

176
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD CIRCADIANA DEL ACOGIL CONSECUTIVOS A LA APLICACIÓN DE SEÑALES QUÍMICAS.

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

PRESENTA
MIGUEL ÁNGEL VERDE VALADEZ

ASESORES
DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO
DR. JOSÉ VICCON PALE
M. EN C. ENRIQUE MORENO SAENZ
M. EN C. SALBADOR SOLORZANO GARCÍA
BIÓLOGO IVAN RAMIRO ESPÍNOLA ALVARADO

CIUDAD UNIVERSITARIA
MÉXICO D.F.

1998



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Cambios en la actividad circadiana del acocii
consecutivos a la aplicación de señales químicas."
realizado por Miguel Angel Verde Valadez.

con número de cuenta 8838887-4 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Beatriz Fuentes Pardo

Propietario

Dr. José Viccon Pale

Propietario

M. en C. Enrique Moreno Saenz

Suplente

M. en C. Salvador Solorzano García

Suplente

Biólogo Ivan Ramiro Espínola Alvarado

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Agradecimientos:

Por su apoyo y guía a la Dra. Beatriz Fuentes Pardo quién luchó conmigo ante todos los problemas sorteados.

Por su colaboración y ayuda en el procedimiento histológico al Dr. Baltazar Barrera Mera.

A mis compañeros de trabajo por hacerme más fácil mi labor dentro del laboratorio.

Dedico este trabajo a:

Todos aquellos que participaron directa e indirectamente en este trabajo y a quienes utilicen este material.

**Este trabajo se realizó en:
El laboratorio de Cronobiología,
Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina.
U.N.A.M.**

**Bajo la dirección de la Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Auspiciado por DGAPA proyecto In-214796**

Entre la noche y el día,
hay un territorio indeciso,
no es luz ni sombra,
es tiempo.

Octavio Paz.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES	1
Sistemas Circadianos	2
Concepto De Reloj Biológico	4
Características De Los Ritmos Circadianos	7
Sincronización De Los Sistemas Circadianos	9
Ritmo Circadiano Del ERG Del Acocil	16
Organización Del Sistema Visual	16
Organización Del Sistema Olfatorio	18
Antecedentes Directamente Relacionados Con Este Trabajo	19
OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS DE TRABAJO	21
MATERIAL Y MÉTODOS	21
DISEÑO EXPERIMENTAL	22
ANÁLISIS DE RESULTADOS	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	29
PROPUESTA	35
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
FIGURAS	44

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Desde hace muchos años el hombre se ha preocupado por saber *dónde* y *cómo* se efectúan los procesos vitales, para lo cual ideó métodos y técnicas de estudio que culminaron con la generación de las ciencias morfológicas y fisiológicas.

Ahora se puede afirmar que las respuestas a las preguntas *¿dónde?* y *¿cómo?* suministran sólo una visión fragmentada de los fenómenos biológicos, ya que muchas funciones cambian de acuerdo con las señales temporales externas y pasan en forma sucesiva y alternada por máximos y mínimos.

Resulta entonces necesario determinar los mecanismos que generan la aparición de tales cambios, así como la relación que guardan con las señales temporales externas, esto es, conocer el *cuándo*. Esto ha llevado al estudio de los ritmos biológicos.

A los fenómenos biológicos que se presentan a intervalos regulares de tiempo se les llama *ritmos biológicos*, expresión que incluye una amplia gama de fenómenos con periodos muy distintos.

El hombre utiliza los relojes para medir intervalos de tiempo, algo semejante sucede en la naturaleza, pues, desde los organismos unicelulares hasta los más complejos, están dotados de sus propios mecanismos de medición del tiempo. De ahí ha surgido la idea de *reloj biológico*, entidad anatomo-funcional por medio de la cual los organismos miden intervalos de diferente magnitud: desde las horas hasta los años.

La organización de los relojes biológicos está poco comprendida, sin embargo, cualquiera que sea el estado del conocimiento sobre los relojes, todos ellos tienen como característica esencial generar funciones que no sólo requieren de tiempo para llevarse a cabo, fundamentalmente están organizadas para medirlo.

Sistemas Circadianos

La investigación sobre relojes biológicos se ha orientado en gran medida al estudio de los ritmos "circa", es decir, aquéllos que presentan periodos cercanos, pero diferentes del periodo de alguna señal externa bien establecida. Muchas funciones muestran un ritmo circadiano (del latín *circa*, cerca; *diem*, día), término acuñado por Halberg (1959), debido a que su periodo endógeno (el cual se pone de manifiesto cuando el organismo en el que se genera es colocado en condiciones ambientales constantes) no es de 24 horas exactas, sino de 24 horas con algunas horas de más o de menos. De igual forma se habla de ritmos circamareales, con periodos próximos a las 12.4 horas; circalunares, con periodos cercanos a los 28 días; circanuales, con periodos alrededor de los 365 días.

De los fenómenos *circa*, los circadianos han sido, con mucho, los mejor estudiados. El concepto de ritmicidad circadiana de los organismos ha estado presente desde hace varios siglos; sin embargo, la idea que actualmente se acepta sobre estos ritmos ha surgido de las características funcionales de los mismos, observadas mediante abundante información experimental obtenida fundamentalmente durante los últimos 40 años.

A partir de las observaciones de De Mairan en 1729 sobre la ciclicidad en los movimientos del follaje de una planta sensitiva, (*Mimosa pudica*) se planteó el problema de esclarecer si los ritmos observados en los seres vivos reflejan solamente la influencia del ambiente sobre ellos, o bien si los organismos son capaces de generar la ritmicidad aun en un ambiente arrítmico. En principio parece sencillo esclarecer este problema. De Mairan demostró que la ritmicidad del follaje persiste si la planta se coloca donde la luz del sol no puede alcanzarla, lo que sugiere que no depende del ciclo día-noche. Sin embargo, transcurrieron más de 30 años antes de que DuMonceau (1758) demostrara que el fenómeno observado por DeMairan no depende de variaciones de la temperatura, y otros 200 años más antes que el origen endógeno de la ritmicidad se aceptara en forma generalizada.

La idea actual acerca del origen endógeno de la ritmicidad circadiana, se basa en el hecho de que en condiciones típicas de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persiste con una ligera pero significativa variación de su periodo con respecto al de la señal externa correspondiente esto es, del ciclo de 24 horas, cuando una función se registra en estas condiciones se dice que está en *oscilación libre o espontánea* (fig. 1). La variación de las 24 horas en el periodo durante la oscilación libre indica que el ritmo observado no depende de fenómenos asociados con la rotación de la tierra. Adicionalmente, los estudios de Erwin Bünning publicados a mediados de la década de los años 30 (Bünning, 1935) demostraron la dependencia genética del periodo de los ritmos circadianos.

Fue hasta la década de 1960, durante la realización de algunos simposios, que empezaron a sistematizarse los protocolos de investigación en el tema de los ritmos biológicos y se logró establecer un mínimo de características que éstos debían cumplir para poder ser considerados como circadianos; Los principales contribuyentes en esta sistematización fueron Jürgen Aschoff, Colin S. Pittendrigh y Erwin Bünning.

El concepto de reloj biológico como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la posibilidad de usar las oscilaciones como una referencia temporal interna. El reloj biológico permite la adecuada interacción en el dominio temporal entre una amplia gama de funciones del organismo y entre éste y su ambiente. Estas características son aceptadas por la mayoría de los estudiosos de la cronobiología, sin embargo los mecanismos por los cuales el organismo lleva a cabo estas interacciones son aún motivo de una controversia que radica en que para algunos autores como Pittendrigh o Aschoff, los ritmos biológicos se basan en estructuras que funcionan como *marcapasos* que tienen la capacidad de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos (Aschoff, 1960; 1965; Pittendrigh 1960; 1965). Para otros autores como Halberg (1964; Halberg y cols., 1967), las propiedades que definen a un reloj biológico son el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos

oscilatorios en los que la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos.

De estas dos propuestas, la sostenida por Aschoff y Pittendrigh ha aventajado, con mucho, a la de Halberg ya que ha sido sustentada en una sólida base experimental.

Concepto De Reloj Biológico

A la fecha, nadie ha llegado a establecer con precisión cómo está organizado un reloj biológico, base de todo sistema circadiano, de ahí que se hayan ideado diversos modelos para representarlo. En todos los modelos propuestos del sistema circadiano está formado por tres elementos básicos: a) un marcapaso o estructura con capacidad de oscilar en forma endógena; b) un sistema encargado de detectar las señales externas y enviarlas al marcapaso (*sincronizador*) y c) las vías y estructuras mediante las cuales se expresa la oscilación.

Uno de estos modelos propone que un reloj biológico estaría formado por una red celular con capacidad de seguir en forma pasiva las oscilaciones generadas por un marcapaso autosostenido.

El modelo requiere que cada sistema celular tenga su propia expresión física o química con el periodo del marcapaso pero no necesariamente con la misma fase. Requiere también de un elemento, que podría ser nervioso (mediante neurotransmisores) o endocrino (por concentraciones hormonales), capaz de transmitir la oscilación desde el marcapaso hasta los sistemas celulares pasivos. Este sistema circadiano sería sincronizado por el tiempo ambiental externo mediante la información detectada por los receptores sensoriales y transmitida hasta el marcapaso.

Otro modelo que se ha propuesto describe una red de unidades celulares donde, en ausencia de señales periódicas externas, cada unidad es, en sí misma, un oscilador con periodo independiente. Un oscilador actuaría como marcapaso, estaría sincronizado con el tiempo externo a través de los sentidos y le impondría su fase a los otros

osciladores esclavos, es decir, estructuras que siguen pasivamente las oscilaciones impuestas por el oscilador principal o marcapaso. Como en el modelo anterior, es necesario postular señales nerviosas o endocrinas que mantengan la sincronización en todo el organismo.

En otro modelo se ha propuesto la actividad multioscillatoria de los organismos sin que haya algún oscilador que actúe como marcapaso. En vez de ello, distintos receptores sensoriales sincronizarían a los distintos osciladores y la sincronización interna se debería a una acción retroalimentadora entre las diferentes unidades osciladoras. El sistema de retroalimentación sería negativo, por lo cual habría un retraso en la señal de retroalimentación que sería, de hecho, la que podría comportarse como un oscilador. El periodo de la oscilación dependería de las características cinéticas del sistema (Moore-Ede y Sulzman, 1981) (fig 2).

Por muchas décadas se ha buscado el sustrato anatómico de los relojes biológicos. Recientemente se han identificado algunos conglomerados celulares capaces de producir ritmicidad circadiana. Diversos criterios se han aplicado para calificar a una estructura como la responsable de la generación de los ritmos. El primero de estos criterios es el de la lesión o ablación. Cuando se lleva a cabo este procedimiento en alguna(s) estructura(s), en particular del sistema nervioso central, se ha confirmado la pérdida de la ritmicidad circadiana.

Al producirse lesiones selectivas en el ganglio supraesofágico o en los tallos oculares, los ritmos locomotor y sensorial en los crustáceos se ven claramente modificados (Aréchiga y cols., 1993). La destrucción del pedúnculo óptico, interrumpe la actividad locomotriz en los insectos (Nishitsutsuji-Uwo y cols., 1967). La pinealectomía suprime el ritmo circadiano de actividad locomotriz de reptiles y aves (Falcón y cols., 1989; Takahashi y cols., 1989). Lesiones del núcleo supraquiasmático en el hipotálamo de los mamíferos producen la anulación de los ritmos locomotor y de ingesta de agua o comida, entre otros (Klein y cols., 1991).

La utilidad de este enfoque depende de la discreción anatómica de la estructura que controla un ritmo determinado.

Un segundo criterio para determinar si una estructura es un posible marcapaso circadiano es el de la *implantación*. Es decir si a la supresión de un ritmo como consecuencia de la lesión o la extirpación de una estructura, sigue la recuperación de la conducta periódica perdida, después de la implantación de la parte dañada, se puede proponer a la estructura implantada como un buen ejemplo de "reloj circadiano".

Implantes de hipotálamo embrionario conteniendo el núcleo supraquiasmático han logrado restaurar en ratas adultas, algunos de los ritmos que se habían perdido después de una ablación, (Drucker-Colin y cols., 1984; Ralph y Lehman, 1991). Implantes de glándula pineal han producido la recuperación de ritmos locomotores después de una pinealectomía (Zimmerman y Menaker, 1979). Resultados similares han sido reportados con implantes de ganglios en insectos (Page, 1982; Handler y Konopka, 1979).

Otro poderoso criterio de identificación de un marcapaso circadiano es su capacidad de seguir oscilando después de haber sido explantado del cuerpo y mantenido en cultivo; posibles relojes como el núcleo supraquiasmático del hipotálamo de los mamíferos y la glándula pineal de los reptiles y las aves (Deguchi, 1979), así como los ojos de gastrópodos y tallos oculares de crustáceos muestran ritmicidad *in vitro* (Eskin, 1971; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Block y cols., 1993).

Los ritmos circadianos se han podido detectar en todos los niveles de organización de los seres vivos, desde el subcelular hasta el de las poblaciones.

Las reacciones químicas de las células siguen un orden temporal debido a la participación de mecanismos acoplados de activación e inhibición. Este orden temporal presenta una amplia gama de periodos no necesariamente circadianos, los que al acoplarse podrían dar origen a

ritmos bioquímicos de síntesis o de degradación de compuestos que participan de manera importante en la regulación de las reacciones metabólicas celulares. Existen muchos trabajos realizados con los ritmos circadianos en este nivel, como los que se encuentran principalmente en organismos unicelulares como *Euglena* y *Gonyaulax*, donde se han estudiado los ritmos de división celular, de fotosíntesis, de emisión de luz (Edmunds y cols. 1987; Morse y cols., 1989); en *Paramecium* se han estudiado los ritmos de conjugación, de consumo de oxígeno y de actividad (Miwa y cols. 1987; Johnson C.H. y cols., 1989; Hasegawa K. y cols., 1990).

