luz en FE	τ en OO1	τ en FE	τ en OO2
Casos con ritmo y sincronizan a FE (n=9)	FE con luz roja n=5	23.7 ± 0.96	23.94 ± 0.14	25.5 ± 1.4 (n=3)
	FE con luz azul n=4	25.3 ± 0.7	24.07 ± 0.2	

Periodo promedio obtenido en los acociles del grupo IV que mostraron ritmo circadiano de actividad locomotora en OO1 y en el que el control histológico mostró una lesión falsa.

Como muestra la tabla, únicamente 3 de estos animales fueron capaces de ser registrados durante todo el experimento y durante la condición final se obtuvo el periodo de ($\tau = 25.5 \pm 1.4$ hs) ya que el resto, o bien mostró falta de actividad o no sobrevivieron al registro completo (figura 19a).

La fase del ritmo durante la sincronización se muestra en la figura 20. En ninguno de los tratamientos con luz monocromática se observó una tendencia unimodal o bimodal significativa ($U=31.2$ con FE roja y $U= 30$ con FE azul).

Un segundo subgrupo esta conformado por animales que presentaron ritmo en oscilación espontánea, pero que no sincronizaron al FE. De este subgrupo solamente se pudieron observar dos en cotroles histológico, en los cuales la lesión se presentó en en la región posterior del protocerebro, al nivel del cuerpo central como se muestra en la micrografía 18a.

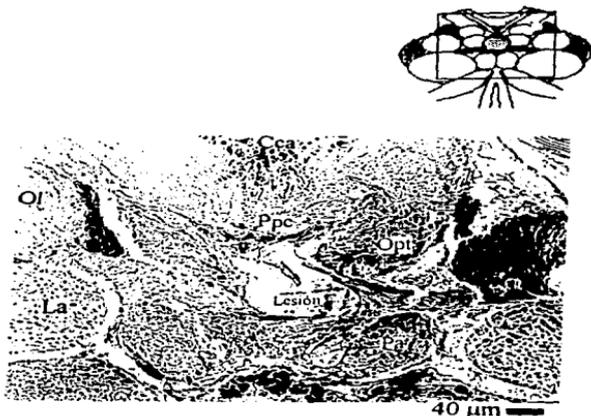


Figura 18a

Fotomicrografía de un corte de longitudinal de un ganglio cerebroide en el que la lesión se ubica en la región posterior del protocerebro. Cuerpo central (Cc), Lóbulo olfatorio (Ol) Lóbulo paraolfatorio (Pa), Lóbulo accesorio (La), Puente protocerebral (Ppc). El recuadro incluido en la figura muestra el área que incluye la fotografía respecto al todo el ganglio y el círculo gris, el área aproximada de lesión.

El actograma de la figura 18b es un registro típico del grupo de animales que mostraron ritmo circadiano en condiciones constantes de oscuridad y que no sincronizaron al FE (n = 9). En oscuridad constante inicial muestra un ritmo circadiano de 21.0 hs, el cual está definido claramente a partir del quinto día de registro, durante el FE con luz roja a partir del día 10, el ritmo cambia su periodo a 26 horas y la actividad se fragmenta en bloques de mayor amplitud, el periodograma correspondiente muestra que, además del valor circadiano mencionado, hay un pico a las 18 hs. El análisis espectral presentó un pico a las 15.5 hs. Finalmente durante la condición de oscuridad constante a partir del día 20, aumenta la amplitud de la actividad. El periodograma correspondiente muestra picos de 15, 20 y 28 hs. La tabla 5 muestra los resultados para este subgrupo de animales.

Tabla 5.

	Tipo de luz en FE	τ en OO1	τ en FE	τ en OO2
Casos con ritmo y no sincronizan a FE	FE con luz roja n=4	24.57 ± 2.65	25.28 ± 1.67	26.2 n=2
	FE con luz azul n=5	25.28 ± 1.67	25.9 ± 2.5	25.8 n=2

La variabilidad en el periodo obtenido en los animales que presentaron ritmo en oscilación espontánea pero que no fue clara la sincronización en FE.

Durante la condición final solo cuatro animales mostraron un ritmo circadiano ($\tau = 26.2 \pm 0.8$, Figura 21b) el resto de animales no mostraron ritmo significativo o no completaron el registro.

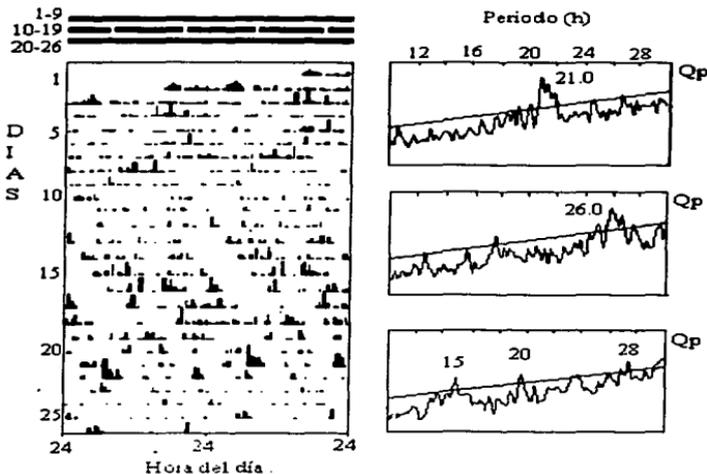


Figura 18.

Actograma del RALM de un animal con lesión en la región media del ganglio supraesofágico. Se presenta un ritmo de periodo corto ($\tau = 21$ hs) y durante el FE con luz roja, el ritmo cambia su periodo a 26 hs sin poder sincronizarse.

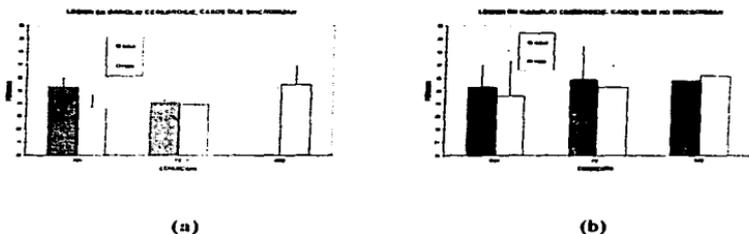


Figura 19.

Cambios en el periodo previo y posterior al FE en animales que sincronizaron (a) y en los que no hubo sincronización (b).

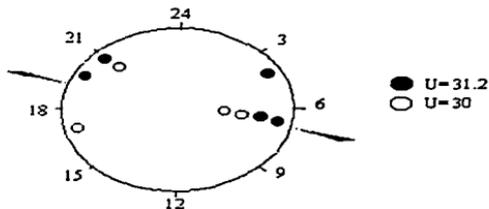


Figura 20.

Distribución de las fases en los animales que sincronizaron al FE. Los círculos rellenos representan los sometidos a FE con luz roja y los círculos vacíos a los sometidos con luz azul.

Un tercer subgrupo esta formado por animales que no mostraron un patrón locomotor circadiano, pues la actividad locomotora se manifiesta en episodios ultradianos, debido a lo cual el análisis estadístico se hizo a 5 a 30 horas. Sin embargo solamente en uno de los cinco registros se pudo obtener el control histológico.

La fotomicrografía de la figura 21a muestra este caso, donde se puede observar que la lesión se encuentra en el borde anterior del protocerebro posterior, entre los neurópilos ópticos y eliminando la región del puente protocerebral. Se nota claramente que las estructuras del cuerpo central están completas así como los neurópilos olfatorio y accesorio.

