



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

11281

14

**“PARTICIPACION DEL GANGLIO CEREBROIDE EN LA  
EXPRESION DE LA ACTIVIDAD CIRCADIANA DE  
RESPUESTA A LA LUZ EN EL ACOCIL”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. EN C. OSCAR H. HERNANDEZ VAZQUEZ**

TUTOR

**DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO**

ENERO DE 2001



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.

**A JESSICA, mi esposa, a quien dedico esta tesis por ser tan comprensiva, entusiasta, amorosa y paciente. Juntos iniciamos este proyecto de vida y juntos hemos dado un paso más. Todo el esfuerzo que implicó alcanzar esta meta se lo dedico a ella... porque sólo con ella y por ella pude lograrlo. Te amo.**

**A mis hijos Jéssica Adriana, Karla María y Oscar Andrés, quienes me han dado el amor e inspiración necesarios para tratar de ser alguien en la vida y quienes han sabido conformarse por el tiempo que este trabajo les ha quitado. Los adoro.**

**A mis padres Sr. Francisco Hernández Guarneros y Graciela Vázquez Mellado, por haberme dado la vida, por su eterno e incansable apoyo y por predicar con el ejemplo.**

**A mis hermanos Francisco, Martha, Antonio y Graciela, a quienes agradezco profundamente su apoyo, comprensión y cariño.**

**A mis sobrinos Alina, Fabián, Mauricio, Elías, David y Arturo, por su cariño y los grandes momentos hasta ahora vividos.**

**A mis suegros Sr. Fernándo Sánchez Madrid y Micaela Ferriz de Sánchez, por todo su apoyo y por haber confiado en mí. Gracias también a Fernándo, Lucy y Daniel así como a Reyna y Fernándo Valadez.**

**A la Dra. Beatriz Fuentes Pardo, por su confianza, apoyo y dirección. Gracias por tenderme la mano cuando más lo necesitaba. Gracias por su apoyo y comprensión a todos y cada uno de los elementos de este laboratorio.**

**A mis asesores, Dr. Alberto Huberman y Dr. Raúl Aguilar, por sus comentarios, críticas y aportaciones a este trabajo. Gracias por el apoyo recibido y el tiempo dedicado a mi instrucción.**

**Al Dr. Luis Eduardo Castillo Hernández, Director del CIET de la UAC, por su gran apoyo y confianza. Agradezco profundamente todas las facilidades que me otorgó para la realización de este trabajo. Asimismo a todos los elementos que conforman el CIET. Gracias por comprensión y ayuda.**

**A la Biol. Mar. Karina Ivett Maldonado León, por su gran apoyo, serio y responsable. Agradezco profundamente las horas dedicadas a la obtención y análisis de los datos así como al cuidado de los animales. Deseo de todo corazón que el Doctorado que recién inició llene todas sus expectativas y lo concluya con éxito. Gracias nuevamente.**

**Many many thanks to Dr. Theodore H. Bullock, from the University of California of San Diego (UCSD) who has been a friend and a guide. It has been a big honor for me to work with him in a research project.**

**A la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber aportado los recursos económicos necesarios para realizar estos estudios.**

# INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	4
I. Ritmos Circadianos.....	4
1. Generalidades.....	4
2. Aspectos filogenéticos.....	6
3. Importancia adaptativa.....	8
4. Estructuras implicadas.....	8
5. Ritmos circadianos en el acocil.....	9
II. Los crustáceos decápodos (acocil).....	12
1. Ventajas.....	12
2. Anatomía del cerebro.....	12
3. Sistema visual.....	14
III. Importancia y utilidad de los registros extracelulares.....	17
IV. Planteamiento del problema.....	20
HIPOTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	26
A. Animales.....	26
B. Procedimientos generales.....	26
C. Preparaciones experimentales.....	27
D. Adquisición de los datos.....	29
E. Análisis.....	29
F. Estimulación.....	32
RESULTADOS.....	33
I. Caracterización de la actividad eléctrica cerebral.....	33
A. Actividad espontánea.....	33
1. Espigas.....	33
2. Ondas lentas.....	34
3. Carácter temporal.....	35
4. Registros crónicos.....	35
5. Influencia del estado de excitación motora.....	35
B. Actividad provocada por estímulos sensoriales.....	36
1. Destellos de luz blanca.....	36
2. Objetos en movimiento.....	37
3. Patrones visuales estructurados.....	37
4. Estímulos mecánicos.....	38
II. Ritmos circadianos en la actividad espontánea.....	39
1. Registros del protocerebro.....	39
2. Registro de otras zonas cerebrales.....	40

3. Los ritmos de distintas zonas están sincronizados...	41
4. Semi-aislamiento quirúrgico del cerebro.....	41
III. Ritmos circadianos en la actividad provocada por luz.....	42
1. Ritmos de los Potenciales Provocados Visuales....	42
2. Registro simultáneo del cerebro y la retina.....	44
DISCUSION.....	46
I. Preparación crónica.....	46
II. Controles.....	46
III. Caracterización de la actividad eléctrica cerebral.....	47
1. Actividad espontánea.....	47
2. Respuestas provocadas por estímulos sensoriales...	53
IV. Ritmos circadianos en la actividad espontánea.....	57
1. Registros de actividad multiunitaria.....	57
2. Acrofase diurna en oscilación libre y fotoperiodo...	58
3. Proto-, deuto- y tritocerebro.....	60
4. Ganglio semiaislado.....	63
V. Ritmos circadianos en las respuestas provocadas por luz.....	64
1. Ritmos en la sensibilidad a la luz.....	64
2. Nivel de acoplamiento.....	65
3. Neuronas neurosecretoras.....	65
CONCLUSIONES.....	68
APENDICE.....	69
I. Controles.....	69
II. Potenciales relacionados con un suceso .....	75
BIBLIOGRAFIA.....	79

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la organización del sistema circadiano responsable del ritmo de respuesta a la luz en el acocil y determinar la participación del ganglio cerebroide en la expresión de este ritmo, utilizando para ello una preparación de animal completo, no anestesiado ni restringido, en la cual fuera posible obtener registros cerebrales de la actividad extracelular multiunitaria, espontánea y provocada, en forma crónica.

Al no haber antecedente alguno sobre dicha preparación, el primer paso importante fue desarrollar la metodología necesaria para obtener registros de la actividad cerebral en preparaciones crónicas. Fue necesario diseñar e implantar en la cabeza del animal un electrodo que no afectara su sobrevivencia por días, semanas o meses. Fue importante mantener íntegros los sistemas sensitivos, motores, humorales y neuroendocrinos durante los días de registro. Para lograr lo anterior fue indispensable realizar diversos controles que permitieran asegurar que los registros cerebrales se encontraban libres de artificios. En el Apéndice se presentan dichos controles.

El segundo paso importante implicó la caracterización de algunos aspectos relevantes de la actividad eléctrica espontánea como son la frecuencia y amplitud predominantes, carácter temporal e influencia del estado de excitación motora. Asimismo, se estableció la factibilidad de registrar potenciales promediados provocados por la estimulación selectiva de las vías sensoriales visual y táctil. Los detalles pueden ser consultados en Hernández y cols., 1992, 1993a,b; 1996a,b.

La caracterización circadiana fue evaluada midiendo la frecuencia de disparo de las neuronas con actividad espontánea, así como la latencia y duración de los potenciales provocados promediados por estímulos luminosos, tanto en condiciones de oscilación libre (oscuridad constante) como en fotoperiodo (luz:oscuridad). Se determinaron los valores del periodo, la relación entre los periodos de actividad y de reposo (relación  $\alpha:\rho$ ) y la amplitud relativa para cada ciclo. En algunos experimentos se obtuvieron registros simultáneos del electrorretinograma (ERG) y del cerebro, o de dos sitios cerebrales distintos, y en algunos otros se obtuvieron los registros cerebrales con los tallos oculares atados o los conectivos circunesofágicos cortados.

Se presentan evidencias de que existen ritmos circadianos de actividad espontánea multi-unitaria en el protocerebro, deutocerebro y tritocerebro del

acocil, tanto en condiciones de oscilación libre como en fotoperiodo. Estos ritmos se encuentran en fase y con una actividad máxima durante las horas de luz. Se observó que la sensibilidad a la luz del cerebro, medida como el recíproco de la latencia de los potenciales provocados visuales (PPVs) tiene un comportamiento circadiano, con un máximo durante los periodos de oscuridad. Finalmente se determinó que el ritmo de sensibilidad a la luz posee un desfase de cerca de  $180^\circ$  con los ritmos de actividad multi-unitaria, coincidiendo en cambio, con la máxima sensibilidad a la luz de los fotorreceptores (ERG) y fibras visuales aferentes, por lo que es plausible proponer que los ritmos circadianos de los PPVs pueden reflejar variaciones circadianas en la sensibilidad a la luz de las estructuras visuales, con el resultado de la liberación circadiana de la hormona dispersora de pigmentos (HDP), inducida y/o producida por neuronas marcapasos localizadas en el cerebro.

## ABSTRACT

One of the most widely studied circadian rhythms in invertebrates is that of light responsiveness whose underlying mechanisms seem to involve different groups of oscillators that act as pacemakers. Although in crayfish, there are clear circadian rhythms in the amplitude electroretinogram (ERG) the precise location of the pacemaker system driving this rhythm is uncertain. Some data suggest that the circadian pacemaker could be located in a group of neurosecretory cells of the supraesophageal ganglion (brain) and that the sinus gland plays determinant role in the generation and expression of this rhythm through periodic release of dispersing-pigment hormone (DPH). Thus, the aims of this work were: 1) to develop a preparation for the chronic recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish, 2) characterize the spontaneous and evoked brain activity and 3) to examine the role of the brain in the expression of the ERG circadian activity, testing the hypothesis that the electrical activity at the brain level has a circadian behavior in the firing pattern of spontaneous multiunit activity (MUA) and in visual evoked potentials (VEPs). The results indicate that there are robust circadian rhythms in both MUA, recorded from several regions of the brain and in latency of the averaged VEPs. These two rhythms showed the main peak by the daytime, while the ERG amplitude is out of phase with it and shows the main peak about midnight.



Además de los ya mencionados, este trabajo ha dado lugar a los siguientes comunicados:

- O.H. Hernández and B. Fuentes-Pardo. (1997). "Circadian electrical activity in the crayfish brain". Annual Meeting de la Society For Neuroscience. New Orleans, La. USA.
- O.H. Hernández and B. Fuentes-Pardo (1999). "Cerebroid ganglion is the presumptive circadian pacemaker of electrical response to light circadian rhythm in the crayfish". V Latin American Symposium in Chronobiology. Buenos Aires, Arg.
- Maldonado-León Karina y Hernández Oscar H. (2000). "Estudio electrofisiológico en el cerebro del cangrejo moro (Menippe mercenaria) semi-intacto, no anestesiado ni restringido. Revista de Investigaciones Marinas. Vol. 20 No. 2.
- O.H. Hernández and B. Fuentes-Pardo (2001). "Cerebroid ganglion is the presumptive circadian pacemaker of electrical response to light circadian rhythm in the crayfish" Biological Rhythms Res. (en prensa).

# INTRODUCCION

## I. Ritmos circadianos.

### 1. Generalidades.

Se ha propuesto que los organismos pueden medir el tiempo astronómico mediante diversos procesos que ocurren tanto en el reino animal como el vegetal, los cuales quedarían incluidos dentro de cuatro categorías: 1) ritmos persistentes que poseen periodos cercanos a los de las mareas (circamareales); cercanos a la duración del día y la noche (circadianos); cercanos a 28 días (circalunares) y cercanos al periodo de traslación de la tierra alrededor del sol (circanuales); 2) sensación del tiempo, tanto en abejas como en humanos; 3) fotoperiodismo estacional, mediante el cual varios organismos realizan una cierta función a un determinado tiempo del año, para lo cual es necesario una medición diaria de la duración del día (o de la noche) y 4) orientación celeste o navegación, en donde el sol, la luna o las estrellas son utilizadas como guías direccionales implicando un sistema sensor del tiempo capaz de compensar las posiciones continuas pero cambiantes en forma predecible (Bünning, 1973; Palmer y cols., 1976; Brady, 1982; Edmunds, 1984).

Estos cuatro tipos de biocronometría funcional tienen correlatos externos (generados por el movimiento de la tierra y los astros) a los cuales los organismos se han adaptado. Aunque los últimos tres tipos han sido encontrados fundamentalmente en organismos más evolucionados y probablemente son relativamente recientes, los ritmos persistentes (de la primera categoría) que son evolutivamente más antiguos, han sido encontrados prácticamente en todas las especies de organismos, tanto del reino animal (Edmunds, 1984) como vegetal (Thain y cols., 2000; Kreps y cols., 2000). Por lo tanto, un entendimiento de las bases fisiológicas y bioquímicas de los osciladores más simples como aquellos de los invertebrados (incluyendo organismos unicelulares) puede ser crucial para dilucidar algunos fenómenos de mayor nivel de complejidad.

Los ritmos circadianos han sido considerados como fenómenos fundamentales de la organización de los sistemas vivientes y han sido denominados circadianos debido a que su periodo no es de 24 horas exactamente, sino de 24

horas con algunos minutos o pocas horas de más o de menos (Aschoff, 1960, 1981; Fuentes-Pardo y Moreno-Sáenz, 1988). Aparte de tener un periodo cercano a 24 hrs, los ritmos circadianos están caracterizados por otros criterios adicionales (Mergenhagen, 1980; Aréchiga, 1996):

- Persisten bajo condiciones ambientales constantes.
- Son casi independientes de la temperatura (con un coeficiente  $Q_{10}$  usualmente cercano a 1 en un intervalo de 15 a 35 °C).
- Pueden ser sincronizados por estímulos cíclicos ambientales con periodos distintos de 24 hrs.
- Pueden ser modificados en su fase (con avances o retrasos) dependiendo del momento circadiano en que se aplique un estímulo adecuado (ejem. señales luminosas).