A nivel de sistemas se han identificado estructuras como el ganglio cerebral en la polilla (Truman, 1974), los ojos en *Aplysia*, (Siwicky y cols. 1989) la glándula pineal de las aves (Deguchi, 1979) o el núcleo supraquiasmático de los mamíferos (Cahill y Menaker, 1989). En todos estos estudios ha sido posible comprobar que la estructura en cuestión es capaz de imponer el periodo y la fase de la ritmicidad biológica en diversos fenómenos estudiados, aun en cultivo.

Los ritmos han sobrepasado incluso el nivel de individuo y actúan en grupos poblacionales. Especies completas se ven afectadas por los ritmos circadianos: ritmos de eclosión de insectos como la mariposa monarca y la mosca de la fruta, donde los organismos nacen simultáneamente (Sinha, 1981).

Características De Los Ritmos Circadianos

Con los experimentos de Bünning, Pittendrigh y Aschoff se pusieron de manifiesto las características esenciales de los ritmos circadianos. Gracias a los estudios realizados por estos investigadores se ha generalizado el manejo de los parámetros mediante los cuales se cuantifica la actividad periódica. Así, la actividad circadiana queda determinada por los valores de periodo, amplitud, frecuencia y nivel de actividad que presentan las oscilaciones.

De la caracterización de los ritmos circadianos, Aschoff (1960) obtuvo una ley empírica que se conoce con el nombre de "Regla de

Aschoff", según la cual los valores de la frecuencia de oscilación, de la relación actividad/reposo o relación α/ρ , (es decir, la relación entre el tiempo en el que la amplitud de la onda alcanza un valor superior al 50% o periodo α y el tiempo en el que la amplitud de la misma está por debajo del 50% o periodo ρ) y el nivel de actividad de las oscilaciones, se incrementan en los organismos diurnos cuando reciben más luz y se reducen en los organismos nocturnos ante esta misma situación ambiental.

Por la misma época en que surgió la regla de Aschoff, Pittendrigh (1960) propuso el concepto de tiempo subjetivo o circadiano el cual es una representación del tiempo interno de los organismos (dado por la presencia de su reloj biológico) independientemente del tiempo externo. El tiempo subjetivo cero corresponde al inicio del periodo α y el tiempo circadiano 24 a un ciclo completo más adelante.

Otra característica de los ritmos circadianos es que poseen mecanismos de compensación de la temperatura. En general se acepta que las oscilaciones circadianas no son modificadas sustancialmente por los cambios de temperatura ya que, dentro de términos fisiológicos (30-38°C), tales cambios no alteran en forma ostensible los parámetros de las oscilaciones circadianas.

Los ritmos circadianos son innatos y hereditarios, esto se ha probado en diversos organismos y estructuras en los que se han seguido los ritmos circadianos hasta por 14 generaciones sucesivas. (Konopka y Benzer, 1971).

También se ha logrado establecer en algunas especies el lugar genético donde radica la capacidad de que la especie muestre algún tipo de ritmo circadiano e inclusive se han producido modificaciones en el mismo, gracias a manipulaciones sobre los genes correspondientes.

Diversos investigadores han identificado en *Drosophila melanogaster* dos tipos de ritmos circadianos; uno de ellos afecta el ciclo de actividad y el otro el de eclosión de las pupas. Un método basado en mutagénesis química permitió a Konopka y Benzer (1971) obtener relojes

mutantes de *Drosophila*. Este trabajo, ya clásico, mostró moscas alteradas en sus sistemas circadianos; mutaciones simples en un gene denominado *per* (por periodo) mostraron cuatro fenotipos característicos: el tipo salvaje (*per*⁺) con un ritmo de actividad y eclosión cercanos a las 24 horas; mutantes de periodo corto (*per*^s), cercano a 19 horas; mutantes de periodo largo (*per*^l), que alcanza hasta 29 horas; y finalmente mutantes arrítmicos (*per*⁰) que se caracterizan porque carecen de un patrón circadiano en los ritmos de eclosión o actividad (Konopka & Benzer, 1971; Konopka, 1979). Gracias a la ingeniería genética, en las últimas décadas se ha logrado notables progresos en la elucidación de los papeles del gene y la proteína *per* en la ritmicidad circadiana. Se ha demostrado que el gene *per* codifica para proteoglicanos que son transcritos por un RNAm de 4.5 Kb, y corresponde a proteínas que contienen alrededor de 1220 residuos de aminoácidos.

El mapeo molecular de mutantes indica, además, que el fenotipo de periodo corto *per*^s resulta de la sustitución de un simple aminoácido en la secuencia, en la posición 589, donde una serina es reemplazada por una aspargina; de igual modo el mutante de periodo largo *per*^l reemplaza una valina por ácido aspártico y el fenotipo *per*⁰ tiene una mutación que cambia el codón de glutamato (CAG) por un codón de término (TAG) en la posición 464. Esto produce una proteína truncada que presumiblemente pierde su función y genera arritmia (Yu y cols., 1987; Bayleies y cols., 1987).

Sincronización De Los Sistemas Circadianos

En condiciones naturales el ambiente geofísico presenta diversas variaciones cíclicas que influyen sobre los ritmos biológicos hasta el punto en que éstos no manifiestan su oscilación espontánea, sino que ajustan su periodo innato al periodo de la variación cíclica con la que también mantienen una estrecha relación de fase. A este fenómeno se le conoce como *sincronización*, y su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el tiempo geofísico. De acuerdo con Pittendrigh, la *sincronización* provee a los relojes biológicos de un mecanismo por el cual son capaces de reconocer la hora

local, propiedad sin la cual los ritmos no tendrían relevancia adaptativa.

El desarrollo de un sistema interno para la medición del tiempo es quizá, uno de los logros adaptativos más relevantes de los organismos, ya que le confiere un orden temporal a la expresión conductual y fisiológica del individuo.

Las señales externas más útiles como referencias temporales son aquéllas que muestran regularidad y que, por tanto, son predecibles para el individuo. Estas señales son conocidas con "Zeitgebers" que en alemán significan "indicadores de tiempo" y que en español se han llamado sincronizadores por sus características de regularidad casi imperturbable; el ciclo de luz-oscuridad es el sincronizador que regula los ritmos circadianos de prácticamente todas las especies lo cual les permite concentrar su actividad en momentos óptimos para su supervivencia.

El concepto de sincronización fue propuesto inicialmente por Pittendrigh y Bruce (1957) durante el desarrollo de un modelo de osciladores. Lo propusieron como un proceso de coordinación entre dos osciladores que se induce cuando éstos oscilan con frecuencia similar; posteriormente el término se aplicó al ajuste de ritmos endógenos con eventos cíclicos de la naturaleza, en el entendimiento de que la sincronización implica control de la fase y del periodo del sincronizador sobre el oscilador biológico.

El proceso de sincronización se establece únicamente con eventos ambientales que coinciden o tienen una frecuencia de oscilación parecida a la del organismo, ya que éste, por sus características intrínsecas está limitado a modificar su periodo de oscilación, sólo dentro de ciertos valores. A los límites de periodicidad de un estímulo sincronizador a los que un oscilador puede ajustar su oscilación endógena se les conoce como *límites de sincronización*.

Así, por ejemplo, un ritmo cuyo periodo en oscilación libre es de 20 horas puede expresar un ritmo de 24 horas al sincronizarse a un

fenómeno externo que tenga este periodo, como el ciclo día-noche por ejemplo.

Diversos autores han demostrado que una variedad de fenómenos ambientales entre los que se encuentran la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento y las señales sociales, puede funcionar como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos. De éstos y otros estímulos potencialmente sincronizadores, las variaciones de iluminación durante un ciclo día-noche son, con mucho, las más potentes, lo que coincide con el hecho de que muestran la mayor estabilidad en el periodo (lo que evidentemente las hace más predecibles), y las convierte en la principal señal de sincronización ambiental, por lo menos para los organismos epigeos.

La sincronización regula no sólo el periodo, sino también la fase. Esto implica que cuando un sistema circadiano queda sincronizado a la señal externa, el ritmo adopta una determinada relación de fase con el día astronómico. Si consideramos que cada ritmo adopta a su vez, una cierta y diferente relación de fase con los demás ritmos de un determinado sistema, esto equivale a decir que el organismo posee un orden temporal interno. Visto desde una perspectiva circadiana, un organismo es un conjunto de relaciones de fase adaptativas entre los múltiples ritmos que existen en todos los niveles de organización, desde el nivel molecular hasta el nivel conductual.

El proceso de sincronización es central a la función circadiana y debe ser comprendido en detalle si se quiere entender a los sistemas circadianos. Este hecho ha sido aceptado por los estudiosos del tema desde hace algún tiempo, lo que significa que muchos esfuerzos se han llevado a cabo para conocer los distintos aspectos del fenómeno.

Para observar el efecto de los estímulos luminosos, estos sincronizadores se han aplicado bajo la forma de fotoperiodos completos de distinta duración. Los fotoperiodos son ciclos alternados de luz y oscuridad en los que la fotofracción tiene un determinado valor. La respuesta a estos cambios se traduce en un cambio del periodo del ritmo en oscilación libre al periodo de la señal que se aplica e indica la dependencia a la luz que tienen los organismos o estructuras que

muestran ritmos circadianos. Uno de los más potentes sincronizadores de los ritmos es el fotoperiodo de 24 horas en el que se alternan 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad (LO 12:12).

En el caso del ciclo día-noche la influencia del sincronizador es un fenómeno continuo, ya que el organismo recibe en forma continua, información de la luminosidad, y por lo tanto el control que ejerce el sincronizador sobre el oscilador es constante. Se supone que el sincronizador genera sobre el oscilador, en forma continua, aceleraciones o desaceleraciones de su velocidad angular. De acuerdo con esta suposición, desde el momento que un sincronizador incide sobre un oscilador en oscilación libre ejerce sobre él su influencia, aunque sus cambios de fase y de periodo son graduales y pueden requerirse varios ciclos para que el oscilador endógeno muestre la fase y el periodo del sincronizador. Estos cambios graduales se conocen como *ciclos transitorios*.

Una vez establecida la relación de fase entre el oscilador y el sincronizador, si éste se retira, aquél es capaz de continuar su oscilación endógena y manifestar de nueva cuenta su periodo intrínseco, a partir de la fase impuesta por el sincronizador.

Se ha planteado la posibilidad de que el sincronizador ejerza una influencia breve o momentánea sobre el oscilador y le ocasione un cambio abrupto, ya sea provocando un adelanto o un atraso de fase. Esta posibilidad se ha explorado en animales mantenidos en condiciones de oscuridad continua a los cuales se les aplica una señal breve de luz al iniciar el día e inmediatamente antes de que inicie la noche, de manera que ambas señales indican los momentos de transición de la noche al día y del día a la noche, sin ejercer un efecto continuo sobre el oscilador. Esta forma de estímulo se conoce como *fotoperiodos esqueleto*, (Pittendrigh, 1981) y mediante su aplicación ha quedado claro que los ritmos pueden ser ajustados por señales ambientales breves, cuando éstas se presentan dentro de la gama de sincronización del organismo. De acuerdo con la fase en que se encuentre la oscilación al incidir cada señal, el individuo interpretará la fase correspondiente a la noche o al día subjetivo. Al variar el tiempo

entre ambas señales y de acuerdo con el momento en el que el organismo sincroniza el inicio de su fase de actividad, se puede determinar la duración de la noche mínima tolerable de los organismos nocturnos, o del día mínimo tolerable en el caso de las especies diurnas (Fuentes Pardo y cols., 1997), es decir, la cantidad mínima de oscuridad o iluminación que requieren las especies para desarrollar en forma óptima su actividad diaria. El que un sistema circadiano sea sincronizado por fotoperiodos esqueleto sugiere la existencia de grupos de osciladores asociados con el encendido y grupos de osciladores asociados con el apagado de la señal luminosa.

Como alternativa para determinar los mecanismos de sincronización, Pittendrigh estudió los cambios de fase que muestran los ritmos en oscilación libre ante estímulos luminosos de intensidad conocida y de corta duración (15 minutos) los cuales se presentan al organismo en diferentes fases de su ciclo circadiano. Al establecer una relación gráfica en la que se muestren los atrasos o adelantos de la fase del ritmo (ordenadas), generados como consecuencia de la aplicación de un estímulo único, con respecto a la hora del ciclo circadiano (abscisas) en la que fue aplicado, se obtiene lo que se conoce con el nombre de "curva de respuesta de fase" (Fig.3) (Pittendrigh, 1960). La construcción e interpretación de las curvas de respuesta de fase se ha convertido en una herramienta valiosa que ha ayudado a predecir algunas propiedades fundamentales de los osciladores que subyacen a los sistemas circadianos.

Se ha encontrado que la aplicación de estímulos únicos puede generar curvas tipo 1 o tipo 0. El número hace alusión al valor de la pendiente que se obtiene de la relación entre los valores de las abscisas y las ordenadas en una curva de respuesta de fase, lo que significa que en algunas casos (curva tipo 1) la aplicación del estímulo genera atrasos y adelantos muy claros que dependen del momento de aplicación del estímulo y en otros (curvas tipo 0) los cambios de fase producidos por el estímulo son débiles y no se pueden asociar con el momento de aplicación de la señal (Winfree, 1980).

Aunque en la mayor parte de las especies la luz es el sincronizador más potente de los ritmos circadianos, en el ambiente de los organismos están presentes otros fenómenos ambientales regulares, de menor potencia, que también participan en la regulación de los ritmos biológicos y que en condiciones especiales, pueden adquirir mayor fuerza y funcionar como los sincronizadores principales. Los estímulos capaces de producir cambios en la fase y el periodo de los ritmos biológicos y de sincronizar a los sujetos en ausencia de luz son clasificados como sincronizadores no fóticos: la temperatura, las señales sociales, algunos fármacos, la actividad física, la presencia del alimento, son algunos ejemplos de sincronizadores no luminosos.