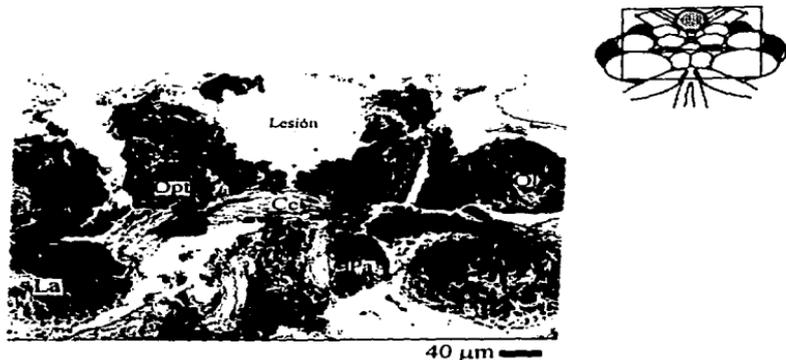


Figura 21a

Fotomicrografía de un corte de ganglio cerebroide en el que la lesión se presenta en la región anterior del protocerebro. Neurópilo óptico (Opt), Lóbulo olfatorio (Ol), Cuerpo central (Cc), Lóbulo paraolfatorio (Pa), Lóbulo accesorio (La). El recuadro incluido en la figura muestra el área que incluye la fotografía respecto al todo el ganglio, y el círculo gris, el área aproximada de lesión.

El actograma correspondiente se muestra en la figura 21b, presenta ausencia de actividad circadiana en OO1 y la amplitud de la actividad es variable. El periodo no es claro y el periodograma presenta varios picos entre las 18 y las 29 hs.

Durante la condición de FE con luz azul se observa que aparece un ritmo que se fragmenta en varios componentes. Dos de los bloques de actividad de alta frecuencia son sincronizados por los dos pulsos de luz; se observa además que en el periodograma aparecen con claridad picos múltiples de 6. Este valor de periodo es constante incluso en análisis espectral mostrado en la parte inferior del actograma. Se presenta de izquierda a derecha para OO1, FE y OO2.

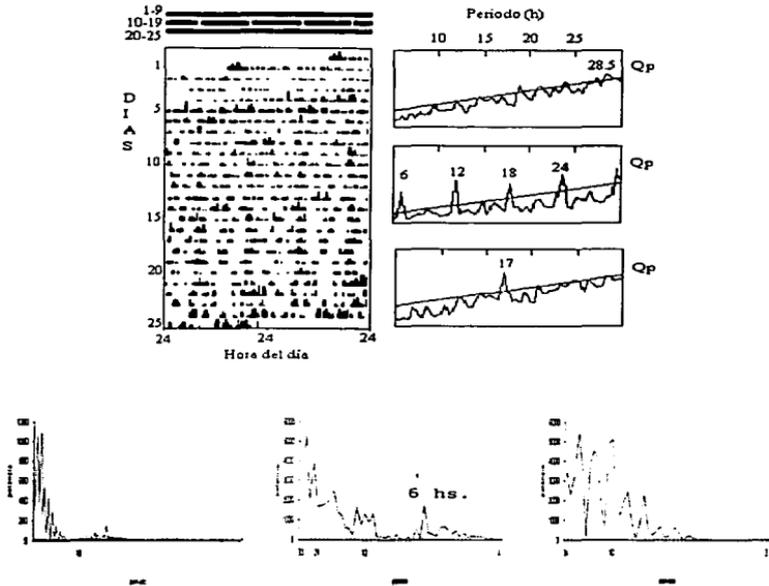


Figura 21.

Actograma de un acocil juvenil con lesión en la región medial del protocerebro. Se observa que no hay un ritmo circadiano manifiesto en oscilación espontánea y que durante el FE con luz azul, aparece actividad ultradiana con periodo de 6 hs. El análisis espectral correspondiente (b) confirma este periodo. Finalmente en OO2, la actividad presenta un periodo de 17 hs.

VI. DISCUSIÓN

El ritmo de actividad locomotora en el acocil juvenil *Procambarus clarkii* muestra el patrón típico descrito para animales de la misma especie en diferentes etapas del desarrollo (Fanjul-Moles y col, 1996). En esta tesis, la edad de los animales en todos los experimentos fue entre 8 y 12 semanas. En este intervalo de edad la proporción de animales que muestran ritmo de manera espontánea es mayor al 80 % (Miranda-Anaya, 1994).

Los resultados demostraron que el ritmo locomotor en condiciones de oscilación espontánea presenta un periodo variable ($\tau=23.69 \pm 2.5$ hs). Se ha descrito que en el acocil adulto, el periodo del ritmo presenta valores de $\tau < 24$ hs (Chaple, 1960; Page y Larimer, 1972) y característico de las especies nocturnas (Aschoff, 1981). El acocil muestra cambios importantes en las características del ritmo de actividad locomotora durante la ontogenia, parte de esto es el cambio en el periodo de $\tau= 25 \pm 2.13$ hs en animales de las primeras cuatro semanas hasta $\tau=24.3 \pm 1.7$ hs en animales de 20 semanas de edad (Fanjul-Moles et al, 1996).

La variación inter individual de τ en organismos de la misma especie ha sido reportada en diversos animales y esto parece ser una característica común en el estudio de los ritmos en oscilación espontánea (Pittendrigh y Daan, 1976 a y b). En el caso del acocil juvenil, la variabilidad del periodo puede ser consecuencia de la maduración y acoplamiento con las vías eefectoras que permiten la expresión del ritmo (Fanjul-Moles et al, 1996) como ocurre en otros invertebrados (Page, 1990).

El ritmo de actividad locomotora en el acocil juvenil íntegro puede ser sincronizado mediante un fotoperiodo esqueleto simétrico que simula un fotoperiodo completo 12:12.

La sincronización discreta produce cambios de fase simultáneos del marcapaso, los cuales se expresan como avances o retrasos hasta lograr la sincronización del ritmo. El marcapaso se estabiliza en una fase con relación al fotoperiodo esqueleto, de tal manera que el avance producido por un pulso de luz es compensado por un retraso de fase producido por el otro pulso (Pittendrigh y Minis, 1964; Pittendrigh y Daan, 1976 b y c).

Al aplicar el FE con luz azul o roja en animales intactos (grupo I), el ritmo de actividad locomotora muestra un carácter bimodal. Los componentes de actividad observados corresponden a uno de corta duración y baja amplitud que aparece de manera simultánea a uno de los pulsos de luz y el segundo de mayor duración y amplitud que en general se sincroniza con el siguiente pulso. El componente de actividad simultáneo al pulso de luz, es similar al componente descrito por otros autores para el acocil adulto bajo condiciones de fotoperiodo completo y es definido como una respuesta exógena al encendido de la luz (Chaple, 1960, Page y Larimer, 1972, 1976). En esta tesis se observó que en animales sin lesiones, el componente exógeno esta presente en la sincronización del ritmo de actividad locomotora al fotoperiodo esqueleto, tanto con luz monocromática roja como con azul; sin embargo es más claro observarlo con pulsos de luz roja (figura 5). La manera de comprobar que el componente simultáneo al pulso de luz es de naturaleza exógena es mediante la eliminación de las vías retinianas. La ablación de la retina y de la lámina ganglionaris en acociles juveniles, evita la expresión del componente simultáneo al encendido de la luz, lo que hace suponer que es el mismo que se ha descrito en el adulto; después de la lesión, el componente endógeno que caracteriza al ritmo en oscilación espontánea, se mantiene y es el que manifiesta la respuesta de sincronización.

Los resultados de este trabajo indican que los cambios de fase que resultan en adelantos o retrasos en el ritmo, están relacionados las características de la curva de respuesta de fase correspondiente. De manera general se ha considerado que en animales nocturnos, la noche subjetiva (considerada en este trabajo como el intervalo entre TC 12 y TC 24) es la zona de mayor sensibilidad. Para una gran diversidad de animales nocturnos la sensibilidad en la noche subjetiva temprana provoca retrasos de fase mientras que en la noche subjetiva tardía provoca avances; durante el día subjetivo se muestra una mínima respuesta a la luz (Pittendrigh y Minnis, 1964; Pittendrigh y Daan 1976 b).