Algunos mecanismos permiten a los osciladores circadianos ajustar su frecuencia de oscilación natural a la frecuencia de algunas señales externas, este fenómeno es conocido como sincronización (Aschoff, 1960). Entre todas las señales externas que se conocen, la luz es, con mucho, la señal sincronizadora más importante, debido a que los cambios cíclicos que muestra en la naturaleza tienen un alto grado de precisión. Asimismo, las oscilaciones circadianas permiten que varias funciones coincidan o eviten la coincidencia, proveyendo a los organismos de un orden temporal interno conocido por algunos autores como sincronización interna (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993; Aréchiga, 1996; Yamazaki y cols., 2000). Un argumento a favor del carácter endógeno de los ritmos es que al colocar un organismo bajo el mayor número de condiciones ambientales constantes (principalmente la luz y la temperatura), sus ritmos presentan periodos diferentes a los que muestran cuando actúan sobre él los diferentes factores externos. La oscilación de los sistemas circadianos en condiciones ambientales constantes se conoce como "oscilación libre" (free-running) y tiene un periodo cercano pero diferente de 24 horas, el cual se hace evidente durante los distintos días en que el organismo es mantenido en condiciones constantes. El periodo cercano pero no exacto a 24 horas excluye la posibilidad de que el ritmo sea originado por una señal externa, la cual tendría un periodo de 24 horas (Pittendrigh, 1981; Fuentes-Pardo y cols., 1988; Aréchiga y cols., 1993; Aréchiga, 1996).

Entre los factores ambientales que influyen sobre los ritmos circadianos, la luz tiene un papel destacado, ya que influye en la característica esencial de los fenómenos circadianos, el periodo, así como en la relación que existe entre los periodos de actividad y de reposo (relación  $\alpha:\rho$ ) y el nivel de excitación del sistema. La relación entre la cantidad de luz y la actividad del organismo

cambia según éste sea diurno o nocturno. La “regla de Aschoff” (Aschoff, 1960) establece que los organismos diurnos aumentan la frecuencia de su ritmo, la relación entre el tiempo de actividad y el tiempo de reposo y el nivel de excitación cuando reciben mayor cantidad de luz, en tanto que, en los organismos nocturnos, se reducen estos tres parámetros ante el mismo incremento de luz.

## **2. Aspectos filogenéticos.**

Si bien la presencia de un sistema nervioso central (SNC) complejo no es imprescindible para evolucionar exitosamente, como lo ejemplifican las bacterias (Schmitz y cols., 2000; Lorne y cols., 2000), algas unicelulares (Lin y Carpenter, 1998; Okamoto y cols., 1999) o las levaduras (Iwasaki y Dunlap, 2000; Liu y cols., 2000; Lee y cols., 2000) que son capaces de realizar las funciones necesarias para su supervivencia y reproducción, es evidente que se requiere de la presencia del SNC para desarrollar capacidades conductuales más complejas y diversas.

A lo largo de la evolución los sistemas nerviosos de los organismos se han diferenciado (especializado) y centralizado cada vez más. Mientras que las células de los sistemas nerviosos de los organismos filogenéticamente más antiguos realizan funciones similares, las de los organismos más evolucionados muestran grados crecientes de especialización. Así mismo, a diferencia de las especies evolutivamente más recientes que tienen sus células nerviosas agrupadas en grandes estructuras cerebrales, las especies más antiguas tienden a tener sus estructuras nerviosas organizadas en forma difusa con respecto a una zona central (simetría radial). Así, el sistema nervioso de los celenterados (hidra, medusa) está constituido de fibras nerviosas difusas en forma aparentemente al azar. Sin embargo, aun en estas especies se observa ya un centralismo neuronal debido a que el sistema nervioso de las medusas está más centralizado que el de la hidra, con dos anillos de neuronas organizados en el manto del animal. En los equinodermos como las estrellas de mar, el sistema nervioso muestra un aumento en la especialización y centralización, ya que aparecen tractos nerviosos, neuronas de asociación y arcos reflejos así como estructuras neurales lejos de la superficie corporal, lo que se asocia con un incremento en la diferenciación de la conducta.

Al parecer en los gusanos planos, se observan los primeros sistemas nerviosos organizados bajo un plan de simetría bilateral (donde las dos mitades son virtualmente imágenes en espejo) en lugar de una simetría radial. Esta simetría

bilateral fue crítica para la evolución de niveles avanzados de centralización en el control de la conducta. Aparecen series de ganglios localizados a lo largo de una columna. Esta organización fue más desarrollada en los gusanos segmentados donde aparecieron ganglios aún más prominentes. En los moluscos cefalópodos como el pulpo, el ganglio más anterior se ha diferenciado como un auténtico cerebro en donde se han identificado hasta 64 secciones o lóbulos. Sin embargo, los cerebros de los artrópodos representan el pináculo de la evolución de los invertebrados debido a que son altamente diferenciados y capaces de mediar conductas complejas (Dewsbury, 1978).

Los ritmos circadianos se han podido detectar en todos los niveles de organización de los seres vivos, de tal manera que están presentes no solo en los organismos multicelulares sino también en poblaciones de organismos unicelulares e incluso en células individuales (Chen y cols., 1998; Ramsdale y Lakin-Thomas, 2000; Xu y cols., 2000). Esto demuestra que la interacción de una red compleja de células como en los organismos evolucionados no es un requisito esencial para la generación de los ritmos. Todos los componentes esenciales del reloj generador de los ritmos pueden estar contenidos dentro de una célula individual y sus mecanismos han de estar basados en reacciones moleculares dentro de la célula en vez de interacciones intercelulares (Hall y Sassone-Corsi, 1998; Hardin, 1998; Giebultowicz, 2000). En los últimos 50 años una gran variedad de ritmos circadianos han sido documentados en numerosos microorganismos eucarióticos en un amplio espectro de variables conductuales, fisiológicas y bioquímicas. Estos ritmos incluyen apareamiento, movilidad, fototaxis, bioluminiscencia, fotosíntesis, división celular, actividades enzimáticas...y otros (Mergenhagen, 1980; Edmunds, 1984; Hastings, 1994; Loros, 1995, Bell-Pedersen y cols., 1996; Ramsdale y Lakin-Thomas, 2000; Refinetti, 2000; Hall, 2000). Aunque existen algunos reportes sobre ritmos circadianos en celenterados, platelmintos y anélidos (Mori, 1960; Sweeney, 1976; Coulon y cols., 1976; Bogéa y cols., 1996; Ambros, 2000), la inmensa mayoría de la información circadiana en invertebrados se ha obtenido de moluscos (Khalsa y cols., 1990, 1995; Geusz y cols., 1994; Michel y cols., 1999; Refinetti, 2000) y artrópodos (Page y Larimer, 1975a,b; Fernández de Miguel y Aréchiga, 1994; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997; Hall y Van Ham, 1998; Williams, 1998; Sauman y Reppert, 1998; Itoh y cols., 2000; Kennedy y cols., 2000). Desde el punto de vista genético, los estudios en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* han contribuido enormemente al conocimiento de los ritmos circadianos mediante el descubrimiento de genes (*period*, *timeless*, *double-time*, *dClock*, *cycle* y *takeout*) y proteínas asociadas (Millar, 2000) que funcionan como el substrato intracelular de dichos ritmos (Hardin,

1998; Kaneko, 1998; Hall y Sassone-Corsi, 1998; So y cols., 2000; Rothenfluh y cols., 2000; Kaneko y cols., 2000)

### **3. Importancia adaptativa.**

La organización básica del sistema nervioso tiende a ser altamente conservada en la filogenia (Katz y Harris-Warrick, 1999). Dado que en todos los niveles de organización de la materia viva se observan fluctuaciones circadianas, se ha considerado que estas oscilaciones proporcionan ventajas adaptativas (Nicolau y cols., 2000). La bioperiodicidad en general y los ritmos circadianos en particular, representan la posibilidad del sistema de alternar las fases de actividad máxima y las de actividad mínima con las consiguientes ventajas en la regulación de la energía. También significa para el organismo que las posee, la posibilidad de entrar en fase con el ritmo de rotación de la tierra, es decir, de aprovechar en forma óptima la energía solar (o la ausencia de ésta) y las señales vinculadas con la alternancia de la luz y la oscuridad. Además, permiten que haya coincidencias espaciales y temporales entre los animales de la misma especie que favorecen el apareamiento o la lucha contra grupos enemigos. En especies distintas, estas coincidencias desempeñan un papel importante como fuente de alimentación. En tales ventajas adaptativas se adivina la presencia de mecanismos de selección natural, los cuales son la base de la evolución de los seres organizados (Fuentes-Pardo y Moreno-Sáenz, 1988).

### **4. Estructuras implicadas.**

Los ritmos circadianos son un buen ejemplo de patrones de conducta que persisten en ausencia del estímulo generador y prácticamente todas las funciones del individuo están moduladas por estos ritmos. Se ha considerado que numerosos ritmos de actividad circadiana son controlados por oscilaciones neuronales que se generan en algún centro nervioso con funciones de marcapaso (Kaneko, 1998). La presencia de ritmos endógenos planteó la necesidad de una o varias estructuras y abrió un amplio campo de investigación que busca en principio localizar la posición anatómica de tal o tales estructuras y averiguar cómo funcionan y cómo interactúan entre sí. Una cuestión fundamental sobre las oscilaciones neuronales es si las fluctuaciones circadianas observadas son causadas por un solo oscilador principal o por las interacciones producidas dentro de una población de osciladores (Pittendrigh, 1960; 1981).

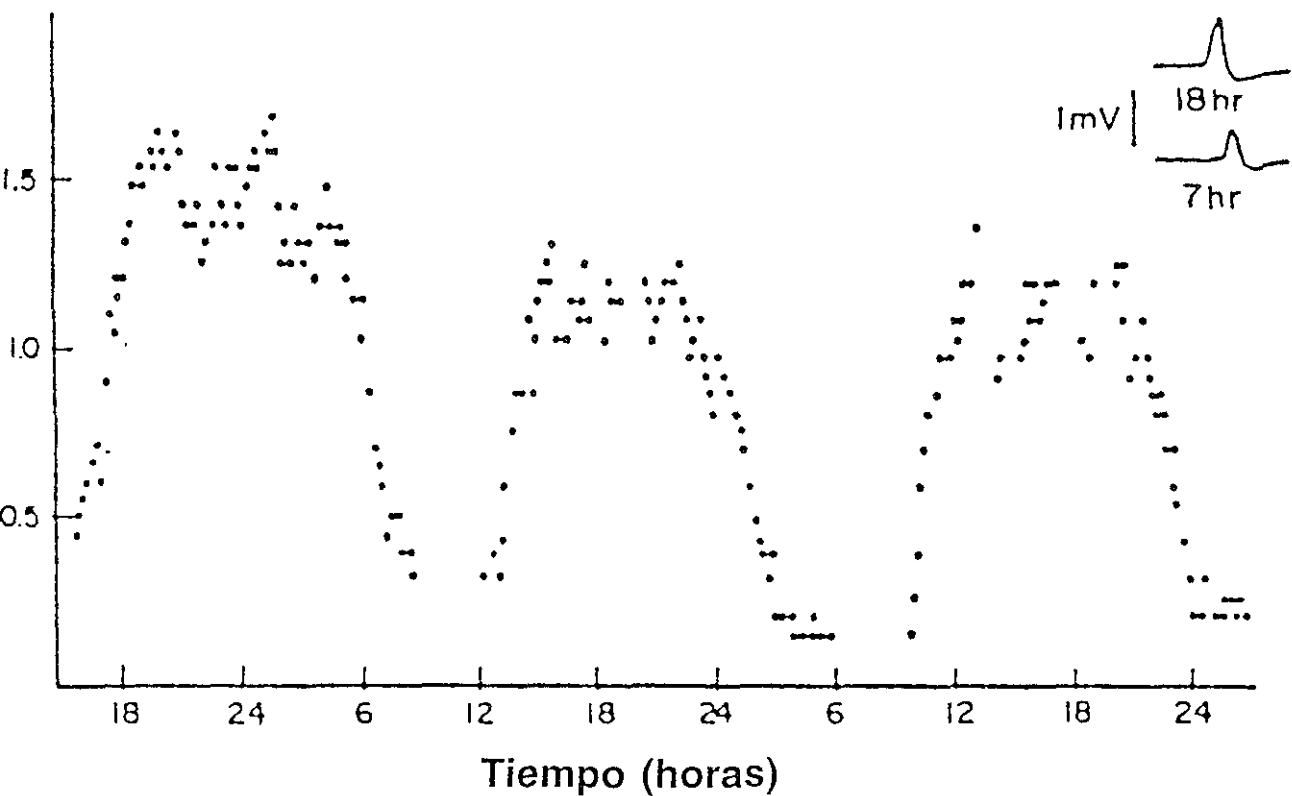
Un enfoque para el estudio de los ritmos circadianos implica el conocimiento de los elementos principales que participan en la generación y expresión de dichos ritmos, es decir, que del conocimiento que se tenga sobre la ubicación de los marcapasos, de las vías eferentes a los ritmos manifiestos (que pueden ser neurales y/o humorales; Aréchiga y cols., 1993) y de los mecanismos de sincronización (principalmente por luz) dependerá, en buena medida, la posibilidad de incidir en los procesos que determinan las características temporales de los seres vivos.