La temperatura ha mostrado tener gran relevancia como sincronizador secundario y se ha asociado tanto a los ritmos circadianos como a los circanuales (Sweeney y Hasting, 1960). En los poiquiloterms, ha demostrado ser una señal sincronizadora primordial (Beck, 1962). En el hombre es especialmente evidente la influencia de fenómenos sociales como sincronizadores. También se ha observado que en ciertos grupos de animales la actividad locomotriz y las secreciones hormonales de los individuos pueden ser un factor determinante en la sincronización del grupo (Winfree, 1967). Se ha observado por ejemplo, que en grupos de hembras o en mujeres cohabitando puede haber sincronización a un determinado estado reproductivo, ya que presentan ovulación en una fase común.

De igual manera, en algunas aves, el canto de coespecíficos y en algunos murciélagos el sonido producido por el movimiento de aleteo en la oscuridad son señales sincronizadoras relevantes (Aschoff y cols., 1982).

También se ha mostrado que ciertos estímulos ambientales que suelen presentarse asociados con los cambios de luz y oscuridad pueden adquirir valor de sincronizadores mediante un proceso asociativo de condicionamiento clásico (Rusak y Zucker, 1975). Se sabe que un fármaco, el triazolam (benzodiazepina), produce cambios de fase de los ritmos circadianos en el criceto (Truek y Losee-Olson, 1987), probablemente debido a la inducción de un incremento de la actividad en los animales. Como las curvas de respuesta de fase al triazolam y a

otros estímulos no fóticos son similares, se ha propuesto que el mecanismo de acción de muchos de estos estímulos implica cambios en la actividad locomotriz de los individuos.

La sincronización por estímulos no fóticos se inicia en muchas especies desde la vida intrauterina, ya que se ha demostrado que in útero, los fetos muestran ritmicidad circadiana congruente con los ritmos de su madre. Se cree que esta sincronización materno-fetal se logra mediante el intercambio de sustancias, probablemente nutrientes u hormonas como la melatonina (Reppert y Weaver, 1991) por medio de la placenta e inmediatamente después del nacimiento, durante el amamantamiento. Se ha propuesto que al paso del tiempo, esta señal pierde relevancia para las crías y que al madurar éstas, las señales no luminosas son reemplazadas por los ciclos luz-obscuridad (Hoffer y Shair, 1982).

En general, parece ser que mientras menor sea el desarrollo del sistema nervioso, más susceptible es la ritmicidad circadiana a la acción de agentes no fóticos.

Una característica común en los procesos de sincronización es la poca transferencia de energía que se observa entre la señal sincronizadora y el oscilador sincronizado. Se habla de sincronizaciones débiles o fuertes, de acuerdo con la señal sincronizadora y el método de acoplamiento que hay entre ella y el sistema que sincroniza. El acoplamiento puede ser directo o indirecto; dos osciladores pueden sincronizarse mutuamente o puede uno de ellos sincronizar a otro en forma unilateral; un sincronizador puede sincronizarse en la misma frecuencia que otro sincronizador o con una frecuencia menor; si un oscilador deja de operar por aplicación constante de luz, la interrupción de ésta puede reiniciar la actividad rítmica.

En un esfuerzo por conocer los mecanismos en los que se basa la sincronización mediante estímulos no luminosos de la ritmicidad circadiana, hemos analizado este fenómeno en organismos de las especies *Procambarus clarki* y *Procambarus digueti*. El ritmo circadiano que

estudiamos es el de respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma; ERG), modelo experimental escogido debido a algunas razones que expondremos un poco más adelante. El sincronizador que empleamos fue la presencia en el sitio de registro de un organismo de la misma especie y de sexo contrario.

Ritmo Circadiano Del ERG Del Acocil

Uno de los ritmos circadianos mejor establecido en el acocil es el ritmo de amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma, ERG) de los fotorreceptores visuales. Para comprender mejor cómo se genera este ritmo y, en su caso, cómo se llevaría a cabo el proceso de sincronización por señales no luminosas, y cuáles serían las estructuras encargadas de detectar e integrar tales señales se presentará inicialmente la organización anatómico-funcional de las estructuras relacionadas con el ritmo del ERG e inmediatamente después, la organización del sistema olfatorio.

Organización Del Sistema Visual

Los fotorreceptores forman parte del ojo compuesto del acocil, órgano constituido por un conjunto de unidades llamadas *omatídias*, dispuestas en forma paralela al eje mayor del tallo ocular. Cada *omatidia* está compuesta por un sistema óptico, un conjunto de elementos fotosensibles y un grupo de células que contienen pigmentos conocidos como accesorios. El sistema óptico lo forman los medios transparentes del ojo, es decir, las células corneales y los conos cristalinos cuyos vértices hacen contacto en los elementos fotosensibles. Estas son ocho células retinulares que contienen un elemento denominado *rabdómero*, el cual está constituido por membranas fotosensibles las que al fusionarse con las de los *rabdómeros* de las células retinulares de la misma *omatidia* constituyen un *rabdómero*. En esta estructura se encuentra un pigmento que se identifica con la rodopsina del vertebrado y que responde a la luz con un cambio estructural y molecular. Esta reacción inicia la respuesta eléctrica a la luz de las células retinulares la que es conducida hasta el sistema nervioso central.

Alrededor de los elementos transparentes se encuentran tres tipos de pigmentos retinianos accesorios, el distal, el proximal, y el de reflexión, este último químicamente análogo a las purinas y pteridinas. Los dos primeros se han identificado con la melanina.

La posición de los pigmentos proximal y distal se modifica de modo que en la obscuridad, los pigmentos se repliegan hacia los extremos de la omatidia por lo que el rabadomo queda descubierto y resulta más sensible a la acción de la luz.

Bajo iluminación, ambos pigmentos se aproximan entre sí y blindan al rabadomo ya que evitan la llegada de la luz tangencial. De hecho, la sensibilidad del ojo a la luz es varias unidades logarítmicas mayor cuando está adaptado a la oscuridad que cuando lo está a la luz ya que los pigmentos retinianos proximal y distal participan importantemente en este cambio de sensibilidad.

Un área brillante, refringente se produce en las células de la córnea cuando la luz es reflejada en la capa del pigmento de reflexión (tapetum), cuando éste queda expuesto a la luz durante la etapa en la que los pigmentos proximal y distal están en la posición de adaptación a la oscuridad. A esta área se le conoce con el nombre de *pseudopupila*.

Al incidir la luz sobre los fotorreceptores retinianos se genera en ellos una respuesta eléctrica, el potencial de receptor, el cual se caracteriza por estar formado por dos componentes: uno rápido, asociado con la intensidad del estímulo luminoso que recibe el nombre de fase transitoria, y otro, la fase estable que dependen de la duración del estímulo. Si por medio de un registro extracelular se recupera la respuesta eléctrica a la luz de un cierto número de fotorreceptores, se obtiene un electroretinograma en el cual se identifican dos componentes, la HI, asociada con la despolarización de las células retinales y la HII que comprende a la actividad eléctrica propia de los rabadomos. Una vez que los fotorreceptores ha respondido a la luz, se manda la información codificada a lo largo de la vía visual hasta activar a ciertas neuronas integradoras presentes en los ganglios visuales que proyectan finalmente en el ganglio cerebroide.

Las neuronas activadas por los fotorreceptores rigen, a su vez, la producción de hormonas que se vierten en la glándula sinusal, en particular de la hormona que promueve la migración del pigmento retiniano accesorio hacia la posición de adaptación a la luz (*hormona dispersora del pigmento distal*). Este reflejo neuroendocrino resulta entonces de carácter protector y, análogo al reflejo pupilar de los vertebrados.

El registro ininterrumpido durante varios días de la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil, ha puesto de manifiesto la existencia de un cambio periódico en la amplitud del ERG. Este cambio tiene las propiedades que corresponden a un ritmo circadiano el cual ha sido profusamente estudiado en esta especie. Así, se conocen sus características en oscilación libre (Fuentes Pardo e Inclán Rubio, 1981); durante la aplicación de estímulos sincronizantes únicos (Fuentes Pardo y Ramos Carvajal, 1983) o periódicos (Fuentes Pardo y cols., 1997); en distintas etapas del desarrollo ontogenético del acocil (Fanjul Moles y cols., 1987; Fuentes Pardo y cols., 1992); en preparaciones aisladas (Sánchez y Fuentes Pardo, 1977); en relación con otros ritmos (Fuentes Pardo e Inclán Rubio, 1981; 1987; Moreno Sáenz y cols., 1992).

Organización Del Sistema Olfatorio

La ruta olfatoria en los artrópodos se origina en la periferia, en estructuras cuticulares especializadas llamadas *sensilla* las cuales se localizan sobre el exterior de las ramas de la primera porción de la antena birramia o *anténulas*. Las neuronas olfatorias receptoras asociadas con las *sensilla* expresan receptores de membrana específicos a determinadas moléculas odoríficas. Como consecuencia de la unión entre la sustancia y el receptor, los iones fluyen por las membranas de las neuronas olfatorias receptoras, modifican el potencial de membrana, se genera el potencial de receptor y se induce la descarga de potenciales de acción.

Los potenciales de acción se conducen a lo largo de los axones de las neuronas olfatorias hasta regiones de un neuropilo glomerular (el lóbulo olfatorio) en el deutocerebro, donde establecen sinapsis con neuronas de segundo orden. Los lóbulos olfatorios son esferas claramente delineadas en los extremos del cerebro que contienen áreas cónicas con paquetes densos de fibras sinápticas llamados glomérulos olfatorios. Se ha sugerido que clases específicas de neuronas olfatorias receptoras expresan tipos particulares de receptores, en regiones específicas de los glomérulos. (Mellor y Alones, 1997).

Los lóbulos olfatorios de cada lado del cerebro están conectados a neuropilos en los tallos oculares por proyecciones interneuronales que forman un prominente quiasma, el tracto globular olfatorio el cual termina dentro del cerebro anterior en el cuerpo hemielipsoideo. (Sandeman y Luff, 1973; Mellon y Munger 1990).

Por otro lado, el lóbulo olfatorio envía proyecciones hacia otra estructura del deutocerebro, el lóbulo accesorio (Fig. 11). A la fecha, no se conoce el papel que, en la olfacción, desempeñan el cuerpo hemielipsoideo y el lóbulo accesorio, aunque se ha sugerido que éste podría estar implicado en la integración de las señales olfatorias y el cuerpo hemielipsoideo en la expresión motora de la conducta olfatoria.

Antecedentes Directamente Relacionados Con Este Trabajo

Gran parte de la información obtenida de estos trabajos fue utilizada como antecedentes en esta tesis, lo que permitió tener un patrón de referencia en lo que se refiere a las propiedades esenciales del ritmo del ERG en oscilación libre y ante estímulos sincronizantes.

Del trabajo de Fuentes Pardo y Ramos Carvajal (1983) se sabe, por ejemplo, que el efecto de la estimulación luminosa sobre el ritmo del ERG no es instantáneo; inicialmente es detectado como una perturbación exógena que hace que el ritmo muestre una irregularidad en el periodo y en la amplitud de las oscilaciones circadianas normales. Estos cambios son transitorios y preceden a la reaparición de un estado estable en el que se reinstalan el periodo y la amplitud originales, con sólo algún

cambio de fase. La acción de estímulos luminosos únicos sobre el ritmo circadiano del ERG llevó a construir una "curva de respuesta de fase" en la que se grafican los atrasos o adelantos que muestran el ritmo circadiano del ERG del acocil, ante la estimulación con señales luminosas de 15 minutos de duración aplicada en las distintas horas de un ciclo circadiano. La curva de respuesta de fase mostró un cambio abrupto de atrasos a adelantos alrededor de las 5 horas circadianas, tiempo que corresponde a la noche subjetiva del acocil. Esta curva es unimodal, es decir, que durante ciertas horas (5-13 hrs. TC) del ciclo circadiano sólo se presentan atrasos de fase, de 13-20 hrs., TC. el estímulo luminoso no produce ni atrasos ni adelantos y en otros momentos del ciclo (20-5 hrs. TC) sólo se producen adelantos de fase (Fig. 2). Esto sugiere que la susceptibilidad a la luz de los osciladores cambia durante el ciclo de 24 horas y muestra el carácter adaptativo del ritmo circadiano del ERG. (Fig. 3).

OBJETIVOS

La presencia de las rutas de sincronización de los sistemas circadianos, los cuales incluyen los marcapasos, y los diferentes ritmos generados en diversas estructuras, permite a los seres vivos adaptarse a las situaciones externas generadas por la alternancia del día y la noche. Del conocimiento que se posea acerca de los mecanismos de acción de estos sistemas depende, en buena medida la posibilidad de realizar en ellos las modificaciones y ajustes necesarios que permitan optimizar el funcionamiento de los organismos ante las condiciones cambiantes del medio externo.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que en la sincronización de los sistemas circadianos pueden participar estímulos diferentes a los luminosos. Este hecho contrasta grandemente con las propuestas iniciales según las cuales los ritmos circadianos son poco afectados por estímulos químicos, mecánicos, térmicos, etc. y ha llevado a un replanteamiento de cuáles son las rutas de sincronización de los ritmos (que hasta hace poco tiempo se proponían casi exclusivamente a nivel de vías visuales) y, por supuesto, cuál es el probable sitio de los marcapasos afectados por la llegada de información por tales rutas.