La figura 22a muestra la CRF del ritmo de actividad locomotora del acocil adulto en condiciones restringidas (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994). La curva ha sido modificada al TC usado en este trabajo y muestra una zona de avances en la noche subjetiva temprana, el resto del tiempo circadiano presenta variabilidad entre zonas de insensibilidad y zonas de retraso. Con base en esta curva y en los diferentes TC en que incidían cada uno de los pulsos de luz del FE en los animales intactos estudiados, se observó que para luz azul se producía sincronización mediante avances en la noche subjetiva tardía y día subjetivo temprano y mediante retrasos en el día subjetivo (figura 22b). La incidencia de pulsos de luz roja causó un ajuste del ritmo mediante avances en la noche subjetiva temprana y por retrasos en la noche subjetiva tardía (figura 22c). Al parecer, los cambios de fase observados con luz roja coinciden con las zonas de adelanto y retraso de la CRF del adulto, mientras que los obtenidos con luz azul presentan fundamentalmente adelantos. Lo anterior podría indicar una sensibilidad espectral diferencial para la luz monocromática azul, en donde una CRF obtenida sólo con pulsos de esta longitud de onda sería diferente a la reportada para el adulto con pulsos de luz blanca; sin embargo lo anterior requiere de más experimentos con un diseño diferente.

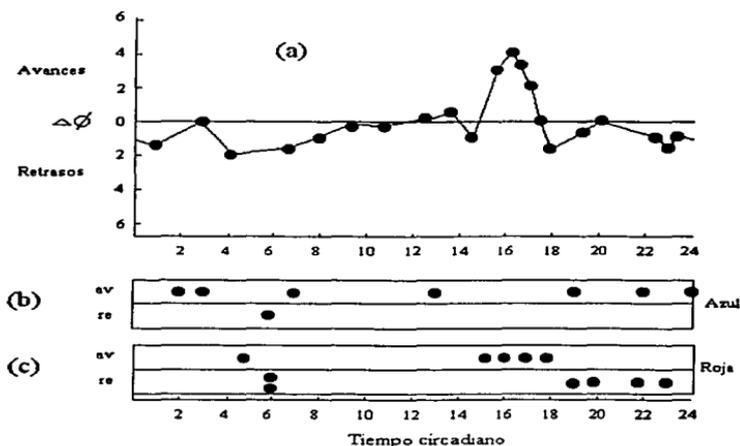


Figura 22.

Cambios de fase del ritmo locomotor en el acocil adulto bajo pulsos de luz blanca (a), modificado de Viccon-Pale y Fuentes Pardo, 1994. El ajuste al FE con luz monocromática en los animales juveniles sin lesión esta representado en (b) para luz azul y en (c) para luz roja.

La fase de máxima actividad en el ritmo de actividad locomotora durante la sincronización al FE en los acociles sin retina, al igual que en los acociles sin lesión, puede ubicarse en cualquiera de los dos pulsos que forman el FE. Lo anterior puede ser consecuencia por una parte de la cercanía de la fase con el pulso de luz y por otra parte por el tiempo circadiano que incide sobre ella. Sin embargo, bajo FE con luz azul, las fases del ritmo presentan menor dispersión que con luz roja respecto al pulso de las 19:00 (X^2 , $p < 0.05$), lo que parece indicar que la luz azul puede lograr un acoplamiento de fase más cercana a la señal sincronizadora cuando sólo hay entrada de luz vía fotorreceptores extrarretinianos. La inestabilidad de la fase en el RALM en los animales adultos sincronizados a un fotoperiodo completo también se observa después de eliminar la retina (Page y Larimer, 1975); por lo que esta estructura parece estar involucrada en el mantenimiento de la relación de fase con el sincronizador.

Los fotorreceptores extrarretinianos han sido descritos en una gran variedad de invertebrados (Wolken, 1988, Horne y Renninger, 1988; Hanna et al, 1988; Page 1982) y en vertebrados (Underwood y Groos, 1982; Foster y Menaker, 1993). Para el acocil *Procambarus clarkii* se han descrito fotorreceptores extrarretinianos en el sexto ganglio abdominal (Prosser, 1934; Wilkens, 1988) los cuales pueden funcionar como fotorreceptores circadianos, ya que mediante su estimulación con luz pueden producirse cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora así como en el de amplitud de electroretinograma (Bernal-Moreno et al, 1996; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo 1987, Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio 1987). Los diversos trabajos realizados en el estudio de los mecanismos de sincronización en el acocil indican que estos fotorreceptores son capaces de mediar la sincronización a un fotoperiodo completo en el acocil adulto; sin embargo en el acocil adulto la ablación de los conectivos al sexto ganglio abdominal no parece evitar la sincronización (Page y Larimer, 1975, 1976).

En algunos animales, la falta de retina y el corte de los conectivos al 6° ganglio abdominal no evita la sincronización al FE con luz monocromática; mientras que en otros acociles no se observa sincronización. Esta variación podría ser debida a grado de madurez y tamaño de los animales, ya que su crecimiento puede ser muy diferente a pesar de tener la misma edad. Se ha reportado que las características del ritmo así como su capacidad de sincronización son más claras conforme aumenta la edad de los acociles (Farjul et al, 1996).

Durante el fotoperiodo esqueleto se observa que un componente del ritmo sincroniza mientras que otro oscila libremente (figura 13 y 14). La capacidad de sincronización en estos animales indica que otras vías extrarretinianas estén involucradas en este mecanismo. Se ha propuesto que para el acocil adulto, los fotorreceptores extrarretinianos en el ganglio supraesofágico pueden mediar la sincronización en ausencia de retina y de conectivos al fotorreceptor caudal (Page y Larimer, 1976). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos autores. Este tipo de fotorreceptores han sido descritos detalladamente en el acocil australiano *Cherax destructor*, (Sandeman y col 1990), sin embargo no existen reportes semejantes para el acocil *Procambarus clarkii*.

La capacidad de sincronización de un ritmo esta en función a la magnitud de los cambios de fase producidos por la luz y en el caso de invertebrados como el xiphosuro *Limulus polyphemus* y en el escorpión *Androctonus australis*, la estimulación de diferentes fotorreceptores causa cambios de fase de diferente magnitud en el ritmo de amplitud del ERG (Horne y Renninger, 1988; Hanna et al, 1988; Fleissner, 1977). En el caso del RALM en el acocil *P. clarkii*, la capacidad de sincronización podría estar en función de la cantidad de vías fotorreceptoras circadianas, tanto retinianas como extrarretinianas que inciden sobre el marcapaso, sin embargo se requiere de un diseño experimental diferente para comprobarlo.

En animales invertebrados y vertebrados, el sistema circadiano puede ser descrito de mejor manera si se consideran dos o más osciladores auto sostenidos (Pittendrigh, 1960; Moore-Ede et al, 1982). En el caso de los mamíferos, la evidencia de los osciladores que controlan el ritmo de actividad locomotora se observa durante la partición del ritmo ("splitting") el cual se presenta cuando existe un cambio en la iluminación de un régimen de luz constante, así como también en algunas lesiones del núcleo supraquiasmático (Moore-Ede et al, 1982). En el caso del ritmo locomotor del acocil sin retina ni comunicación neural con el sexto ganglio abdominal, la presencia de dos grupos de actividad con periodos diferentes; sugiere que la expresión del ritmo es consecuencia de un sistema multioscillatorio con desacoplamiento interno. Este fenómeno no se relaciona con el de splitting ya que no se observaron estados meta estables, posiblemente por que el tiempo de registro durante FE no fue suficientemente largo para alcanzar a manifestar el fenómeno.

Se ha discutido la ubicación del o los osciladores responsables de la generación del ritmo de actividad locomotora. Por una parte Page y Larimer (1976) han propuesto que el marcapaso que controla el RALM se ubica en el ganglio cerebroide. Por otra parte Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981) proponen que el ganglio cerebroide no es necesario para la expresión de los ritmos locomotor y ERG, y que esta estructura neural solo les permite un acoplamiento de fase.