## **5. Ritmos circadianos en el acocil.**

Algunos grupos de animales han resultado particularmente útiles para el estudio de una amplia gama de funciones. El acocil, por ejemplo, ha sido extensamente estudiado en una gran variedad de contextos que incluyen las bases neurales de la conducta, los mecanismos de liberación de hormonas y la correlación entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. En estudios de ritmos circadianos, los acociles han demostrado ser excelentes modelos biológicos debido a su capacidad de sobrevivencia bajo las condiciones artificiales requeridas para registros a largo plazo (Fernández de Miguel y Aréchiga, 1992; Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993; Fernández de Miguel y Aréchiga, 1994; Rodríguez-Sosa y cols., 1994; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997; Roeder, 1999; Prieto-Sagredo y cols., 2000).

Uno de los ritmos circadianos más profusamente estudiados en el acocil es el que muestran las células fotorreceptoras visuales en respuesta a estímulos luminosos, es decir, el ritmo de amplitud del electroretinograma (ERG; fig. 1; Page y Larimer, 1975b; Barrera-Mera, 1976; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1980; Moreno-Sáenz y cols., 1987; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1992; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 1997). Sin embargo, y a pesar de que el estudio de este ritmo ha sido muy amplio, aún no se conoce con detalle cual es la organización anatomofuncional en la que se basa el sistema circadiano responsable de tal ritmo y no se sabe dónde se localizan las células marcapaso.

Los ritmos circadianos de sensibilidad a la luz, medidos como amplitud del ERG reflejan los cambios diarios en la posición de los pigmentos retinulares de protección, los cuales modulan la cantidad de luz que alcanza al receptor (Aréchiga y Fuentes-Pardo, 1970), sin embargo, también la misma célula retinular (receptor) puede mostrar una distinta sensibilidad de acuerdo con la disponibilidad de fopigmento en las diferentes horas del día (Sánchez y



**Fig. 1** Ritmo circadiano en la amplitud del electroretinograma (ERG) en el acoscil completo. Se pueden observar oscilaciones de alta frecuencia dentro de los tres ciclos mostrados. La abscisa muestra el tiempo externo. El inserto muestra el ERG a dos diferentes horas del día. Note las diferencias en amplitud en ambos registros. Figura tomada de Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977.



Fuentes-Pardo, 1977). La modulación de la sensibilidad a la luz en el acocil al nivel de la retina, implica cambios en la captación de la luz en función de la posición de los pigmentos de protección retinianos, de tal manera que la amplitud de la respuesta de los fotorreceptores a un pulso de luz de una intensidad determinada depende del estado funcional de tres grupos de substratos celulares: a) de la ganancia o amplificación a nivel de los fotorreceptores propiamente, b) de la posición de un grupo de gránulos pigmentarios oscuros intracelulares de las células fotorreceptoras (pigmentos proximales, PP). En la oscuridad, estos gránulos son retraídos en el cono axonal de los fotorreceptores, dejando la superficie de éstos expuesta a la luz; bajo iluminación, los gránulos son dispersados en el fotorreceptor proporcionando a estas células blindaje o protección de la propia luz, c) de la posición de otro tipo de gránulos pigmentarios denominado pigmentos distales (PD) que están localizados dentro de un grupo de células largas y delgadas paralelas a los fotorreceptores y que cubren toda la longitud de la omatidia, desde la córnea hasta la lámina basal. Estos pigmentos también son retraídos en la oscuridad (o durante la noche) y dispersados bajo iluminación (Aréchiga y cols., 1993).

Se sabe que tanto los PP como los PD son capaces de mantener su ritmo circadiano de cambios de posición bajo oscuridad constante (OO; Bennit, 1932). Sin embargo, mientras que los PP presentan su migración en respuesta directa de los fotorreceptores a la luz, los PD parecen no ser reactivos a la luz, sino sensibles a neurohormonas secretadas en respuesta a la propia luz. La hormona dispersora de pigmentos distales (HDPD) es secretada durante la iluminación y promueve la dispersión, sobre todo de los pigmentos distales (Kleinholz, 1966; Moreno-Sáenz y cols., 1992). También se ha encontrado que bajo la influencia de un neuropéptido similar a la HDPD, la hormona dispersora de pigmentos (HDP), las propias células fotorreceptoras reducen su respuesta a la luz.

Por lo tanto, en el acocil, los pigmentos retinianos de protección son considerados como efectores de un reflejo neuroendocrino que es iniciado cuando la luz alcanza los fotorreceptores (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993) y es terminado cuando la HDPD (Welsh, 1930) o HDP es liberada desde la glándula sinusal, que es un órgano neurohemal localizado en el tallo ocular.

Estos hechos han llevado a proponer que el ritmo de amplitud del ERG en el acocil depende de la disponibilidad de fotopigmento dentro de las células

retinulares y de la posición de los pigmentos retinianos de protección, por lo que los cambios periódicos en amplitud del ERG son, necesariamente, una expresión de los cambios en uno o ambos de estos parámetros (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993).

Los registros simultáneos de largo tiempo del ERG de ambos ojos del acocil muestran fluctuaciones en la amplitud con un patrón circadiano y mantienen una fuerte relación de fase, tanto en ciclos de luz-oscuridad como en condiciones de oscilación libre en oscuridad constante, de tal manera que en animales intactos, los ritmos del ERG de ambos ojos están sincronizados (Page y Larimer, 1975a, b).

Uno de los procedimientos más comúnmente utilizados para la localización de marcapasos circadianos ha sido la lesión o la extirpación de estructuras neurales o neurohumorales (Nishiitsutsuji-Uwo and Pittendrigh, 1968b; Loher, 1972; Page y cols., 1977; Page, 1981; Aréchiga, 1996; Sauman y Reppert, 1998). La extirpación unilateral de la glándula sinusal produce una pérdida de la fase entre los dos tallos oculares, a pesar de que el ojo privado de la glándula sigue mostrando oscilaciones rítmicas. Si se lesionan ambas glándulas sinusales, desaparecen las oscilaciones circadianas del ERG de ambos ojos y se pierde toda relación temporal entre ellos (Hernández-Falcón y cols., 1987). Esto puede indicar que cada ojo posee al menos un oscilador que está implicado en la generación del ritmo del ERG y que está relacionado con un oscilador equivalente del ojo contralateral. Sin embargo, la persistencia del ritmo circadiano de amplitud del ERG del tallo ocular y de la migración de los PP en condiciones de aislamiento, permite excluir la posibilidad de que exista únicamente un oscilador para ambos ojos (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993). Por lo tanto, dilucidar cómo se establecen y mantienen las relaciones apropiadas dentro de un sistema con osciladores múltiples es relevante, ya que el acoplamiento de osciladores puede determinar las características de los ritmos circadianos.

A nivel de interneuronas visuales, tanto en el acocil (Aréchiga y Wiersma, 1969b) como en el cangrejo (Aréchiga y cols., 1974) se ha mostrado un ritmo circadiano (paralelo al de la amplitud del ERG) en la frecuencia de disparo de las fibras de respuesta sostenida (sustaining fibres, SFs). Estas SFs también presentan un ritmo de actividad espontánea en condiciones de oscuridad constante. Es probable que el origen de este ritmo involucre otro tipo de interneuronas del tracto óptico denominadas fibras de actividad (activity fibres; AF), las cuales son interneuronas mecanoreceptivas eferentes que

exhiben una variación rítmica en su activación (Aréchiga y cols., 1980). Se ha mostrado que las AF tienen una influencia facilitadora sobre las SFs en su respuesta a la luz y que sus oscilaciones pueden reflejar el ritmo de actividad locomotora del animal (Aréchiga y Wiersma, 1969a; Wiersma y Yamaguchi, 1966).

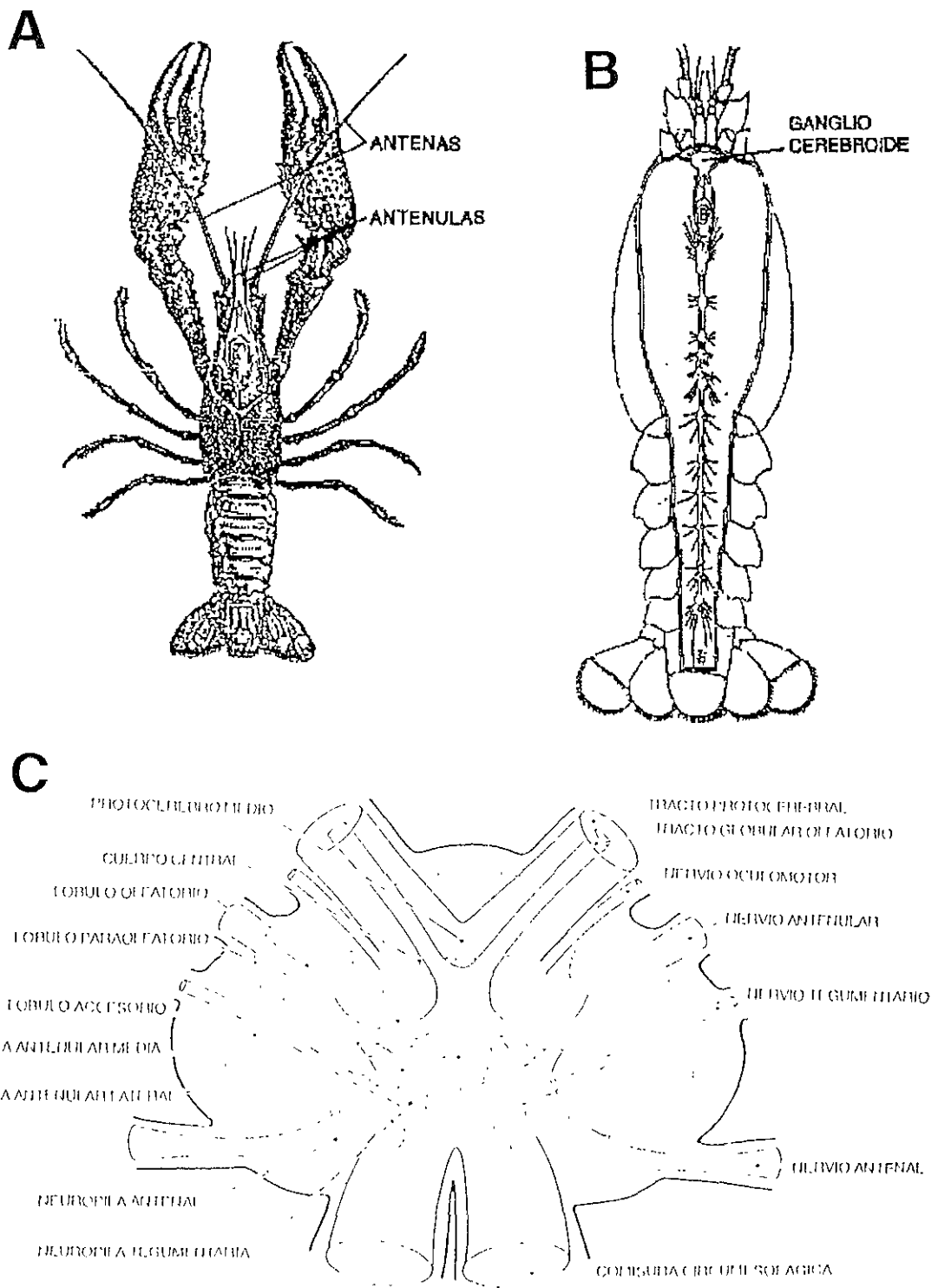
## **II. Los crustáceos decápodos (acocil).**

### **1. Ventajas.**

En estudios que relacionan patrones electrográficos cerebrales con estados conductuales, los artrópodos como animales experimentales ofrecen varias ventajas sobre organismos evolutivamente más complejos (vertebrados): sus cerebros y órganos sensoriales poseen relativamente pocas neuronas, su sistema nervioso central está anatómicamente y funcionalmente bien diferenciado y sus patrones conductuales son típicamente estereotipados. Entre los artrópodos, los crustáceos decápodos (fig. 2) han sido utilizados por los neurobiólogos debido a que son animales comparativamente grandes, con neuropilas cerebrales y entradas visuales bien mapeadas (Wiersma, 1958; Wiersma y cols., 1964; Wiersma y Mill, 1965; Wiersma y Yamaguchi, 1966; Wiersma y Yamaguchi, 1967; Sandeman y Denburg, 1976; Glantz y cols., 1981; Arbas y cols., 1988; Sandeman y cols., 1992). Además, estos animales tienen características anatómicas en la cabeza que favorecen la introducción de electrodos para alcanzar el cerebro sin dañar las estructuras circunvecinas. Su fácil adquisición y mantenimiento en condiciones de laboratorio constituyen ventajas adicionales.

### **2. Anatomía del cerebro.**

La cabeza del acocil tiene un par de ojos compuestos con tallos oculares relativamente largos a través de los cuales se recibe y procesa la información visual. Dos pares de antenas: las antenas I (anténulas o primeras antenas) compuestas c/u de dos flagelos sensoriales que llevan información principalmente quimiorreceptiva (Derby y Ache, 1984), y las antenas II compuestas de un flagelo sensorial largo que lleva información predominantemente mecanorreceptiva (Derby, 1982). El sistema nervioso central (SNC) de los invertebrados difiere del de los vertebrados en que las sinapsis especializadas y los componentes de conducción de las neuronas



**Fig. 2** *Procamburus clarkii*. **A.** Animal completo, vista dorsal. **B.** Cadena ganglionar. Consta del ganglio más anterior llamado ganglio cerebroide, ganglio supraesofágico, ganglio cerebral o simplemente cerebro, un ganglio subesofágico, cinco ganglios torácicos y seis abdominales. **C.** Vista dorsal del cerebro con sus principales lóbulos, tractos y neuropilas.

están separados de los somas, los cuales se ubican en la periferia de los ganglios. Así, la porción central de un ganglio se encuentra desprovista de cuerpos celulares y consiste sólo de neuritas las cuales forman la neuropila (o neuropilo), que es el área en donde se efectúan la transmisión y propagación de las señales (Cohen, 1969).