El objetivo de este trabajo es conocer si además de la ruta de sincronización por luz del ritmo circadiano del ERG, la cual ha sido previamente establecida, existe la posibilidad de sincronización de este ritmo por la estimulación de tipo químico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si la aplicación de una señal química es capaz de modificar las características esenciales de un ritmo circadiano en oscilación libre. Entonces existe una ruta de sincronización por medio de la cual el estímulo aplicado influye sobre el sistema circadiano considerado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron acociles adultos de 5-7cm de longitud, en estado de intermuda, de las especies *Procambarus digueti* provenientes de Michoacán México y *Procambarus clarki* del laboratorio de crustáceos del doctor Baltazar Barrera Mera en Mixquihuala Hidalgo, México.

Una vez que hubieron llegado a nuestro laboratorio, los animales fueron colocados en acuarios de plástico de 50 centímetros de largo por 20 cm. de ancho y 20 cm. de profundidad, en condiciones de temperatura (16°C) e iluminación controladas.

El régimen de iluminación que recibieron fue de 12 horas de luz alternadas con 12 horas de oscuridad, es decir, se les aplicó un fotoperiodo LO 12:12 donde el encendido de la luz fue a las 7:00 de la mañana y el apagado a las 7:00 de la noche.

Se les alimentó regularmente con vegetales, huevo y pescado.

Un día antes de que entraron en experimentación se les pegó en el dorso del caparazón, un pedazo de corcho con acrílico dental (Nic-ton RV5) de secado rápido.

De igual manera los ojos pedunculados se mantubieron fijos durante el experimento. Para ello se introdujo entre ambos ojos y el caparazón

frontal un pedazo pequeño de algodón mojado con acrílico. Las quelas se ataron suavemente con bandas elásticas. En estas condiciones, los animales se sujetaban del corcho por medio de una pinza de fémur y se les introducía en un acuario, con el fin de que el agua les cubriera las branquias y manteniendo la parte rostral fuera de la misma durante todo el experimento. El acuario tenía dos compartimientos, uno donde estaba el macho y otro en el que se colocaría a una hembra o a otro macho, según el diseño experimental que se describe más adelante, se colocaba dentro de una cámara de temperatura controlada (15°C) y oscuridad constante donde se registraba, en forma individual y durante un tiempo mínimo de diez días consecutivos, el ritmo circadiano de amplitud de respuesta a la luz.

Para obtener las respuestas eléctricas a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma ERG) se colocaba un semimicroelectrodo de metal, de aproximadamente 5µm de diámetro en la punta, a través de la superficie de la córnea; el electrodo de referencia se sumergía en el agua. El otro extremo del electrodo estaba conectado a un preamplificador GRASS modelo RPS107. Los estímulos luminosos necesarios para obtener un ERG eran enviados al ojo del acocil desde un fotoestimulador GRASS modelo PS22 a una frecuencia de 1 destello de 1.8 lux de intensidad y 10µs de duración cada 3 minutos; la activación del fotoestimulador dependía de un programa instalado en una computadora Printaform. Una vez que el ERG había sido amplificado, la señal se enviaba a un osciloscopio (Tektronix TDS 460) para cuantificar su amplitud. También era enviada a un polígrafo (GRASS 79D) y, en paralelo, a una tarjeta analógico-digital para ser almacenada en la computadora. (Fig.4)

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron acociles machos en estado de intermuda de los cuales se obtenía el ERG durante todo el tiempo del experimento.

Al quinto día de registro se introducía al baño una hembra de la misma especie la que permanecía en él durante cuatro horas y con los distintos horarios que permitían cubrir el ciclo circadiano (0:00-4:00,

4:00-8:00, 8:00-12:00, 12:00-16:00, 16:00-20:00, y 20:00-0:00 horas, TC). La hembra permanecía encorchada sujeta a un soporte universal y separada del macho por una barrera de acrílico opaco perforada en la parte baja. De esta manera se aseguraba que el macho no la viera ni tuviera ningún contacto directo con ella pero que el agua que cubría a ambos especímenes pudiera fluir libremente de un compartimiento al otro. Una vez que la hembra era retirada se cambiaba el agua del baño.

Un segundo grupo experimental fue utilizado como registro control. En estos registros se llevaron a cabo las mismas maniobras que en el primer caso sólo que en lugar de introducir una hembra, se introducía otro macho en el baño.

Con el objeto de comprobar si los posibles efectos que se esperaba detectar sobre el ritmo circadiano del ERG obedecían a la acción de señales químicas dejadas por la hembra durante su estancia dentro del baño, se trabajó un tercer grupo experimental formado por acociles adultos machos colocados en la misma condición que los animales del primer grupo pero que habían sido previamente sometidos a una operación quirúrgica mediante la cual les había sido extirpado el deutocerebro o por lo menos los lóbulos olfatorios. (Fig. 5)

Las operaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: los animales se anestesiaban por frío durante una hora, con un pequeño taladro mototul se hacía una pequeña perforación en la parte dorso-rostral del caparazón del acocil justo a la altura entre ambos tallos oculares. Al quedar expuesto el ganglio cerebroide se observan cuatro regiones lobulares de las cuales se extirpaba la superior izquierda y derecha que corresponden a la región integradora olfatoria o deutocerebro. Después de la cirugía (la cual se llevaba a cabo bajo el microscopio estereoscópico) se colocaba un pequeño parche de acrílico dental en el orificio del caparazón y se dejaba que el animal se recuperara durante no menos de 2 días antes de llevar a cabo el registro del ERG de acuerdo con el procedimiento descrito. (Figs. 6 y 7)

ANÁLISIS DE RESULTADOS

De cada experimento se graficó el promedio de la amplitud del ERG durante 15 minutos, es decir, 5 valores medidos cada tres minutos, versus el tiempo transcurrido. Al desplegarse estas gráficas se comprueba que la amplitud del ERG muestra oscilaciones periódicas que siguen un patrón de características circadianas, es decir que tienen un periodo con valor cercano a 24 horas. De estas oscilaciones se determinaron, además del periodo, la amplitud, la relación α/p y la fase (fig. 1). Los datos capturados se analizaron por medio del programa estadístico conocido como periodograma (Statgraphics), el cual se aplicó por separado a los datos obtenidos desde el inicio del experimento hasta el momento de introducción de la hembra o el macho según el caso (días 1-5) y a los datos correspondientes a la segunda parte del registro, es decir, a partir de que se aplicó el estímulo y hasta el fin del experimento (días 5-10).

Para medir el posible efecto de la señal aplicada sobre las características del ritmo se marcaron en las gráficas los momentos de la fase de máxima actividad de cada ciclo antes y después del estímulo. Se marcaron también al momento en que se esperaba que apareciera la máxima actividad si no hubiera habido estímulo y se medía la diferencia entre las fases observadas y esperadas. Con las medidas de atrasos y adelantos de fase producidos por el estímulo durante el ciclo circadiano de 24 horas, se construyó una curva de respuesta de fase para estímulos de posible carácter químico.

Se construyeron también gráficas que muestran día con día los tiempos de inicio y duración de la fase α antes y después de aplicar la señal externa. De las características de las rectas que unen los momentos de inicio de la fase α antes y después de la señal, se determinaron los cambios en el periodo circadiano y en la fase producidos por el estímulo correspondiente.

RESULTADOS

La gráfica central de la figura 8 muestra el ritmo circadiano de amplitud de ERG. de un acocil macho adulto colocado en condiciones constantes de obscuridad (00) y temperatura (16°C). El eje de las ordenadas muestra el voltaje producido por las células fotorreceptoras ante un destello de prueba de 1.8 lux de intensidad y 10 μ s de duración, en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo. El periodo circadiano fue de 23.5 horas. Los picos de máxima actividad se presentan en este caso hacia las 8 horas. El cuarto día del experimento se introdujo un macho de la misma especie (indicado por la flecha) el cual permaneció en el baño de las 18 a las 22 horas. Es notable la ausencia de una etapa transitoria en el registro, el que se mantiene sin variación aparente hasta el último día del experimento. Sólo se encontró, el cuarto día después del estímulo, una pequeña diferencia de fase de menos de 2 horas entre los máximos de actividad esperado y observado.

La gráfica inferior corresponde al mismo experimento sólo que muestra los tiempos de inicio y duración del periodo de actividad a lo largo de todo el experimento (fase α). La pendiente positiva de la recta que une las horas a las que se inició cada día la fase de actividad expresa que la duración del periodo circadiano es menor a 24 horas. La línea punteada indica el momento en que se introdujo un acocil macho al baño de registro. La falta de efecto de esta acción sobre el ritmo del ERG queda evidenciada por la ausencia de cambio en la pendiente de la recta que se prolonga hasta el cuarto día después de aplicado el estímulo.

En la parte superior izquierda y derecha se presentan los periodogramas de los ciclos antes y después de la aplicación de la señal. En ambos casos los periodos predominantes son similares, lo que refuerza la idea de que la llegada al baño de un espécimen de la misma especie y mismo sexo no afecta al ritmo circadiano de respuesta a la luz.

En la figura 9, la gráfica central muestra 9 de 10 ciclos del ritmo circadiano de amplitud del ERG de un acocil adulto colocado en condiciones constantes de oscuridad (00) y temperatura (16°C).

Como en la figura anterior, en el eje de las ordenadas se muestra el voltaje generado por las células fotorreceptoras ante un destello de prueba de 1.8 lux de intensidad y 10 μ s de duración; el eje de las abscisas corresponde al tiempo externo.

La característica más sobresaliente de este registro es que corresponde a un animal al que se le extirpó el deutocerebro. Se comprueba que la fase de mínima actividad se presenta cerca del medio día y los máximos próximos a las 24 horas. La actividad es, sin embargo bastante más irregular que la que suelen mostrar los animales intactos lo que se refleja en variaciones frecuentes del voltaje del ERG, Sin embargo el periodo endógeno tuvo un valor promedio de 23 horas, por lo que las oscilaciones cambian sus picos de actividad a lo largo del registro y aparecen cada vez más temprano. Al cuarto día en la gráfica se introdujo el estímulo que en este caso fue una hembra de la misma especie, puesta en el baño de las 16 a las 20 horas (el inicio se indica en la figura por la flecha), aquí no se alcanza a ver un transitorio y el ritmo mantiene sus parámetros semejantes a los que tenía antes de la llegada de la hembra. Esto da como resultado que al medir el punto de máxima actividad una vez recuperado el estado estable (el 4o día después de la señal), y comparar este momento con el que se hubiera presentado si no hubiera habido estímulo, sólo aparece una diferencia de 1 hora, valor que bien puede considerarse como parte de la variación que muestra los ciclos circadianos en un mismo experimento.

La gráfica inferior muestra los tiempos de inicio y duración de la fase de actividad (fase α) cada día del registro. La regularidad de los ciclos se notó en los momentos de inicio de la fase α , los que se presentan en forma regular a lo largo del registro. Al trazar la recta que une los momentos de inicio de actividad se comprueba, por su pendiente positiva, que el ritmo tiene un periodo promedio menor a 24 horas. La línea punteada marca el tiempo en el que se presentó la

hembra en el baño de registro donde estaba el animal de experimentación.

En la parte superior izquierda y derecha se presentan los periodogramas de los ciclos antes y los ciclos después de la aplicación de la señal. Se puede ver que la distribución de los periodos es diferente, en ambos casos, lo que quizá se pueda asociar con la irregularidad de las oscilaciones ya que la organización del sistema circadiano ante la presencia de una hembra, parece no haber sido grandemente modificada, inclusive en este grupo experimental.

En la parte central de la figura 9 se muestra el ritmo circadiano de amplitud de ERG de un acocil macho adulto colocado en condiciones constantes de oscuridad (00) y temperatura (16°C). El eje de las ordenadas muestra el voltaje producido por las células fotorreceptoras ante un destello de prueba de 1.8 lux de intensidad y 10 μ s de duración; el eje de las abscisas muestra el tiempo externo. Los máximos de actividad se presentan hacia la medianoche lo que expresa la actividad circadiana propia de un organismo nocturno. El cuarto día de experimentación se introdujo al baño de registro una hembra de la misma especie la cual no podía ser vista por el macho. Su presencia produjo un brusco cambio en el ritmo, es decir un transitorio durante el cual la actividad se vio abatida durante algunas horas, después de las cuales hay una clara recuperación. En la parte superior de la gráfica se marcó el momento en que se espera que aparezca la máxima actividad de cada ciclo, de acuerdo con el valor promedio del periodo circadiano (20 horas). El cuarto día de registro se midió la diferencia entre los tiempos en que se esperaba y se observó el máximo de actividad. (líneas punteadas y continuas respectivamente). Esta diferencia correspondió a un adelanto de fase de 5.4 horas.

En la gráfica inferior se muestra el mismo experimento que en la gráfica anterior, sólo que en él se presentan el inicio y la duración de los tiempos de actividad (fase α) de cada ciclo, antes y después de la presencia de la hembra en el baño. Inicialmente el periodo circadiano promedio fue menor de 24 horas, lo que quedó expresado en la pendiente positiva de la recta que une los momentos de inicio de la

fase α . La llegada de la hembra al sitio de registro del ERG produjo modificaciones sustanciales en la fase y el periodo del ritmo como puede verse en la figura donde queda claramente expresado que la diferencia entre la fase esperada y la que se observa es de 10 horas (marcado por la línea punteada) de atraso, y el cambio de periodo es 3 horas ya que después del estímulo mostró un valor promedio de 23 horas.

Los periodogramas que se presentan en la región superior de la figura 6 ponen de manifiesto claras diferencias en la distribución de los periodos circadianos más significativos antes (izquierda) y después (derecha) del estímulo, lo que va de acuerdo con las modificaciones que presentan los registros del ritmo circadiano (gráfica central) y de la fase de actividad (gráfica inferior).