Diversos estudios señalan que tanto el ritmo ERG como el RALM son generados y regulados por estructuras de los pedúnculos oculares y el ganglio cerebroide (Barrera-Mera, 1976; Larimer y Smith, 1980). En este trabajo se presenta un caso en el que al lesionar el área del protocerebro donde se encuentran terminaciones de axones procedentes de los fotorreceptores extrarretinianos cerebrales para el acocil *Cherax* (Sandeman y col, 1990) desaparece el RALM y la

presencia de ritmos ultradianos durante el FE con luz monocromática indica que las estructuras responsables de la generación circadiana de la actividad se han lesionado o bien estructuras intermedias involucradas en su expresión, pero no así aquellas estructuras neurales que son necesarias para la expresión de una actividad ultradiana. Sin embargo se requiere más experimentos con animales lesionados en la región anterior del protocerebro para confirmar esta observación. Un fenómeno semejante ha sido descrito por Gekkerma et al (1990) en el roedor *Microtus arvalis*, en el que la lesión del Núcleo Supraquiasmático evita la expresión circadiana pero no elimina al ritmo ultradiano de actividad locomotora.

Lo anterior nos lleva a proponer por una parte que el RALM en el acocil juvenil, podría ser consecuencia de un sistema múltiple de osciladores acoplados y ubicados en el ganglio cerebroide; entre los cuales se encontraría la capacidad de generar ritmos ultradianos. Las estructuras fotorreceptoras, tanto retinianas como extrarretinianas requieren de las estructuras involucradas en el área media protocerebral para manifestar de manera clara la sincronización al fotoperiodo esqueleto y que la luz monocromática puede ser un mecanismo que facilite la sincronización, sin embargo este es un campo que debe explorarse con nuevos experimentos.

Un posible modelo del control circadiano de actividad locomotora en el acocil se muestra en la figura 23, y comprende al menos un par de osciladores en el ganglio cerebroide (posiblemente ubicados en protocerebro) acoplados entre sí y al menos tres vías de fotorrecepción circadiana. La respuesta locomotora del acocil es compleja y diversos factores independientes del oscilador pueden modificar la actividad locomotora. Los elementos neuroendócrinos de los pedúnculos oculares pueden afectar directamente la expresión de la locomoción, como la respuesta al encendido de la luz en un protocolo de fotoperiodo completo (Page y Larimer,

1967; Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997). El fotorreceptor extrarretiniano posiblemente ubicado en protocerebro podría presentar dos tipos de fotorreceptores circadianos con sensibilidad espectral diferencial, los cuales influyen en la sincronización dependiendo del tipo de luz reciben. Finalmente el fotorreceptor caudal puede influir sobre el reflejo de escape mediante la retracción del pleón (Wilkens, 1988; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997) y cambios de fase mediante pulsos de luz únicamente en el sexto ganglio abdominal (Fuentes-Pardo e Inclán Rubio, 1987).

La luz monocromática de λ corta y de λ larga, pueden ser muy importantes como señales de sincronización si consideramos que estas tienen una fuerte variación durante el amanecer y el atardecer (Nuboer et al, 1983; Smith, 1982), y que durante la aurora y el ocaso diversos osciladores con sensibilidad espectral diferencial permitan un mecanismo de sincronización así como de plasticidad en los cambios de fotoperiodo que suceden a lo largo de las estaciones del año.

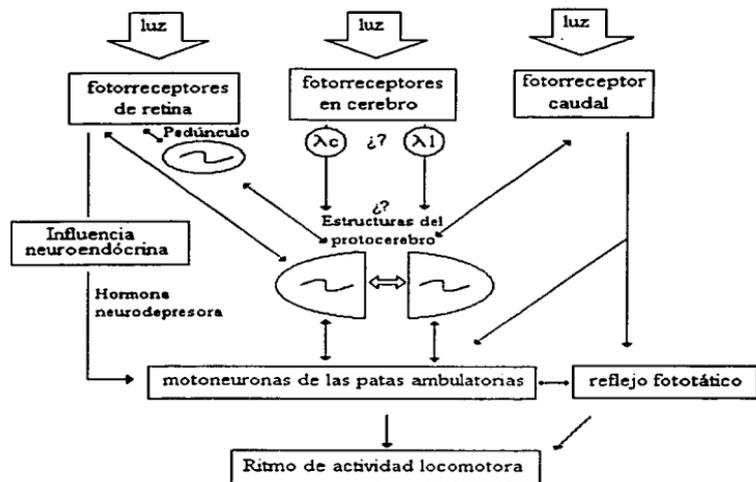


Figura 23.

Modelo de la posible integración de fotorrecepción circadiana en el ritmo de actividad locomotora en el acocil juvenil (ver texto).

VII. CONCLUSIONES

- El Ritmo circadiano de actividad locomotora en acociles juveniles intactos puede ser sincronizado mediante fotoperiodo esqueleto con luz monocromática de λ corta y λ larga.
 - La ausencia de las vías retinianas no evita la sincronización del RALM en acociles juveniles.
 - La luz monocromática de λ larga y de λ corta no parecen ejercer efectos diferenciales en la expresión del RALM como sucede en el ritmo ERG en el acocil juvenil *Procambarus clarkii*.
 - El RALM en el acocil juvenil puede ser consecuencia del acoplamiento de dos o más osciladores y es posible que entre estos exista diferente capacidad de respuesta a diferentes tipos de luz.
 - La sincronización mediante los fotorreceptores en el ganglio supraesofágico, propuestos por Page y Larimer (1976) pueden sincronizar solo a un componente del ritmo.
 - El ganglio cerebroide y en particular el protocerebro posterior parece ser la región en donde se integra las vías de control de la expresión circadiana de actividad locomotora.
-

VIII. REFERENCIAS

- Aréchiga, H. Fernández-Quiroz, F. Fernández de Miguel, F y Rodríguez Sosa, L. 1992. The circadian system of crustaceans (Review). *Chronobiol. Int.* 9(6):1-19.
- Aréchiga, H y Rodríguez-Sosa, L. (1977) Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 77, 17-29.
- Aschoff, J. 1981. Freerunning and entrained circadian rhythm. En: *Handbook of behavioral neurobiology*. J. Aschoff, Ed. vol 4. Plenum Press 81-92.
- Barrera-Mera, B. 1976. The effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm in crayfish. *Physiol. Behav.* 17: 59-64.
- Batchelet, E. 1981. Circular statistics in biology. N. Y. Acad. Press. 337 pp.
- Bernal-Moreno, J. A., Miranda-Anaya, M. y Fanjul-Moles, M. L. 1996. Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination. *Biol Rhythm Res.* 27(3) 299-301.
- Bruno, M. S. y Kennedy, D. 1962. Spectral sensitivity of photoreceptor neurons in the sixth ganglion of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 6:41-46.
- Chaple, W. D. 1960. Light on the movement of crayfish. Master thesis. Syracuse University.
- Daan, S. 1977. Tonic and phasic effects of light. *Ann. NY Acad. of Sci.* 290:51-59.
- Edwards, D. H. 1984. Crayfish extraretinal photoreception. I. Behavioral and motoneuron responses to abdominal illumination. *J. Exp. Biol.* 109:291-306.
- Fanjul-Moles, M. L., Prieto Sagredo, J. A y Fuentes-Pardo, B. 1991. Sinus gland regulates the spectral sensitivity in the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 98 A (2):317-322.
- Fanjul-Moles, M. L., Moreno Sáenz, E. Villalobos Hiriart, N y Fuentes-Pardo, B. 1987. ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A (2):213-219.
- Fanjul-Moles, M. L. Miranda-Anaya, M y Fuentes-Pardo, B. 1992. Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102A (1) 99-106.
- Fanjul-Moles, M. L. Miranda-Anaya, M. y Prieto, J. 1996. Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol Int.* 13: (1)15-26.

