

2EJ



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DE LA ESTIMULACION LUMINICA EN EL SEXTO GANGLIO ABDOMINAL SOBRE LA RESPUESTA ELECTORRETINOGRAFICA DEL ACOCIL JUVENIL *Procambarus clarkii*, IMPLICACIONES CIRCADIANAS”

### TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

**GISELA GOMEZ LIRA**



27/2/76  
SECCION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



INSTITUTO NACIONAL  
VENEZOLANO  
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: **EFFECTO DE LA ESTIMULACIÓN LUMÍNICA EN EL SEXTO GANGLIO ABDOMINAL SOBRE LA RESPUESTA ELECTORRETINOGRÁFICA DEL ACOCIL JUVENIL Procambarus clarkii, IMPLICACIONES CIRCADIANAS.**

realizado por **GISELA GÓMEZ LIRA**

con número de cuenta 9215763-9 , pasante de la carrera de **BIOLOGÍA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. MANUEL MIRANDA ANAYA

Propietario

Dr. RENÉ CÁRDENAS VÁZQUEZ

Propietario

Dra. MARÍA LUISA FANJUL MOLES

Suplente

Dra. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Suplente

Biol. JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

Consejo Departamental de **BIOLOGÍA**

*Edna María Suárez Díaz*  
Dra. Edna María Suárez Díaz

*[Handwritten signatures and initials]*  
René Cárdenas Vázquez  
Mano Lira  
W. S. L. G.  
J. A. P.

**El presente trabajo fue desarrollado en el  
Laboratorio de Neurofisiología Comparada,  
de la Facultad de Ciencias, UNAM,  
bajo la dirección del  
Dr. Manuel Miranda Anaya.**

## AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quisiera agradecerle a mi director de tesis, el Dr. Manuel Miranda Anaya, por aceptar dirigirme en la realización de este proyecto, así como por todo el apoyo que me ha brindado, aun fuera de México en todas las decisiones que he tomado, demostrándome que es un gran amigo.

Quisiera agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM, donde entre en contacto con la investigación y aprendí a trabajar con entusiasmo y amor a la Ciencia con el ejemplo de la Dra. Ma. Luisa Fanjul Moles, una mujer de gran capacidad y tenacidad, que nos brinda a cada uno de los miembros del laboratorio todo el apoyo para que nos desarrollemos en el difícil camino de la investigación. De igual manera le agradezco al Biólogo Julio Prieto, un gran maestro, que influyo directamente en mi gusto por la fisiología, al ser alumna en su clase. También quiero agradecer a Elsa, Oscar, Carolina, Inés, Beatriz, Abud, Octavio y Ma. Elena por el apoyo que siempre me brindaron y por que hicieron que el ambiente de trabajo fuera inmejorable.

A mis sinodales quiero darles un agradecimiento especial, por aceptar revisar mi trabajo y por todas las críticas que realizaron al mismo, ya que sin sus comentarios no se habría podido lograr. Gracias a la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte y al Dr. René Cárdenas Vázquez, investigadores ejemplares de nuestra universidad.

A mi familia que le debo todo, le agradezco profundamente por todo el apoyo y cariño que me han dado a lo largo de toda mi vida en todas mis decisiones que en algún momento he tomado y por que nunca han dejado de creer en mi. Gracias a mi Padre a mi Madre y a mi hermano, a quienes quiero darles la satisfacción de terminar mi carrera. Y no sólo ellos han sido un gran estímulo en mi vida, sino también mis abuelos y tíos, quienes siempre me impulsaron para lograr mis metas y objetivos.

Hay otro grupo de personas que han sido muy importantes en mi vida, un grupo de verdaderos amigos que logre cultivar desde mis años en el CCH-Oriente, y que siempre me han impulsado y estimulado para ser la mejor en todo lo que yo haga, no voy a mencionar sus nombres por que no es necesario, ellos saben a quien me refiero y saben lo que para mi han significado.

A mis amigos de la Facultad, con quien compartí cuatro años de mi vida y con quienes disfrute la carrera, también quiero agradecerles todos los momentos buenos y malos que pasamos juntos.

Por último quiero agradecerle su apoyo, comprensión, cariño y amistad a una persona muy especial para mí, mi mejor amigo, quien a pesar de todo, siempre ha estado junto a mí en los momentos más importantes de mi vida y a quien le debo en gran parte el haber logrado esta meta, al ser un motivo más para ello.

## Índice

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	7
Historia de los ritmos circadianos	
Características Generales de los ritmos circadianos	
Organización General del Sistema Nervioso del Acocil.....	11
El ojo compuesto del acocil (Fotorreceptor retiniano)	
Regulación neuroendócrina en el pedúnculo ocular del acocil	
Regulación endocrina de la sensibilidad visual en el acocil	
Electrorretinograma en el acocil (ERG).....	20
Fotorreceptor Caudal (FRC) en el Sexto Ganglio Abdominal.....	23
Sincronización del ritmo ERG.....	24
Planteamiento del problema.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	28
Materiales y Métodos.....	29
Obtención y cuidado de los animales en le laboratorio	
Obtención del elctrorretinograma	
Análisis de resultados	
Resultados.....	33
Discusión.....	47
Conclusiones.....	54
Referencias Bibliográficas.....	55

## RESUMEN

•El fotorreceptor extrarretiniano localizado en el sexto ganglio abdominal del acocil *Procambarus clarkii*, ha causado gran interés desde su descubrimiento en 1934. Desde entonces un gran número de investigadores han tratado de dilucidar la funcionalidad de este fotorreceptor. Entre sus más interesantes características esta su influencia sobre los fotorreceptores retinianos, particularmente en su influencia sobre la amplitud del electroretinograma (ERG).

El objetivo de este trabajo es dilucidar la relación entre la variación de la amplitud del ERG, cuando el fotorreceptor extrarretiniano del sexto ganglio abdominal es estimulado con pulsos de luz blanca de intensidad y duración controlada, así como observar, de que manera tal respuesta es modificada durante diferentes horas del día. Para ello, pulsos de luz de distinta intensidad (1, 10, 100 y  $600 \text{ Wm}^{-2}$ ) fueron usados en animales distintos, bajo condiciones controladas de luz y temperatura. La respuesta electroretinográfica fue obtenida cada 3 minutos y la estimulación lumínica en el sexto ganglio abdominal cada 4 horas. Los parámetros como variación en la amplitud del ERG, latencia e intervalo de transición fueron evaluados. Los resultados de este trabajo indican que el fotorreceptor extrarretiniano, localizado el sexto ganglio abdominal, provoca variaciones en la amplitud de la respuesta del ERG al ser estimulado con luz blanca. La magnitud de tales variaciones depende de la hora del día y de la intensidad utilizada. Lo anterior implica que el sistema circadiano que controla el ritmo de amplitud del ERG en el acocil es afectado por el sexto ganglio. Mostrando una relación fisiológica entre las estructuras fotorreceptoras y, que varias estructuras neurosecretoras están implicadas en esta relación, alterando la dispersión de los pigmentos retinianos.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución todos los organismos han estado sometidos a la temporalidad ejercida por los cambios ambientales cíclicos, esto se manifiesta en toda la diversidad biológica. Así el reloj biológico representa la capacidad de medir el tiempo internamente y de establecer una relación con el tiempo externo para lograr la sincronización entre los procesos fisiológicos y los factores ambientales.

Los movimientos de rotación y de translación de la Tierra producen cambios cíclicos en la distribución de diferentes formas de energía, como la luz y el calor, generalmente, tales oscilaciones presentan diferentes periodos (24 horas o un año), de manera que la mayoría de los seres vivos estamos expuestos a estas fluctuaciones. Durante la evolución de los seres vivos, el orden temporal presente en el ambiente introdujo cierta periodicidad externa sobre los primeros grupos celulares al influir en los sistemas metabólicos primitivos, regulando la presencia o ausencia de alguna sustancia a cierta hora del día, o interviniendo en el funcionamiento de las asas de retroalimentación negativa que los componen (Pittendrigh, 1984), originando programas temporales genéticamente determinantes en los organismos, quienes desarrollaron la capacidad de manejar la información externa y medir el tiempo. Es por ello que los ciclos biológicos son tan semejantes a los ciclos geofísicos, ya que manifiestan la temporalidad ambiental; mientras que las diferencias que se observan entre ellos se deben a la variabilidad intrínseca de cada organismo (Aguilar, 1993).

De esta manera, cualquier sistema biológico que presenta una oscilación sostenida por un sistema activo y que continua aún cuando la energía es constante, entonces puede ser propuesto como un sistema con un ritmo endógeno, a diferencia de un ritmo generado exógenamente que necesita de una referencia periódica de señales externas para expresarse (Aschoff, 1984).

## ANTECEDENTES

### HISTORIA DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Por siglos se creyó que los cambios cíclicos en los organismos se debían exclusivamente a que manifestaban las variaciones cíclicas en los factores ambientales, como la alternación de la luz y la oscuridad en el ciclo diario o del calor y el frío a lo largo de las estaciones del año. No fue sino hasta el siglo XVIII cuando los científicos de la época comenzaron a cuestionarse el origen endógeno de los ritmos biológicos. En 1729, el astrónomo francés J. J. de Mairan reportó que los cambios cíclicos en la posición de las hojas del heliotropo, persisten aún después de colocar a las plantas en condiciones de oscuridad constante. Posteriormente Candall, reportó que los ritmos biológicos diarios que persisten en condiciones constantes de iluminación difieren del ciclo de las 24 horas, al observar que los movimientos de las hojas de *Mimosa pudica* en oscuridad constante tienen un periodo de 22-23 horas. Por otra parte Bunning demostró que la periodicidad biológica es transmitida de generación en generación de acuerdo con las leyes de la Genética, al obtener productos híbridos de dos variedades genéticamente diferentes de *Phaseolus* (con periodos de 23 y 27 horas en el ciclo de movimiento de tallos y hojas) con periodos de 25 horas (citados en Moore-Ede et al., 1982; Reinberg y Smolensky, 1993;).

A la persistencia de la ritmicidad biológica, con una ligera pero significativa variación con respecto al periodo que la caracteriza, se ha denominado oscilación espontánea, comúnmente conocido como "free running" (Aguilar, 1993). El periodo de oscilación espontánea de un ritmo biológico se aproxima ligeramente al periodo de los ciclos ambientales a los que se ajusta. El termino circadiano "alrededor de un día" fue introducido por Halberg en 1959 para referirse a aquellos ritmos u oscilaciones endógenos con un periodo cercano a las 24 horas (Aschoff, 1984; Aguilar, 1993).

Son muchos los ritmos que presentan un periodo alrededor de las 24 horas y un año, sin embargo se han demostrado ritmos tanto ultradianos (con un periodo menor a 24 horas) como infradianos (más de 24 horas). Entre ellos hay 4 ritmos asociados a los ciclos geofísicos de las mareas, las fases de la luna y las estaciones. Manifestándose en los sistemas biológicos con ritmos circamareales, circalunares y circanuales de los sistemas biológicos (Aschoff, 1984).

### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS**

El concepto de reloj biológico surge de la hipótesis de que, una o varias estructuras orgánicas funcionan como marcapasos y son capaces de imponer periodo y fase a los diferentes procesos orgánicos. Donde los relojes biológicos presentarían dos funciones principales, por un lado al tener la capacidad de reconocer el tiempo, pueden reprogramar el orden temporal interno de acuerdo a los cambios ambientales y por el otro al proveer una secuencia temporal estable en su programa de la sucesión de los eventos miden los lapsos de tiempo (Pittendrigh, 1984). Sin embargo hay investigadores, como Halberg y Reinberg que no circunscriben el concepto de reloj a una o varias estructuras, sino que el reloj es el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos con la participación de ciertas estructuras específicas (Aguilar, 1993), que cumpliría con las funciones descritas anteriormente de la misma manera.

La relación de los factores externos sobre los ritmos biológicos no fue completamente entendida sino hasta que en 1954, tanto Halberg como Aschoff introdujeron la idea de que las variaciones cíclicas ambientales son capaces de influir en la expresión de los ritmos circadianos. Los factores ambientales como luz y temperatura son capaces de imponer un periodo a la ritmicidad biológica y de establecer una relación de fase entre el ciclo ambiental y el biológico (a tales factores

se les ha llamado "zeitgeber" (dador de tiempo), sincronizadores o agentes sincronizadores). A este fenómeno se le llama sincronización y su importancia radica en que permite el ajuste entre el tiempo biológico con el geofísico, dando a los organismos la capacidad de reconocer la hora del día (Aguilar, 1993).

Existen dos mecanismos, por los cuales la luz, como agente sincronizador puede establecer su influencia sobre el reloj biológico. En el primer caso la señal sincronizadora entra al oscilador de manera continua a través de casi todo el ciclo provocando cambios en la velocidad angular del oscilador. Mientras que en el segundo caso la señal sincronizadora es breve causando cambios de fase abruptos y discretos, adelantando o retrasando el ritmo (Pittendrigh, 1984).

En 1960, J. Aschoff mostró que en una amplia variedad de especies diurnas de invertebrados y vertebrados, el periodo de la oscilación espontánea ( $\tau$ ) en condiciones de iluminación constante (LL), se acorta en especies diurnas cuando se incrementa la intensidad de la luz y se alarga en especies nocturnas. Al mismo tiempo, la relación entre la duración de la actividad y la de reposo ( $\alpha/\rho$ ) es mayor en los animales diurnos que en los nocturnos en LL. Lo que implica que a mayor intensidad de la luz, la fase de actividad dura más en los animales diurnos; además de que el periodo ( $\tau$ ) es más largo a 24 horas en animales diurnos en condiciones de oscuridad constante (DD) y más corto en animales nocturnos. Esta relación de respuestas es mejor conocida como la Regla de Aschoff, la cual parece cumplirse en muchas especies (Aschoff, 1984).

El ciclo completo de un ritmo circadiano tiene 24 horas circadianas, una hora circadiana tiene un valor de  $\tau/T$ , donde  $\tau$  es el periodo del ritmo biológico y T son las 24 horas del tiempo real o externo. De esta manera la oscilación es descrita en términos de Tiempo Circadiano (CT), la escala de tiempo circadiano representa la relación temporal de la variable biológica con el zeitgeber (Moore-Ede et al., 1982; Pittendrigh, 1984).