Los experimentos en los que se introdujo al baño de registro una hembra, se hicieron durante el ciclo de 24 horas a intervalos de 4, que es el tiempo que el estímulo permaneció en el sistema de registro. Esta maniobra tuvo por objeto conocer si la sensibilidad al estímulo (que asociamos con la presencia de hormonas sexuales de la hembra) cambia de acuerdo con la hora del día, lo que de presentarse sugiere la acción de un estímulo químico sobre los osciladores responsables del ritmo circadiano del ERG. Así los osciladores mostrarían cambios en su velocidad expresados como adelantos o atrasos de la fase del ritmo una vez que éste hubiera recuperado su estado estable alterado inicialmente a consecuencia de la estimulación aplicada.

Los resultados de 35 experimentos que cubrieron el ciclo de 24 horas se reunieron en la curva de respuesta de fase que se muestra en la figura 11. El eje de las ordenadas muestra los cambios de fase, atrasos o adelantos, medidos en el estado estable del ritmo. En las abscisas se tiene la hora circadiana a la que se aplicó el estímulo. Puede observarse que la curva no muestra ningún patrón definido ya que no hay zonas en las que prevalezcan los adelantos o en las que básicamente se detectan atrasos.

Esto significa que la curva fue muy irregular ya que mostró horas circadianas muy próximas en las que indistintamente se presentan

atrasos o adelantos de fase. Una comparación entre esta curva y la que fue obtenida con la aplicación de estímulos luminosos únicos (Fuentes Pardo y Ramos Carvajal, 1983) (fig. 3) refuerza la idea de que la presencia de una hembra en el sitio de registro del ERG de un macho altera la organización de los osciladores que subyacen a la generación y expresión del ritmo circadiano del ERG.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este trabajo corroboran la presencia de un ritmo circadiano en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma ERG.) de los fotorreceptores visuales del acocil cuando este organismo es registrado en condiciones de oscilación libre en oscuridad constante (00). Este ritmo ha sido ampliamente identificado (Aréchiga y Wiersma, 1969; Aréchiga y cols., 1973; Sánchez y Fuentes Pardo, 1977) en distintas especies de acocil y muestra, en lo general, las características fundamentales de un ritmo circadiano correspondiente a una especie nocturna, cuando es registrado en oscuridad constante (00), es decir, un periodo promedio menor a 24 horas, nivel de actividad relativamente elevado y relación α/ρ mayor de 1 (Figura 1).

Cuando se aplica un estímulo luminoso breve (15 min.) a un acocil del que se registra el ritmo circadiano del ERG en oscilación libre bajo oscuridad constante (excepto por los destellos de prueba) se corrobora que como, lo probaron Fuentes Pardo y Ramos Carvajal (1983) el estímulo luminoso produce un transitorio (etapa en la que las oscilaciones muestran grandes variaciones en el periodo y la amplitud) de duración variable, después del cual el ritmo recupera un estado estable que se caracteriza porque el periodo muestra de nueva cuenta valores semejantes a los que tenía antes de la aplicación del estímulo. Si se toma como referencia de la fase del ritmo algún determinado punto del ciclo de 24 horas (la hora de inicio del tiempo de actividad (periodo α) o la hora en que el ciclo alcanza su máxima amplitud, por ejemplo), se puede conocer la hora externa a la que se presenta cada día, la fase considerada. Evidentemente esta hora depende del periodo de la oscilación. Como consecuencia de la señal luminosa de 15 min., la oscilación circadiana muestra un claro cambio de fase lo que equivale a

decir que entre la hora en que aparece la fase del ritmo y la hora en la que se esperaba que aparecería si no hubiera habido cambios producidos por el estímulo, hay un atraso o un adelanto (aunque también puede no haber cambio alguno), que depende de la hora circadiana a la que se haya aplicado el estímulo. Al graficar en un eje de coordenadas la hora circadiana de aplicación del estímulo con respecto a los cambios de fase inducidos por el mismo, Fuentes-Pardo y Ramos Carvajal construyeron una curva de respuesta de fase que permite visualizar el efecto diferencial a lo largo de un ciclo circadiano, producido por la llegada de un estímulo capaz de perturbar, en forma transitoria, la organización de los osciladores que subyacen al ritmo del ERG correspondiente. (Fig. 3)

Es evidente que la luz aplicada es un potente sincronizador del ritmo circadiano del ERG.

Por otra parte, la efectividad sincronizadora de otros agentes diferentes a la luz y la temperatura no ha sido debidamente documentada, aun cuando haya reportes en este sentido. (Enright, 1965; Aschoff, 1963) Hay datos que sugieren que el sonido, el contacto social, factores psicológicos, son factores capaces de sincronizar los ritmos del humano (Lobban, 1960). Cambios en las características de la rueda que suele emplearse para registrar la actividad motriz de los cricetos son suficientes para que el ritmo circadiano motor de estos animales cambie sus parámetros esenciales (Mrosovsky, 1989). El sonido del canto del gorrión *Passer domesticus*, sincroniza el ritmo locomotor de esta especie (Menaker y Eskin, 1966).

La presencia de la reina en una colonia de abejas obreras de la especie *Apis mellifera carnica* L (Moritz y Sakofski, 1991) induce la sincronización de los correspondientes ritmos de actividad de todos los miembros de la colonia.

Estos y muchos otros ejemplos que se encuentran en la literatura ponen de manifiesto el hecho, ahora aceptado por un gran número de investigadores, de que la sincronización de los ritmos circadianos se puede llevar a cabo mediante la acción de estímulos distintos a los luminosos por más que éstos sigan siendo considerados los más potentes sincronizadores.

En este punto, sin embargo, debe hacerse notar que para demostrar que una señal es un agente sincronizador efectivo, el ritmo considerado debe modificar su frecuencia hasta hacerla igual a la de la señal que se le aplique. También debe excluirse la posibilidad de que el ritmo esté enmascarado, es decir, que el cambio que se observa sea producido sólo en el parámetro que se mide y no en el sistema que mide el tiempo. Para ello debe demostrarse que la fase del ritmo ha cambiado durante la sincronización.

Bajo estos criterios, muy pocos de los trabajos sobre sincronización de los ritmos por estímulos no luminosos ponen realmente de manifiesto tal sincronización. Mucho menos la explican, ya que a la ausencia de criterios para establecer con claridad el mencionado proceso debe añadirse la frecuente falta de información acerca de la localización del sistema circadiano, de las rutas de sincronización que se emplearían y obviamente, de los mecanismos de interacción entre ambos elementos.

Al emplear como punto de comparación los cambios de fase del ritmo de amplitud del ERG producidos por estímulos luminosos únicos, quisimos conocer el posible efecto que sobre el mismo ritmo circadiano registrado también en condiciones de oscilación libre en la oscuridad (00), tendría la presencia de un potencial perturbador de los osciladores responsables del ritmo circadiano, la señal química asociada con la presencia en el mismo baño de registro, de un miembro del sexo opuesto. Consideramos que, dadas las características del sistema de registro (el animal sumergido en el agua y sin poder desplazarse en el medio) y debido a que el estímulo utilizado podría ser cualquier sustancia liberada por la hembra era necesario que el estímulo se aplicara durante un periodo de 4 horas, tiempo relativamente largo si se le compara con el estímulo luminoso que dura 15 minutos, pero que no se antoja excesivo si se considera que las sustancias tendrían que difundir en el medio antes de alcanzar el sistema olfatorio del macho.

Entre las sustancias liberadas por la hembra, que podrían ejercer una cierta acción sobre el ritmo circadiano del ERG del macho, se encuentra la ectisterona. La ectisterona es una hormona esteroidea presente tanto en las hembras como en los machos de esta especie.

sobre todo poco antes del momento de la muda. Sin embargo también ha sido propuesta como una feromona que en las hembras se liberaría de acuerdo con un ritmo circadiano que muestra su pico máximo durante la noche. Aún cuando no hay mucha información sobre este posible papel de la ecdisterona en las hembras del acocil, no deja de ser tentadora la propuesta de que esta hormona, justamente en su papel de feromona, pudiera ser la responsable de las modificaciones que observamos en el comportamiento circadiano del macho. Evidentemente falta mucha información que permita aceptar o rechazar con claridad esta propuesta.

Los cambios producidos en el ritmo del ERG a consecuencia de la presencia de la hembra en el baño de registro fueron muy evidentes. Cualquiera que fuera la hora de aplicación de la señal, el ERG sufría modificaciones inmediatas en la amplitud, que solían mantenerse por tiempos muy variados, que sugerían la presencia de un transitorio. Cuando se analizaban los experimentos, sin embargo, se comprobó que los cambios no sólo se presentaban en forma transitoria sino que se mantenían todo el tiempo del experimento ya que incluían, con frecuencia, cambios en el periodo. Esto nos hizo suponer inicialmente que la presencia de la hembra en el baño, (aun cuando no era vista por el macho) era, en efecto un estímulo sincronizante - muy potente - del ritmo circadiano del ERG. Sin embargo, al reunir la información obtenida de todos los experimentos hechos en esta condición, comprobamos que los efectos producidos por la estimulación eran independientes de la hora circadiana a la que se hubiera introducido la hembra, ya que en un determinado momento del ciclo, igual se podía observar un atraso, un adelanto o una ausencia de cambio de fase.

Más aún, en la mayor parte de los experimentos habían cambios de periodo, pero éstos tampoco mostraban ningún patrón evidente (Tabla 1).

La construcción de la curva de respuesta de fase puso de manifiesto esta irregularidad. De la comparación entre el CURVA DE RESPUESTA DE FASE obtenida a partir de la aplicación de un estímulo luminoso (Fuentes Pardo y Ramos Carvajal, 1983) (Fig. 3) con la CURVA DE RESPUESTA DE FASE generada a partir de la presencia de la hembra, se puede concluir que ante esta última situación el ritmo circadiano del ERG no sólo no es sincronizado sino que se desorganiza casi por completo (Fig. 11).

Para probar que la acción observada en el ritmo circadiano del ERG se debía, en efecto, a la presencia de alguna sustancia liberada por la hembra hacia el baño donde estaba presente el macho del que se registraba el ERG, se llevó a cabo como control, la segunda serie experimental que consistió en la introducción al baño de otro macho colocado en condiciones semejantes a las de la hembra. Cualquiera que hubiera sido la hora de la introducción, el animal en registro no pareció enterarse de la presencia del otro macho, como puede inferirse del registro del ritmo del ERG, el cual sólo mostró una pequeña alteración al momento de la introducción pero se mantuvo sin ningún cambio ostensible durante el resto del experimento (Fig. 8).

El tercer grupo experimental vino a confirmar la idea de que los cambios producidos en el ritmo del ERG son debidos a la liberación hacia el baño de alguna sustancia química producida por la hembra.

El supuesto del que se partió es que los cambios serían detectados básicamente por los receptores químicos que se localizan en la base de las anténulas, donde se iniciaría la información que alcanzaría el deutocerebro, en particular el glomérulo olfatorio. La forma mediante la cual se enteraría el marcapaso responsable de la oscilación circadiana de arriba de las señales químicas, así como los mecanismos que participarían en los registros del reloj biológico ante estas señales, es algo que, a la fecha, se desconoce por completo. Como quiera que se lleven a cabo estos procesos lo que resultó evidente es que cuando el sujeto de experimentación fue un animal al que previamente se le habían extirpado los lóbulos olfatorios o todo el deutocerebro (Fig. 6 y 7) (que es el caso de los animales que conformaron el 3er grupo experimental), la presencia de una hembra dentro del baño, cualquiera que hubiera sido el horario en el que fue introducida, no produjo ningún efecto detectable en el ritmo circadiano (Fig. 9) lo que evidentemente apoya la interpretación dada a los experimentos que conformaron el primer experimental.

De acuerdo con estos hechos y retomando la idea de que la ecdisterona podría ser la sustancia responsable del cambio que muestra el ritmo del ERG de los machos ante la presencia de una hembra, se encuentran en la literatura algunos casos de artrópodos en los que la

presencia de individuos de la misma especie y de sexo contrario altera y desorganiza los sistemas circadianos. Lin y Lee (1996) y Lee y Wu (1994) por ejemplo, comprobaron en la cucaracha *Blattella germanica* que la actividad locomotriz relacionada con el apareamiento y con la búsqueda de la pareja durante la época de apareamiento, está bajo el control de un reloj biológico el cual induce el que los individuos de ambos sexos sincronicen sus movimientos. Sin embargo, el ritmo circadiano tiende a quedar enmascarado en las hembras debido al desarrollo cíclico de los ovarios. Sólo la presencia de algunos factores de tipo social como por ejemplo el contacto directo con los machos (inducido experimentalmente) llevaría al desenmascaramiento de su ritmo circadiano locomotor. Aun cuando los autores no proponen ninguna explicación a estos hechos, lo que resulta sumamente interesante para nuestro trabajo es la evidencia que obtienen de que son justamente los cambios cíclicos en el desarrollo de los ovarios (cambios que necesariamente corresponden a cambios hormonales) la causa del enmascaramiento del ritmo.

El enmascaramiento es un fenómeno que se presenta con relativa frecuencia en los sistemas circadianos, el termino alude al hecho de que bajo ciertas formas de estimulación, un ritmo circadiano permanece, pero queda disimulado (enmascarado) debido a las respuestas que da el sistema circadiano a esas formas de estimulación. Es decir que podría proponerse que los cambios cíclicos de hormonas sexuales femeninas son una posible causa de que el macho, que los detectaría por su presencia en el baño, altere sus patrones circadianos en forma evidente. De hecho lo que aquí observaríamos sería el enmascaramiento en el macho del ritmo del ERG debido a la acción de hormonas sexuales femeninas.

Bajo la perspectiva de un posible proceso de enmascaramiento del ritmo del ERG, nuestros resultados podrían ser explicados de acuerdo con algunas ideas que diversos autores han expresado alrededor de este fenómeno en algunas especies de vertebrados.