-
- Fanjul-Moles, M. L. y Fuentes-Pardo, B. 1988. Spectral sensitivity in the course of the ontogeny on the crayfish *P. clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A, (1) 61-66.
- Fleissner, G. 1977. Scorpion lateral eyes. Extremely sensitive receptors of zeitgeber stimuli. *J. Comp. Physiol.* 118: 101-108.
- Foster, R. G. y Menaker, M. 1993. Circadian photoreception in mammals and other vertebrates. En: *Light and biological rhythms in man*. Ed. Wetterberg, L. Werner Green International Series, 1993. Pergamon Press, N. Y. pp 73-91.
- Frank, K. D. y Zimmerman, W. F. 1969. Action spectra for the phase shifts of a circadian rhythm in *Drosophila*. *Science*. 163:688-689.
- Fuentes-Pardo, B. e Inclán-Rubio, V. 1981. Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman). *Comp. Biochem. Physiol.* 68A :477-485.
- Fuentes-Pardo, B e Inclán-Rubio, V. 1987. Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythm in crayfish. I Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem Physiol.* 86A (3): 523-527.
- Gekerna, M. P. Groos, G. A y Daan, S. 1990. Differential elimination of circadian and ultradian rhythmicity by hypothalamic lesions in the common vole, *Microtus arvalis*. *J. Biol Rhythms*. 5(2): 81-96.
- Goldsmith, T. H. y Fernández, H. R. 1968. Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*. 60: 156-175.
- Hanna, W. J. Horne, J. A y Renninger, J. H. 1988. Circadian Photoreceptor organs in *Limulus*. II. The telson. *J.Comp. Physiol* A, 162: 133-140.
- Hastings, J. W. 1987. Action spectrum for phase shifting in *Chlamydomonas*. *Photochem. Photobiol.* 46:86s.
- Hastings, J. W. Rusak, B. y Boulos Z. 1992. Circadian rhythms: The physiology of the biological timing. En: *Neural and integrative animal physiology*. C. L. Prosser, Ed. NY Wiley Press. p 435-546.
- Horne, J. A y Renninger, J. H. 1988. Circadian Photoreceptor organs in *Limulus*. I ventral medial and lateral eyes. *J.Comp. Physiol* A, 162: 127-132.
- Inclán-Rubio, V. 1991. Shifting phase on electroretinogram circadian rhythm induced by monochromatic light stimuli in crayfish *Procambarus bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol* A. 156:189-198.
-

-
- Inclán-Rubio V y Fuentes-Pardo, B. 1987. Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythm in crayfish. II Functional relationship between caudal and visual photoreceptors. *Comp. Biochem Physiol.* 86A(3):529-536.
- Joshi, D. y Chandrashekaran, M. K. 1985. Spectral sensitivity of the photoreceptors responsible for phase shifting the circadian rhythm of activity in the bat, *Hiposideros speoris*. *J. Comp. Physiol. A*, 156:189-198.
- Kavaliers, M. 1980. Retinal and extraretinal entrainment action spectra for the activity rhythms of the lake chub, *Coxesius plumbeus*. *Behav. and neural biol.* 30: 56-67.
- Larimer, J.L. y Smith, J. T. F. 1980. Circadian rhythm on retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* 136:313-326.
- Marques, M. D. y Waterhouse, J. M. 1994. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiol Int.* 11(3) 146-155.
- Miranda-Anaya, M. 1994. Estudio ontogénico de la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora en el acocil *Procambarus clarkii*. Tesis de grado, Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miranda-Anaya, M y Fanjul-Moles, M. L. 1997. Non parametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiol Int.* 14 (1): 25-34.
- Moore-Ede, M. C. Sulzman, M. F. y Fuller, Ch. A. 1982. The clocks that timing us. *Physiology of circadian timing system.* Harvard Univ. Press. Cambridge 448 pp.
- Mote, M. I. y Black, K. R. 1981. Action spectrum and threshold sensitivity of entrainment of circadian running activity in the cockroach *Periplaneta americana*. *Photochem. Photobiol.* 34:257-265.
- Nuboer, J. F. W., van Nuys W. M. y Steenbergen, J.C. 1983. Colour changes in a light regimen as synchronizers of circadian activity. *J. Comp. Physiol.* 6:41-46.
- Page, T. L. 1982. Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. *Experientia* 38: 1007-1013
- Page, T. L. 1989. Masking in invertebrates. *Chronobiol Int.* 6(1) 3-11.
- Page, T. L. 1990. Circadian rhythms of locomotor activity in cockroach nymphs: free running and entrainment. *J. Biol. Rhythms* 5(4) 273-289.
- Page, T. L. y Larimer, J. L. 1972. Entrainment of the locomotor activity rhythm in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 78: 107-120.
-

-
- Page, T. L. y Larimer, J. L. 1975. Neural control of circadian rhythmicity in crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:59-80.
- Page, T. L. y Larimer, J. L.: 1976. Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.* 23:245-251.
- Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of the living systems. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:159-182.
- Pittendrigh C. S. 1981. Circadian systems: entrainment. En *Handbook of behavioral Neurobiology.* J. Aschoff ed. vol 4: 95-124.
- Pittendrigh, C. S. 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock watcher. *Ann. Rev. Physiol.* 55:17-54.
- Pittendrigh, C. S. y Daan, S. 1976 a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.* 106:223-252.
- Pittendrigh, C. S. y Daan, S. 1976 b. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment. Pacemaker as a clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291-331.
- Pittendrigh, C. S. y Daan, S. 1976 c. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of the Phase Response Curve. *J. Comp. Physiol.* 106 256-266.
- Pittendrigh, C. S. y Daan, S. 1976d. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure, a clock for all seasons. *J. Comp. Physiol.* 106 333-355.
- Pittendrigh, C. S. y Minis, D. H. 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks *Am. Nat.* 98:261-294.
- Prosser, C. L. 1934. Action potentials in the nervous system of the crayfish. *J. Cell comp. physiol.* 4(4):363-377.
- Rietveld, W. J., Minors, D. S. y Waterhouse, J.M. 1993. Circadian rhythms and masking: An overview. *Cronobiol. Int.* 10(4) 306-312.
- Roenneberg, T. 1995. The effects of light on the *Gonyaulax* circadian system. *Ciba Found. Symp.* 183 *Circadian rhythms and their adjustment.* Wiley press, N. Y. 108-133.
- Sandeman, D. C.; Sandeman, R. E. y Aiken, A. R. 1988. Serotonin containing neurons in crayfish brain. *J. Comp. Neurol.* 269:465-478.
- Sandeman, D. C., Sandeman, R. E. y H. G. de Couet. 1990. Extraretinal photoreceptors in the brain of crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21(4) 619-629.
-

-
- Smith, H. 1982. Light quality, Photoreception, and plant strategy. *Ann Rev. Plant. Physiol.* 33:481-518.
- Sokolove, P. G. Bushell, W. N. 1978. The chi-square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythm. *J. Theor. Biol.* 72:131-160.
- Suzuki, T. Airakawa, K. y Eguchi, E. 1985. Effects of light and temperature on the rodopsins-porphyrpsin visual system of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Zool. Sci.* 2:455-461.
- Swade, R. H. Tonic effects of light and parametric entrainment. *J. Theor. Biol.* 22y-239. 1969.
- Underwood, H. y Groos, G. 1982. Vertebrate circadian rhythms: Retinal and extraretinal photoreception. *Experientia.* 38: 1013-1021.
- Viccon-Pale, J. A. y Fuentes-Pardo, B. 1994. Synchronization by light of the circadian rhythm of motor activity in the crayfish. *Biol. Rhythm Res.* 25(3)267-276.
- Wald, G. 1967. Visual pigments in crayfish. *Nature.* 215:1131-1133.
- Weber, R. 1979. The circadian system of man. Results of experiments under temporal isolation, Berlin Springer verlag.
- Wilkens, L. A. y Larimer, J. L. 1976. Photosensitivity in the sixth abdominal ganglion of decapod crustaceans: a comparative study. *J. Comp. Physiol* 106: 69-75.
- Wilkens, L. A. 1988. The crayfish caudal photoreceptor: advances and questions after the first half century. *Comp. Biochem Physiol.* 91C (1) 61-68.
- Wolken, J. J. 1988. Photobehavior of marine invertebrates: Extraocular photoreception. *Comp. Biochem. Physiol* 91C (1):145-149.
- Yagi K. L. y Loher, W. 1986. Circadian locomotor rhythm and the influence of moulting in australian field cricket nymphs. *Physiol Entomol* 11:97-105.
-

ANEXO

Publicación de los resultados correspondientes a los grupos Y y II.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

NONPARAMETRIC EFFECTS OF MONOCHROMATIC LIGHT ON THE ACTIVITY RHYTHM OF JUVENILE CRAYFISH

Manuel Miranda-Anaya and María Luisa Fanjul-Moles*
L. Neurofisiología Comparada, Ap. Postal 70-371, Coyoacán,
C. P. 04510, D. F. Mexico

ABSTRACT

The current study was carried out to test the influence of blue and red monochromatic light upon the motor activity rhythm of juvenile crayfish as well as determine whether this effect involves extraretinal photoreception. Two groups of 46 juvenile instars were used: (1) intact control animals and (2) animals lacking retina and lamina ganglionaris. All animals were individually monitored with a motor activity recording system for 30 days. For the first 10 days the animals were maintained and kept in constant darkness (DD) and then submitted to 24-h skeleton photoperiod cycles (SP) consisting of 30 min red or blue light signals calibrated to the same irradiance (25 Wm^{-2}) during the next 10 days. Afterwards, they were left in DD for the last 10 days of the experiment. Activity was quantitatively and qualitatively analyzed. Results show that all control intact animals synchronized to blue or red light exhibited shift advances or delays. These results indicate that both circadian responses to monochromatic light investigated in this study are mediated by extraretinal photoreceptors. (*Chronobiology International*, 14(1), 25-34, 1997)

Key Words: Circadian rhythm—Crayfish—Locomotor activity—Skeleton photoperiod—Monochromatic light.