Para que una oscilación periódica presente en los organismos pueda ser considerada como un ritmo biológico circadiano endógeno, debe de cumplir con las siguientes características:

1. Debe de persistir en condiciones ambientales constantes y la longitud de su periodo no es exactamente igual a la longitud del periodo del ciclo geofísico que refleja.
2. El ritmo sincroniza a factores ambientales de luz y temperatura constantes, que presentan un  $T = 24$  horas, sin embargo hay otros agentes como el sonido y los factores sociales; que son capaces de sincronizar un ritmo biológico. La influencia de las variaciones ambientales sobre el ritmo biológico varía según la hora o fase del ciclo a la cual se estimulo.
3. Un ritmo biológico presenta compensación de temperatura. Es decir, el organismo presenta un  $Q_{10}$  de aproximadamente 1.0 ante cambios de temperatura de  $10^{\circ} C$ .

## ORGANIZACION GENERAL DEL SISTEMA NERVIOSO EN EL ACOCIL.

El acocil presenta un sistema nervioso característico de los crustáceos macruros, el cual consiste de un doble cordón nervioso ventral y una serie de ganglios pareados que van desde la región cefálica a la caudal (Figura 1a). Los tres primeros ganglios torácicos están fusionados en el ganglio supraesofágico y se unen al ganglio subesofágico a través de las comisuras circumesofágicas. Además de 5 ganglios torácicos y 6 abdominales no fusionados (Holdich y Lowery, 1988).

El ganglio supraesofágico (ganglio cerebroide o cerebro) se divide en protocerebro, deutocerebro y tritocerebro; la división esta asociada con la evolución de los órganos de los sentidos (Holdich y Lowery, 1988). El protocerebro anterior se conecta con los pedúnculos oculares inervando la región óptica. Cada pedúnculo se puede subdividir en cinco neuropilos: la lamina, la medula externa, la medula interna la medula terminal y el cuerpo hemielipsoidal (Figura 1b). Estas dos últimas estructuras son derivados embriológicos del protocerebro medio (conocido como el protocerebro externo) y son capaces de tomar parte en el proceso visual (Sanderman, 1990).

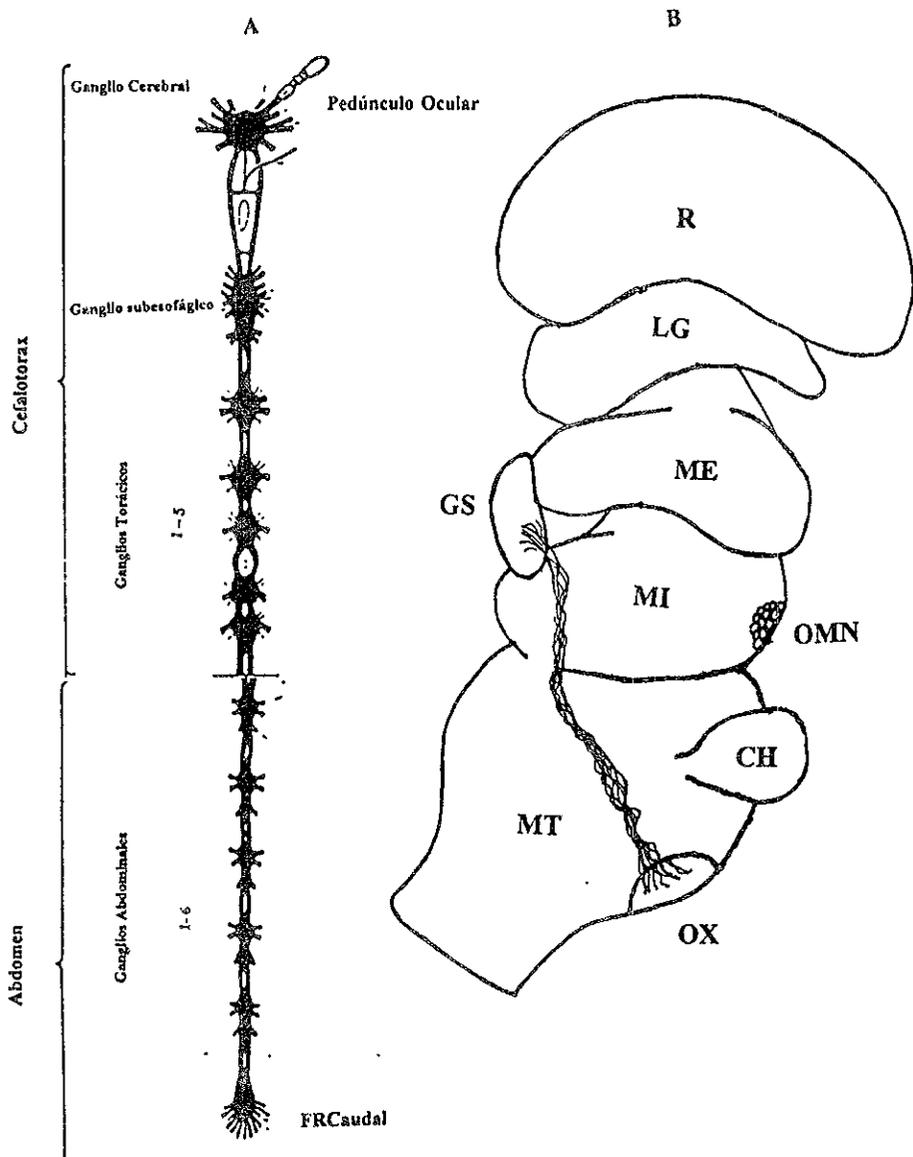


Figura 1. A. Esquema de los ganglios céfalicos, torácicos y abdominales en el Sistema Nervioso del acocil, además del Pedúnculo Ocular (Modificado de Bliss, 1982). B. Esquema del lóbulo óptico del acocil adulto. Retina (R), Lamina Ganglionaris (LG), Médula Externa (ME), Médula Interna (MI), Médula Terminalis (MT), Glándula Sinusal (GS), el Cuerpo Hemi-elipsoidal (CH), el Órgano Medular Neurosecretor (OMN) y el Organo X (OX) (Modificado de Aréchiga, 1983).

## EL OJO COMPUESTO DEL ACOCIL (Fotorreceptor retiniano)

Los fotorreceptores retinianos del acocil, localizados a ambos lados del rostrum, móviles y pedunculados cumplen con las características inherentes a cualquier célula fotorreceptora para captar la luz, absorben cuantos de luz en sistemas membranosos especializados ricos en fopigmentos moleculares. En estos fotorreceptores se transduce el estímulo luminoso en señales eléctricas (Hartwin, 1986; Eckert et al., 1989).

Al igual que los fotorreceptores de otros organismos como los trematodos, cefalópodos e insectos, en los crustáceos los fotorreceptores se desarrollaron a partir de algún tipo de microvellosidades derivadas de procesos flagelares, perteneciendo a los receptores rabdoméricos (Eakin, 1966).

La unidad funcional del ojo compuesto del acocil es la omatidia (Figura 2a), la cual está compuesta por un par de células corneales, un cono cristalino, un tracto corneal y ocho células retinulares formando un largo rabdomo, además de células accesorias pigmentarias (Holdich y Lowery, 1988; Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993).

La superficie del ojo está cubierta por una córnea, que forma el límite entre el medio externo y el medio interno, observándose en su cara externa las subdivisiones omatidiales formando las facetas corneales. Bajo la córnea se encuentra el cono cristalino, siendo el enlace entre la córnea y las células fotorreceptoras. Es una estructura acuosa transparente, compuesta generalmente por 4 células del cono cristalino (Shaw y Stowe, 1982). Debajo de la córnea y el cono cristalino, se encuentra el rabdomo, una extensión de la superficie membranosa de las células retinulares donde se lleva a cabo la fotorrecepción. El rabdomo está formado por más de 1000 microvilli, pequeñas membranas tubulares unidas muy estrechamente. Estos microvilli son perpendiculares al eje óptico de la omatidia y paralelos a los planos horizontal y vertical. Mientras que las células rabdoméricas R2, R3, R6 y R7 son

verticales; las células R1, R4 y R5 son horizontales. Estos receptores terminan en la lamina ganglionaris, la cual esta formada por dos capas plexiformes, compuestas de neuronas monopolares y las terminales de las 7 células receptoras (R1-R7) proyectadas desde una sola omatidia y una red de canales vasculares llenos de hemolinfa bajo la lamina. La célula R8, con relación a las demás células se encuentra considerablemente reducida y en una posición distal y excéntrica (Shaw y Stowe, 1982; Sabia y Glantz, 1985). Los rbdomeros se fusionan para formar el rbdomo central (Holdich y Lowery, 1988).

Además, los ojos compuestos del acocil están dotados de tres tipos de pigmentos accesorios, que modulan el flujo de fotones a las membranas fotosensibles en los rbdomos localizados en la omatidia. Uno de estos pigmentos esta compuesto por gránulos blanquecinos que reflejan la luz; los otros dos pigmentos son: el pigmento distal (PD), un tipo de gránulos oscuros localizados a lo largo de la omatidia, del final de la córnea hasta terminar en la membrana basal. Y el pigmento proximal (PP), localizado dentro de las células fotorreceptoras (Aréchiga, 1983). En cuanto al tipo de pigmentos visuales que existen en el ojo compuesto del acocil, se ha reportado que al hacer extracciones con cloroformo, tanto en ojos adaptados a la luz como a la oscuridad, se ha obtenido retinal1, un cromóforo diferente a la rodopsina de los vertebrados. En *Procambarus clarkii* se ha encontrado que el pico de máxima absorbancia se encuentra entre los 556-570nm, es decir, el pigmento en los ojos de estos acociles absorbe en un espectro más cercano al rojo. Se ha observado también un pico de sensibilidad cerca de los 450nm, lo que sugiere que hay receptores al azul, que podrían contribuir a aumentar la sensibilidad espectral de estos organismos en la oscuridad (Wald, 1967).

Posteriormente Suzuki y colaboradores (1985) reportaron que en los ojos de acociles hay un tipo de cromóforo diferente al retinal, el 3-dehidrorretinal. El cual presenta variaciones estacionales en su contenido, ya que en verano se presentaba una menor cantidad con respecto al resto del año. En relación con esta diferencia en

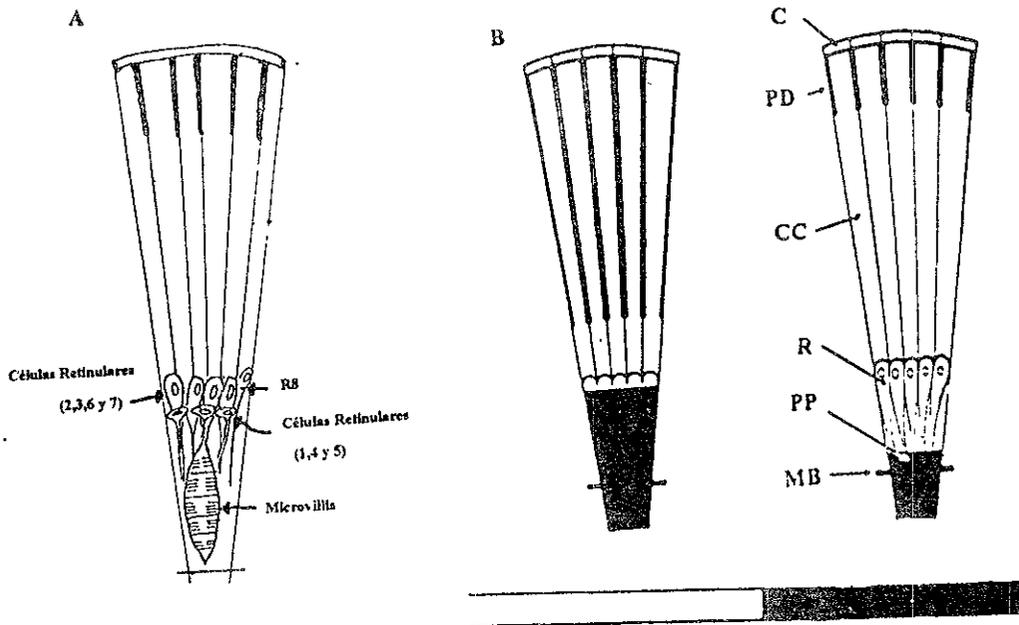


Figura 2 A. Esquema del ojo compuesto del acocil, donde se observan los componentes del fotorreceptor retinal. B. Representación del ojo en condiciones de iluminación (izquierda) y bajo oscuridad (derecha). Cornea (C), Pigmento Distal (PD), Cono Cristalino (CC), Células Retinulares (R), Pigmento Proximal (PP), Membrana Basal (MB).  
(Modificado de Archiga y Rodríguez-Sosa. 1997)

los picos de máxima absorción, se ha observado que en verano es de 560nm, mientras que en invierno es de 600nm (Nosaki, 1969; Hariyama y Tsukanbara, 1988).

Esto se ha explicado como el resultado de las combinaciones que se dan a lo largo del año entre la opsina presente en el ojo y el retinal o el 3-dehidrorretinal. Así, en verano se presenta la unión entre la opsina y el 3-dehidrorretinal formando un pigmento con una  $\lambda_{max}$  de 560nm; pero al unirse con el retinal en invierno el pigmento absorbe a una  $\lambda_{max}$  de 600nm (Hariyama y Tsukanbara, 1988).

Durante la oscuridad, el pigmento proximal se retrae hacia la lamina ganglionaris y el distal hacia la córnea, mientras que en condiciones de iluminación los gránulos son dispersados cubriendo el rabadomo (figura 2b). Sin embargo, la fisiología de ambos pigmentos es muy diferente, por ejemplo el umbral de respuestas a la luz es más bajo en el PP que en el PD, no existiendo posibilidad de que se sobrelapen los rangos de intensidad de luz a los cuales los dos pigmentos responden. Además el pigmento proximal migra como una respuesta directa de los fotorreceptores retinianos a la luz u oscuridad. Mientras que el PD por si mismo no es reactivo a la luz pero es sensible a las neurohormonas liberadas en respuesta a la luz u oscuridad. Bajo condiciones constantes existen diferencias, mientras el PP muestra variaciones circadianas de considerable amplitud bajo oscuridad constante (DD), cambia muy poco en condiciones de luz constante (LL). Al contrario, el PD presenta notables variaciones en LL y permanece casi retraído bajo condiciones constantes de oscuridad (Aréchiga, 1977; Aréchiga, et al., 1992; ).