En invertebrados, el SNC está compuesto de varios ganglios en sus segmentos cefalotorácico y abdominal y un par de nervios llamados conectivos, que conectan cada uno de ellos (fig. 2B). El ganglio más anterior es el llamado supraesofágico, cerebroide o cerebro propiamente y representa la estructura nerviosa fundamental que se describe en este estudio (fig. 2C). Existen tres divisiones principales en el cerebro: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (fig. 3; Sandeman y cols., 1992).

**Protocerebro.** Se divide en tres regiones:

**a). Ganglio óptico.** Contiene tres neuropilas – lámina (L), médula externa (EM) y médula interna (IM) - dedicadas primordialmente a procesar la información recibida de los fotorreceptores de la retina.

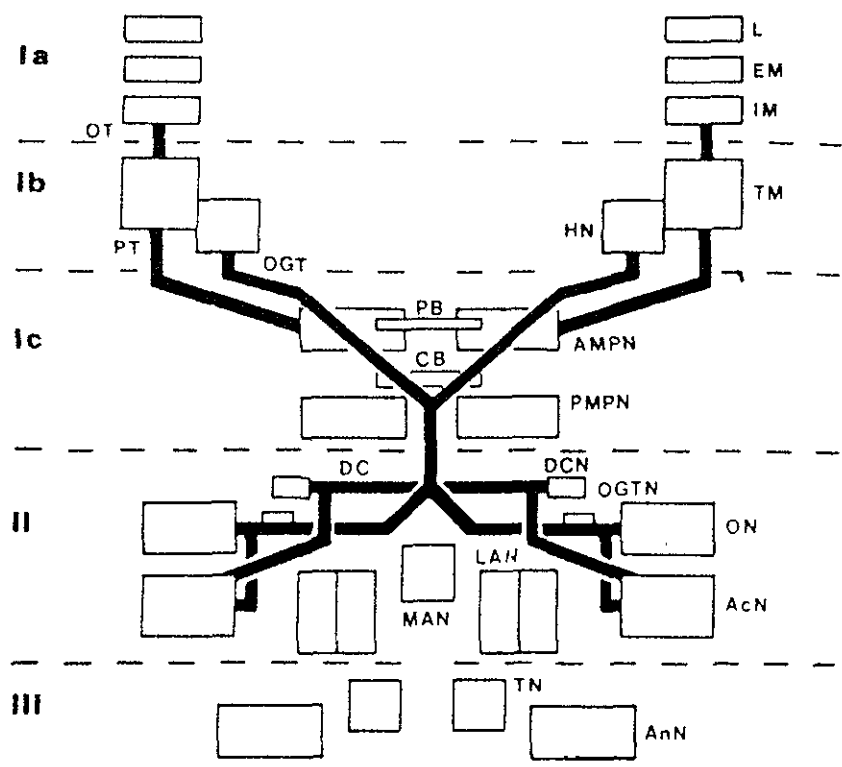
**b). Protocerebro lateral.** Contiene dos neuropilas – médula terminal (TM) y cuerpo hemielipsoidal (HN) -. La primera contiene células neurosecretoras del órgano X y de su órgano neurohemal, la glándula sinusal (GS), que juntas constituyen uno de los sistemas neuroendocrinos más importantes de los crustáceos. El HN a veces se encuentra como una estructura glomerular y se ha postulado que es homólogo con el *corpora pedunculata* de los insectos (Hanström, 1925).

**c). Protocerebro medio.** Forma la parte anterior de las neuropilas situadas medianamente en el cerebro. Contiene dos pares de neuropilas a los lados de la línea media - medial anterior (AMPN) y medial posterior (PMPN) – y dos neuropilas impares que cruzan la línea media – puente protocerebral (PB) y cuerpo central (CB) -.

**Deutocerebro.** Consta de las siguientes neuropilas.

**a). Lóbulo olfatorio (ON).** Recibe las terminales de las aferentes primarias de los quimiorreceptores de las antenas I.

**b). Neuropila lateral de la antena I (LAN).** La neuropila lateral de cada lado del cerebro recibe aferentes de los mecanorreceptores, del estatocisto, y de quimiorreceptores no vellosos de la antena I ipsilateral. También contiene los campos sinápticos de neuronas motoras que controlan los movimientos de la antena I ipsilateral.



**Fig. 3.** Regiones cerebrales y neuropilas. Las barras negras gruesas representan los tractos y comisuras que unen las neuropilas, las cuales están representadas como cuadrados o rectángulos. Las abreviaciones y los números romanos representan las divisiones del cerebro de acuerdo al orden como se describen en el texto (Ia, Ib y Ic: protocerebro; II: deutocerebro y III: tritocerebro; lámina (L), médula externa (EM), médula interna (IM), médula terminal (TM), cuerpo hemielipsoidal (HN), neuropila medial anterior (AMPN), neuropila medial posterior (PMPN), puente protocerebral (PB), cuerpo central (CB), lóbulo olfatorio (ON), neuropila lateral de la antena I (LAN), neuropila media de la antena I (MAN), lóbulo accesorio (AcN), neuropila de la comisura deutocerebral (DCN), neuropila del tracto globular olfatorio (OGTN), neuropila de la antena II (AnN), neuropila tegumentaria (TN), tracto óptico (OT), tracto protocerebral (PT), tracto globular olfatorio (OGT), comisura deutocerebral (DC). Figura tomada de Sandeman y cols., 1992.

- c). **Neuropila media de la antena I (MAN)**. También recibe contactos sinápticos del estatocisto.
- d). **Lóbulo accesorio (AcN)**. Es más grande que el lóbulo olfatorio en el acocil, sin embargo, no hay evidencia de que reciba aferentes primarias ni eferentes motoras.
- e). **Neuropila de la comisura deutocerebral (DCN)**. Ha sido también llamado “lóbulo paraolfatorio”. Sus conexiones sinápticas no han sido bien definidas.
- f). **Neuropila del tracto globular olfatorio (OGTN)**. Aquí se han encontrado neuronas grandes con inmunorreactividad a la serotonina y que hacen contactos sinápticos con los lóbulos olfatorio y accesorio (Schmidt y cols., 1991).

**Tritocerebro.** Incluye únicamente dos neuropilas.

- a). **Neuropila de la antena II (AnN)**. Las aferentes primarias de la antena II terminan en esta neuropila, la cual contiene también los campos sinápticos de motoneuronas que controlan el movimiento de la antena II.
- b). **Neuropila tegumentaria (TN)**. Recibe las entradas aferentes de mecanorreceptores del caparazón dorsal.

Asimismo existen varios tractos que unen áreas de neuropilas en los cerebros de crustáceos. Los mejor conocidos y bien identificados son los siguientes (Sandeman y cols., 1992):

- **Tracto óptico (OT)**. Une el último de los ganglios ópticos (IM) con el protocerebro lateral.
- **Tracto protocerebral (PT)**. Une la TM y el HN con la neuropila protocerebral medial anterior y otras áreas del cerebro.
- **Tracto globular olfatorio (OGT)**. Conecta los cuerpos hemielipsoidales y la TM con los lóbulos olfatorios y accesorios de ambos lados del cerebro.
- **Comisura deutocerebral (DC)**. En el acocil presenta dos poblaciones de axones que cruzan el cerebro conectando los dos lóbulos accesorios.
- **Conectivos circumesofágicos (OC; no ilustrados)**. Son dos tractos grandes que unen el cerebro con el ganglio subesofágico y la cadena ventral.

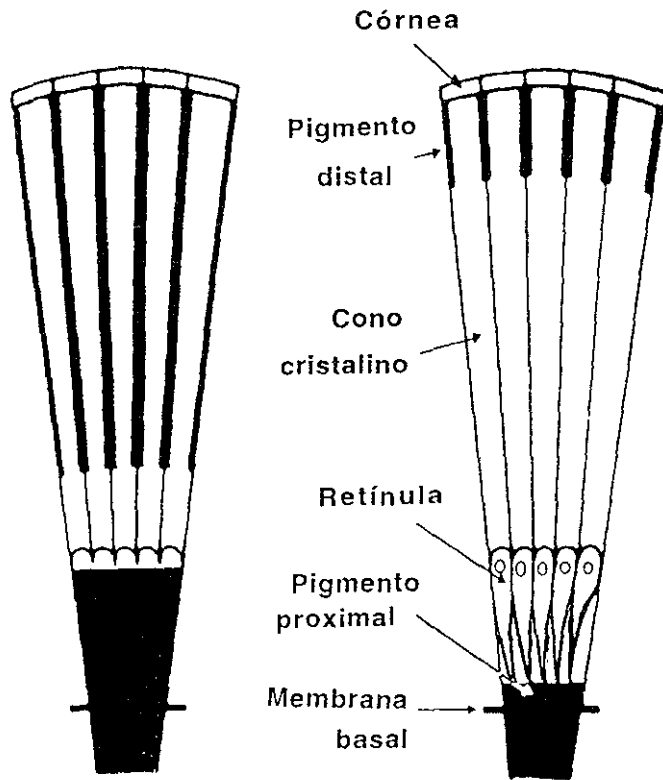
### 3. Sistema visual.

El ojo compuesto del acocil consiste de 2000 a 3000 unidades funcionales llamadas omatidios, los cuales detectan regiones limitadas del espacio que quedan traslapadas. Dependiendo de su adaptación a la luz, esta característica lo convierte en un ojo que opera por superposición de imágenes. El omatidio

consiste de un grupo de células fotorreceptoras y accesorias que forman la unidad estructural del ojo compuesto de los artrópodos. Cada omatidio consta de un lente corneal, un cono cristalino, un tracto cristalino y ocho células receptoras formando un rabdómero microvelloso (fig. 4). Siete de estas células receptoras contienen dos tipos de gránulos pigmentarios que protegen cada omatidio, uno proximal y el otro distal. La posición de estos pigmentos en los estados de adaptación a la luz y a la oscuridad permite diferentes ángulos de captación para los receptores en forma individual. El registro de la actividad eléctrica poblacional de los fotorreceptores retinianos lo constituye el electroretinograma (ERG), el cual puede estar formado por dos componentes referidos como H-I y H-II (Naka y Kuwabara, 1956). El componente H-I aparece sólo con el encendido de la iluminación, se origina en la parte interna de la capa de receptores y es el responsable del ERG en la adaptación a la oscuridad. En cambio, el H-II se mantiene durante el estímulo, aparece durante la adaptación a la luz y se origina fuera de la capa de receptores (Naka y Kuwabara, 1956).

Moviéndonos en forma centrípeta, se ha demostrado (al menos en *Leptograpsus*; Stowe, 1977) que el arreglo en mosaico de los fotorreceptores retinianos es proyectado en forma retinotópica dentro de la lámina, donde hacen contacto con células monopolares (Strausfeld y Nässel, 1981). Estas neuronas monopolares están conectadas en forma característica con las terminales específicas de los receptores constituyendo canales paralelos distintos que proyectan hacia células de relevo en la médula externa (EM). A este nivel (médula externa), que es donde se originan las interneuronas visuales de alto orden denominadas fibras de respuesta sostenida (sustaining fibres, SFs; ver adelante), el mosaico retinotópico es mantenido por neuronas transmedulares de campo corto que están arregladas en forma periódica (1:1) con respecto al arreglo columnar de las neuronas laminares (Strausfeld y Nässel, 1981). Esta proyección retinotópica a nivel de la EM ha sido confirmada por Kirk y cols. (1982) quienes encontraron que cada SF posee una arborización dendrítica restringida a aquella porción de la EM que corresponde a su campo receptivo corneal. De la EM la información visual fluye hacia la médula interna (IM) a través de ramilletes de neuronas de relevo columnares retinotópicas y neuronas columnares T. Sin embargo, a nivel de la IM el arreglo de las neuronas de relevo postsinápticas es tal que el mosaico retinotópico se hace burdo. En este sitio las células de relevo columnar hacen contacto sináptico con otras interneuronas de alto orden que llevan la información hacia el protocerebro lateral y/o directamente hacia el cerebro (Strausfeld y Nässel, 1981).





**Fig. 4** Representación esquemática de una sección longitudinal de la retina del acicil. Bajo condiciones de adaptación a la luz (**izquierda**) los pigmentos proximales y distales se encuentran dispersos cubriendo la mayor parte del eje longitudinal de la retina. Por el contrario, bajo condiciones de adaptación a la oscuridad (**derecha**) ambos grupos de pigmentos se encuentran retraídos. Figura modificada de Aréchiga y cols., 1993.

A nivel del tracto protocerebral (PT; también llamado nervio óptico) aún no se cuenta con una información histológica completa acerca del origen de las interneuronas aferentes y de la localización de sus cuerpos celulares. Tampoco se cuenta con informes detallados sobre el destino de la mayor parte de fibras eferentes que viajan por este tracto. En el PT del acocil se ha encontrado una gran variedad de fibras nerviosas, no solamente visuales sino también mecanorreceptivas.