Submitted July 17, 1996; returned for revision August 27, 1996; accepted September 26, 1996.

*To whom all correspondence should be sent.

INTRODUCTION

Light has been recognized as the primary entraining agent for circadian rhythms, but relatively few studies have examined the effect of its spectral composition on circadian processes (1). In some unicephal organisms as well as invertebrates a detailed action spectrum for phase advances and delays has been measured (2-4). In crayfish, the identity of photoreceptors that transduce light input to the circadian pacemaker has not been elucidated. Some authors have proposed that photoreceptors that entrain the locomotor and electroretinographic (ERG) amplitude rhythms in adult crayfish reside in the supracerebral ganglion (5) and both rhythms can be entrained by extraretinal pathways. Other studies on the development of crayfish circadian system (6-8) have proposed the existence of two kinds of circadian photoreceptors participating in the ERG amplitude rhythm resetting, a short and a long wavelength photoreceptor system, that could interact with the pacemaker system by means of retinal and extraretinal inputs. This study was carried out to test the influence of the different wavelengths on the synchronization of the motor activity rhythm in juvenile crayfish as well as to determine whether this effect involves extraretinal photoreception. When maintained in 12:12 LD cycles under complete photoperiod, crayfish exhibits masking effects on the activity rhythm, making the synchronization process difficult to evaluate (9). Symmetrical skeleton photoperiods (SP) can successfully entrain the locomotor activity rhythm of some animals in the same way as the corresponding complete photoperiod. (10). Hence the motor activity rhythm of unrestrained, intact, and retina and lamina ganglionaris-deprived juvenile crayfish was recorded to evaluate their ability to entrain to monochromatic red and blue SP. The results show the crayfish is able to synchronize to red and blue monochromatic SP even in the absence of the retina and lamina ganglionaris.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Procedure

Forty-six young crayfish *Procambarus clarkii* instars, 16-20 weeks old, were used. All were born in our laboratory from field-collected animals, acclimatized to laboratory conditions, and mated here. Animals were divided into two groups: (1) intact control animals and (2) animals with retina and lamina ablation. During the experiment all organisms were placed individually in small double-compartment aquaria made of black acrylic plastic. One end of the aquarium was sealed by glueing a piece of wax containing fish and vegetables serving as food during the experiment. One of the compartments was a tunnel simulating a burrow and the other was a wide chamber (9). Temperature was kept constant at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Light pulses were provided by an optic fiber (Dolan-Jenner mod 170.2) placed 15 cm from the chamber and controlled by a programmable timer. Light intensity was adjusted by neutral density filters; monochromatic light was provided by Kodak Wratten narrow band interference filters with peak transmittance wavelengths of 460 and 640 nm. The intensity of the stimulus was calibrated with respect to the crayfish position using a Li-Cor quantum-radiometer-photometer with a Li-Cor pyranometer, mod PY-17197. Irradiance was fixed at a value of 25 watts m^{-2} . All the crayfish were placed in light-dark cycles (LD 12:12) from eclosion to the beginning of the experiment. The experiment always started at 15:00 h, during the photophase of the cycle. Each crayfish was transferred to its home cage and placed in complete darkness during

the first 10 days of the experiment. From the eleventh to twentieth day of the experiment, the crayfish were submitted to a 30 min blue or red light SP simulating a complete LD 12 : 12 photoperiod (lights on at 07:00 and 19:00 h). On the twentieth day of stimulation, the lights were turned off and the animals were maintained in darkness (DD) for a minimum of 10 days.

Data Recording and Analysis

Animals were individually monitored with a motor activity recording system as previously described (9). The activity during the 24-h periods was conventionally double-plotted as actograms (Tau program, Minimeter Co., Inc.). Analysis of the motor activity was based on the occurrence of major bursts of movement. To define activity peaks, the levels of locomotor activity had to be larger than the mean \pm standard deviation; i.e., small movements such as from antennae were filtered out. The motor rhythm of crayfish is not very prominent and sometimes not present (11). Hence, quantitative statistical methods had to be used to determine if a rhythm existed or not and to estimate its parameters. To determine the presence or lack of rhythmic patterns objectively, the data of 10 consecutive days were plotted in 20-min bins and analyzed according to Sokolove and Bushnell's (12) chi-square periodogram at 10–30-h intervals. All animals showing significant periodograms, i.e., spikes above a confidence interval of $p < 0.01$, were considered rhythmic. Period differences between free running in preentrained and postentrained conditions of the two groups of animals were tested using a nonparametric Kolmogorov-Smirnov test. The phase reference point for measuring the possible advances or delays induced by the light pulses was either the maximal peak of activity (mode) or the onset of activity. Activity time was ascertained from the moment when the amplitude of a cycle reached 50% of its maximum until it had returned to this value. Hence, circadian time (CT) 12 denotes the onset of activity. To estimate this phase reference point, we calculated the onset of activity from the estimated rhythm in each 24-h period. This was projected to the first recording day by means of a regression line calculated by the least-squares method in which the day in the sequence was the independent variable and the onset of activity was the dependent variable. The slope of the regression line was used to verify the period value (13). To determine the rhythm phase under LD, the onset of activity, occurring relative to whether the lights were on or off, was chosen as a reference point. Average phases for both groups of animals under blue or red SP were determined using Rao's and Rayleigh circular statistic tests for nonrandomness (14).

Surgery and Histology

Surgical lesions were performed on animals anesthetized with ice. Under a dissecting microscope the retina and lamina ganglionaris of the eye complex were bilaterally removed using a razor knife. The wounds were sealed with small amounts of melted wax and the animal was left to recover before continuing the experiment. At the end of the experiment, the eyestalk was dissected to verify the surgical lesion. Afterwards, it was fixed in formaldehyde, included in paraplast, and cut with a microtome. Slices were dyed with toluidine blue and observed and photographed using a Nikon Labophot 2 light microscope.