## **REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA EN EL PEDÚNCULO OCULAR DEL ACOCIL.**

El pedúnculo ocular de los crustáceos contiene varias estructuras neurosecretoras importantes, entre ellas están el sistema órgano X-glándula sinusal y el órgano medular neurosecretor (Kirk et al, 1983; Aréchiga et al., 1985). En varios experimentos se ha observado que extractos crudos de pedúnculo ocular y glándula sinusal son capaces de disminuir la sensibilidad retinal y la amplitud del ritmo electroretinográfico. Así como de inducir la migración de los pigmentos proximales a su estado de adaptación a la luz en condiciones de oscuridad constante en el acocil *Procambarus* (Aréchiga, 1977; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997).

El sistema órgano X-glándula sinusal (OX-GS) ha sido caracterizado como un racimo de células neurosecretoras localizadas en la parte media de la médula terminalis. El soma de estas células se ubica en el órgano X y sus terminales axónicas a la glándula sinusal, la cual se localiza más distalmente, entre la médula interna y la médula externa (Glantz et al., 1983; Aréchiga et al., 1985).

## **REGULACION ENDOCRINA DE LA SENSIBILIDAD VISUAL EN EL ACOCIL.**

Varios neuropéptidos han sido aislados y caracterizados del sistema OX-GS, entre ellos se encuentran la hormona concentradora de eritróforos (ECH), la hormona hiperglicémica (HGH), la hormona de adaptación a la luz del pigmento distal (DPLH), la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH), la hormona dispersora de pigmentos (PDH) y la hormona neurodepresiva (NDH) (Glantz et al., 1983; Aréchiga et al., 1985; Gaus y Stieve, 1992). La liberación de estas neurohormonas parece estar influida por los cambios en las condiciones de

iluminación, ya que hay ciertas evidencias de que tanto la ECH, HGH, RPCH, NDH y DPLH son liberadas en respuesta al encendido de la luz (Glantz et al., 1983).

Las hormonas PDH y RPCH actúan principalmente sobre los cromatóforos integumentarios y sobre los pigmentos retinales. Esto implica que cambios rítmicos en la secreción de estas neurohormonas provocan cambios en la migración de los pigmentos, lo cual se refleja en cambios en la amplitud del electroretinograma (Aréchiga et al., 1985; Gaus y Stieve, 1992).

En 1992 Gaus y Stieve, realizaron varios experimentos para observar los efectos de varias hormonas sobre la amplitud del electroretinograma del acocil *Orconectes limosus*. Al aplicar  $5 \times 10^{-9}$  mol de RPCH la amplitud se incrementaba en un 33% del valor inicial en los 30 minutos posteriores a la aplicación. Mientras que con una alícuota similar de PDH la amplitud del ERG decrece hasta un 78 % del valor inicial. Otra hormona que provocó alteraciones notables en la respuesta de ERG fue el péptido cardiactivo de crustáceos (CCAP), la cual disminuye la respuesta inicial en un 30%, 30 min después de la aplicación de una alícuota similar (Gauss y Stieve, 1992).

Por otro lado la hormona neurodepresora localizada en el pedúnculo ocular y en otras partes del sistema nervioso central del acocil *Procambarus clarkii*, presenta un ritmo de aproximadamente 22 hrs en oscuridad constante y al igual que la DRPH, es el final de una cascada neuroendócrina disparada por estímulos luminosos induciendo la dispersión de los gránulos pigmentarios dentro de las células retinulares. Al realizar investigaciones sobre el comportamiento de estas hormonas, se encontró que ambas presentaban variaciones circadianas con un máximo en el día, contrastando con el pico de la RPCH, que presenta un pico máximo de concentración por la noche (Aréchiga et al., 1985).

En cuanto a los posioles neurotransmisores involucrados en la sensibilidad de los fotorreceptores en crustáceos se ha postulado que tanto el ácido gama-

aminobutírico (GABA) como la serotonina (5-HT) afectan la actividad de las células neurosecretoras en el acocil (Aréchiga et al., 1985; Aréchiga et al., 1990b).

El GABA es un neurotransmisor que inhibe a las células neurosecretoras del pedúnculo ocular en el acocil *Procambarus clarkii*, siendo el mediador de potenciales post-sinápticos inhibitorios (IPSP) en las células neurosecretoras del órgano medular neurosecretor (MNO), el cual consiste de 15 a 20 células espontáneamente activas en la oscuridad, localizadas en el margen de la medula interna. La inhibición de estas células al interactuar con GABA altera el control sináptico del sistema neuroendócrino del pedúnculo ocular causando que el pigmento distal se estacione en la posición de adaptación a la luz (Kirk et al., 1983). Mientras que la 5-HT se localiza en varios ganglios del sistema nervioso central (SNC) y el pedúnculo ocular de varios crustáceos, su concentración varía rítmicamente a lo largo del ciclo de 24 hrs; afectando con ello la actividad motoneuronal en el ganglio central y la neurotransmisión neuromuscular periférica. Además media la liberación de varios productos neurohormonales, esta última característica es la que posibilita que actúe sobre las células fotorreceptoras de la retina, bloqueando agentes que abolen la retracción de los pigmentos, lo cual causa que la sensibilidad del fotorreceptor se incremente (Aréchiga et al., 1990).

Al igual que cualquier otro fotorreceptor, el del acocil *Procambarus clarkii* presenta un rango de intensidades donde las células retinianas pueden responder sin saturarse codificando la intensidad, produciendo señales que se incrementan al aumentar la energía del estímulo; este es el llamado rango dinámico (Eckert et al., 1989).

Glantz (1968), encontró que la respuesta de las células fotorreceptoras del acocil a estímulos de diferentes intensidades (luz blanca  $\text{cd}/\text{pie}^2$ ) varió a lo largo de un rango de 3 unidades logarítmicas. A bajas intensidades la respuesta se eleva sigmoidalmente a un valor que es mantenido por la duración del estímulo,

incrementándose tanto la amplitud como la velocidad de incremento al aumentar la intensidad del estímulo de luz aplicado.

La amplitud del potencial receptor es aproximadamente proporcional al logaritmo del estímulo. Como una consecuencia a esta relación logarítmica, un porcentaje de cambio en la intensidad del estímulo provoca el mismo cambio porcentual en el potencial del receptor a lo largo de un amplio rango de intensidades (Eckert et al., 1989).

### **ELECTRORRETINOGRAMA EN EL ACOCIL (ERG)**

El electroretinograma (ERG) es el registro de la actividad eléctrica del ojo completo. Se obtiene a través del registro del cambio de voltaje detectado por un electrodo activo en la córnea con relación a un electrodo indiferente colocado fuera de la preparación, al estimular el fotorreceptor visual con un pulso de luz de corta duración (aproximadamente 10 ms)(Shaw y Stowe, 1982; Eckert, et al., 1989).

El ERG del acocil consiste en dos componentes H-I y H-II. El H-I es un elemento que responde solo al encendido de la luz y es un pico con potencial positivo, mientras que H-II corresponde al componente negativo y lento que varía su amplitud en relación con la duración del estímulo. (Naka y Kuwabara, 1959).

Uno de los procesos rítmicos en decápodos es el movimiento de los pigmentos accesorios (PP y PD) en el ojo compuesto del acocil, que ocultan o exponen el rabdomo de la omatidia. En el acocil, tanto el pigmento proximal como el pigmento distal exhiben ritmos circadianos de movimiento en DD y su posición parece reflejarse en la amplitud del ERG, el cual exhibe también una fluctuación circadiana. La mayor amplitud del ERG se presenta cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad y una amplitud menor durante el estado de adaptación a la luz (Page y Larimer, 1975). Estas fluctuaciones en la amplitud del ritmo de ERG

incrementándose tanto la amplitud como la velocidad de incremento al aumentar la intensidad del estímulo de luz aplicado.

La amplitud del potencial receptor es aproximadamente proporcional al logaritmo del estímulo. Como una consecuencia a esta relación logarítmica, un porcentaje de cambio en la intensidad del estímulo provoca el mismo cambio porcentual en el potencial del receptor a lo largo de un amplio rango de intensidades (Eckert et al., 1989).

## **ELECTRORRETINOGRAMA EN EL ACOCIL (ERG)**

El electroretinograma (ERG) es el registro de la actividad eléctrica del ojo completo. Se obtiene a través del registro del cambio de voltaje detectado por un electrodo activo en la córnea con relación a un electrodo indiferente colocado fuera de la preparación, al estimular el fotorreceptor visual con un pulso de luz de corta duración (aproximadamente 10 ms)(Shaw y Stowe, 1982; Eckert, et al., 1989).

El ERG del acocil consiste en dos componentes H-I y H-II. El H-I es un elemento que responde solo al encendido de la luz y es un pico con potencial positivo, mientras que H-II corresponde al componente negativo y lento que varía su amplitud en relación con la duración del estímulo. (Naka y Kuwabara, 1959).

Uno de los procesos rítmicos en decápodos es el movimiento de los pigmentos accesorios (PP y PD) en el ojo compuesto del acocil, que ocultan o exponen el rabdomo de la omatidia. En el acocil, tanto el pigmento proximal como el pigmento distal exhiben ritmos circadianos de movimiento en DD y su posición parece reflejarse en la amplitud del ERG, el cual exhibe también una fluctuación circadiana. La mayor amplitud del ERG se presenta cuando los pigmentos están en posición de adaptación a la oscuridad y una amplitud menor durante el estado de adaptación a la luz (Page y Larimer, 1975). Estas fluctuaciones en la amplitud del ritmo de ERG

indican ciertos cambios en la reactividad a la luz de los fotorreceptores retinianos (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993).

En *Procambarus clarkii* se encontró que el periodo del ritmo de ERG es de aproximadamente 23-25 horas cuando los organismos se encuentran en DD, encontrándose la máxima amplitud cerca del inicio de la noche, mientras que empieza a declinar en el paso de la noche al día. Page y Larimer (1975; 1976) demostraron que el control de la oscilación del ritmo es una función de varios elementos neurales del cerebro y los lóbulos ópticos, siendo el ganglio supraesofágico un componente importante del sistema. Por otra parte en estudios posteriores se ha observado que al aplicar un estímulo lumínico en el fotorreceptor caudal, el ERG presenta variaciones de amplitud a 2 horas diferentes del día (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987).

La migración del pigmento distal en la retina depende de productos neurosecretados por el órgano X, los cuales son almacenados y liberados por la glándula sinusal; mientras que el pigmento proximal es capaz de funcionar como un efector independiente a las neurosecreciones. Esta liberación rítmica de la glándula sinusal es una vía para el control del ritmo circadiano de migración de pigmentos en el acocil y de manera consecuente del ritmo de amplitud de ERG (Page y Larimer, 1975).

El ritmo de ERG persiste en preparaciones de ojo aislado de acocil, conservando las características generales del ritmo, con un periodo de alrededor de 22 horas, presentando la máxima amplitud por la noche (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977).

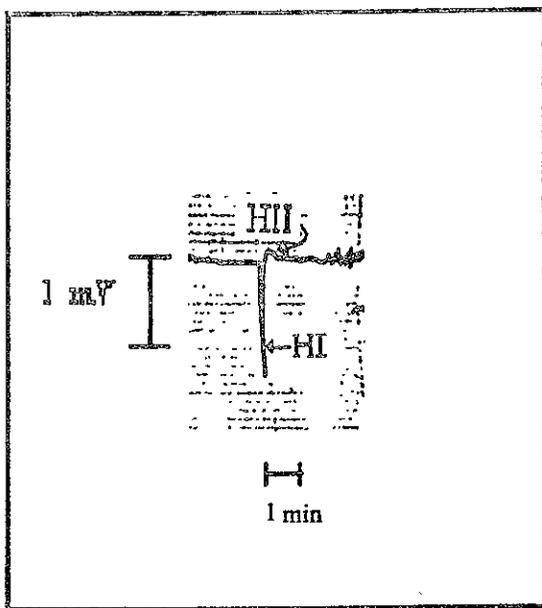


Figura 3. Electrorretinograma.

La respuesta eléctrica en las células retinulares del acocil tiene dos componentes principales HI (respuesta inmediata al estímulo luminoso) y HII (dependiente de la duración del estímulo). La respuesta mostrada se obtuvo de los registros realizados en la fase experimental de este trabajo (el componente HI es negativo y el HII es positivo, ya que se cambió la polaridad de la respuesta en el registro).

## FOTORRECEPTOR CAUDAL (FRC) EN EL SEXTO GANGLIO ABDOMINAL

El fotorreceptor caudal del acocil fue descrito por Prosser en 1934, quien realizó varios experimentos con el fin de probar la existencia de cierto tipo de fotorreceptores extrarretinianos en el cordón nervioso del acocil adulto (*Cambarus virillis*). Al explorar de manera sistemática el cordón nervioso ventral con una luz de 2 mm de diámetro y una intensidad de 200 m/cd, obtuvo la respuesta eléctrica solo al iluminar el sexto ganglio abdominal de cada organismo, además de observar un lento incremento en el número de impulsos espontáneos a lo largo del cordón nervioso. Esto evidencio que el sitio fotosensible se encontraba solo en el sexto ganglio (Prosser, 1934).

En este mismo trabajo, Prosser muestra que hay una sensibilidad diferencial de las células fotosensibles a la luz de diferente longitud de onda que aplicó sobre el fotorreceptor caudal, ya que la respuesta obtenida (número de impulsos) iba decreciendo respectivamente cuando el FRC era iluminado con luz blanca, verde, azul y naranja; no encontrando ninguna respuesta al estimular con luz roja (Prosser, 1934). Posteriormente Bruno y Kennedy en 1962, demostraron que la región del espectro donde se presentaba una respuesta máxima al iluminar el sexto ganglio estaba cerca de los 500 nm (Bruno y Kennedy, 1962).

Las características de la respuesta eléctrica también mostraban cambios al variar la intensidad de la luz, ya que al aplicar estímulos de 2 m/cd no se observo una respuesta clara, mientras que al estimular el fotorreceptor caudal con luz a una intensidad de 200 m/cd la respuesta era amplia y lenta (Prosser, 1934).

Esta respuesta eléctrica obtenida proviene de un par de neuronas fotosensibles presentes en el sexto ganglio, al ser estimuladas su patrón de descarga es tónico, cuenta con un prolongado periodo de latencia después de la descarga inicial y un largo periodo de sumación de potenciales subumbrales (Bruno y Kennedy, 1962).