Davis y cols. (1987) encontraron que el ritmo de actividad del criceto macho se ve enmascarado por la presencia en el medio de registro de una hembra de la misma especie. Algo semejante fue hallado en el marsupial australiano *Petaurus breviceps* (Kleinknecht, 1985) y en el primate *Caliithrix jacchus* (Erkert y cols., 1986). Aschoff y von

Goetz (1988) encontraron que la presencia periódica de 3 h por día, de una hembra de la especie *Mesocricetus auratus* en un sitio próximo al lugar de registro de la actividad de cricetos machos, ciegos por enucleación, no produjo ningún cambio de fase en el ritmo motor de estos animales. Los autores concluyen que se requiere un contacto físico entre hembras y machos para que se lleve a cabo la sincronización de sus ritmos circadianos. Sin embargo, en algunos de sus experimentos los mismos autores encontraron alteraciones en el patrón circadiano del ritmo motor de machos ciegos, debidas a la presencia de la hembra y concluyen que su trabajo y los de Erkert y cols. (1986) y Kleinknecht (1985) apoyan la participación de las vías olfatorias y probablemente también auditivas, como rutas implicadas en el enmascaramiento de los ritmos circadianos de distintas especies de mamíferos.

PROPUESTA

La señal luminosa inicia la activación de los fotorreceptores visuales los cuales activan las fibras aferentes (Nervio óptico) que se proyecta desde la periferia hasta el sistema nervioso central. A lo largo de éste recorrido, se llavan a cabo distintas sinapsis en los neuropilos de las láminas ganglionares y la médula terminal, lo que implica que la información visual llega altamente procesada hasta el protocerebro medio, en particular hasta el neuropilo protocerebral medio anterior. Es probable que en esta estructura no sólo se integre la información visual sino que se genere la actividad rítmica que caracteriza a la respuesta a la luz del acocil, de tal manera que habría una salida periódica desde éste sitio hasta la glándula sinusal (GS), estructura que se encuentra en el tallo ocular y que está muy próxima a la médula terminal. La glándula sinusal libera, también periódicamente, neurosecreciones acumuladas procedentes de distintas estructuras (como el órgano X y probablemente fibras neurosecretoras del sistema nervioso central) hacia el torrente circulatorio de tal suerte que los fotorreceptores y los pigmentos accesorios verían modificada su capacidad de respuesta.

Por otro lado, la información química recibida desde los sensores olfatorios llegan a las neuronas aferentes desde donde arribarían al glóbulo olfatorio. Es posible que la información química integrada en

el lóbulo accesorio y desde donde algunas fibras alcanzarían el tracto olfatorio el cual proyecta hasta el núcleo hemielipsoideo (Fig. 12) (flechas negras).

Como las señales químicas alteran el ritmo circadiano del ERG, se propone una comunicación entre el cuerpo hemielipsoideo y el neuropilo protocerebral medio anterior de tal manera que la información química estaría en posibilidad de modificar la actividad periódica (circadiana) que se transmite desde el NPMA hasta el sistema visual de esta especie.

CONCLUSIONES

1.- Si se registra la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales de un acocil colocado en condiciones de oscilación libre bajo oscuridad constante (00), se comprueba que la amplitud del ERG presenta cambios periódicos que al ser analizados muestran características circadianas.

2.- Si durante la fase estable del ritmo circadiano de amplitud del ERG de un acocil, se coloca en el baño de registro durante 4 horas otro acocil macho, no se producen cambios detectables en las oscilaciones del ritmo del ERG.

3.- Si de un acocil macho al que se le han extirpado quirúrgicamente los lóbulos olfatorios o el deutocerebro, se registra el ERG durante varios días consecutivos, se comprueba que la amplitud de éste muestra un ritmo circadiano similar al de un animal intacto.

4.- El ritmo circadiano del ERG de un acocil macho al que se le han extirpado los lóbulos olfatorios o el deutocerebro no presenta ninguna modificación que pueda atribuirse a la presencia de una hembra específica en el baño de registro.

5.- Si durante la fase estable del ritmo circadiano de amplitud del ERG de un acocil macho, se coloca en el baño de registro un acocil hembra en distintos momentos del ciclo circadiano, durante un periodo de 4 horas, las oscilaciones del ritmo se alteran en amplitud, periodo y

fase, sin que estos cambios se puedan correlacionar con la hora circadiana a la que se introdujo la hembra.

6.- Estos datos sugieren que la desorganización que muestra el ritmo circadiano del ERG de un acocil macho cuando se introduce al baño de registro una hembra de la misma especie, es producida por la acción de alguna sustancia química de carácter hormonal liberada por la hembra hacia el baño y detectada por el sistema olfatorio del macho.

7.- El que una señal olfatoria altere el sistema circadiano responsable de la generación y expresión del ritmo del ERG, sugiere la presencia de una vía que comunique al centro olfatorio con el sistema circadiano. Se propone una posible conexión entre el sistema olfatorio y el sistema circadiano del ERG.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aréchiga H. and Wiersma C.A.G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1:71-85.
2. Aréchiga H., Fuentes-Pardo B. and Barrera B. (1973). Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: *Neurobiology of Invertebrates* (Ed. Salanki) p.p.403-421 Publishing House of the Hungarian Acad. Sci.
3. Aréchiga H., Fernández-Quiroz. F., Fernández de Miguel F. and Rodríguez-Sosa L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Cronobiol. Int.* 10:1-19.
4. Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25:11-28.
5. Aschoff J. (1963). Comparative physiology: Diurnal rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 25:581-600.
6. Aschoff J. (1965). The phase-angle difference in circadian periodicity. In: *Circadian Clocks*. Amsterdam. North Holland Publishing Co., p.p. 262-276.
7. Aschoff J. and C. von Goetz. (1988). Masking of circadian activity rhythms in male golden hamsters by the presence of females. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 22:409-412.
8. Aschoff J., S. Dann, and K.I. Honma. (1982). Zeitgebers, entrainment and masking: some unsettled questions. In: Aschoff J., S. Daan and

- G.A. Grou. Vertebrate circadian system: Structure and physiology. Springer Verlag, New York.
9. Bayles M.K., T.A. Bargiello, F.R. Jackson and M.W. Young. (1987). Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature*. 326: 390-392.
 10. Beck S.D. (1962). Temperature effects on insects: Relation to periodism. *Proceedings of the North Central Branch Entomological Society of America* 17:18-19.
 11. Block G.D., Khalsa S.B.S., McMahon L., Michel S., and Geusz M. (1993). Biological clocks in the retina: Cellular mechanism of biological timekeeping. *Int. Rev. Cytol.* 146: 83-144.
 12. Bünning E. (1935). Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmik bei Insekten und bei Pflanzen. *Berichte d. Deutschen Bot. Ges.*, 53:594-623.
 13. Cahill G.M. and Menaker M. (1989). Responses of the suprachiasmatic nucleus to retinohypothalamic tract volley in a slice preparation of the mouse hypothalamus. *Brain Res.* 471(1) p65-75.
 14. Davis F.C., Stice S. and Menaker M. (1987). Activity and reproductive state in the hamster: independent control by social stimuli and a circadian pacemaker. *Physiol. Behav.* 40: 583-590.
 15. Deguchi A.T. (1979). Circadian oscillation in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature*. 282:94-5.
 16. De Mairan Dourteus J. B. (1729). *Observation botanique. Histoire de l'académie royale des sciences Paris.* p 35.
 17. Drucker-Colin R., Aguilar-Roblero R., García Hernández F., Fernández-Cancino F., and Bermudez-Rattoni F. (1984). Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311:353-57.
 18. Duhamel Du Monceau H. L. (1758). *La physique des arbres.* Paris: H. L. Guérin et L.F. Delatour.
 19. Edmunds L.N.Jr., Laval-Martin D.L. and Goto K. (1987) Cell division cycles and circadian clocks. Modeling a metabolic oscillator in the algal flagellate *Euglena*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 503:459-475.
 20. Enright J.T. (1965). Synchronization and ranges of entrainment. In: *Circadian Clocks.* Amsterdam. North Holland Publishing Co., p.p. 112-124.
 21. Erker H.G., Nagel B., and Stephani Y. (1986). Light and social effects on the free-running circadian activity rhythm in common marmosets (*Callithrix jacchus*; Primates): social masking, pseudo-

- splitting and relative coordination. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 18:443-452.
22. Eskin A. (1971). Properties of the *Aplysia* visual system: In vitro entrainment of the circadian rhythm and centrifugal regulation of the eye. *Z. Vergl. Physiol.* 74:353-37.
 23. Fanjul-Moles M.L., Moreno-Sáenz E., Villalobos-Hiriart N. and Fuentes-Pardo B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 A: 213-219.
 24. Falcón J., Marmillón J.B., Claustrat B. and Collin J.P. (1989). Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: An in vitro study in the pike. *J. Neurosci* 9:1943-50.
 25. Fuentes-Pardo B. and Inclán Rubio V. (1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythm in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74 A: 711-714.
 26. Fuentes-Pardo B. and Inclán Rubio V. (1987). Caudal photoreceptores synchronize the circadian rhythms in crayfish: Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86 A: 231-527.
 27. Fuentes-Pardo B. and Ramos Carvajal J. (1983). The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 3:711-714 p.p.
 28. Fuentes-Pardo B., Fanjul-Moles M.L., and Moreno-Sáenz E. (1992). Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle. Res.*, 23: 81-91.
 29. Fuentes-Pardo B., Solórzano García S, and De la O Martínez A. (1997). Effects of complete and skeleton photoperiods on the circadian rhythms of the electroretinogram of the crayfish. *Biological Rhythm Research.* 28:69-84.
 30. Halberg F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, Ed. Withrow. Washinton: A.A.A.S. pp 803-878.
 31. Halberg F. (1964). Organism as circadian systems: Temporal analysis of their physiologic and pathologic responses, including injury and death. In: *Medical aspects of stress in the military climate.* Washintong D.C.: Walter Reed Army Institute for Research.
 32. Halberg F., Tong Y.L. and Johnson E.A. (1967). Circadian system

- examples. In H. Von Mayersbach (Ed.) The cellular aspects of biorhythms. Berlin: Springer.
33. Handel A.M. and Konopka R.J. (1979). Transplantation of a circadian pacemaker in *Drosophila*. *Nature* 279:236-238.
 34. Hasegawa K., Tanakadate A., and Ishikawa H. (1990). Circadian locomotor activity in an isolated cell of *Paramecium*. *Prog. Clin. Biol. Res.* 341-B:707-715.
 35. Hoffer M. A. and Shair H. (1982). Control of sleep-wake states in the infant rat by features of the mother-infant relationship. *Devel. Psychobiol.* 15:229-243.
 36. Johnson C.H., Miwa Y., Kondo T., and Hastings J.W. (1989). Circadian rhythm of photoaccumulation in *Paramecium bursaria*. *J. Biol. Rhythms.* 4(4) 405-415.
 37. Klein D.C., Moore R.Y. and Reppert S.M. (1991). (eds) *Suprachiasmatic Nucleus: The mind's clock*. New York, Oxford University Press.
 38. Kleinknecht S. (1985). Lack of social entrainment of free-running circadian activity rhythms in the Australian sugar glider (*Peraurus breviceps*: marsupialia). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16:189-193.
 39. Konopka, R.J. (1979). Genetic dissection of the *Drosophila* circadian system. *Fed. Proc.* 38:2602-2605.
 40. Konopka R.J. and Benzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58:2112-2116.
 41. Lee H.J. and Wu Y.L. (1994). Mating effects on the feeding and locomotion of the German cockroach *Blattella germanica*. *Physiol. Entomol.* 19:39:45.
 42. Lin T.M. and Lee H.J. (1996). The expression of locomotor circadian rhythm in female German cockroach *Blattella germanica* (L.). *chronobiol. Int.* 13(2) p81-91.
 43. Lobban M.C. (1960). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25,325; In: *Circadian Clocks*, J. Aschoff, ed. North Holland, Amsterdam, 1965. p.p. 219-227.
 44. Mellon D.F. and S.D. Munger (1990). Nontopographic projection of olfactory sensory neurons in the crayfish brain. *J. Comp. Physiol.* 296:253-262.
 45. Mellor Jr. D.F. and V.E. Alones (1997). Response properties of higher level neurons in the central olfactory pathway of the crayfish. *J. Comp. Physiol.* 181:205-216.
 46. Menaker M. and Eskin A. (1966). Entrainment of circadian rhythms by sound in *Passer domesticus*. *Science.* 154:1579-1581.

47. Miwa I., Nagatoshi H., and Horie T., (1987). Circadian rhythmicity within single cells of *Paramecium bursaria*. *J. Niol. Rhythms*. 2(1) 57-64.
48. Moore-Ede M.C. and Sulzman F.M. (1981). Internal Temporal Order. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology, 4 Biological Rhythms*, J. Aschoff, ed. Plenum Press, New York and London. p.p. 215-238.
49. Moreno-Sáenz E., Fuentes-Pardo B. and Hernández-Falcón J. (1992). Photoentrainment of the circadian rhythm in the electroretinogram of the crayfish and its dependence on the sinus gland. *J. Exp. Zool.* 264:144-152.
50. Moritz R.F.A. and Sakofski F. (1991). The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29:361-365.
51. Morse D., Milos P.M., Roux E., and Hastings J.W. (1989) Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyalax* involves translational control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(1) 172-6
52. Mrosovski N. (1989). Nonphotic enhancement of adjustment to new light-dark cycles: Masking interpretation discounted. *J. Biol. Rhythms.* 4: 365-370.
53. Nishitsutsuji-Uwo J., S.P. Petropulos and Pittendrigh C.S. (1967). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach I. Role of the pars intercerebralis. *Biol Bull* 133:679-696.
54. Page T.L. (1982). Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. *Science* 216:73-5.
55. Pittendrigh C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor symp. on Quant. Biol.*, 25:159-184.
56. Pittendrigh C.S. (1965). Biological clocks: The functions, ancient and moder, of circadian oscillations. *Science in the sixties*. Proceedings of the 1965 couldcroft symposium. Air Force Office of Scientific Research pp. 96-111.
57. Pittendrigh C.S. (1981). Circadian systems: Entrainment. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology, 4 Biological Rhythms*, J. Aschoff, ed. Plenum Press, New York and London. p.p. 95-123.
58. Pittendrigh C.S. and Bruce V.G. (1957). An oscillator model for biological clocks. In: D. Rudnick, (Ed), 1957. *Rhythmic and cynetetic peocesses in growth*. Pricenton: Princeton U.P.