Wiersma y Yamaguchi (1966) caracterizaron los componentes neurales del nervio óptico del acocil mediante análisis unitarios. Estos autores mencionan que existen dos clases principales de fibras visuales: unas que reaccionan a cambios en el nivel de luminosidad y otras que responden al movimiento de objetos. De interés para este estudio están las fibras de respuesta sostenida (SFs), que son un grupo de 14 interneuronas que disparan en ráfaga cuando sus campos visuales son expuestos a la luz (Glantz, 1971). La frecuencia de disparo de estas fibras puede ser modulado por el nivel de "excitación" motora del animal (Aréchiga y Wiersma, 1969b). En estudios intracelulares realizados por Wood y Glantz (1980a) se determinó que las SFs son las neuronas visuales más frecuentemente encontradas en el cerebro y fueron clasificadas de acuerdo con sus características temporales de respuesta provocada por luz blanca. Se encontraron cuatro clases: 1) neuronas tónicas, 2) neuronas tónicas de latencia larga, 3) neuronas fásicas de adaptación lenta y 4) neuronas fásicas de adaptación rápida. Wiersma y Yamaguchi (1966) han postulado que los distintos tipos de fibras visuales viajan en forma centrípeta por zonas diferentes del nervio óptico, lo que podría indicar que cada tipo de fibras llega a sitios diferentes de la masa cerebral e implica que el procesamiento e integración en paralelo es una característica sobresaliente de estos animales.

Existe también un gran número de neuronas no-visuales que viajan en el PT que están asociadas con la quimiorrecepción. Se sabe que esta información es transmitida a nivel del tracto protocerebral por un arreglo en paralelo de interneuronas estructural y funcionalmente diversas que son coactivadas por estímulos sensoriales. Miembros de este arreglo pueden ser interneuronas de bajo orden, que proyectan desde los lóbulos olfatorios y/o accesorios a la médula terminal vía el tracto globular olfatorio, o interneuronas de alto orden las cuales conectan la médula terminal con el cerebro o con el resto de la cadena ganglionar a través de los conectivos circunesofágicos (Derby y Blaustein, 1988).

En el acocil, cerca de la mitad del número total de fibras nerviosas del PT está constituido por fibras primarias provenientes de vellos ubicados en la región cefálica. Así mismo, existe una gran cantidad de interneuronas visuales eferentes que cruzan hacia el ojo contralateral o interneuronas que transmiten estímulos mecanorreceptivos (Wiersma y Roach, 1977).

### **III. Importancia y utilidad de los registros extracelulares.**

Desde hace tiempo los potenciales de campo producidos por un grupo de células han sido considerados como un reflejo indirecto de los cambios en su potencial de membrana (Hubbard y cols., 1969), es decir, de los potenciales sinápticos y de acción que se producen al unísono en las células. Por lo tanto, un estudio de dichos potenciales proporciona información invaluable con respecto a la actividad promedio de las células en el grupo y es un requisito básico para comprender las características fisiológicas de cualquier tipo de ensamblaje neuronal. Bullock (1993) señala que la operación de poblaciones organizadas de neuronas no puede describirse adecuadamente mediante la simple suma o extrapolación de las actividades individuales de las neuronas. Así, algunos parámetros emergentes como la sincronía (Singer, 1999) son muy importantes debido a que implican cooperatividad entre neuronas, al menos en animales evolutivamente recientes.

Los registros extracelulares de la actividad eléctrica del cerebro han sido útiles para estudiar el principal centro integrativo de la información sensorial y para establecer correlaciones entre eventos neurofisiológicos y conductuales. Estos estudios han sido realizados principalmente en mamíferos y en algunos casos han apoyado la existencia de mecanismos fisiológicos comunes en la generación y/o regulación de algunas funciones, por ejemplo el sueño (Dement y Kleitman, 1957; Hendricks y cols., 2000; Nicolau y cols., 2000). En contraste, en animales más simples como los invertebrados se desconocen tales correlaciones, debido en parte, al hecho de que los registros de la actividad eléctrica del cerebro han sido realizados en rebanadas (Williamson y Budelmann, 1991), preparaciones aisladas (Laverack, 1980; Derby y Ache, 1984; Ache y Sandeman, 1980; Combes y cols., 1999; Ohkuma y cols., 2000) y ocasionalmente en animales completos pero restringidos en sus movimientos (Bullock y Uter, 1976; Bullock, 1984; Jing y Gillette, 1999). Sin embargo, dada la riqueza informativa que representan los cerebros de invertebrados (particularmente artrópodos y moluscos), han aparecido algunos trabajos utilizando preparaciones completas no anestesiadas y con libertad de

movimientos (Aréchiga, 1969; Bullock, 1984; Bullock y Budelmann, 1991; Bleckmann y cols., 1991).

La actividad eléctrica espontánea de fondo es un buen ejemplo de propiedad emergente de una población neuronal, donde aún un conocimiento extenso de las funciones celulares no puede predecir ni explicar el modo de funcionar de dicho ensamblaje organizado. Visto como un fenómeno biológico es interesante mencionar que en los vertebrados existe una gran similitud de sus patrones espacio-temporales desde los peces hasta los mamíferos, es decir, hasta ahora no han sido identificadas diferencias sistemáticas al menos en la forma de onda o en la distribución de densidad espectral, aún en clases ampliamente separadas como los peces y los mamíferos. Esta actividad es consistente a pesar de las diferencias que existen entre miembros de una misma especie (Adrian y Buytendijk, 1931; Gerard y Young, 1937; Bremer y cols., 1939; Enger, 1957; Schadé y Weiler, 1959; Hunsaker II y Lansing, 1962; Parson y Huggins, 1965; Segura y De Juan, 1966; Walker y Burger, 1973; Warner y Huggins, 1978; Laming, 1980; Huntley, 1987; Bullock y Basar, 1988).

Por otro lado, en lugar de las ondas lentas y suaves con frecuencia no mayor de 60 hz, típicas de los centros superiores de los vertebrados, el registro del cerebro de anélidos, artrópodos y moluscos muestra una actividad eléctrica rápida, en espigas de bajo voltaje y con una banda de frecuencias que se extiende en los cientos de hertz, aunque bajo determinadas circunstancias ha sido posible registrar ondas lentas (Adrian, 1931, 1937; Adrian y Matthews, 1934; Jahn y Crescitelli, 1938; Ramón y cols., 2000). Bullock y Basar (1988) han demostrado que estas diferencias entre vertebrados e invertebrados no se deben a las características del electrodo, tamaño celular o cerebral, número o densidad de células o grado de laminación, sino son debidas primordialmente a propiedades de cooperatividad entre el mismo conjunto de neuronas.

El registro extracelular de la actividad neuronal en preparaciones intactas y crónicas permite explorar el funcionamiento de células (Aréchiga y Wiersma, 1969a) o poblaciones celulares (Bullock, 1984; Bullock y Budelmann, 1991; Bullock y cols., 1991) en situaciones en las cuales el animal mantiene sus funciones regulatorias, particularmente del sistema nervioso central, a través de sus sistemas corporales (circulatorio, endocrino, etc.) que permanecen intactos. En algunos artrópodos, en particular, la circulación hemolinfática permite influencias neuromodulatorias debido a neuropéptidos producidos y liberados por una glándula neurohemal, el complejo Organo X-Glándula

Sinusal (Scharrer, 1987; García y cols., 1994). Así mismo, los registros por largo tiempo (días, semanas, meses) hacen posible el estudio de fenómenos circadianos, circamensuales, circanuales (Aréchiga y Wiersma, 1969b, Aréchiga y cols., 1980; Fanjul-Moles y cols., 1991; Aréchiga y cols., 1993) o estacionales (Segura y De Juan, 1966).

Además de la actividad espontánea, otra variedad de registro extracelular que ha demostrado ser muy útil en la clínica y en el laboratorio experimental utilizando animales completos es la de potenciales provocados (PPs; Hernández y cols., 1999; Bharath y cols., 2000; Hamm y cols., 2000; Wang y cols., 2000). Chang (1959) define los PPs como un cambio eléctrico detectable en cualquier parte del cerebro en respuesta a una estimulación deliberada de un órgano sensorial periférico, un nervio o un punto sobre la vía sensorial o cualquier estructura relacionada con el sistema sensitivo. El valor absoluto de este potencial puede ser medido tan solo con un electrodo colocado sobre el tejido activo y el otro llevado a tierra.

Los PPs de poblaciones organizadas de células en el sistema nervioso central son considerados como potenciales de campo compuesto que representan la actividad neta de la población y por lo tanto señales de sus transacciones subsecuentes. Los PPs ofrecen un gran número de mediciones en cuanto a la forma, latencias y dinámicas que no pueden ser predichos por registros de unidades unitarias.

Algunas ramas del conocimiento como la Neuroetología buscan desenmascarar los substratos neurales de la conducta característica de cada especie, incluyendo diferencias en el sistema nervioso. Esto significa que los neuroetólogos están interesados no sólo en los componentes adaptativos, las vías neurales y los mediadores químicos, sino también en las propiedades dinámicas, es decir, en las funciones de acoplamiento, de velocidad de respuesta, o cualquiera otra que pueda ser considerada como característica temporal propia de los constituyentes neurales. En la esfera visual, las variables fisiológicas medibles relevantes a las propiedades dinámicas han incluido: a) electroretinograma (ERG; Miranda-Anaya y cols., 2000), b) actividad en espigas de neuronas individuales (Fénelon y cols., 1998; Combes y cols., 1999) y c) potenciales provocados por estímulos luminosos o por choques eléctricos a las vías visuales (Kenemans, 2000; Satishohandra, 2000; Ohkuma y cols., 2000). En relación a estos últimos, Bullock y cols. (1991) mencionan que mientras otras variables no han sido capaces de dilucidar diferencias adaptativas entre especies, los potenciales provocados constituyen

un elemento prometedor como fuente de pistas o indicios para conocer las diferencias adaptativas en sus propiedades dinámicas. Hasta ahora, los potenciales provocados promediados han sido registrados en numerosos vertebrados (Schadé y Weiler, 1959; Prosser, 1965; Karamian y cols., 1966; Sutterlin y Prosser, 1970; Platt y cols., 1974; O'Benar, 1976; Matsumoto y Bando, 1981; Bullock cols., 1991), sin embargo, los reportes en invertebrados sólo se limitan a los de Bullock (1984) y Bullock y Budelmann (1991) en cefalópodos y Serrato y cols. (1996) en el acocil.

Los PPs difieren de los cambios en la actividad eléctrica espontánea en varios aspectos (Chang, 1959): a) Conllevan relaciones temporales definidas con el inicio del estímulo, es decir, tienen un período de latencia determinado por la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos, la distancia de conducción entre el punto de estimulación y el sitio de registro, el retardo sináptico y el número de sinapsis involucradas. b) Tienen un patrón definido de respuesta característico de un sistema específico, el cual es más o menos predecible y reproducible bajo condiciones similares. c) Usualmente se registran en un área circunscrita del sistema nervioso central donde se localiza el electrodo activo.

#### **IV. Planteamiento del problema.**

Hay un acuerdo general de que en los sistemas biológicos coexisten varios osciladores y que la organización temporal de los organismos depende no solamente de las propiedades de los marcapasos individuales sino también de las relaciones integrativas entre ellos. A pesar de que el ritmo de amplitud del ERG es uno de los más profusamente estudiados (fig. 1), aún se desconoce con certeza dónde se genera y cómo se regula.

Dado que el ganglio cerebroide conecta ambos tallos oculares a través de los nervios ópticos, se le ha considerado, con gran probabilidad, como la estructura que realiza la integración de los ritmos circadianos de respuesta a la luz del acocil (Larimer y Smith, 1980; Barrera-Mera y Block, 1990). Las evidencias quirúrgicas presentadas por Page y Larimer (1975b) sugieren que debe existir una estructura en o cerca de la línea media del cerebro responsable de la ritmicidad circadiana. Estos autores involucran en este respecto al tracto globular olfatorio debido a que cruza por la línea media, recibe entradas sinápticas desde los lóbulos olfatorios y accesorios y constituye el principal tracto eferente de interneuronas desde el cerebro hacia

los tallos oculares, además de que su lesión, desde el propio cerebro o a nivel de los tractos ópticos, deprime fuertemente el ritmo de amplitud del ERG. Por otro lado, mediante una preparación aislada en la que se preservan ambos tallos oculares y el protocerebro del acocil, se registraron ritmos circadianos en la amplitud del ERG similares al animal intacto (Barrera-Mera y Block, 1990), por lo que se presume que es en protocerebro donde se deben originar estos ritmos (Barrera-Mera, 1976, 1978). Sin embargo, hasta ahora no se conocen los elementos celulares responsables de la generación del ritmo de respuesta a la luz en el acocil.

A la fecha no existen informes de trabajos en los que se haya registrado directamente la actividad eléctrica del cerebro del acocil durante los ciclos de 24 horas. Esto es debido a que el cerebro de los crustáceos es extraordinariamente sensible a la hipoxia circulatoria (Waterman y cols., 1964) y por lo tanto los intentos de registro en condiciones de aislamiento o en cerebros transplantados no han sido exitosos. Es en estas condiciones donde se hace deseable la pertinencia de una preparación experimental crónica que permita el registro de neuronas cerebrales en animales semi-intactos. Por lo tanto, las evidencias disponibles que sugieren que el cerebro pudiera alojar a los osciladores circadianos responsables del ritmo del ERG derivan primordialmente de manipulaciones experimentales en las que se han lesionado diversas estructuras.

En 1973, se mostró que la extirpación del cerebro suprime el ritmo retiniano de respuesta a la luz (Aréchiga y cols., 1973). Sin embargo, posteriormente se encontró que este ritmo retiniano puede continuar presente después de la extirpación del cerebro, siempre y cuando en la obtención del ERG se apliquen señales luminosas de prueba de baja intensidad (Barrera-Mera, 1976; Larimer y Smith, 1980). Estos hallazgos permitieron postular que la ablación del ganglio supraesofágico bloquea el componente del ritmo que depende de los pigmentos distales, mientras que son preservados los componentes que dependen de los pigmentos proximales y de los fotorreceptores retinianos, los cuales son capaces de generar sus propias señales circadianas. Sin embargo, la cuestión de la sincronización de los ritmos retinianos de ambos tallos oculares aún no ha sido resuelta.