Simon y Edward (1987) se encargaron de trazar los patrones de ramificación del fotorreceptor caudal del acocil a lo largo del cordón nervioso, encontrando que hay pequeñas ramificaciones dendríticas hacia el ganglio torácico y remanentes hacia el ganglio abdominal, mientras que en los ganglios subesofágico y supraesofágico las ramificaciones son más extensas (Simon y Edwards citados en Wilkens, 1988).

## SINCRONIZACIÓN DEL RITMO ERG

La sincronización de los ritmos circadianos se debe al acoplamiento de la información o señales que llegan de diversos receptores al reloj biológico, lo cual implica que debe de existir cierta comunicación entre las estructuras receptoras del estímulo y las estructuras que generan y expresan el ritmo (Fuentes-Pardo e Inclan-Rubio, 1987).

Inclan-Rubio y Fuentes-Pardo en 1987, propusieron que el fotorreceptor retiniano (FR) y el sexto ganglio abdominal son dos vías de entrada sensibles a la luz capaces de sincronizar el ritmo de ERG, dándose una relación anatómico-funcional entre ambos fotorreceptores. Esta idea es reforzada por el hecho de que estímulos luminosos sobre el fotorreceptor caudal (FRC) evocan potenciales de acción en la cadena abdominal, la cadena torácica y las comisuras circumesofágicas del sistema nervioso del acocil *Procambarus bouvieri* (Inclan-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987).

Otros autores aceptan la posibilidad de que la persistencia en la ritmicidad de liberación de algunas hormonas en animales a los cuales se les han retirado los pedúnculos oculares es una evidencia de la existencia de algún tipo de fotorrecepción extrarretiniana (Aréchiga, 1977; Glantz et al., 1983; Aréchiga et al., 1985; Aréchiga et al., 1990). Un ejemplo de ello es el ritmo de variación en la concentración de NDH, la cual se mantiene en animales sin pedúnculos oculares conservando su pico por la mañana (Aréchiga et al., 1985).

Simon y Edward (1987) se encargaron de trazar los patrones de ramificación del fotorreceptor caudal del acocil a lo largo del cordón nervioso, encontrando que hay pequeñas ramificaciones dendríticas hacia el ganglio torácico y remanentes hacia el ganglio abdominal, mientras que en los ganglios subesofágico y supraesofágico las ramificaciones son más extensas (Simon y Edwards citados en Wilkens, 1988).

## SINCRONIZACIÓN DEL RITMO ERG

La sincronización de los ritmos circadianos se debe al acoplamiento de la información o señales que llegan de diversos receptores al reloj biológico, lo cual implica que debe existir cierta comunicación entre las estructuras receptoras del estímulo y las estructuras que generan y expresan el ritmo (Fuentes-Pardo e Inclan-Rubio, 1987).

Inclan-Rubio y Fuentes-Pardo en 1987, propusieron que el fotorreceptor retiniano (FR) y el sexto ganglio abdominal son dos vías de entrada sensibles a la luz capaces de sincronizar el ritmo de ERG, dándose una relación anatómico-funcional entre ambos fotorreceptores. Esta idea es reforzada por el hecho de que estímulos luminosos sobre el fotorreceptor caudal (FRC) evocan potenciales de acción en la cadena abdominal, la cadena torácica y las comisuras circumesofágicas del sistema nervioso del acocil *Procambarus bouvieri* (Inclan-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987).

Otros autores aceptan la posibilidad de que la persistencia en la ritmicidad de liberación de algunas hormonas en animales a los cuales se les han retirado los pedúnculos oculares es una evidencia de la existencia de algún tipo de fotorrecepción extrarretiniana (Aréchiga, 1977; Glantz et al., 1983; Aréchiga et al., 1985; Aréchiga et al., 1990). Un ejemplo de ello es el ritmo de variación en la concentración de NDH, la cual se mantiene en animales sin pedúnculos oculares conservando su pico por la mañana (Aréchiga et al., 1985).

Aréchiga (1977 y 1990) reporta que la migración del pigmento distal es la respuesta a un reflejo neuroendocrino disparado desde un fotorreceptor extrarretinal. Lo cual se refuerza por el hecho de que la liberación de la DRPH es disparada por un fotorreceptor extrarretinal con dos pigmentos involucrados, uno con pico a 480 nm y el otro con  $\lambda_{\text{max}}$  de 540 nm (Glantz et al, 1983; Aréchiga et al., 1985).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La medición del tiempo de manera circadiana se relaciona con algún tipo de sistema fotorreceptor que le permite al reloj circadiano la capacidad de sincronizarse con las variaciones naturales de fotoperiodo. Estos sistemas fotorreceptores pueden ser de naturaleza tanto retiniana como extrarretiniana.

En el acocil, el par de neuronas sensibles a la luz localizadas en el 6o. ganglio abdominal, descritas por Prosser en 1934, son un ejemplo de esta tendencia donde ciertos organismos poseen órganos sensibles a la luz diferentes a los que se encuentran en el sistema visual (Bruno y Kennedy, 1962).

El papel del sexto ganglio abdominal en la sincronización del ritmo de ERG ha sido controversial. Page y Larimer (1976) demostraron que la separación del sexto ganglio abdominal de la cadena ganglionar no altera la sincronización del ritmo ERG, concluyendo que el FRC no interviene en este proceso. Sin embargo, Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo (1987) reportaron cambios en los parámetros circadianos del ritmo de ERG, mediante la estimulación lumínica directamente sobre el sexto ganglio abdominal a 2 horas diferentes del día. Proponiendo que el fotorreceptor del sexto ganglio abdominal interviene en la sincronización del ritmo de ERG.

Lo anterior nos lleva a pensar en que, si existe una influencia importante entre los fotorreceptores extrarretinianos y la respuesta electrorretinográfica, tal influencia puede ser manifestada mediante la relación estímulo-respuesta que existe entre estos dos sistemas fotorreceptores, además de que dicha influencia tenga variabilidad en función al estado en que se encuentra el sistema circadiano que controla el ritmo del ERG en el acocil juvenil *Procambarus clarkii*.

## HIPÓTESIS

Si el 6o. ganglio abdominal del acocil juvenil *P. clarkii* interviene como un fotorreceptor circadiano en la modulación del ritmo de ERG, los cambios en la intensidad de la estimulación lumínica sobre este fotorreceptor modificarán la magnitud del ERG a lo largo del nictámero.

Si la estimulación lumínica del fotorreceptor caudal del 6o ganglio interviene en los mecanismos de regulación de la sensibilidad visual, sus efectos en amplitud serían proporcionales a la intensidad del estímulo, así como las relaciones temporales correspondientes entre el inicio del estímulo y la respuesta obtenida.

## OBJETIVOS

- Determinar si cambios en la estimulación lumínica restringida a la región del telsón influyen sobre la magnitud del ERG del acocil juvenil *P. clarkii* como aquellas reportadas para el acocil adulto (*P. bouvieri*).
- Describir la posible relación entre la intensidad del estímulo luminoso en el telsón y el cambio en la amplitud del ERG, así como la latencia, la transición de amplitud durante el pulso de luz y los efectos post pulso.
- Observar si dichos cambios varían de manera que sean dependientes del sistema circadiano que regula la sensibilidad visual en el acocil *P. clarkii*.

## **METODOLOGÍA**

### **OBTENCIÓN Y CUIDADO DE ANIMALES EN EL LABORATORIO**

Se utilizaron 16 acociles juveniles de la especie *Procambarus clarkii* sin distinción de sexo y con una talla telson-róstro aproximada entre 5 y 7.5 cm. Los organismos fueron obtenidos del campo y mantenidos en el laboratorio en acuarios de 45 X 65 X 30 cm. equipados con filtros biológicos. Los acociles estuvieron sometidos a un ciclo LD 12:12 (encendido a las 07:00 hrs) y aireación constante proporcionada por una bomba de aire. Todos los organismos estuvieron sometidos al fotoperiodo mencionado durante al menos una semana antes de cada experimento y fueron alimentados con verdura cocida y pescado.

### **OBTENCIÓN DEL ELECTORRETINOGRAMA**

El registro del electrorretinograma (ERG) fue realizado individualmente. Cada organismo fue inmovilizado utilizando un dispositivo plástico que mantuvo separadas la región abdominal y la región cefalotóracica. El acocil fue sujetado mediante un anillo de algodón entre dos placas de acrílico negro y los apéndices locomotores fueron inmovilizados con cera. El animal finalmente estuvo en una posición tal que le permitía mantener ventilación constante en la cavidad branquial, inmerso agua por debajo del nivel del rostrum y con los pedúnculos oculares expuestos en la superficie y fijos con algodón y cera (Figura 4). La fibra óptica con la cual se aplicaron los pulsos de luz, estuvo colocada en la parte del dispositivo correspondiente a la región del abdomen, la punta de la fibra estuvo a pocos milímetros de la superficie ventral del telson con el fin de reducir la dispersión de luz más allá de ésta región.

Las posibles variaciones de temperatura en la punta de la fibra fueron monitoreadas antes de cada registro, colocando un termómetro en contacto directo con la punta de la fibra óptica.

Todo el dispositivo fue colocado dentro de un refrigerador que mantuvo la preparación en condiciones constantes de oscuridad (excepto durante la aplicación de pulsos para obtener el ERG y pulsos aplicados mediante la fibra óptica). La temperatura se mantuvo constante en 15-17 °C.

En una de las córneas del acocil se implanto un electrodo de acero con una punta de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro y otro electrodo se mantuvo como referencia, sumergido en el agua de la preparación, ambos estaban conectados a un amplificador DC (Grass mod. 7P122E) el cual mandaba la señal a un polígrafo (Grass mod. 79E) y por otra parte, la señal era digitalizada y capturada por una computadora (tarjeta PC-Lab Card 812), la misma que enviaba la señal digital al estimulador. Al mismo tiempo que la computadora almacenaba los datos cada 3 minutos, la respuesta se registraba simultáneamente en papel para su posterior análisis.

El estímulo luminoso de prueba fue aplicado por un fotoestimulador (Grass mod. PS22) cada tres minutos con una intensidad de  $5.1 \mu\text{Einsteins m}^{-2}\text{s}^{-2}$ , y una duración de 10 ms, el sistema estuvo calibrado a un milivoltio por centímetro.

Una vez que se tuvo el registro del ERG de un día, cada acocil recibió un estímulo de luz blanca en el sexto ganglio abdominal mediante el uso de una fibra óptica (Dolan-Jenner mod. 170D), cuya fuente luminosa fue una lámpara de halógeno ubicada fuera del refrigerador. La intensidad fue controlada con ayuda de filtros de interferencia. La intensidad del estímulo proveniente de la fibra óptica fue calibrada con un fotómetro (Li-Cor mod. LI-189) para obtener cada una de las intensidades de luz blanca utilizadas (1, 10, 100 y  $600 \text{ Wm}^{-2}$ ). Para cada intensidad se usaron 4 individuos, registrados por aproximadamente tres ciclos cada uno. El estímulo en el telson fue aplicado durante 30 minutos a intervalos de 4 horas (24, 4,

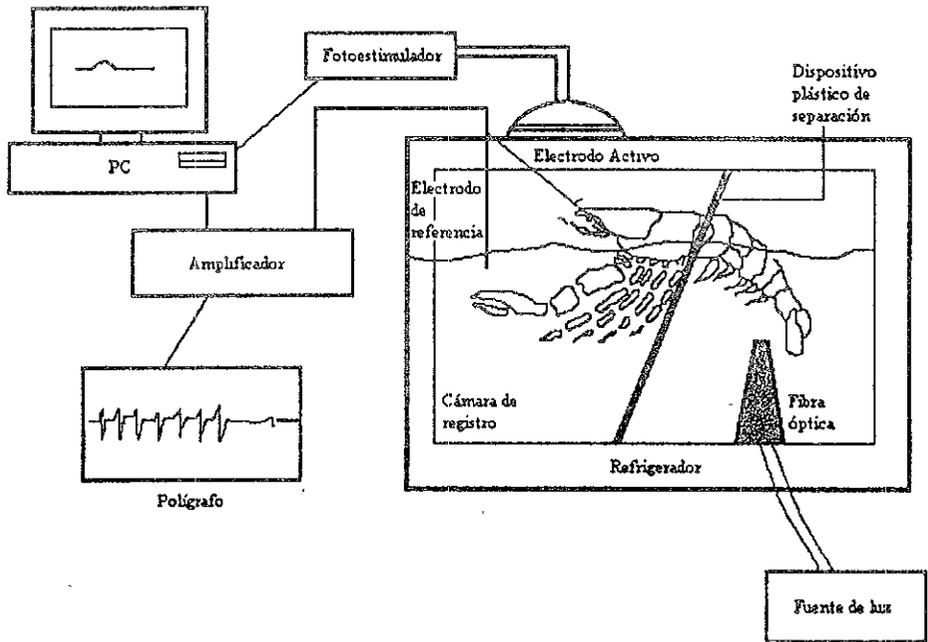


Figura 4. Sistema de Registro.

Esquema del diseño experimental, la cámara de registro contiene la fibra óptica que estimulaba el sexto ganglio abdominal con luz blanca. La respuesta era capturada por una PC y registrada en un polígrafo.

8, 12, 16 y 20 hrs) con la ayuda de un interruptor programable (CSA mod. LMST 100).

## ANALISIS DE RESULTADOS

Se consideró la amplitud (cm) de los diez ERG previos al estímulo luminoso en el telson para ser usados como referencia. Posteriormente se consideraron los diez siguientes ERG obtenidos durante el pulso de luz al sexto ganglio (experimentales) y finalmente se consideraron las respuestas generadas durante al menos 30 minutos posteriores al pulso.

Tomando como referencia la media y la desviación estándar de las respuestas testigo se compararon con la media de la amplitud de los ERG obtenidos durante la aplicación del pulso de luz en el telson. Los datos fueron porcentualizados para su comparación, considerando como el 100 % a la media de los 10 valores previos al pulso

Con estos datos se realizaron las gráficas correspondientes para establecer la relación entre el cambio porcentual de la respuesta de ERG a cada intensidad de luz blanca con la hora del día a las que fue aplicado el pulso (hora del día vs. cambio % del ERG). Además se obtuvo una curva de porcentaje de cambio contra el logaritmo de la intensidad para cada hora del día. Todos estos datos fueron sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas.

Se realizaron las gráficas correspondientes al voltaje del ERG (mV) a lo largo del día, el registro fue cada tres minutos, de tal manera que se observara el ciclo del ERG y las variaciones provocadas por la estimulación con luz blanca en el FRC.