59. Ralph M.R. and Lehman M.N. (1991). Transplantation: A new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends. Neurosci.* 14:362-66.
60. Reppert S.M. and D.R. Weaver (1991). A biological clock is oscillating in fetal suprachiasmatic nuclei. In: Klein D.C., R.Y. Moore y S.M. Reppert *Suprachiasmatic Nucleus. The mind's clock.* Oxford university press, New York 405-418.
61. Rusak B. and Zucker Y. (1975). Biological rhythms and animal behavior. *Annual Rev. Psychol.* 26:137-171.
62. Sánchez J.A. and Fuentes-Pardo B. (1977). Circadian rhythm in the amplitud of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56:601-605.
63. Sandeman D.C. and S.E. Luff (1973). The structural organization of glomerular neuropile in the olfactory and accessory lobes of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Ana.* 142:37-61.
64. Sinha S. (1981). A linear oscillator model for circadian rhythms: Implications for phase response curves. *Cronobiologia.* 8(4) 377-91.
65. Siwicki K.K., Strack S., Rosbask M., Hall J.C., and Jacklet J.W. (1989). An antibody to the *Drosophila* period protein recognized circadian pacemaker neurons in *Aplysia* and *Bulla*. *Neuron.* 3(1):51-8.
66. Sweeney B. and J.W. Hasting. (1960). Effect of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25:87-104.
67. Takahashi J.S., Murakami N., Nikaido S.S., Pratt B.L. and Robertson L.M. (1989). The avian pineal, a vertebrate model system of the circadian oscillator: Cellular regulation of the circadian rhythms by light, second messengers, and macromolecular synthesis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 45:279-352.
68. Truek F.W. and Losee-Olson S.H. (1987). Dose response curve for the phase-shifting effect of triazolam on the mamalian circadian clock. *Life Sci.* 40 (11):1033-1038.
69. Truman J.W. (1974). Physiology of insect rhythms IV: Role of the brain in the regulation of flight rhythm of the giant silkmths. *Journal of Comparative Physiology.* 95:281-296.
70. Winfree A.T. (1967). Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. Theor. Biol.* 16:15-42.
71. Winfree A.T. (1980). *The geometry of biological time.* Berlin: Springer-Verlay.

72. Yu Q., A.C. Jacquier, Y. Citri, M. Hamblen, J.C. Hall and M. Rosbash. (1987). Molecular mapping of point mutations in the period gene that stop or speed up biological clock in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 784-788.
73. Zimmerman N. H. and Menaker M., (1979). The pineal gland: A pacemaker within the circadian system of the house sparrow. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:999-1003.

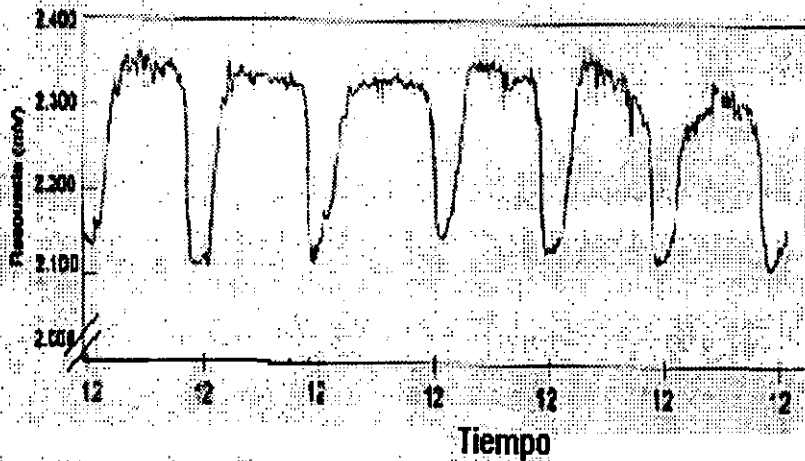


Figura 1. Registro del ritmo circadiano de amplitud del ERG de un acocil macho, adulto, colocado en condiciones constantes de temperatura (16°) y oscuridad (00) (sólo interrumpida por los destellos luminosos de prueba). Abcisas: Tiempo. Ordenadas: Voltaje del ERG. Nótese que las características del ritmo corresponden a las de un animal nocturno (ver texto).

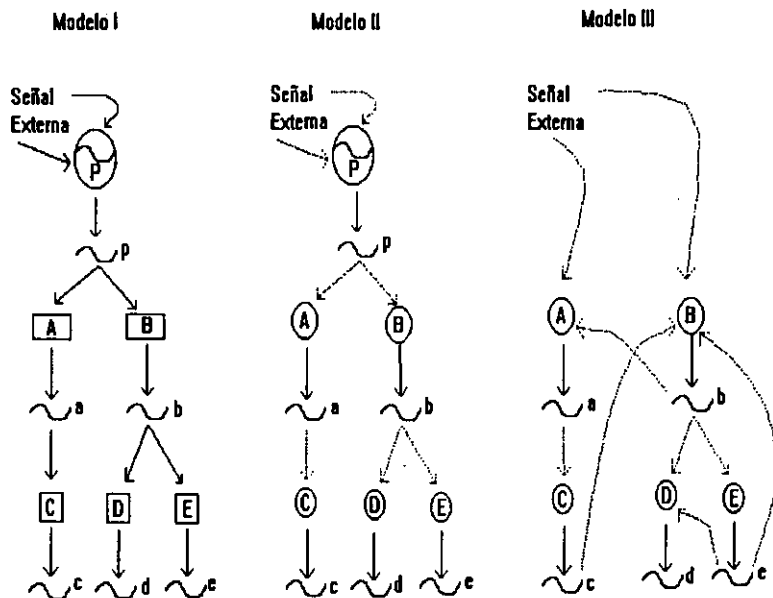







Figura 2. Modelos de sistemas circadianos; el símbolo  representa una estructura celular capaz de oscilar en forma endógena; el  representa una estructura celular que sigue las oscilaciones en forma pasiva; la figura  indica la oscilación de un mediador químico;  indica la vía sincronizadora hacia el oscilador endógeno;  indica la dirección de la fuerza oscilatoria; P es el marcapaso; Modelo I, sistema oscilatorio con sólo 1 oscilador; Modelo II, sistema con osciladores múltiples arreglados en forma jerárquica; Modelo III, sistema con osciladores múltiples arreglados en forma no jerárquica. (Tomado de Moore-Ede, 1981).

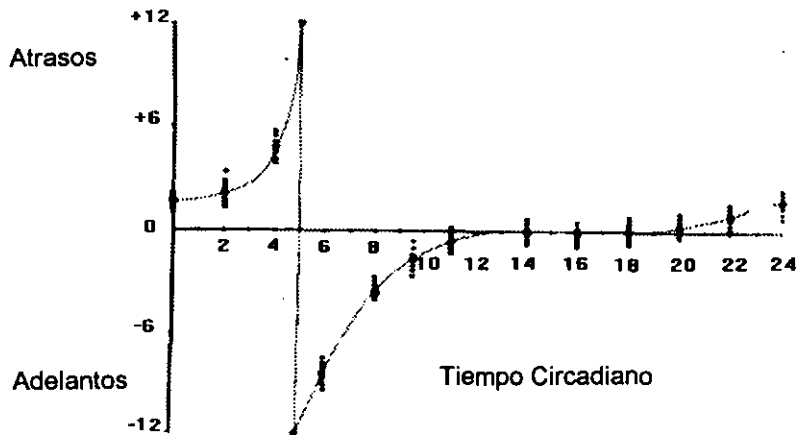


Figura 3. Curva de respuesta de fase del ritmo circadiano del amplitud de ERG de un acocil colocado en oscuridad constante (00) ante la aplicación de estímulos luminosos únicos de 15 minutos de duración. Abscisas: Tiempo circadiano de aplicación del estímulo. Ordenadas: cambios de fase en horas. Note que la curva tiene una zona en la que sólo hay atrasos y otra en la que sólo se presentan únicamente adelantos de fase. (Fuentes-Pardo y Ramos Carvajal, 1983).

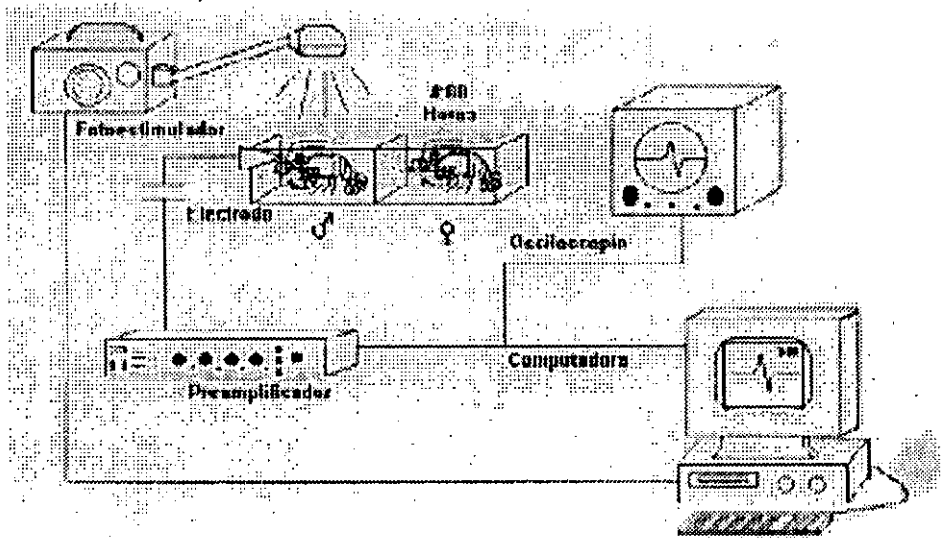


Figura 4: Sistema empleado en el registro de ERG. La computadora manda una señal cada 3 minutos a los fotoestimuladores. La respuesta al destello es recogida por un electrodo metálico y la señal amplificada pasa por un osciloscopio y llega a la computadora donde queda almacenada. Otro animal de la misma especie (estímulo) es introducido al baño de registro sin que el sujeto de experimentación pueda verlo ni haya contacto físico entre ambos.



Figura 5: Fotografía de un corte transversal del ganglio cerebroide: A) deutocerebro, B) lóbulo olfatorio.



Figura 6: Fotografía de un corte transversal del ganglio cerebroide al que se le extirpó el lóbulo olfatorio.

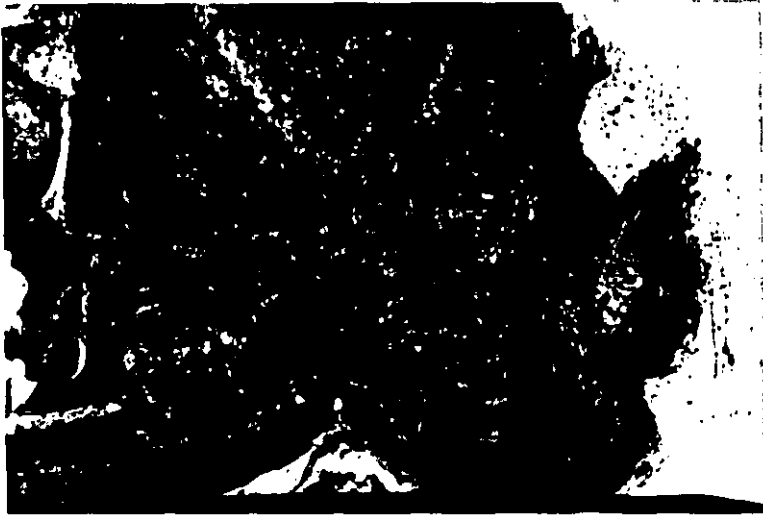


Figura 7: Fotografía de un corte transversal del ganglio cerebroides al que se le extirpó el deutocerebro completo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

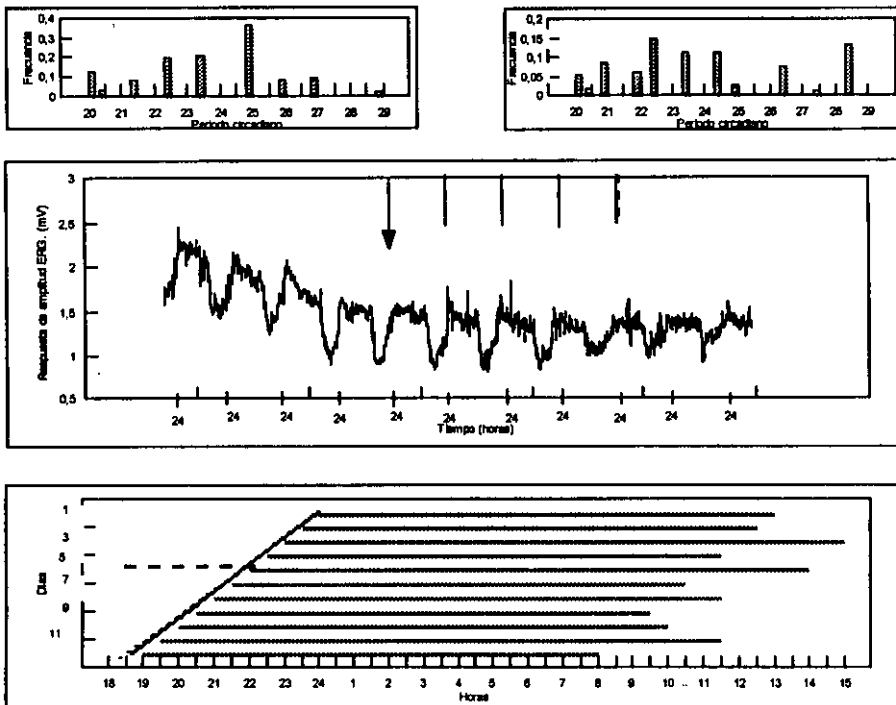


Figura 8: La gráfica central muestra el ritmo circadiano de amplitud de ERG. de un acocil macho adulto colocado en condiciones constantes de obscuridad (00) y temperatura (16°C). El cuarto día del experimento se introdujo un macho de la misma especie (indicado por la flecha) el cual permaneció en el baño de las 18 a las 22 horas. La gráfica inferior corresponde a los tiempos de inicio y duración del periodo de actividad a lo largo de todo el experimento (fase α). La falta de efecto de esta acción sobre el ritmo del ERG queda evidenciada por la ausencia de cambio en la pendiente de la recta que se prolonga hasta el cuarto día después de aplicado el estímulo. En la parte superior izquierda y derecha se presentan los periodogramas de los ciclos antes y después de la aplicación de la señal. (Ver texto).