RESULTS

Figure 1 shows the effect of blue light upon the locomotor activity of two juvenile crayfish: (a) intact and (b) retina-ablated. a) The actogram and the corresponding periodograms show a clear unimodal circadian rhythm that depicts a significant period of 24.6 h ($p < 0.01$) under DD. This rhythm changes to a bimodal pattern during the exposure to the blue SP cycle. The rhythm synchronizes to this cycle throughout a phase jump advancing 2.3 h, changing to a bimodal pattern and shortening to $\tau = 23.8$ h. The periodogram depicts a significant peak at 12 h. This bimodal pattern changes to an unimodal one during the last 10 recording days in darkness. Under these posttreatment conditions, the free-running rhythm lengthens, $\tau = 24.8$ h. b) The actogram shows the effect of blue light on the activity of one animal lacking retina and lamina ganglionaris. The unimodal circadian rhythm shown by this animal under the DD condition ($\tau = 25.1$ h)

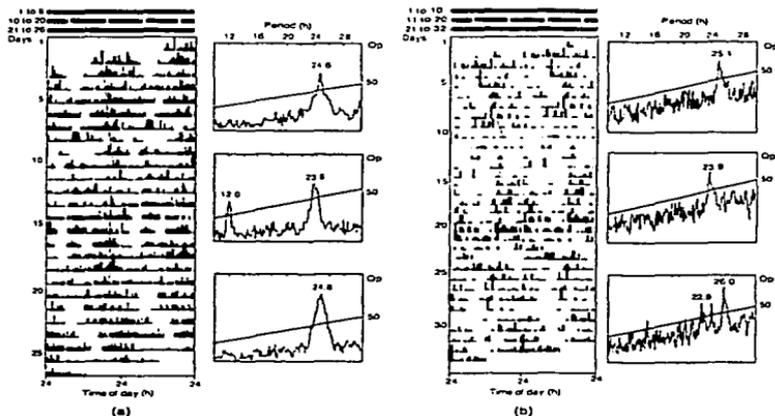


FIGURE 1. Locomotor activity rhythms of two juvenile crayfish that were each maintained in DD for 10 days and afterwards exposed to blue SP (two 30-min pulses of 460 nm and 25 W m⁻², at 07:00 and 19:00 h). Data are presented in the double-plotted format with the activity of successive days stacked vertically. (a) Intact crayfish, (b) retina-ablated crayfish. (Left) Actogram for 10 days of recording in DD, SP, and DD again. (Right) Corresponding periodograms for 20-min bins of the activity record computed for 10 days under each condition. In (a) 19:00 h pulsed light occurring at CT 16 in the 10th day seems to evoke a phase advance. (b) 19:00 h pulsed light occurring at CT 22 produces a phase advance. Regression line periods are in (a) 24.4 and 23.8 h and in (b) 25.2 and 24.0 h, respectively. See text for further explanation.

persists in the SP cycles after some days of apparent arrhythmia. The rhythm synchronizes to SP after 2 days of apparent lack of rhythmicity advancing 2 h and shortening its period value ($\tau = 23.9$ h). During the DD postentrainment condition this animal's rhythm seems to fragment with emergence of three circadian peaks and one significant ultradian peak.

Figure 2 shows the effect of the red SP cycles on the activity rhythm of two young crayfish: (a) intact and (b) retina-ablated. Figure 2a depicts a clear and statistically significant unimodal rhythm in DD as shown in the corresponding periodogram. This rhythm seems to synchronize to the red SP cycles after 5 days of transients, with a phase delay of 9.0 h, showing the absolute peak about 20:00 h and a second peak at the 07:00 h lights-on time. Postentrainment DD shows the control phase and disappearance of the lights-on peak. Under this condition, the rhythm shortens its period value to 23.5 h. During the 35 days of recording, some changes in the activity level were observed as previously described for this rhythm during development (9). In Figure 2b, the actogram

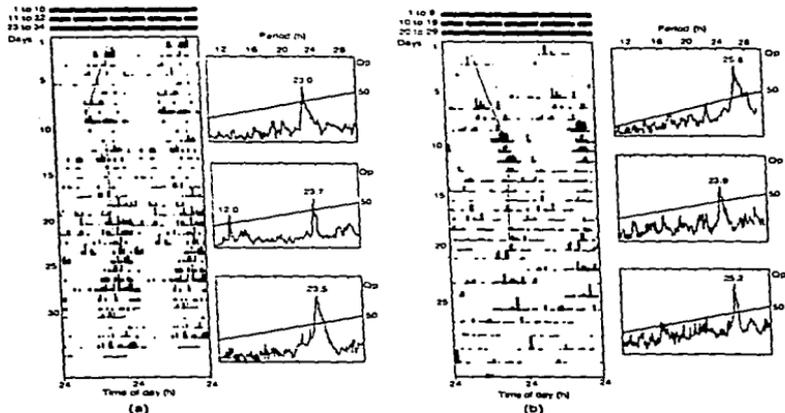


FIGURE 2. Locomotor activity record and its associate periodograms of two juvenile crayfish—(a) intact and (b) retina-ablated—that were exposed to red SP (two 30-min pulses of 640 nm and 25 W m⁻²). Note the “lights-on” peak during the entrainment condition in the intact crayfish is not present in retina-deprived crayfish. Note the rhythm splitting as well as the change of the rhythm period value during the DD postentrainment. In (a) 19:00 h pulse light occurring at CT 14 during the 11th day evokes a phase delay. (b) 19:00 h light pulse occurring at CT 13 produces an advance. Regression line periods are in (a) 22.8 and 24.1 h, and in (b) 25.3 and 23.88 h, respectively. See text for details.

depicts the circadian unimodal activity rhythm of a young animal lacking retina and lamina. This rhythm is able to synchronize to the red SP cycle by means of a phase advance of about 1.83 h and by displaying an unimodal circadian rhythm ($\tau = 23.9$ h.). Afterwards, during the DD postentrainment, this rhythm lengthens to $\tau = 25.2$ h, and several ultradian bouts emerge; only one of these peaks shows a significant value in the periodogram.

Based on the rhythmicity criterion established, i.e., at the $p < 0.01$ level in the periodogram, 90% ($n = 22$) of all the intact animals showed a statistically significant circadian activity rhythm; 80% ($n = 17$) of the animals lacking retina and lamina showed a statistically significant circadian rhythm. The period of the rhythm showed great variability in both intact and retina-ablated animals. Generally, two kinds of young crayfish were found, a group exhibiting a shorter τ than 24.0 h and another one having a longer τ of over 24.0 h. All animals showed free-running activity rhythms that entrained to blue or red SP by means of phase advances or delays. Figure 3 shows the mean of the rhythm's period value in DD, SP, and postentrainment DD conditions in animals with

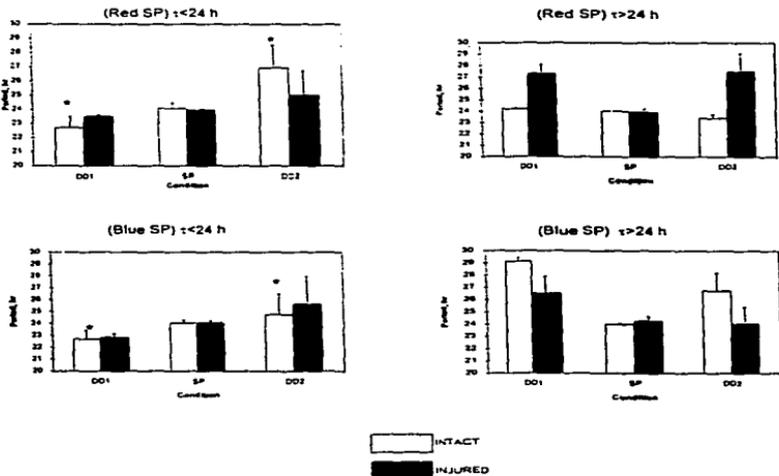


FIGURE 3. Changes in the free-running rhythm period value after rhythm entrainment to blue and red SP in intact and retina-ablated juvenile crayfish. Note all crayfish of both intact and deprived retina groups entrain to blue and red SP. Each bar indicates the average and the vertical lines standard deviation. * $p < 0.05$. See text for explanation.

short and long period values submitted to blue and red SP cycles. In general, intact animals had a shorter period than retina-ablated ones when recorded under DD prior to the SP cycles. Both groups of animals synchronized equally well to blue or red SP cycles. Considerable lengthening or shortening of the rhythm period value during the postentrainment DD condition can be observed in both groups of animals. Statistical testing showed significant differences ($p < 0.05$) between the rhythm's free-running period in intact animals before and after being submitted to red and blue SP. Both groups of animals under blue or red light conditions showed no significant differences in the number of transients required to synchronize to the blue or red SP.

The distribution of phases among the animals belonging to both groups, intact and retina-ablated resetting to blue and red SP, is shown in Figure 4. Groups 1 and 2 recorded under blue SP and group 1 recorded under red SP exhibited resetting to the morning pulse. Rao's test revealed a significant ($p < 0.01$) nonrandom bimodal clustering in these groups. Group 2 recorded under red SP shows an unimodal resetting to the evening pulse; Rao's test demonstrated a statistical significant unimodal nonrandom distribution. Rayleigh's test indicated a nonsignificant unimodal distribution in all the cases ($p > 0.05$).