Se consideró como latencia el intervalo de tiempo que sucede entre el inicio del estímulo luminoso y la presencia de una respuesta claramente diferente a la de referencia, mientras que el intervalo de transición se consideró como el cambio de la

amplitud de la respuesta entre dos estados estables de amplitud. Para estas dos variables se realizaron las gráficas correspondientes para cada intensidad en relación con la hora del día a la cual se aplicaron los pulsos.

## RESULTADOS

La aplicación de pulsos de luz blanca en el sexto ganglio abdominal produce fundamentalmente decrementos de la amplitud del ERG, en función de la hora del día y de la intensidad aplicada.

### Variación en la amplitud del ERG a pulsos de luz blanca en el sexto ganglio abdominal, de $1 \text{ Wm}^{-2}$ de intensidad.

La amplitud de la respuesta del electroretinograma a la aplicación de luz blanca de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  en el sexto ganglio abdominal mostró decrementos respecto a su control a las 8:00, 12:00 y 16:00 hrs, alcanzando disminuciones de hasta un 14%. Mientras que de las 20:00 a las 4:00 hrs los pulsos de luz blanca causaron cambios menores al 1% en la amplitud del ERG.

Es decir, a lo largo del día hay ciertas horas donde la sensibilidad de la retina se ve afectada al recibir estímulos luminosos sobre el fotorreceptor extrarretiniano localizado en el sexto ganglio; mientras que en otras horas (4:00 y 24:00 hrs) la sensibilidad no varió (Figura 5a). Sin embargo estas diferencias no fueron significativas.

En la Figura 5b, se muestra el promedio ( $\pm$  error estándar) de los datos correspondientes a la amplitud de los 10 ERG's previos al pulso (cuadros llenos), se observa un claro incremento en la amplitud del ERG entre las 12:00 a las 20:00 hrs. Los triángulos representan el cambio de amplitud de ERG durante el pulso, siendo más claros tales efectos a las 12:00 y 16:00 hrs.

La figura 5c muestra dos ejemplos de la variación de la amplitud del ERG como consecuencia de la aplicación de un de luz de  $1 \text{ Wm}^{-2}$ . Los cuadros llenos muestran los datos de las 4:00 hrs, donde la variación de la amplitud entre los datos

de referencia y los experimentales es menor al 1%, mientras que a las 12:00 hrs (cuadros vacíos), la caída con respecto a los ERG's de referencia es del  $13.42 \pm 2.23\%$ .

### **Variación en la amplitud del ERG con pulsos de luz blanca de $10 \text{ Wm}^{-2}$ de intensidad en el sexto ganglio abdominal.**

Al aplicar el estímulo de luz blanca de  $10 \text{ Wm}^{-2}$  de intensidad se observó que la acción de la luz sobre el FRC provoca decrementos en la amplitud de la respuesta del fotorreceptor retiniano en casi todas las horas a la que fue aplicado, con excepción de las 12:00 hrs (figura 6). A las 8:00 y 24:00 hrs la respuesta mostró la mayor disminución en su amplitud, con caídas del  $13.4 \pm 3.31\%$  y  $14.95 \pm 0.64\%$  respectivamente; mientras que a las 16:00 las disminuciones observadas fueron solo del  $4.5 \pm 3.73\%$ . El cambio obtenido a las 12:00 hrs, fue un incremento en la amplitud de la respuesta del ERG de más del 7% (fig. 6a). En este caso la prueba de Kruskal-Wallis tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas, a las diferentes horas del día a las que se aplicó el pulso.

En el ERG a lo largo del tiempo que se muestra en la Figura 6b, se observa que el incremento presente a las 12:00 hrs (triángulos) se corresponde con la fase de reposo del ciclo circadiano, mientras que a las horas de mayores decrementos (8:00 y 24:00 hrs) es donde se presenta la fase de máxima actividad.

La Figura 5c presenta las curvas de datos a las 12:00 (cuadros llenos) y 24:00 hrs (cuadros vacíos), en la primera se observa que a la entrada del pulso se da un incremento en la amplitud de la respuesta del ERG, que decae un poco antes del término del pulso de luz blanca. Mientras que a las 24:00 hrs, el decremento de la amplitud del ERG se presenta 6 minutos después de la entrada del pulso y perdura por 6 minutos al término del mismo, para recuperar la amplitud gradualmente.

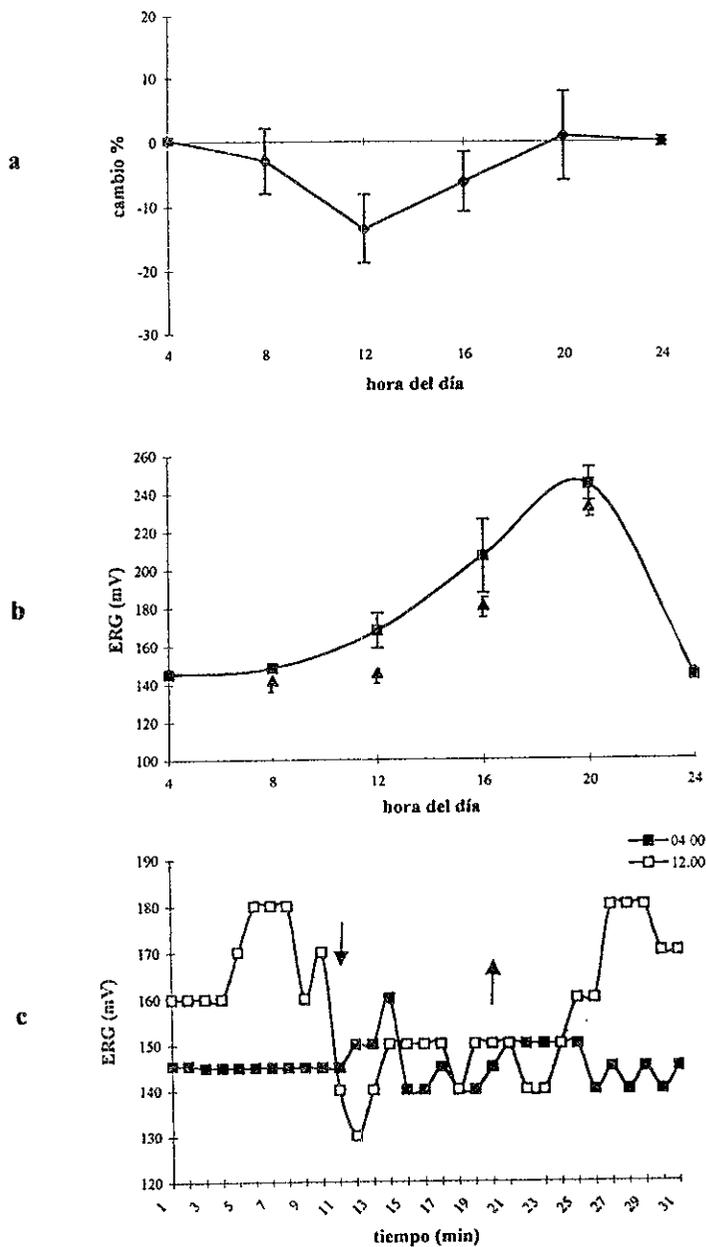


Figura 5. Cambios en la amplitud de la respuesta del ERG al aplicar pulsos luminosos de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  por 30 minutos sobre el sexto ganglio abdominal. a) Presenta los cambios porcentuales de la amplitud de la respuesta experimental con respecto a la media de referencia (media  $\pm$  error estándar), b) Registro de los datos reales (mV) del ritmo de la amplitud del ERG de acociles juveniles *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas, los cuadros representan la media de referencia  $\pm$  error estándar (barras) y los triángulos son los cambios provocados por el pulso de luz blanca y c) Representación gráfica de dos ejemplos de la variación de la amplitud del ERG durante la aplicación del pulso, la flecha hacia abajo indica la entrada del pulso de luz, mientras que la flecha hacia arriba señala el término del pulso de luz.

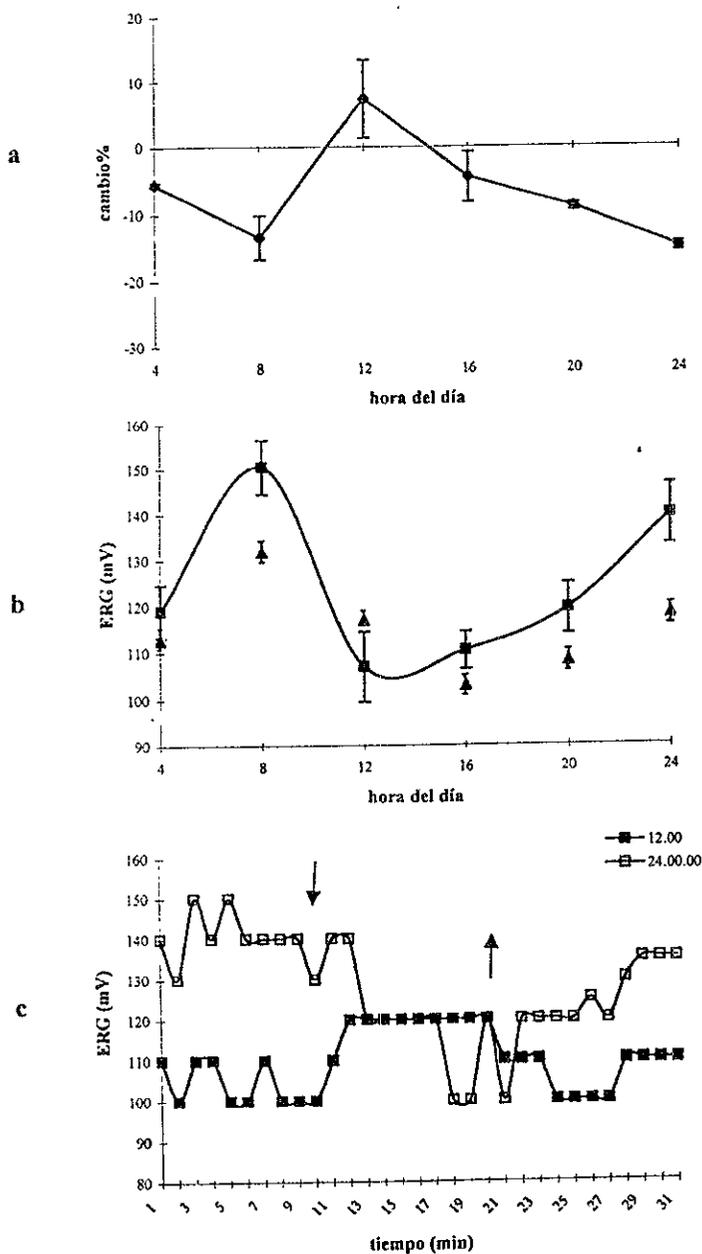


Figura 6. Cambios en la amplitud de la respuesta del ERG al aplicar pulsos luminosos de  $10 \text{ Wm}^{-2}$  por 30 minutos sobre el sexto ganglio abdominal. a) Presenta los cambios porcentuales de la amplitud de la respuesta experimental con respecto a la media de referencia (media  $\pm$  error estándar), b) Registro de los datos reales (mV) del ritmo de la amplitud del ERG en un ciclo de 24 horas, los cuadros representan la media de referencia  $\pm$  error estándar (barras) y los triángulos son los cambios provocados por el pulso de luz blanca y c) Representación gráfica de dos ejemplos de la variación de la amplitud del ERG durante la aplicación del pulso, la flecha hacia abajo indica la entrada del pulso de luz, mientras que la flecha hacia arriba señala el término del pulso de luz.

## Variación en la amplitud del ERG a pulsos de luz blanca de $100 \text{ Wm}^{-2}$ en el FRC.

La amplitud de la respuesta del fotorreceptor retiniano tuvo cambios porcentuales de mayor magnitud que en los casos anteriores. Se encontró que hay horas del día a las que el estímulo lumínico provocó decrementos de hasta un 20% y horas en las que los cambios son menores al 3%. En la Figura 7a se observa que tanto a las 4:00 como a las 16:00 hrs la respuesta disminuye en un  $20.5 \pm 3.54$  y  $18.8 \pm 2.03\%$  respectivamente, siendo las horas donde el efecto de la luz sobre la respuesta del fotorreceptor retiniano fue mayor con respecto a las siguientes horas. Este efecto disminuyó hacia las 8:00 y 20:00 hrs donde los decrementos fueron menores al 10%; mientras que a las 12:00 y 24:00 hrs la luz blanca sobre el fotorreceptor abdominal causó efectos menores al 3% en la amplitud de la respuesta del fotorreceptor retinal.

Al comparar las variaciones circadianas de amplitud con aquellas producidas por el pulso de luz en el FRC, se pudo observar que se presentaron disminuciones claras en la amplitud del ERG, aunque no significativas estadísticamente.

En la Figura 7b, observamos este fenómeno, con la caída de mayor magnitud ( $-20.52 \pm 3.54\%$ ) en la amplitud a las 4:00 hrs de tiempo externo, donde se ve la máxima amplitud del ritmo (triángulo lleno). Mientras que a las 16:00 hrs, donde empieza a decaer la amplitud del ritmo se muestra la otra caída de  $18.8 \pm 2.03\%$ .

En este caso presentamos las curvas de los datos a las 4:00 y 24:00 hrs (Figura 7c), mayor y mínima variación en la amplitud del ERG respectivamente. Por un lado se ve que a las 4:00 hrs el decremento en la respuesta comienza en el segundo ERG posterior al pulso (cuadros llenos), mientras que a las 24:00 hrs no se ve tan claramente el incremento del  $2.8 \pm 1.2\%$  (cuadros vacíos).