Se han propuesto dos posibles mecanismos de sincronización bilateral que no son mutuamente excluyentes: el hormonal y el neural. El primero está apoyado en que los pigmentos retinianos, en particular los pigmentos accesorios distales son sensibles al efecto de algunas hormonas (por ejemplo

la HDP). En 1976, Barrera-Mera mostró que la ablación completa del cerebro produce una disminución en la escala de oscilación circadiana del área de brillantez de la pseudopupila. En animales sin deutocerebro se observó una disminución de la fase diurna del ritmo circadiano del ERG, lo cual podría deberse a una disminución de la hormona de adaptación a la luz sintetizada en el propio cerebro. También se observó una disminución del tamaño y cambios microestructurales de la glándula sinusal subsecuentes a la lesión del ganglio supraesofágico, por lo que se pensó que los cambios electroretinográficos reportados pudieran estar relacionados con una regulación neurohumoral originada en el cerebro (Barrera-Mera, 1976).

Por otro lado, el mecanismo neuronal tiene su base en la presencia de vías axonales que cruzan de un lado al otro del cerebro y a la existencia de fibras eferentes que salen del cerebro hacia los tallos oculares. Existen evidencias de que es necesaria la vía neural desde o hacia el cerebro para sincronizar ritmos como el del fotorreceptor del sexto ganglio abdominal (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987) y el locomotor (Page y Larimer, 1975a). Con relación a este último, se ha mostrado que aunque la ablación de los tallos oculares no anula consistentemente el ritmo de actividad locomotora en el acocil, el aislamiento neural del cerebro de los centros motores torácicos mediante la sección de los conectivos circumesofágicos resulta invariablemente en una conducta aperiódica, por lo que se sugirió que el marcapaso que controla los ritmos se debe localizar en el cerebro, ejerciendo sus acciones circadianas mediante vías neurales (Page y Larimer, 1975a). Datos en otras especies de artrópodos también apuntan hacia el cerebro como regulador de los ritmos circadianos. En *Limulus polyphemus* (Kass y Barlow, 1992) se postula la presencia de al menos dos relojes circadianos en el cerebro, los cuales desempeñan un importante papel en el funcionamiento del sistema visual periférico de este animal.

En la integración y acoplamiento de los fenómenos circadianos de la respuesta a la luz en el acocil, aún se desconoce el número, localización, distribución y propiedades fisiológicas de las células marcapaso que originan los ritmos manifiestos. Sin embargo, dada la presencia de neuronas cerebrales con actividad eléctrica espontánea (en algunos casos rítmica) en los distintos sitios del ganglio cerebral (proto-, deuto- y tritocerebro), las cuales poseen numerosas conexiones electrotónicas (Wood y Glantz, 1980a y b) y debido a que en esta estructura nacen fibras neurosecretoras que envían sus prolongaciones hacia la glándula sinusal, que es donde se liberan importantes neurosecreciones (de HDPD, entre otras), se consideró interesante probar la



hipótesis de que las neuronas cerebrales con actividad espontánea pueden tener un patrón de disparo circadiano, muy probablemente endógeno. Asimismo, debido a que las fibras visuales que responden a la luz (SFs) presentan un ritmo circadiano en su actividad espontánea y provocada (en fase con el ERG) y que poseen conexiones anatomofuncionales con interneuronas de más alto orden en el protocerebro, se postuló determinar mediante potenciales provocados visuales (PPVs) promediados, que el cerebro presenta también un ritmo circadiano de sensibilidad a la luz, el cual está acoplado al del ERG; todo esto utilizando una preparación crónica en la cual el animal mantiene sus sistemas fisiológicos (circulatorio, neuroendocrino, sensorial y motor) intactos y permite la evaluación del sistema neuronal durante días, tanto en condiciones de fotoperiodo como en oscilación libre.

## **HIPOTESIS**

Si en el ganglio cerebroide del acocil existen neuronas que participan en la actividad circadiana de esta especie, entonces mediante el registro poblacional de la actividad eléctrica espontánea y provocada podremos detectar fluctuaciones periódicas de tipo circadiano.

## OBJETIVOS

### Principal

Determinar en preparaciones semi-intactas, la participación del ganglio cerebroide en la expresión de la actividad circadiana de respuesta a la luz del acocil.

### Específicos

1. Desarrollar una preparación experimental que nos permita el registro crónico de la actividad eléctrica cerebral del acocil no anestesiado ni restringido.
2. Caracterizar los patrones de actividad eléctrica cerebral multiunitaria: espontánea y provocada por estimulación sensorial.
3. Evaluar los patrones temporales de disparo espontáneo en diferentes regiones del ganglio cerebroide con el fin de establecer su posible carácter circadiano endógeno.
4. Examinar si los potenciales provocados visuales (PPVs) registrados a nivel cerebral poseen un patrón de actividad circadiano y establecer la correlación temporal que muestren con el ritmo circadiano de respuesta retiniana a la luz (ERG).

## MATERIALES Y METODOS

### A. Animales.

Los experimentos se realizaron en acociles *Procambarus clarkii*, adultos, sin distinción de sexo, comprados a proveedores locales. Los animales fueron mantenidos en acuarios bien oxigenados a temperatura controlada entre 20 y 22 °C y alimentados diariamente con vegetales diversos o pescado seco. Los animales fueron mantenidos fuera de la pecera experimental con ciclos luz:oscuridad de 12:12 hrs, con el encendido de la luz a las 7:00 hrs y el apagado a las 19:00 hrs.

### B. Procedimientos generales.

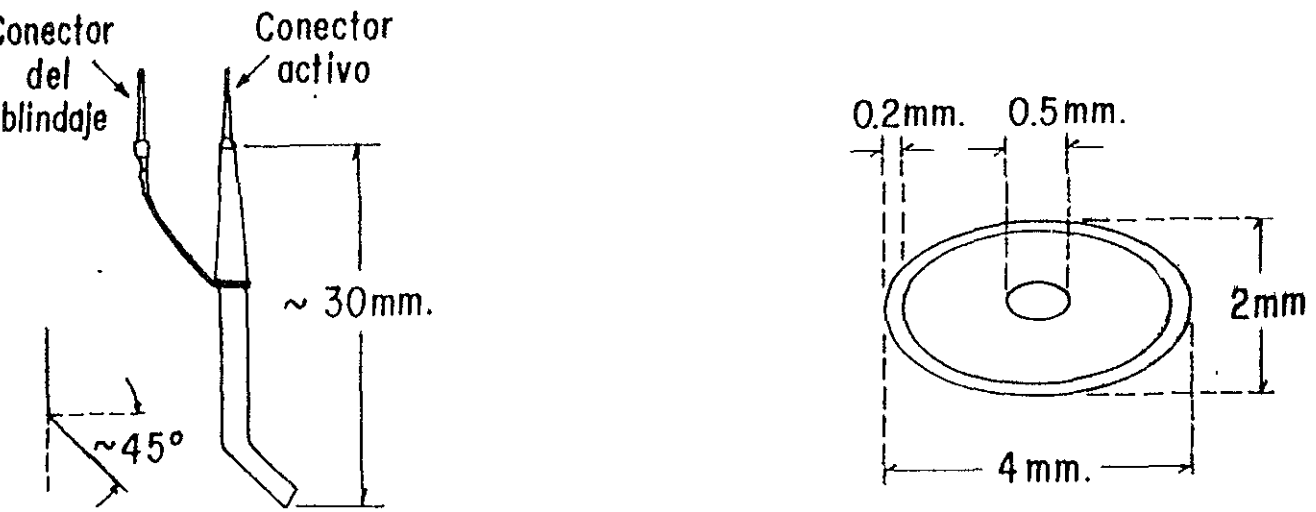
#### 1. Electrodo de registro.

Para el registro extracelular de la actividad eléctrica espontánea y provocada del cerebro se utilizó un electrodo diseñado y elaborado en el laboratorio (Hernández y cols., 1996a, ver Apéndice). Consistió de uno o dos alambres de acero inoxidable o plata clorurada (0.2 - 0.5 mm) con punta roma que fueron colocados dentro de cánulas de plástico (para su aislamiento eléctrico) y a su vez dentro de un tubo de acero inoxidable obtenido de agujas hipodérmicas No. 10-14. En el extremo del tubo en contacto con el cerebro se colocó cera dental para hacer que la superficie de exposición de las puntas redondeadas fueran de 0.2 a 0.5 mm. La distancia entre punta y punta fue de 0.3 a 0.6 mm. En el otro extremo de cada alambre se colocó un conector para enviar las señales bioeléctricas al amplificador a través de un cable blindado flexible. Al tubo se soldó un alambre de cobre con un conector y se llevó a tierra (fig. 5). Ya puesto en el animal, el tubo de acero quedó rodeando al ganglio y sirviendo de blindaje, mientras que la punta redondeada hacía contacto con la superficie del cerebro registrando la actividad neuronal (fig. 6). Para el registro de la actividad electrorretinográfica (ERG) y/o de los tallos oculares se utilizaron electrodos de tungsteno aislados en su longitud excepto en la punta, la cual tenía un diámetro de entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ .

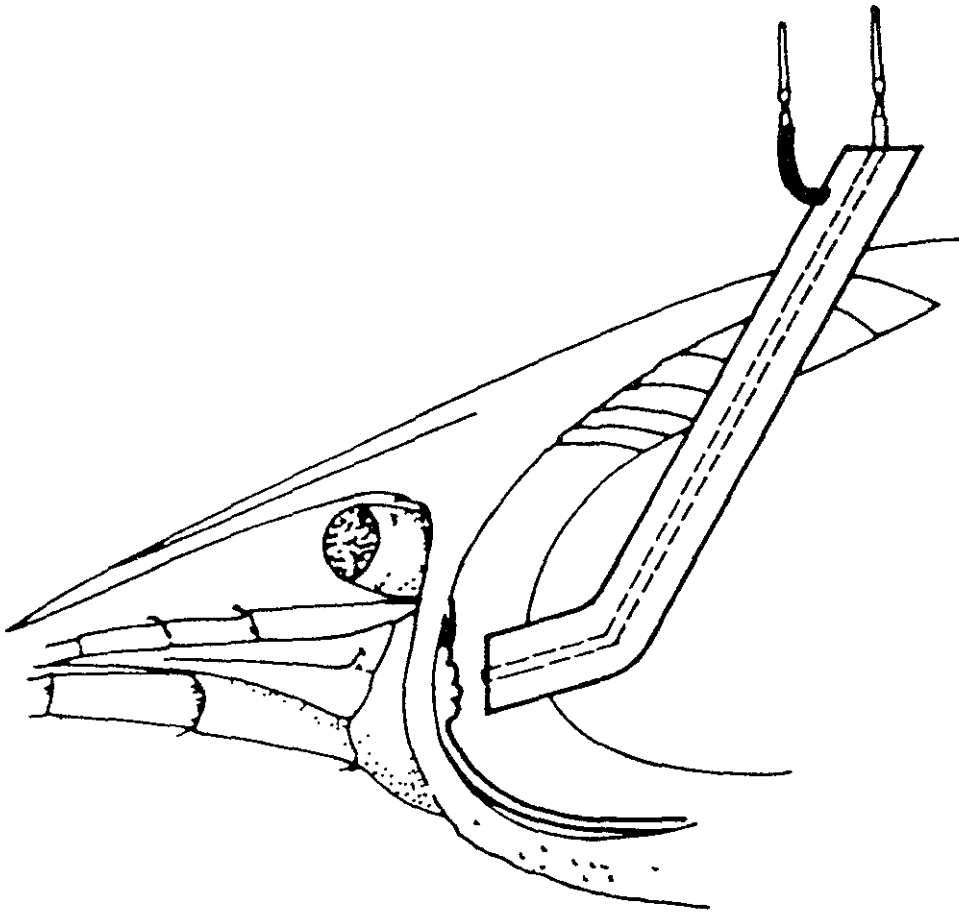
#### 2. Implantación del electrodo.

Los animales fueron anestesiados colocándolos en recipientes con hielo escarchado durante 5 a 10 min. Se practicó una incisión cuadrada de

## ELECTRODO



**Fig. 5.** Electrodo extracelular de registro. Vista lateral (izquierda). Detalle del extremo que hace contacto con el ganglio (derecha)



**Fig. 6.** Electrodo implantado en la cabeza del acocil. Aunque el extremo inferior del electrodo hace contacto con el cerebro, en la figura se presenta un poco separado para mayor claridad.

aproximadamente 3x3 mm sobre la cara dorsal del caparazón, inmediatamente detrás del rostrum y a un lado de la línea media, para no dañar la arteria cerebral media que irriga al ganglio cerebroide. Bajo microscopio estereoscópico, se separaron los músculos esofágicos y se introdujo el electrodo de registro. A un lado del electrodo se fijaron uno o dos tornillos al caparazón dorsal para evitar su dislocación. Este ensamblaje fue firmemente asegurado aplicando cemento dental. Durante la disección, el campo quirúrgico fue bañado frecuentemente con solución salina fría. Una vez que el electrodo fue implantado, se colocó nuevamente al animal en agua tibia hasta su recuperación total.