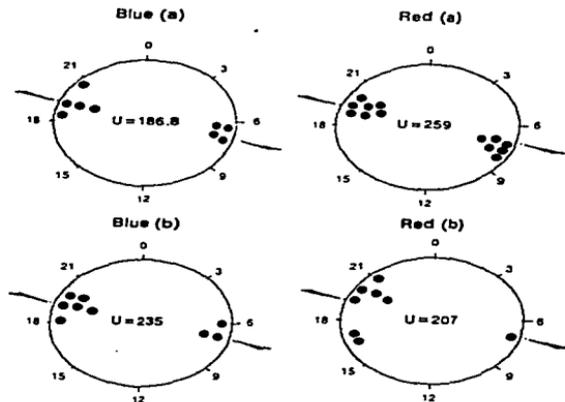


FIGURE 4. Estimated phases of the activity rhythm for the two groups of crayfish recorded under blue or red SP. The times of the two pulses forming the SP are indicated by filled arrows. Bimodal and unimodal Rao's test and unimodal Raleigh's test showed $p < 0.01$ and $p > 0.05$, respectively. See text for explanation.

DISCUSSION

These results show that the activity rhythm of young *P. clarkii* can be synchronized with skeleton photoperiod regimes simulating a complete photoperiod of LD 12:12. The discrete entrainment involves abrupt phase shifts of the pacemaker caused by the two pulses defining the skeleton photoperiod which allows the circadian responses to the light, including the delay and advance shifts involved in rhythm resetting, to be observed (15). When animals were placed under red or blue light, the locomotor activity of intact animals exhibited a bimodal activity rhythm with two peaks—the shorter duration one immediately resetting at the first pulse of light (07:00 h) and the second longer burst of activity occurring near the second pulse in the evening (Figs. 1a and 2a). The shorter burst of activity seems similar to the "lights-on" peak that has been described for adult crayfish and which has been proven to be exogenously driven (5,11,16). This peak seems clearer when recorded under red light, appearing at each cycle. When the crayfish is recorded under blue light, this first burst of activity waxes and wanes throughout the different recording days (Fig. 1a). Removal of ommatidia and lamina abolishes this peak (Figs. 1b and 2b) in adult crayfish as reported by some authors (11). The aforementioned could indicate the influence of retinal photoreceptors with a differential spectral sensitivity during development upon the walking leg activity responsible for this peak (17). The longer burst of activity corresponds to the endogenously driven "lights-off" peak of the adult crayfish (18). This longer burst of activity synchronizes to both blue and red monochromatic light even in the absence of retina and lamina indicating the presence of extra-retinal circadian photoreceptors that are able to detect short and long wavelengths.

Both in the intact and retina-ablated animals, long and short-wavelength monochromatic light pulses evoked phase advances or delays on the rhythm according to when the light occurred during the subjective day or night of the free-running rhythm. The phase-response curve of the circadian oscillator controlling the locomotor activity in the restrained adult crayfish seems to show a type 0 curve, displaying a large fraction of delays from 20 to 12 h CT and a peak advance at about CT 17 h (19). During the first day of the entrainment, morning or evening pulses during the free-running rhythm originated either a phase advance or delay based on the animal's CT (Figs. 1 and 2). Afterwards, the successive phase shifts caused by the two light pulses stabilized the rhythm during entrainment as it was proposed elsewhere for other nocturnal animals (15).

Both in intact and retina-ablated animals, no differences in the number of transients required to synchronize to the LD cycle were found; nor were phase relations between the light pulse and the rhythm phase disturbed. The aforementioned findings indicate that the synchronization mechanism to light irradiance is extraretinal. Although synchronization persists in animals lacking retina and lamina, the level of activity increases suggesting that retina and lamina could be involved in its regulation. Comparison of the free-running period value of control and experimental animals previous to entraining with that calculated in the postentrainment DD reveals aftereffects in τ resulting from phase shifts. These aftereffects are more frequent in the intact groups, suggesting that this phenomenon could be associated with the retina. The bimodal pattern shown by the intact and retina-ablated animals under blue light as well as the intact crayfish under red light could indicate bistability (10). These groups of animals are able to exhibit two behavioral patterns, some young crayfish selecting the first and the others the second dark interval in which to express their main activity. This phenomenon suggests the need to carry out new experiments to investigate the strategies used by this nocturnal species

to adapt to a changing photoperiod. The results of this study indicate that both circadian responses to monochromatic light examined herein are mediated by extraretinal photoreceptors, as has been proposed for other invertebrates (20). Further studies must investigate the characteristics and location of this photoreceptor, its influence on other parameters of this rhythm, as well as its relation to the circadian photoreceptors proposed for the ERG amplitude rhythm during crayfish development.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Dr. Michael H. Smolensky for his advice and editorial help. We are grateful too to Dr. Raúl Aguilar Roblero and Dra. Margarita Chavez Cano for their critical commentaries and suggestions to this work and Jesús Sáenz for his technical support. This work is part of doctoral thesis of Manuel Miranda Anaya. Research was supported by PADEP UNAM 03001, CONACyT 0112P-N, and DGAPA fellow.

REFERENCES

1. Hastings WJ, Rusak B, Boulos Z. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: Prosser CL, ed. *Neural and integrative animal physiology*. New York: Wiley-Liss, 1992:435-546.
2. Klemm E, Ninneman H. Detailed action spectrum for the delay shift in pupae emergence of *Drosophila pseudoobscura*. *Photochem Photobiol* 1976; 24:369.
3. Frank KD, Zimmerman WF. Action spectra for phase shifts of a circadian rhythm in *Drosophila*. *Science* 1969; 163:688.
4. Morse DJ, Hastings W, Roenber T. Different phase responses of the circadian oscillators in Gonyaulax. *J Biol Rhythms* 1994; 9(3-4):263-74.
5. Page TL, Larimer JL. Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem Photobiol* 1976; 23:245-51.
6. Fanjul-Moles ML, Miranda-Anaya M, Fuentes-Pardo B. Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol* 1992; 102A(1):99-106.
7. Fanjul-Moles ML, Miranda-Anaya M, Bernal-Moreno JA. Effect of the light quality on the phase response curve of the ERG circadian rhythm in juvenile instars of crayfish *Procambarus clarkii*. *Soc Neurosci Abstr* 1993; 19:1616 (abstract 662.23).
8. Bernal-Moreno JA, Miranda-Anaya M, Fanjul-Moles ML. Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination. *Biol Rhythm Res*. 1996; 27 (in press).
9. Fanjul-Moles ML, Miranda-Anaya M. Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol Int* 1996; 13(1):15-26.
10. Pittendrigh CS. Circadian systems: entrainment. In: Aschoff J, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*. 4. *Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, 1981: 95-124.
11. Page TL, Larimer JL. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. The role of eyes and caudal photoreceptor. *J Comp Physiol* 1972; 78: 107-20.

12. Sokolove PG, Bushell WN. The Chi-square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 1978; 72:131-60.
13. Enright JT. Data analysis. In: Ashoff J, ed. *Handbook of behavioral neurobiology. 4. Biological Rhythms*. New York: Plenum Press, 1981:21-38.
14. Batschelet E. *Circular statistics in biology*. New York: Academic Press, 1981.
15. Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemaker as a clock. *J Comp Physiol* 1976; 106:291-331.
16. Chapple WD. Light and the movement of crayfish. Master's degree thesis, Syracuse University, 1960.
17. Fanjul-Moles ML, Fuentes-Pardo B. Spectral sensitivity in the course of ontogeny of crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp Biochem Physiol* 1988; 91A:61-6.
18. Page TL, Larimer JL. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J Comp Physiol* 1975; 97:50-80.
19. Viccon-Pale J, Fuentes Pardo B. Synchronization by light of the circadian rhythm of motor activity in the crayfish. *Biol Rhythm Res* 1994; 25:267-76.
20. Page TL. Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. *Experientia* 1982; 38:1007-13.