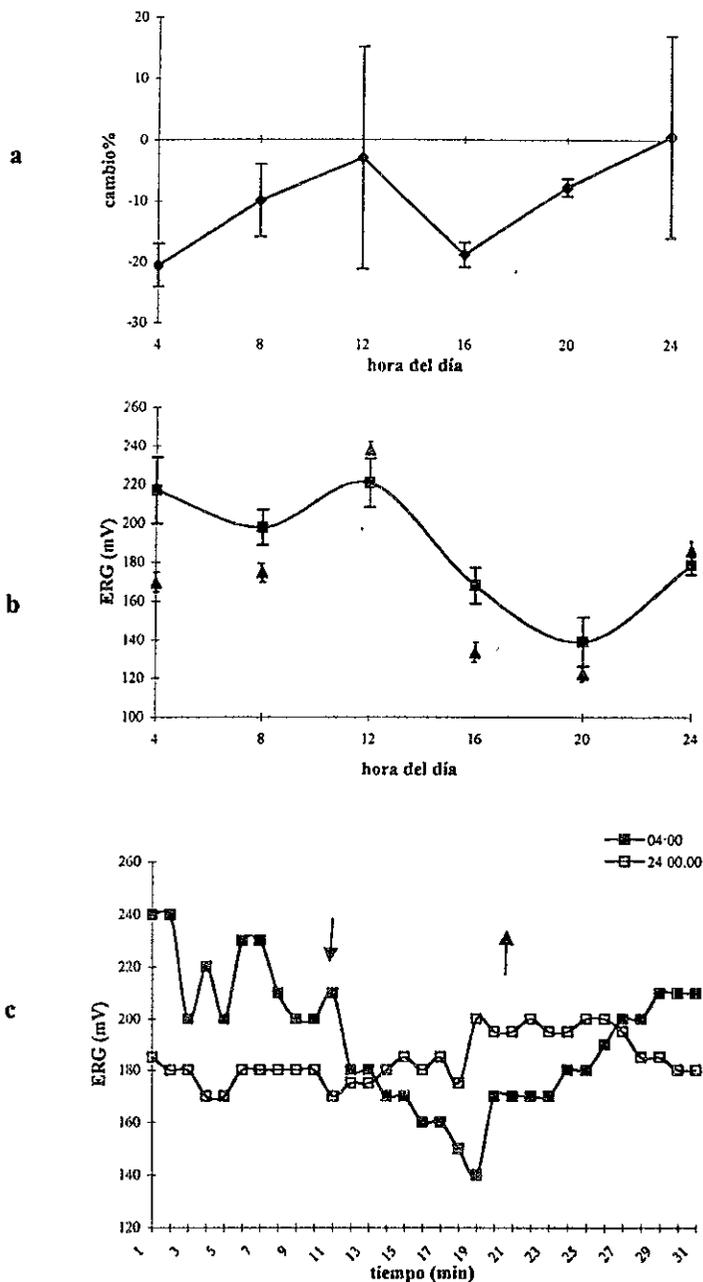


Figura 7. Cambios en la amplitud de la respuesta del ERG al aplicar pulsos luminosos de  $100 \text{ Wm}^{-2}$  por 30 minutos sobre el sexto ganglio abdominal. a) Presenta los cambios porcentuales de la amplitud de la respuesta experimental con respecto a la media de referencia (media  $\pm$  error estándar), b) Registro de los datos reales (mV) del ritmo de la amplitud del ERG de acociles juveniles *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas, los cuadros representan la media de referencia  $\pm$  error estándar (barras) y los triángulos son los cambios provocados por el pulso de luz blanca y c) Representación gráfica de dos ejemplos de la variación de la amplitud del ERG, la flecha hacia abajo indica la entrada del pulso de luz, mientras que la flecha hacia arriba señala el termino del pulso de luz.

### **Variación en la amplitud del ERG a pulsos de luz blanca de $600 \text{ Wm}^{-2}$ de intensidad en el FRC.**

Cuando se aplican pulsos de  $600 \text{ Wm}^{-2}$  sobre el FRC, la amplitud de la respuesta del ERG presentó los decrementos más notables. Así en la Figura 8a se presentan los cambios porcentuales en la amplitud de la respuesta generados a partir de la estimulación lumínica. Esta gráfica se puede dividir en dos partes, la primera se extiende de las 4:00 a las 12:00 hrs, donde se observa que los decrementos son mayores al 20%. La segunda parte de la gráfica presenta caídas en el ERG de  $15.8 \pm 2.24\%$ ,  $11.6 \pm 2.56\%$  y  $11.0 \pm 0.69\%$  a las 16:00, 20:00 y 24:00 hrs respectivamente. La primera mitad del día externo representa una zona de mayor sensibilidad del receptor retiniano a los estímulos luminosos recibidos por el fotorreceptor caudal del sexto ganglio, mientras que la segunda mitad del día la sensibilidad disminuye por lo cual los cambios observados son de menor magnitud. Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis sobre los datos, se observó que hay diferencias significativas entre ellos ( $p < 0.05$ ).

La media de los datos correspondientes a los testigos, previos a cada pulso, muestran claras diferencias con los obtenidos durante el pulso en la Figura 8b, que corresponde a un ciclo de 24 horas y donde se observa que la magnitud de los decrementos en la respuesta es mayor en la primera mitad del día (de las 4:00 a las 12:00 hrs), con relación a la segunda mitad que va de las 16:00 a las 24:00 hrs.

Como se observa en la Figura 8c, el inicio del decremento en la amplitud de la respuesta correspondió al encendido de la luz sobre el sexto ganglio abdominal. En este caso se presenta la caída de la respuesta a las 8:00 (cuadros llenos) y 20:00 (cuadros vacíos) hrs, la máxima y mínima variación en la amplitud de la respuesta del ERG respectivamente.

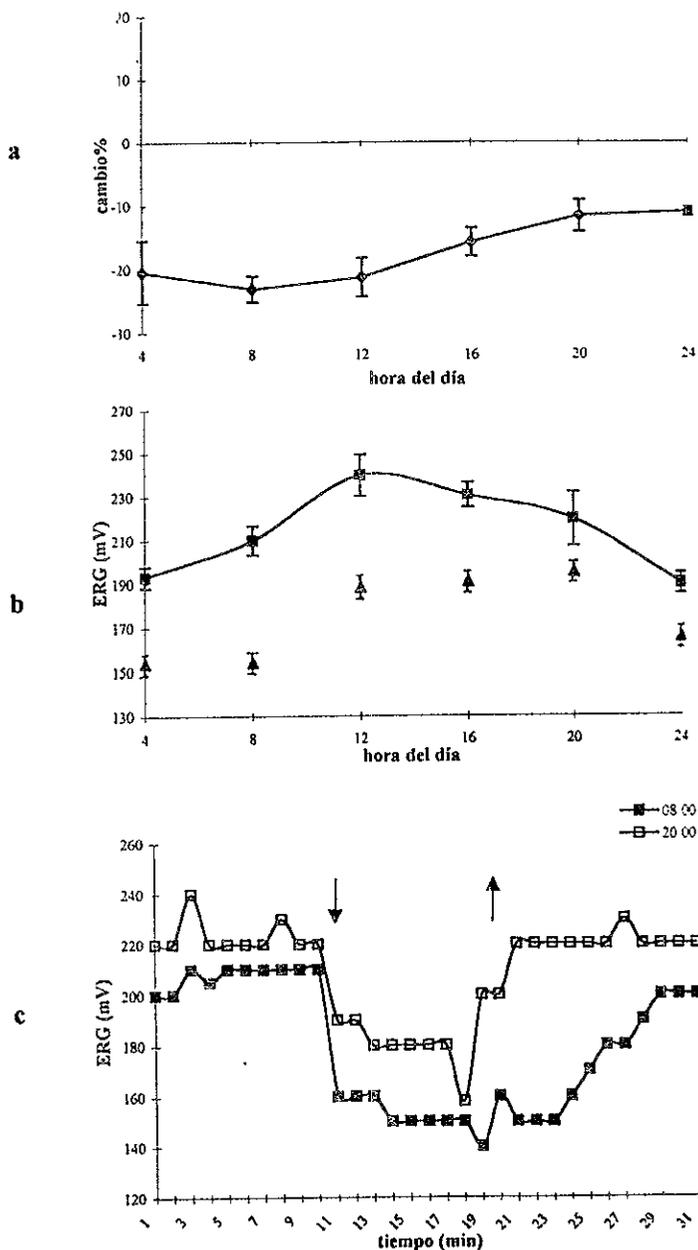


Figura 8. Cambios en la amplitud de la respuesta del ERG al aplicar pulsos luminosos de  $600 \text{ Wm}^{-2}$  por 30 minutos sobre el sexto ganglio abdominal. a) Presenta los cambios porcentuales de la amplitud de la respuesta experimental con respecto a la media de referencia (media  $\pm$  error estándar), b) Registro de los datos reales (mV) del ritmo de la amplitud del ERG de acociles juveniles *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas, los cuadros representan la media de referencia  $\pm$  error estándar (barras) y los triángulos son los cambios provocados por el pulso de luz blanca y c) Representación gráfica de dos ejemplos de la variación de la amplitud del ERG durante la aplicación del pulso, la flecha hacia arriba señala el término del pulso de luz, mientras que la flecha hacia abajo señala el inicio del pulso de luz.

### **Variación de la amplitud del ERG vs. Log Intensidad del estímulo luminoso en el sexto ganglio abdominal.**

Las intensidades usadas en las secciones anteriores, fueron consideradas en función de su valor logarítmico con el fin de conocer si existe una relación entre la variación en la amplitud de la respuesta y el logaritmo de la intensidad usada (ya que esta es una manera de conocer la sensibilidad de un fotorreceptor). La Figura 9, muestra esta relación en las diferentes horas de día a las que se aplicó el pulso de luz blanca.

En la Gráfica 9a observamos las curvas obtenidas con los datos de las 4:00 y 16:00 hrs (líneas y puntos respectivamente). En ambas existe una parte de la curva en la cual el cambio porcentual en la amplitud de la respuesta aumenta conforme se incrementa la intensidad del estímulo luminoso, hasta que alcanza la saturación en  $\log I=2$ , continuando con una meseta hasta  $\log I=2.78$ .

A las 8:00 y 20:00 hrs no se alcanza la saturación de la respuesta, solo se observa que el cambio porcentual es mayor al aumentar el logaritmo de la intensidad del pulso de luz, con la excepción del valor obtenido para  $\log I=2$ , donde el cambio porcentual es menor con respecto al cambio obtenido en la intensidad anterior (Figura 9b).

En el caso de la Figura 9c, donde se presentan las curvas para las 12:00 y 24:00 hrs, tenemos un comportamiento totalmente diferente al observado en las otras horas del día. No hay una relación entre la magnitud del cambio porcentual y el logaritmo de la intensidad, ya que las mayores variaciones que se presentan a las 12:00 hrs están en la primera y la última unidad logarítmica ( $\log I=0$  y  $\log I=2.78$ ), y en las intermedias los valores son menores al 3%. Mientras que a las 24:00 hrs, tanto en  $\log I=0$  como en  $\log I=2$  los cambios no son mayores al 1% y en las otras dos unidades logarítmicas, los cambios no sobrepasan el 11%.

En resumen, el comportamiento de las curvas de cambio porcentual de la amplitud de la respuesta de ERG varía según la hora del día a la que se aplicó el pulso de luz blanca sobre el sexto ganglio, lo cual es soportado por el hecho de que al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis hay diferencias estadísticamente significativas a las 4:00, 8:00, 12:00 y 16:00 hrs, mientras que a las 20:00 y 24:00 hrs no se encontraron diferencias.

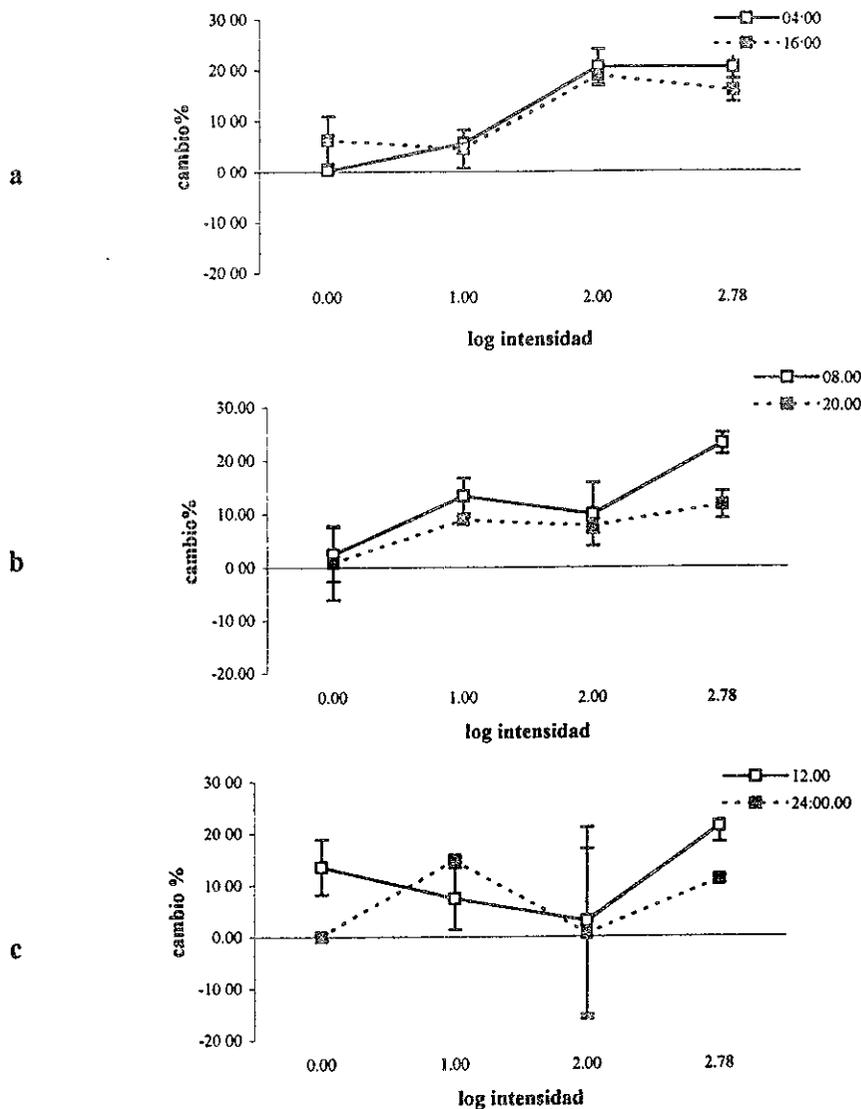


Figura 9. Relación del cambio porcentual en la amplitud de la respuesta con el logaritmo de la intensidad de luz blanca aplicada sobre el sexto ganglio abdominal. a) Curva de los datos de las 4:00 y 16:00 hrs (línea continua y línea discontinua respectivamente) b) Datos gráficos del cambio en la amplitud de la respuesta de ERG a las 8:00 y 20:00 hrs (línea continua y discontinua, respectivamente), y c) Variación a las 12:00 y 24:00 hrs, al aplicar pulsos de luz blanca sobre el fotorreceptor retiniano (línea continua y discontinua respectivamente). Los datos son promedio  $\pm$  error estándar (barras).