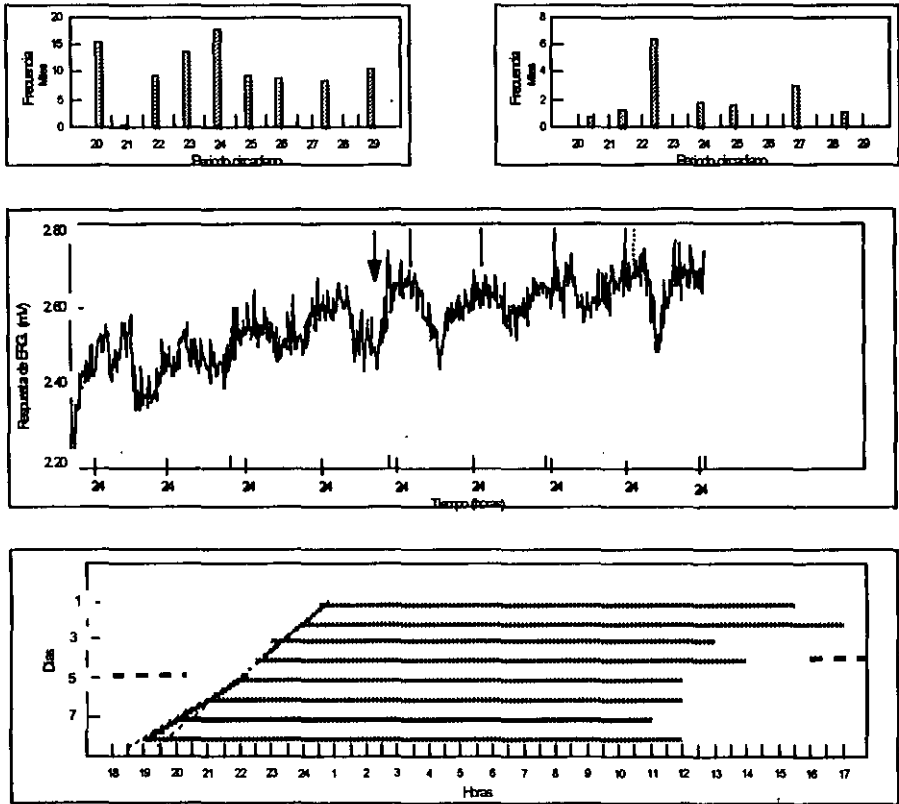


Figura 9: La gráfica central muestra 9 de 10 ciclos del ritmo circadiano de amplitud del ERG de un acodil adulto al que se le extirpó el deutocerebro y fue colocado en condiciones constantes de oscuridad (00) y temperatura (16°C). La flecha señala el momento en que se introdujo en el baño una hembra de la misma especie. La gráfica inferior muestra los tiempos de inicio y duración de la fase de actividad (fase α) a lo largo del registro. En la parte superior izquierda y derecha se presentan los periodogramas de los ciclos antes y después de la aplicación de la señal. (Ver texto).

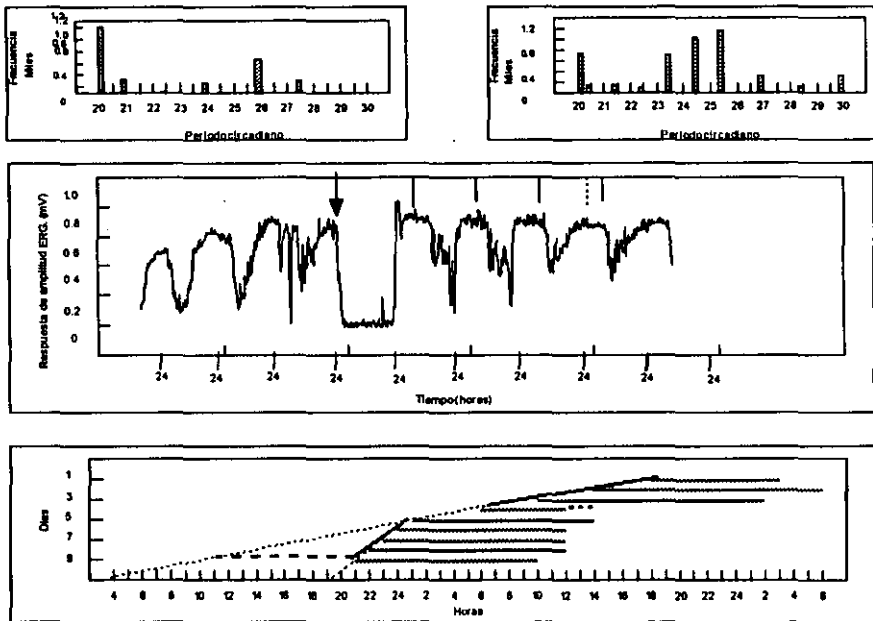


Figura 10: La parte central muestra el ritmo circadiano de amplitud de ERG de un acocil macho adulto colocado en condiciones constantes de oscuridad (00) y temperatura (16°C). El cuarto día de experimentación se introdujo al baño de registro una hembra de la misma especie. En la gráfica inferior se muestra el inicio y la duración de los tiempos de actividad (fase α) de cada ciclo. La llegada de la hembra al sitio de registro del ERG produjo modificaciones sustanciales en la fase y el periodo del ritmo. Los periodogramas que se presentan en la gráfica superior ponen de manifiesto claras diferencias en la distribución de los periodos circadianos más significativos antes (izquierda) y después (derecha) del estímulo. (Ver texto).

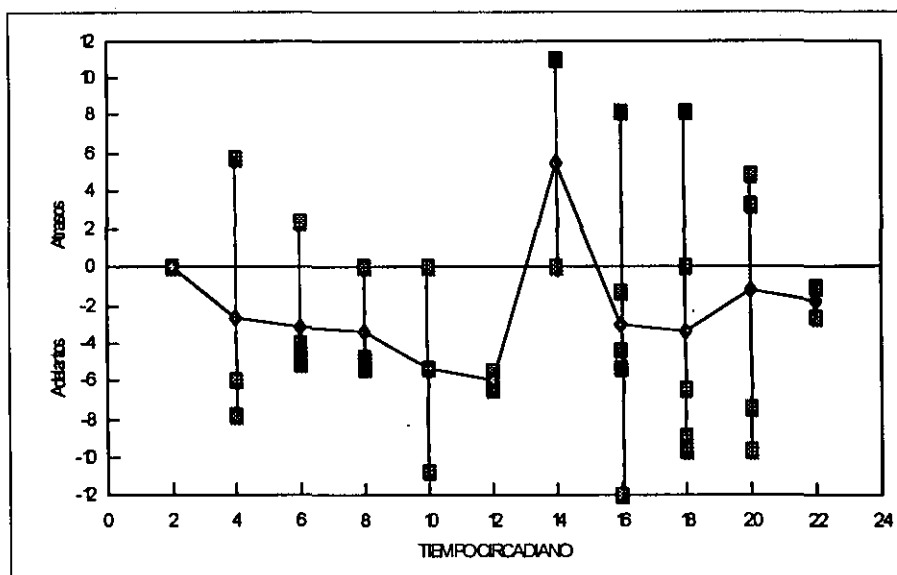


Figura 11: Curva de respuesta de fase construida con los atrasos y adelantos (ordenadas) que mostró el ritmo del ERG cuando una hembra había sido introducida al baño durante distintos tiempos circadianos del animal de experimentación (abscisas). Puede observarse que la curva no muestra ningún patrón definido ya que no hay zonas en las que prevalezcan los adelantos o en las que básicamente se detectan atrasos.

Estímulo luminoso

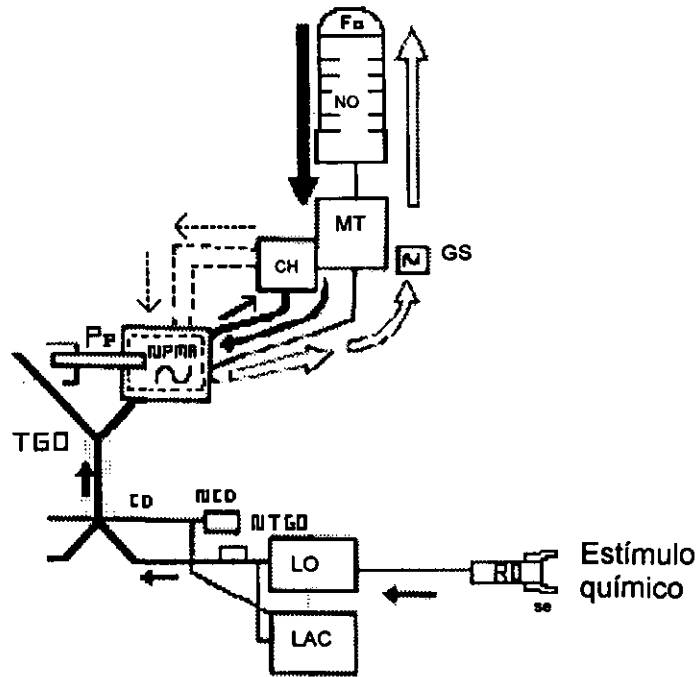


Figura 12: Diagrama que muestra las principales estructuras del sistema nervioso del acicil y las posibles rutas que participan en la sincronización del ritmo circadiano del ERG por estimulación luminosa y por señales químicas (ver texto).

Fo- Fotorreceptor
 NO- Neuropilos Ópticos
 MT- Medula Terminal
 CH- Cuerpo Hemielsoidal
 GS- Glandula Sinusal
 NPMA- Neuropilo Protocerebral Medio Anterior
 Pp- Puente Protocerebral
 TGO- Tracto Globo Olfatorio

CD- Comisura Deutocerebral
 NDC- Neuropilo de la Comisura Deutocerebral
 NTGO- Neuropilo del Tracto Globo Olfatorio
 LO- Lobulo Olfatorio
 se- Sensilla
 RO- Receptor Olfatorio
 LAC- Lobulo Accesorio

Experimentos	Tiempo	Período	Período	Diferencia	Adeiantos (-)
	Circadiano	Antes del Estímulo	Después del Estímulo	en los Periodos	Atrasos (+)
Experimento 1	2,9	23,0	22,0	1,0	0,0
Experimento 2	4,8	18,4	23,2	-4,8	-6,0
Experimento 3	5,3	22,0	22,6	-0,6	-7,8
Experimento 4	5,7	25,0	24,0	1,0	5,7
Experimento 5	6,1	20,0	21,3	-1,3	-5,1
Experimento 6	6,3	26,1	21,1	5,0	-4,6
Experimento 7	6,4	26,0	26,0	0,0	-4,6
Experimento 8	6,8	19,0	18,3	0,7	-4,0
Experimento 9	7,0	21,4	22,3	-0,9	2,4
Experimento 10	8,0	21,4	21,3	0,1	0,0
Experimento 11	8,0	24,4	23,5	0,9	-4,8
Experimento 12	9,0	25,3	22,8	2,5	-5,4
Experimento 13	10,8	23,0	24,3	-1,3	-10,8
Experimento 14	11,5	21,7	23,1	-1,4	0,0
Experimento 15	11,7	25,7	25,7	0,0	-5,4
Experimento 16	13,0	23,2	26,1	-2,9	-5,5
Experimento 17	13,6	20,6	20,0	0,6	-6,5
Experimento 18	14,4	27,6	22,8	4,8	-11,0
Experimento 19	14,9	28,0	29,3	-1,3	0,0
Experimento 20	16,0	26,7	28,4	-1,7	-4,4
Experimento 21	16,0	25,0	27,1	-2,1	-1,3
Experimento 22	16,3	21,3	21,3	0,0	-5,4
Experimento 23	17,2	29,0	25,0	4,0	-12,0
Experimento 24	17,5	26,1	22,5	3,6	8,1
Experimento 25	18,3	22,0	24,0	-2,0	-6,5
Experimento 26	18,4	22,0	21,3	0,7	-8,9
Experimento 27	18,9	27,0	29,0	-2,0	8,2
Experimento 28	19,0	27,2	26,0	1,2	-9,6
Experimento 29	19,2	24,8	27,5	-2,7	0,0
Experimento 30	20,1	26,6	24,3	2,3	-7,5
Experimento 31	20,2	23,5	22,5	1,0	-9,7
Experimento 32	20,8	23,2	22,8	0,4	3,2
Experimento 33	20,8	20,6	22,2	-1,6	4,8
Experimento 34	21,2	24,6	25,3	-0,7	3,2
Experimento 35	22,0	26,2	28,0	-1,8	-2,6
Experimento 36	22,4	25,3	24,0	1,3	-1,06

Tabla 1: Resultados de los experimentos de animales machos a los que se estimuló con hembras puestas en el baño de registro en distintos momentos circadianos.