El procedimiento quirúrgico no produjo cambios en la conducta del animal. Su viabilidad fue evaluada durante los primeros 3 a 5 días por la presencia de movimientos espontáneos y reflejos, reflejos de defensa y de escape, deambulación, alimentación, reflejos oculomotores a la estimulación táctil, movimientos de sacudida de las antenas I y movimientos exploratorios de las antenas II (Ache y Sandeman, 1980). Mediante esta técnica se ha obtenido la sobrevivencia y registro de animales saludables por periodos hasta de 9 meses.

Para el registro del ERG se introdujo el electrodo de tungsteno penetrando en forma perpendicular la córnea. Para evitar la dislocación del electrodo, se pegaron los tallos oculares con cemento dental, se sujetó al animal del caparazón dorsal, se le mantuvo elevado en la pecera con un nivel de agua por debajo de sus pedúnculos oculares y se le amarraron las patas y las quelas.

A la muerte o sacrificio del animal se pasaron a través del electrodo de 0.1-1 mA de corriente directa usando una unidad de corriente constante (Grass mod. CCU1) para señalar la región del cerebro en donde se encontraba la punta del electrodo. La localización de la marca de lesión se realizó por visualización directa mediante microscopía estereoscópica.

## **C. Preparaciones experimentales.**

### **1. Animal basal.**

Esta preparación consistió en un animal completo, con electrodo implantado, totalmente recuperado de la anestesia quirúrgica, no restringido en sus movimientos y con libertad de adoptar cualquier tipo de conducta dentro del confinamiento de la pecera experimental, la cual consistió de un recipiente plástico de aprox. 12 cm de diámetro en la base y 15 cm de alto, con un nivel

de agua de 1-2 cm, en condiciones constantes de temperatura ( $n = 50$ ). Dado que una vez colocado el electrodo en el cerebro es fijado al caparazón, el registro de cada sitio implicó animales diferentes. Los registros con esta preparación sirvieron para caracterizar la actividad eléctrica espontánea y fueron obtenidos utilizando los siguientes lineamientos:

- a). Se usaron animales adultos de uno u otro sexo.
- b). Sólo se utilizaron animales que se recuperaron satisfactoriamente del procedimiento quirúrgico para la implantación del electrodo y mostraron una conducta "normal" en el acuario (según Ache y Sandeman, 1980) en los días de registro.
- c). Los registros de actividad espontánea fueron obtenidos diariamente entre las 10 y las 12 hrs con la luz de la habitación prendida.
- d). El agua del tanque se mantuvo a una temperatura de entre los 20 y 22 °C.
- e). Los registros se tomaron cuando el animal se encontraba en posición horizontal y no se observaba movimiento de alguna parte del cuerpo o apéndices.
- f). Siempre hubo un mínimo de dos machos y dos hembras en la pecera.
- g). Se evitó cualquier tipo de estimulación (movimiento de objetos o personas, cambios de luz, ruidos, etc.) durante la toma de registros.

El registro de animales muertos fue utilizado para capturar el nivel de ruido y restarlo a los registros del animal vivo durante el análisis ( $n = 25$ ). Los registros se obtuvieron horas después de que el animal dejó de presentar movimientos espontáneos y de responder a estímulos, lo cual fue evaluado en forma visual. La información se capturó conectando al animal en la pecera experimental en las mismas condiciones de registro de animales vivos.

## **2. Animal no restringido (con libertad de movimientos).**

Se utilizó en la caracterización de la actividad provocada por estímulos sensoriales ( $n = 45$ ) y en los experimentos circadianos, tanto de actividad espontánea como de actividad provocada por luz ( $n = 31$ ). Fue similar al animal basal pero los registros fueron tomados a distintas horas del día tanto en condiciones de fotoperiodo como en oscuridad constante. Solamente se mantuvo y registró un animal cada vez en la pecera experimental.

## **3. Animal restringido (en sus movimientos).**

Es propósito de esta preparación fue evitar que el animal se quitara el electrodo incrustado en el ojo a través de la cornea. Se trata de animales



completos pero sujetos por el tórax con una pinza y suspendidos de tal manera que ninguno de sus apéndices hiciera contacto con las paredes del acuario. Las patas y quelas fueron amarradas. El nivel de agua se mantuvo por debajo de los pedúnculos oculares. Esta preparación se utilizó en los experimentos en los que se registró simultáneamente del cerebro y de la retina (n = 28).

#### **4. Animal operado.**

Se utilizó en algunos experimentos circadianos de actividad espontánea. Previa anestesia con hielo y mediante microscopía estereoscópica se ligaron desde la base ambos tallos oculares (n = 5) y/o se cortaron los conectivos circumesofágicos (abordaje ventral por arriba de la región bucal; n = 5), dejando intactos el ganglio cerebroide (con el electrodo de registro) y la circulación cerebral. Posteriormente se colocó al animal en agua tibia hasta su total recuperación (2-3 hrs) y se transfirió al sitio experimental para su registro eléctrico.

#### **D. Adquisición de los datos.**

Las señales bioeléctricas espontáneas fueron amplificadas y filtradas (0.3-3000 Hz) mediante amplificadores de AC (Grass mod. 7P511) y capturadas para su análisis fuera de línea en una computadora Macintosh Performa 630 a través de un convertidor A/D (MP100, Biopac Systems), utilizando una velocidad de muestreo de 8 KHz. Paralelamente, la actividad eléctrica fue monitoreada con un osciloscopio de rayos catódicos (Tektronix). Las respuestas provocadas por estímulos luminosos fueron registradas mediante amplificadores de AC (Grass mod. 7P511) y filtradas entre 0.3-100 Hz para el ERG y entre 100-3000 Hz para los potenciales provocados visuales (PPVs) a nivel del cerebro.

#### **E. Análisis.**

Para la caracterización de la actividad eléctrica espontánea (animal basal) se capturó un registro diario de 6 segundos durante 15 a 30 días. Los trazos digitalizados fueron analizados con el programa AcqKnowledge (Biopac Sys.) obteniendo el espectro de potencias mediante el cálculo de la transformada rápida de Fourier (FFT) de segmentos seleccionados de 1 seg (8192 muestras). Para comparar los diferentes registros dividimos el espectro de potencias en intervalos de frecuencia (5-50 hz), calculamos su integral y graficamos los

valores máximos. Para los experimentos circadianos se tomaron registros de 5 segundos cada 30-90 minutos durante 3-10 días. Cada segundo de la actividad eléctrica fue filtrada digitalmente (pasa altos) en 250 hz, se calculó su valor absoluto y se determinó el número de espigas superiores a  $8 \mu\text{V}$  (nivel de ruido pico a pico) mediante el programa Acqknowledge. Se promedió el número de espigas de los 5 segundos. La actividad espontánea multiunitaria fue registrada como el número de espigas/seg, suavizada con 3-5 puntos (Minors y Waterhouse, 1988) y graficada como frecuencia de impulsos vs tiempo mediante el programa Cricket. Como en los distintos animales la amplitud de las espigas registradas fue variable, los valores fueron normalizados con la finalidad de agrupar y cuantificar los parámetros circadianos (periodo, relación alfa/rho y amplitud relativa) de los ciclos correspondientes a cada situación experimental. En algunos experimentos se determinó la amplitud de las espigas calculando el voltaje raíz medio cuadrática ( $V_{\text{rms}}$ ) mediante el programa Igor (Wavemetrics).

Tras la estimulación con destellos de luz blanca se registraron los promedios de potenciales provocados visuales (PPVs) y/o respuestas electroretinográficas (ERG). Después de la amplificación y filtración como anteriormente se mencionó, los promedios fueron digitalizados a 5 KHz y almacenados en la computadora para su análisis fuera de línea. La latencia de los PPVs se calculó mediante el programa Acqknowledge, midiendo el tiempo desde el inicio del destello luminoso hasta la primera espiga claramente identificable. La duración de los PPVs se determinó midiendo directamente sobre la pantalla con el Acqknowledge. Los datos fueron suavizados y graficados vs tiempo con la ayuda del programa Cricket. Los valores de amplitud máxima del ERG fueron también determinados con Acqknowledge y graficados vs tiempo con el Cricket.

Para determinar si las respuestas obtenidas seguían un patrón circadiano, cada experimento fue analizado, primero en forma separada y después en forma conjunta de acuerdo con la correspondiente condición experimental. Con los datos de cada registro se construyó una gráfica en la que quedaron expresados los valores de la frecuencia de disparo (o latencia o duración de los PPVs) promediados cada 30-90 minutos versus el tiempo transcurrido. En todas las gráficas así obtenidas se pudo observar la repetición periódica de algunos valores, lo que fuertemente sugirió la presencia de un ritmo biológico. Al hacer un análisis cuidadoso de las gráficas, fue evidente que en un gran número de registros se presentaron los máximos y los mínimos con intervalos cercanos a veinticuatro horas. Sin embargo, debido a que los registros

mostraron también un alto nivel fluctuaciones ("ruido biológico"), lo cual dificulta medir con veracidad los periodos directamente sobre la gráfica, se decidió aplicar el periodograma (Enright, 1965), que es una técnica matemática por medio de la cual puede establecerse el valor exacto del periodo de mayor significación estadística de un conjunto de mediciones obtenido de un fenómeno periódico. El análisis consiste en tomar una serie de datos numéricos resultantes de mediciones tomadas a un fenómeno a intervalos regulares. Si existe una cantidad razonable de tales mediciones (serie de tiempo de al menos tres ciclos) y si es posible pensar que existe un componente armónico principal del periodo  $p$  sujeto a modificaciones al azar provenientes de una distribución normal, el valor de la desviación estándar  $A$ , de las observaciones hechas al tiempo  $h$ , es un estimador eficiente del valor de la función periódica durante este tiempo. El valor del estimador para un periodo  $p$  es proporcional al componente armónico de periodo  $P$  que es el mayor entero menor o igual que  $p$ . Si se construye una gráfica de estimadores contra los periodos propuestos, el estimador de mayor valor para un periodo dado, indicará que ese periodo es el componente principal de la función. Así, la gráfica que se obtiene relaciona el periodo de frecuencia versus el valor del periodo (Fuentes-Pardo y Vargas, 1979; Vega, 1993).

La aplicación de esta técnica se hizo para cada grupo de ciclos obtenido en condiciones experimentales semejantes. Así, por ejemplo, de 8 experimentos en los que se registró la frecuencia de actividad espontánea del protocerebro bajo condiciones de oscuridad constante (OO), se obtuvieron 30 ciclos. El periodograma hizo evidente que el periodo de mayor significación estadística de estos 30 ciclos fue de 28.5 hrs, aun cuando aparecen otros periodos con valores cercanos. Evidentemente el periodograma se pudo haber aplicado a cada uno de los 8 experimentos por separado y promediado después los valores obtenidos en cada caso, lo que nos permitiría obtener un promedio y su respectivo error estándar. No se hizo así, porque se consideró más importante calcular el periodo de mayor significación estadística que muestran todos los ciclos que se generaron ante una misma condición externa

Se calculó para cada ciclo la relación entre el periodo de actividad  $\alpha$  (tiempo durante el cual la curva de la gráfica está por arriba del 50% del máximo) y el periodo de reposo  $\rho$  (tiempo en el que el nivel de la curva está por debajo del 50% del máximo), es decir la relación  $\alpha/\rho$  (Aschoff, 1960), así como la amplitud relativa (es decir, la relación entre los valores máximos y mínimos alcanzados en cada ciclo). Los periodos, la relación  $\alpha/\rho$  y la amplitud relativa

fueron promediados en forma separada de acuerdo a cada condición experimental.

## **F. Estimulación.**

La estimulación luminosa se realizó disparando un fotoestimulador Grass mod. PS33 Plus desde la computadora. Se promediaron de 20 a 100 destellos (1-4 Hz) de luz blanca difusa aplicada a 25-30 cm del animal, con intensidad de 1.375 lumen seg/pe<sup>2</sup>. La estimulación con patrones visuales estructurados (cuadros y rayas) se obtuvieron a través de un Grass mod. 10VPG. La estimulación táctil se aplicó disparando el solenoide de una bocina (con un bastón de vidrio acoplado a su parte central) mediante un estimulador Grass S88 el cual es controlado por la computadora. En los experimentos circadianos el esquema de fotoperiodo se aplicó preñdiendo la luz de la habitación a las 7 de la mañana y apagándola a las 7 de la noche. Bajo el esquema de oscilación libre, los animales se mantuvieron en oscuridad constante.