Los resultados se resumen en la Tabla 1 a manera de cambios porcentuales y a diferentes intensidades de estímulo.

Intensidad	Hora del día					
	4:00	8:00	12:00	16:00	20:00	24:00
1Wm <sup>-2</sup>	0.27±0.55 (10)	-2.43±5.1 (9)	-13.55±5.38 (8)	-6.22±4.6 (10)	0.87±6.95 (8)	-0.01±0.78 (8)
10Wm <sup>-2</sup>	-5.56±0.28 (9)	-13.44±3.3 (9)	7.4±6.0 (7)	-4.5±3.73 (10)	-8.91±0.57 (8)	-14.96±0.63 (8)
100Wm <sup>-2</sup>	-20.52±3.54 (9)	-9.94±5.94 (8)	-2.99±18.15 (10)	-18.8±2.03 (8)	-7.72±1.41 (7)	0.58±16.49 (7)
600Wm <sup>-2</sup>	-20.41±4.91 (11)	-23.14±2.0 (10)	-21.31±3.04 (11)	-15.9±2.24 (12)	-11.65±2.56 (12)	-11.06±0.69 (12)

Tabla 1. Variación porcentual de la amplitud de la respuesta experimental con respecto a la amplitud de la respuesta testigo a cada hora que se aplicó el pulso de luz blanca en las cuatro intensidades experimentales. Los valores representan la media ± error estándar en cada condición, los números en paréntesis son el número de casos en cada experimento.

## **Respuesta Post-pulso**

Se revisaron los electroretinogramas obtenidos cada tres minutos posteriores al término del pulso de luz blanca al sexto ganglio abdominal en cada intensidad. La revisión fue extendida hasta 3 horas después con el fin de observar si la aplicación del pulso de luz activa mecanismos posiblemente endocrinos, cuyos efectos no fueran observables durante el tiempo de aplicación del pulso. Los resultados obtenidos no muestran variaciones semejantes a las obtenidas durante el pulso de luz en ningún caso.

## **Latencia y Tiempo de transición**

A lo largo del día se observa que la latencia y el tiempo de transición de la respuesta del fotorreceptor retiniano varían con la intensidad de luz que se aplica sobre el sexto ganglio abdominal.

En la Figura 10, se muestra la tendencia de estos parámetros con respecto a la hora del día. De esta manera en la Figura 10a se observa que al aplicar la luz de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  de intensidad sobre el fotorreceptor extrarretiniano, la respuesta del ERG tuvo un cambio inmediato a la entrada del pulso de luz a las 24:00 y 4:00 hrs, en tanto que en las demás horas la duración de la latencia y el tiempo de transición en el ERG provocan que el cambio en la amplitud de la respuesta se presente de 6-12 minutos después de que el estímulo luminoso entra por el sexto ganglio.

Con luz de  $10 \text{ Wm}^{-2}$  de intensidad (Figura 10b) el comportamiento de estos parámetros cambia con respecto a lo obtenido con  $1 \text{ Wm}^{-2}$ , de tal manera que aunque a las 4:00 hrs la variación en la respuesta se presenta inmediatamente después de la entrada del pulso de luz blanca, a las 8:00, 12:00 y 24:00 hrs, este cambio tardó 9 minutos. Mientras que a las 16:00 y 20:00 hrs, hubo de 18 a 21 minutos de retraso en la variación en la respuesta al aplicar el pulso, es decir hay un incremento en la latencia de la respuesta y en el tiempo de transición de la misma.

Cuando se aplicaron pulsos de luz de  $100\text{Wm}^{-2}$ , las horas donde la máxima variación de la respuesta se da de manera inmediata aumento, presentándose este efecto a las 24:00, 4:00 y 8:00 hrs, disminuyendo la latencia a tres minutos y el intervalo de transición a 3 minutos en las siguientes horas (Figura 10c).

El efecto más inmediato de la luz sobre la variación de la amplitud de la respuesta se dio al estimular el sexto ganglio abdominal con luz blanca de  $600\text{Wm}^{-2}$ , ya que en este caso la máxima variación se obtiene inmediatamente en todas las horas del día a las que se aplica el estímulo, sin la presencia de latencia o de transitorios en el ERG antes de alcanzar la máxima variación en la amplitud de la respuesta.

En este caso se aplicó la prueba de ANOVA de una vía para observar las posibles diferencias en el comportamiento de estos parámetros, sin embargo no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

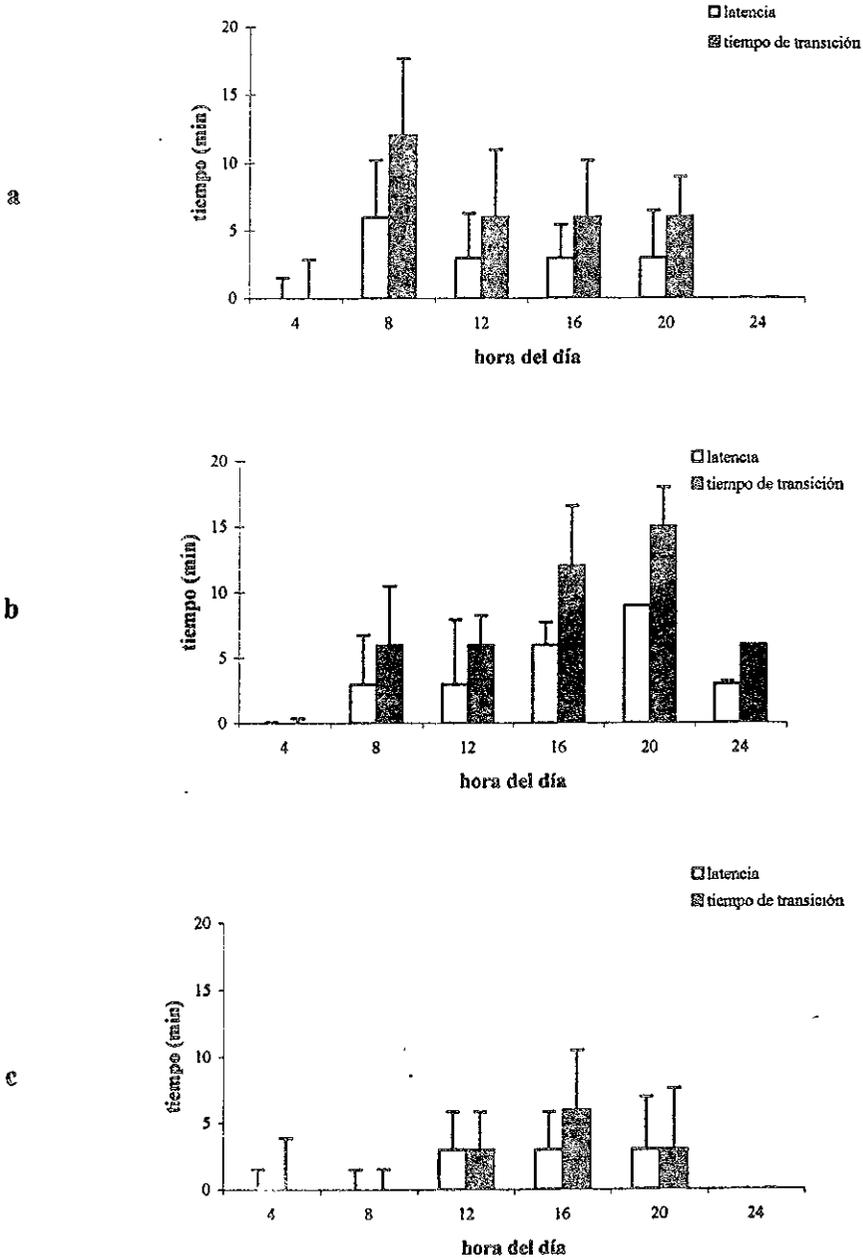


Figura 10. Gráficas de la duración de la latencia (minutos) y el tiempo de transición (minutos) de la respuesta del ERG al aplicar el pulso de luz blanca en el sexto ganglio abdominal. a) Pulsos de luz de 1 Wm<sup>-2</sup> de intensidad, b) Pulsos de luz de 10 Wm<sup>-2</sup> de intensidad y c) Pulsos de luz de 100 Wm<sup>-2</sup> de intensidad (latencia columnas vacías y el tiempo de transición en columnas llenas). Promedio ± error estándar (barras).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la respuesta electroretinográfica del acocil juvenil *Procambarus clarkii* modifica su amplitud al aplicar pulsos de luz blanca en el sexto ganglio abdominal y a diferente hora del día.

**Variación en la amplitud del ERG a pulsos de luz blanca de diferentes intensidades (1, 10, 100 y 600 Wm<sup>-2</sup>) en el sexto ganglio abdominal.**

Las variaciones en la amplitud son diferentes a los resultados obtenidos por Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo (1987), en el acocil adulto *Procambarus bouvieri*. En contraste con lo reportado por estos autores, donde la mayor disminución en la respuesta del ERG se obtuvo 60 minutos después de que el pulso de luz en el FRC termino, en el acocil juvenil *P. clarkii* la máxima variación se obtuvo en el intervalo de los 30 minutos del pulso (Figuras 5c,6c, 7c y 8c). Es decir, el tiempo de estimulación es suficiente para observar la máxima variación en la amplitud de la respuesta al aplicar cualquiera de las intensidades utilizadas, de esta manera el efecto del pulso de luz parece estar restringido al intervalo de su aplicación, ya que no se observaron cambios comparables en la amplitud de la respuesta después del pulso. Esto sugiere que en el acocil juvenil, el efecto sobre la respuesta eléctrica del fotorreceptor retiniano es mayor y más rápida que en acocil adulto *P. bouvieri* al estimular el FRC localizado en el sexto ganglio, lo que nos indica que en estadios de desarrollo más tempranos del acocil esta vía de comunicación entre ambos fotorreceptores funciona con mayor rapidez.

En cuanto a la magnitud del cambio observado en el trabajo de Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo (1987), la amplitud de la respuesta disminuyó 20% y 30% al aplicar pulsos de luz blanca de 20-25 Wm<sup>-2</sup> de intensidad por la mañana (9:00 hrs) y por la

noche (21:00 hrs) respectivamente. En nuestro estudio, la magnitud del cambio en la amplitud de la respuesta dependió de la intensidad de luz aplicada sobre el sexto ganglio y de la hora del día. Reportándose horas del día en las cuales no hubo variaciones superiores al 1% al estimular con luz blanca de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  hasta cambios superiores al 20% (con respecto a la media de referencia) cuando la luz alcanzó una intensidad de  $600 \text{ Wm}^{-2}$ .

La hora a la que se presentó la máxima variación porcentual en la amplitud de la respuesta también fue diferente para cada intensidad, se presentó a las 12:00 hrs cuando el estímulo luminoso fue de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  y de  $10 \text{ Wm}^{-2}$ . Mientras que al aplicar pulsos de luz de 100 y  $600 \text{ Wm}^{-2}$  las horas de máximo cambio porcentual se dieron a las 4:00 y 8:00 hrs respectivamente (Tabla 1).

Los resultados obtenidos muestran que el fotorreceptor caudal en el sexto ganglio, puede tener influencia sobre los mecanismos que regulan la sensibilidad visual en el acocil juvenil *P. clarkii*. A pesar de que en este trabajo no se consideraron mecanismos de sincronización extrarretiniana, el efecto del FRC sobre la retina sugiere que este sistema podría ser efectivo en los mecanismos de sincronización del ritmo circadiano del ERG; así como sucede en aquellos involucrados en la expresión circadiana de actividad locomotora (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997).

En el acocil *P. clarkii* se ha observado que la expresión de los ritmos circadianos de ERG y de actividad motora, así como la capacidad de sincronización por luz, varía durante la ontogenia (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fanjul et al, 1998), es por tanto posible que la respuesta del sistema FRC-retina presente variaciones de sensibilidad entre juveniles y adultos, ya que probablemente las vías neuroendócrinas que median la sensibilidad de este sistema pudieran estar aún en desarrollo.

Esta característica presente en los organismos juveniles se ve reflejado en la gran variabilidad que se observan en los resultados y que provoca que al aplicar las

pruebas estadísticas no se obtengan diferencias significativas, más que cuando se aplica la intensidad de  $600 \text{ Wm}^{-2}$  (la máxima intensidad utilizada). Es decir, estadísticamente a esta intensidad de luz si se observa que hay diferencias al aplicar los pulsos de luz en diferentes horas del día. Sin embargo que una diferencia no sea demostrada estadísticamente, no quiere decir que no exista o que no sea importante para los organismos.

La respuesta del sistema visual ante estímulos directamente en el FRC es dependiente de la intensidad. Sin embargo la relación de estímulo-respuesta presenta una gran variabilidad en bajas intensidades ( $1$  y  $10 \text{ Wm}^{-2}$ ) y una clara estabilidad respecto al tiempo externo a la máxima intensidad usada ( $600 \text{ Wm}^{-2}$ ). Esto sugiere que la interacción entre el FRC con los mecanismos que regulan la sensibilidad retinal de manera circadiana, requieren que para una regulación efectiva por parte del FRC se reciba luz de intensidades altas. Con base a lo anterior es lógico pensar que un sistema con mecanismos de regulación tan fina como es la retina misma, no requiera de la regulación por parte de otras estructuras fotorreceptoras, pero que sin embargo sean importantes en otros mecanismos de integración conductual, como es el caso del reflejo fototáctico (Edwards, 1984).

#### **Variación de la amplitud del ERG vs log Intensidad del estímulo luminoso en el sexto ganglio abdominal.**

En cuanto a la variación de la respuesta con relación al logaritmo de la intensidad del estímulo lumínico, Glantz (1968 y 1971) reportó que la magnitud (V) de la respuesta de las células del fotorreceptor retiniano se relacionaban con el logaritmo de la intensidad de estímulos de luz blanca. De tal manera que el rango dinámico de la función cubrió 1.7 unidades logarítmicas y el rango total de la respuesta generalmente fue mayor a 4 unidades logarítmicas (.01-1000 candelas/ $\text{pie}^2$ ). Este autor encontró que conforme se incrementaba la intensidad del

estimulo luminoso, los potenciales obtenidos en las células retinulares aumentaban de amplitud. Este amplio rango de intensidad del estímulo, facilita que los pigmentos retinianos (Proximal y Distal) migren totalmente, ya que por un lado el Pigmento Proximal (que responde directamente a la luz) se dispersa parcialmente en una unidad logarítmica, alcanzando la saturación en 2 unidades logarítmicas de intensidad lumínica (lux). Y el pigmento distal (respuesta disparada por la hormona DPLH) tiene su nivel de saturación hasta 4 unidades logarítmicas de intensidad del estímulo lumínico (lux) (Aréchiga, 1977).

Las variaciones de amplitud analizadas en este trabajo con base en el logaritmo de la intensidad de la luz, sugieren que el sistema FRC-retina pueda responder a la luz de manera semejante a como lo hace la retina solamente, sin embargo, en lugar de observar un efecto de incremento en la respuesta se observa una reducción de la misma, lo que probablemente involucre al sistema FRC-retina como un sistema accesorio en los mecanismos de adaptación a la luz. Sin embargo, tal relación parece clara únicamente a las 4:00 y 16:00 hrs, mientras que en el resto del tiempo no parece haber una tendencia clara. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que tal relación  $\log-I$  vs amplitud de la respuesta no es constante.

Con lo anterior podemos suponer que al encontrarse los organismos en condiciones de oscuridad constante, la variación en la amplitud de la respuesta del ERG dependió casi por completo de los movimientos del Pigmento Proximal (PP), ya que este pigmento retiniano presenta variaciones circadianas bajo esta condición, mientras que el Pigmento Distal permanece casi totalmente retraído (Aréchiga, 1977 y Aréchiga et al, 1992). Esto puede indicar que la luz captada por el FRC provocó impulsos nerviosos que llegaron de manera indirecta a las estructuras de la retina, de tal manera que el PP se dispersó y causó los decrementos en la amplitud de la respuesta al disminuir la sensibilidad de la retina a la luz.

Sin embargo, no se puede descartar un posible efecto sobre la regulación del Pigmento Distal (PD), esto sugiere que el estímulo podría llegar desde el FRC al

sistema órgano X- glándula sinusal encargada de la liberación de la DPLH, que dispersa al PD.

### **Tiempo de transición y Latencia.**

La velocidad con la que se presentan las máximas variaciones en la amplitud de la respuesta (0-12 minutos) después de aplicar el pulso de luz, nos hace suponer que el efecto de la luz en el sistema FEC-retina esta mediado por vías neurales, pero depende de la intensidad del estímulo si el efecto en la amplitud de se observa de manera inmediata (en los 3 min posteriores al encendido de la luz de  $600 \text{ Wm}^{-2}$  de intensidad) o tarda más tiempo (en las otras intensidades). Esto indica que aunque con estímulos de  $1 \text{ Wm}^{-2}$  de intensidad de luz sobre el FRC se alcanza el punto de saturación del Pigmento Proximal, lo que causaría cierto decremento en la amplitud de la respuesta; la máxima variación no se produce sino hasta que ambos pigmentos son dispersados.

A las 4:00 hrs el cambio en la amplitud de la respuesta del sistema FRC-retina es inmediato en todas las intensidades, mientras que en las demás horas se presenta cierto tiempo de transición y de latencia. La disminución en el número de transitorios y del tiempo de latencia conforme se incrementa la intensidad en las otras horas, puede deberse a que con el aumento en la intensidad del estímulo se acelera la respuesta de ambos pigmentos en la retina, por lo cual la máxima disminución en la amplitud de la respuesta se observa en los primeros tres minutos.

La caída casi inmediata de la respuesta de las células retinulares puede deberse a un estímulo nervioso originado en el sexto ganglio y que viaja hasta la el pedúnculo ocular o la retina, provocando la respuesta migratoria de ambos pigmentos retinianos. A pesar de esto, la conexión anatómica entre estas estructuras no ha sido descrita, solo existen pruebas fisiológicas de la influencia del sexto

ganglio sobre el cordón nervioso y el fotorreceptor retiniano (Inclan-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987).

Otros investigadores cuyos trabajos han sido hechos *in vitro*, han observado que la amplitud del ERG puede ser modificada mediante la aplicación de hormonas sobre la retina del acocil *Orconectes limosus* (Gaus y Stieve, 1991). Cuando se utilizo la RPCH la amplitud de la respuesta del ERG tuvo un incremento hasta del 33% de la amplitud inicial en los 30 minutos posteriores a la aplicación. Mientras que la PDH y la CCAP (Péptido cardiactivo de crustáceos) se observaron decrementos del 22% y 70% respectivamente en el mismo lapso de tiempo. Esto implica que el control del movimiento del Pigmento Distal por la PDH y la RPCH es solo un componente de un complejo sistema que regula la respuesta del ERG (Gaus y Stieve, 1991).

Simon y Edwards (citados por Wilkens, 1988) han propuesto la existencia de ramificaciones dendriticas del sexto ganglio abdominal que terminan en los ganglios sub y supraesofágico. Estas vías pueden llevar la información lumínica que es recibida por el FEC hasta el ganglio cerebroide, donde las señales serían recibidas especialmente por las neuronas presentes en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1976) para posteriormente enviarlas hacia el tracto óptico de cada ojo. De esta manera se aseguraría que el sistema órgano X-glándula sinusal recibieran esta información a través de los axones que llegan del ganglio cerebroide y del tracto óptico, disparando la liberación de la PDLH que dispersa el Pigmento Distal. Además al llegar la información lumínica al tracto óptico, se activarían las fibras descritas por Wiersman y Yamaguchi (1967) que reaccionan a la luz y que posiblemente faciliten la migración del Pigmento Proximal.

El que tanto en *Procambarus bouvieri* como en *P. clarkii* pudiera darse una organización anatómica similar, provocando resultados funcionales muy parecidos (en ambas especies hay decrementos en la amplitud de la respuesta del ERG al estimular el FRC), implica que el sistema FRC-retina es una vía de sensibilidad

luminosa de gran importancia en este tipo de organismos y que muy probablemente la conexión madure a lo largo del desarrollo.

El hecho de que la información recibida por el FRC del sexto ganglio tenga que pasar por estructuras donde se ha propuesto que residen los osciladores circadianos del acocil (en cerebro y pedúnculo ocular) explica la dependencia circadiana en la variación de la amplitud de la respuesta; además de reforzar la idea de que la edad también influye en la variabilidad observada.

Las implicaciones adaptativas del sistema FER-ERG no son claras, sin embargo parece ser un fenómeno general en los animales (con excepción de mamíferos), que los fotorreceptores extrarretinianos tienen una importante participación en los mecanismos de sincronización de los ritmos circadianos. En este caso, al considerara que el ERG es una respuesta con variaciones circadianas, es claramente influido por un fotorreceptor extrarretiniano.

### **Conclusiones.**

En el acocil juvenil *Procambarus clarkii*, el fotorreceptor caudal localizado en el sexto ganglio abdominal provoca generalmente disminuciones en la amplitud de la respuesta del ERG al recibir estímulos de luz blanca.

La magnitud de los cambios (decrementos) depende de la intensidad de luz utilizada, así como de la hora del día a la que se aplique el pulso, lo que implica cierta dependencia circadiana en la respuesta generada.

Estos resultados implican que la relación anatómica entre ambos fotorreceptores es funcional desde el estadio juvenil.

Los elementos neuroendócrinos que pueden estar involucrados en el sistema FER-ERG, incluyen aquellos que participan en la regulación de los pigmentos PP y PD, como el ganglio cerebroide, el sistema Órgano X-glándula sinusal y el tracto óptico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar Roblero, R. 1993. Teorías de los Ritmos Biológicos. Memorias I Curso Latinoamericano de Cronobiología. UNAM. México.
- Aréchiga, H. 1976. La Problemática de los Ritmos Circádicos. Bol. Estud. Méd. Biol. 29:1-17.
- Aréchiga, H. 1977. Modulation of visual input in the crayfish. Identifid Neurons and Behavoir of Arthropods. Hoyle (Ed.). Plenum Press. N.Y. 387-403 pp.
- Aréchiga, H. 1983. Mecanismos de Integración de los Ritmos Biológicos. Ciencias. 34:141-152
- Aréchiga, H.; J. L. Cortes; V. García y L. Rodríguez-Sosa. 1985. Neuroendocrine Correlates of Circadian Rhithmicity in Crustaceans. Amer. Zool. 25: 265-274.
- Aréchiga, H.; E. Bañuelos; E. Frixione; A. Picones y L. Rodríguez-Sosa. 1990. Modulation of Crayfish retinal sensitivity by 5-hidroxitriptamine. J. exp. Biol. 150:123-143.
- Aréchiga, H; U. García y L. Martínez-Millan. 1990b. Synaptic regulation of Neurosecretory cell activity in the crayfish eyestalk. Frontiers in Crustacean Neurobiology. 347-380.
- Aréchiga, H.; F. Fernández-Quiroz; F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa. 1992. The Circadian Systems of Crustaceans. Chronobiol. Int. 9(6): 1-19.
- Aréchiga, H. y L. Rodríguez-Sosa. 1997. Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. J. mar. biol. Ass. U.K. 77:17-29.
- Aschoff, J. 1984. A Survey on Biological Rhythms. In Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. Aschoff, J. (Ed.). Plenum Press. N. Y., 3-8 pp.
- Bruno, M. S. y D. Kennedy. 1962. Spectral Sensitivity of Photoreceptor neurons in the sixth ganglion of the Crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 6: 41-46.
- Eakin, R.M. 1966. Evolution of Photoreceptors. Cold Spring Hard. Symp. Quant. Biol. 30:363-370.
- Eckert, R.; D. Randall y G. Augustine. 1989. Fisiología Animal. Interamericana McGraw-Hill. España. 177-183, 205, 207pp.

- Fanjul-Moles, M. L.; O. Castañón-Cervantes y J. Prieto-Sagredo. 1998. Effect of skeleton photoperiods upon the circadian locomotor activity rhythm during development in crayfish *Procambarus clarkii* Biol. Rhythm Res. 29(4):427-441.
- Fuentes-Pardo, B. y V. Inclán-Rubio. 1987. Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish-I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. Comp. Biochem. Physiol. 86A(3): 523-527.
- Fuentes-Pardo, B. y J. Hernández-Falcón, 1993. Neurobiology of the Circadian clock of Crayfish. Trends in Comp. Biochem. Physiol. 1:635-673.
- Gaus, G y H. Stieve. 1992. The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*. Z. Naturforsch. 47c:300-303.
- Glantz, R.M 1968. Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish, *Procambarus clarkii* Vision Res. 8:1407-1421
- Glantz, R.M. 1971. Peripheral versus central adaptation in the crustacean visual system. J. of Neurophysiol. 34(4):485-492.
- Glantz, R.M.; M. D. Kirk y H. Aréchiga. 1983. Light input to crustacean neurosecretory cells. Brain Res.256:307-311.
- Hariyama, T. y Y. Tsukahara. 1988. Seasonal variation of spectral sensitivity in crayfish reticular cells. Comp. Biochem. Physiol. 91<sup>a</sup>(3):529-533
- Hartwin, H.G. 1986. Structure and Function of retinal and extraretinal photoreceptive organs. In Comparative Physiology of Environmental Adaptation. Vol.3 Pévet (Ed.). Strasbourg. 45-55pp.
- Holdich, D. M y R. S. Lowery. 1988. Freshwater crayfish. Timber Press. EUA. 1-52 pp.
- Inclán-Rubio, V y B. Fuentes-Pardo. 1987. Caudal Photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish-II. Functional relationships between caudal and visual photoreceptors. Comp. Biochem. Physiol. 86A(3):523-527.
- Kirk, M. D.; J. I. Prugh y R. M. Glantz. 1983. Retinal illumination produces synaptic inhibition of neurosecretory organ in the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana). J. Neurobiol. 14(6):473-480.

- Miranda-Anaya, M. y M. L. Fanjul-Moles. 1997. Nonparametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiology International* 14(1):25-34.
- Moore-Ede, M., F. M. Sulzman y C. A. Fuller. 1982. *The Clocks that Time us*. Harvard University Press. England. 3-60 pp.
- Naka, K. y M. Kuwabara. 1959. Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exptl. Biol.* 36:51-61
- Nosaki, H. 1969. Electrophysiological study of color encoding in the compound eye of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Z. Vergl. Physiologie*. 64:318-323.
- Page, T. L. y J. L. Larimer. 1975. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish II. The ERG amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:81-96.
- Page, T. L. y J. L. Larimer. 1976. Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochemistry and Photobiology*. 23:245-251.
- Pittendrigh, C.S. 1984. Circadian Systems: General Perspective. In *Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms*. Aschoff, J. (Ed.). Plenum Press. N. Y. 57-80 pp.
- Pittendrigh, C.S. 1984. Circadian Systems:Entrainment. In *Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms*. (Ed.) Aschoff, J. Plenum Press. New York 95-98pp
- Prosser, C. L. 1934. Action potentials in the nervous system of the crayfish II. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. *J. Cell Physiol.* 4(4):363-377.
- Reinberg, A y M. Smolensky. 1993. Introduction to Chronobiology. In *Biological Rhythms and Medicine*. Reinberg, A y M. Smolensky (Ed.). Springer-Verlag N. Y. 1-21pp.
- Sabia, R. y R. Glantz 1985. Polarization sensitivity of crayfish photoreceptors is correlated with their termination sites in the lamina ganglionaris. *J. Comp. Physiol.* 156:315-318.
- Sánchez, J.A. y B. Fuentes-Pardo. 1977. Circadian Rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56<sup>A</sup>:601-605.

- Sanderman, D.C. 1990. Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science.* 223-239.
- Shaw, S. R. y S. Stowe. 1982. Photoreception. *The Biology of Crustacea Vol.3.* D.E. Bliss (Ed). Academic Press. USA. 292-356 pp.
- Suzuki, T; M. Makino-Tasaka y S. Miyata 1985. Competition between retinal and 3-dehydroretinal for opsin in the regeneration of visual pigment. *Vision Res.* 25(2):149-154.
- Wald, G. 1967. Visual Pigments of crayfish. *Nature* 215(9):1131-1133.
- Wiersman, C. A. G. y T. Yamaguchi. 1967. Integration of visual stimuli by the crayfish central nervous system. *J. Exp. Biol.* 47:409-431.
- Wilkins, L. A. 1988. The crayfish caudal photoreceptor: Advances and questions after the first half century. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C(1):61-68