## RESULTADOS

### I. Caracterización de la actividad eléctrica cerebral.

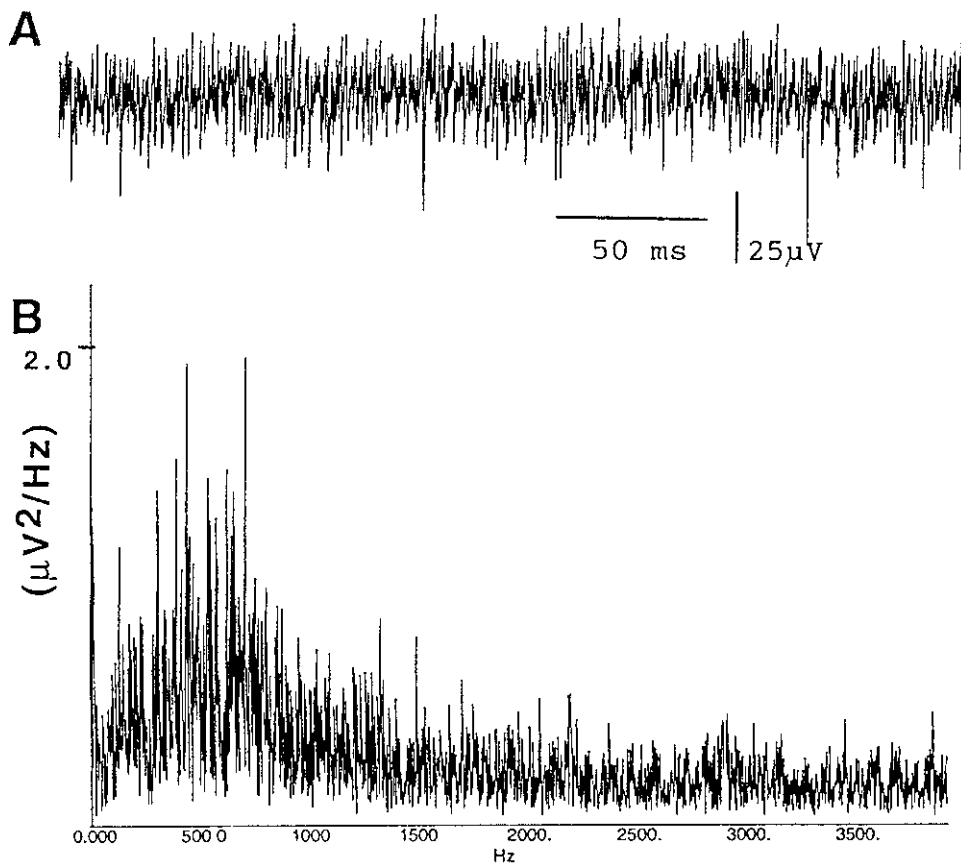
#### A. Actividad espontánea.

Los registros de la actividad eléctrica espontánea (sin estimulación intencional) del ganglio cerebroide que se presentan en este estudio fueron obtenidos de animales no anestesiados ni restringidos en sus movimientos y con capacidad de adoptar libremente y en forma espontánea diversas conductas. Docenas de acociles fueron registrados en estas condiciones alrededor de 30 días consecutivos. El animal basal se refiere a preparaciones en reposo cuya viabilidad fue evaluada mediante los criterios utilizados por Ache y Sandeman (1980). Los controles que validan la preparación crónica se presentan en el Apéndice.

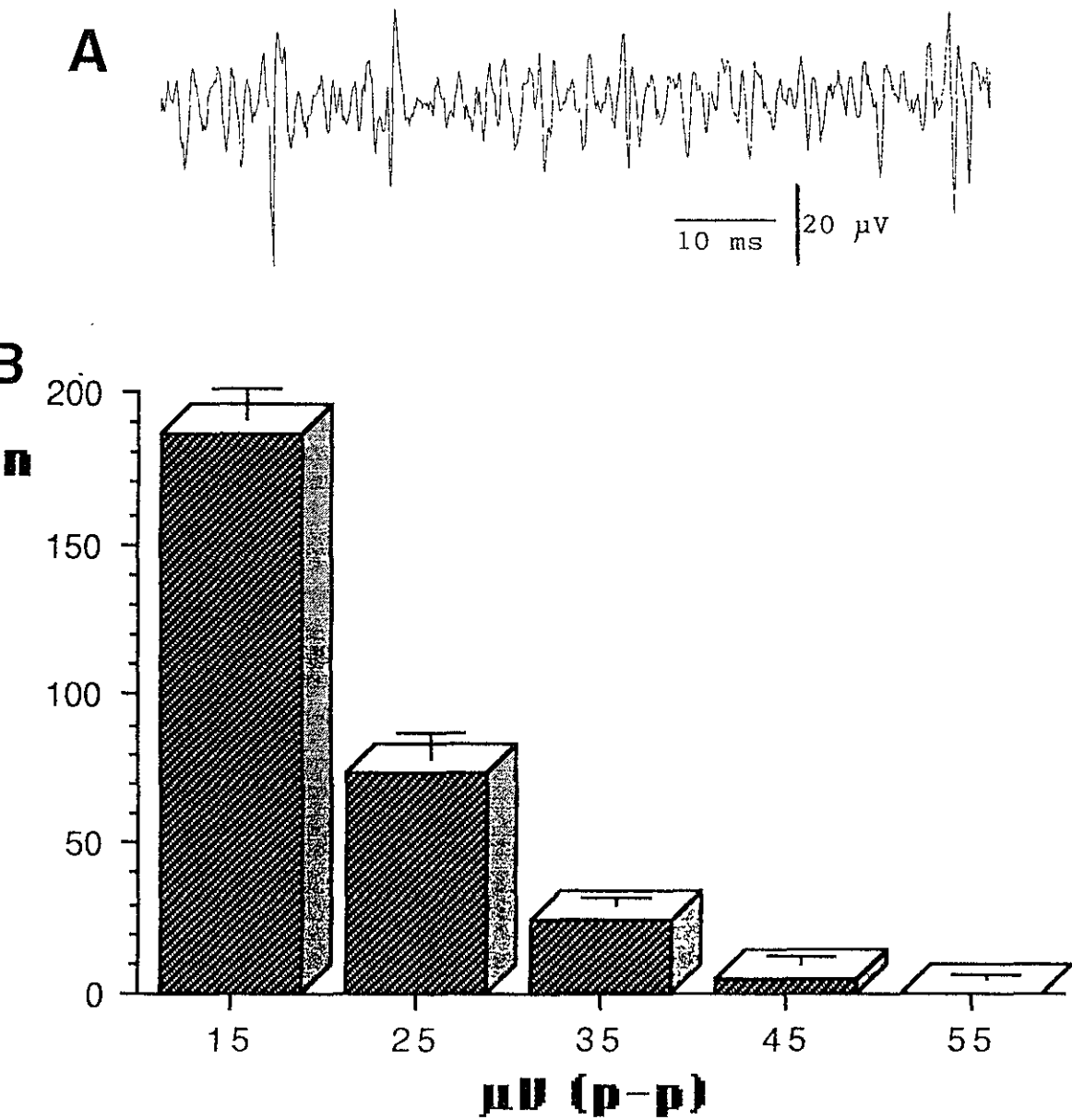
##### 1. Espigas

En un principio se abrieron los filtros de 1 a 10,000 hz con el objeto de determinar a qué frecuencias pertenecían los principales componentes neuronales. Como puede verse en la fig. 7A, la actividad eléctrica espontánea que se registra en el cerebro del acocil está compuesta por un patrón complejo de pocas ondas lentas y numerosas espigas, lo cual es congruente con el esquema general de actividad eléctrica cerebral espontánea de invertebrados planteado por Bullock (1945). En la fig. 7B se presenta el espectro de potencias del registro anterior y se observa que la mayor parte de la actividad se encuentra por debajo de 1.5 khz, alcanzando niveles de ruido alrededor de los 2 khz, es decir, por arriba de este valor solamente se detectan componentes de frecuencia debidos a actividad no biológica, es decir, a artificios del sistema de registro. Debido a ésto, en registros subsecuentes (excepto donde se indica) se colocó el filtro pasa bajos en 3,000 hz.

En la fig. 8A se muestra un registro típico espontáneo (filtros 1-3,000 hz) a barrido rápido obtenido del ganglio cerebroide de un acocil en condiciones basales. El patrón eléctrico tiene un gran predominio de espigas de corta duración y de amplitud variable (ver adelante). La mayor parte de las espigas no presenta indentaciones o un aspecto aserrado que pudiera sugerir que cada espiga se genera por el disparo mas o menos sincrónico de varias neuronas; en cambio, su aspecto continuo sugiere que se trata de la activación de células



**Fig. 7** Actividad espontánea cerebral. **A.** Registro de actividad espontánea abriendo los filtros en 1 y 10,000 Hz con el animal inmóvil. **B.** Espectro de potencias que muestra la mayor parte de la energía en las centenas de Hz y niveles de ruido por arriba de los 1.5 KHz.



**Fig. 8.** Espigas. **A.** Predominio de espigas en la actividad espontánea del cerebro del acocil. **B.** Histograma de espigas en cada rango de voltaje contadas en un lapso de 1 segundo en un animal inmóvil. Se puede observar que predominan las espigas de baja amplitud ( $n = 6$  segundos).

individuales. La magnitud de los componentes eléctricos registrados en el ganglio de cada animal fue muy variable, aunque en general se observaron espigas con amplitudes entre 8 y 60  $\mu\text{V}$  y duración entre 0.5 y 2 ms. La fig. 8B presenta el contenido de espigas en 1 segundo de un registro típico en el animal basal. Se puede observar que aquellas con una amplitud de entre 10 y 20  $\mu\text{V}$  son las que dominan el registro, aunque existen otras más grandes con menor frecuencia de aparición.

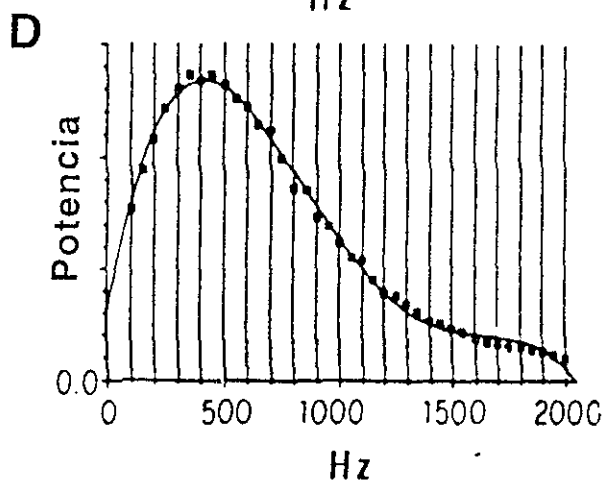
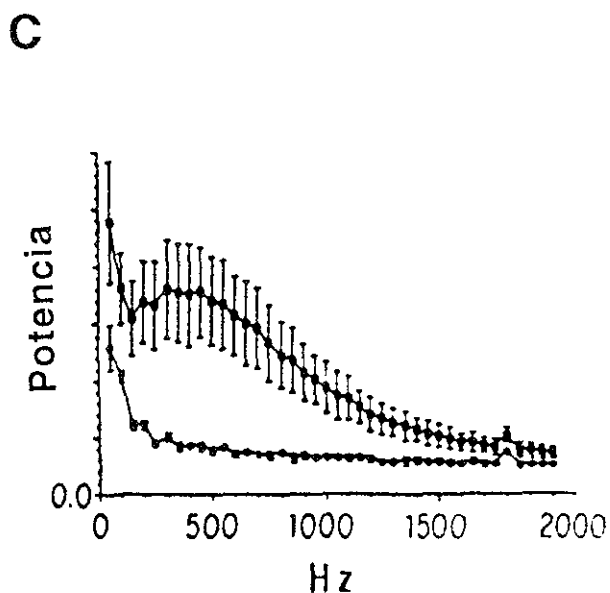
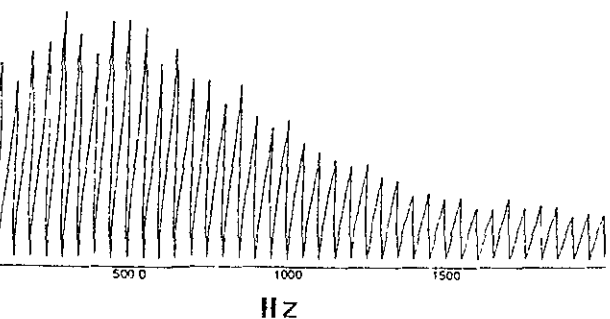
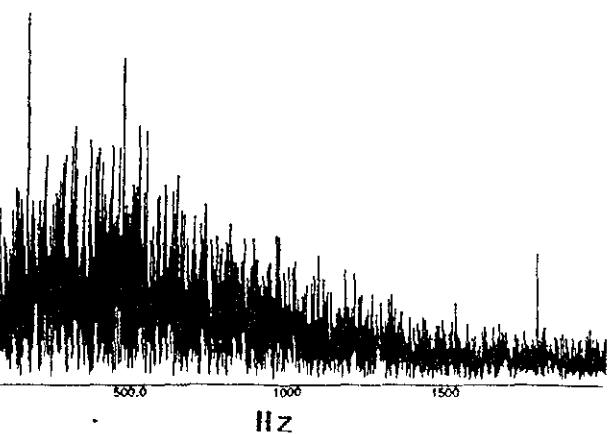
Para determinar los componentes de frecuencia se calculó el espectro de potencias de cada segundo de registro mediante la transformada rápida de Fourier (FFT; ver métodos). En la fig. 9A se presenta un espectro característico de un registro. Se puede observar que existe una gran energía que va desde 1 hasta los 1500 hz, donde se alcanza el nivel de ruido. Para evaluar y comparar los espectros del mismo animal y/o animales distintos, se calculó la integral de segmentos de 50 hz de cada espectro (fig. 9B). En el panel C se presentan los promedios (y desviación estándar) de los valores máximos de las integrales de 36 segundos de registro (6 segundos en 6 animales distintos). Los registros de los animales muertos fueron analizados y graficados en forma similar; los picos de las integrales se restaron de aquellos obtenidos bajo condiciones basales. En la fig 9D se presenta la diferencia ajustando un polinomio de cuarto orden con objeto de visualizar mejor el pico, el cual fue de  $453 \pm 88$  hz ( $n = 36$ ).

Una descripción cuantitativa del espectro de potencias de esta actividad espontánea en animales basales fue obtenida integrando la potencia en segmentos de frecuencia representativos. Estos datos se muestran en el cuadro 1, el cual contiene los valores de la integral de la potencia de cinco segmentos de frecuencia seleccionados en forma empírica, pero que cubren el ancho de banda principal de las señales cerebrales del acocil (2-1000 hz;  $n = 17$ ).

## 2. Ondas lentas

Con el objeto de estudiar el contenido de ondas lentas ( $< 40$  hz) en el cerebro, se registraron segmentos de actividad espontánea filtrando entre 0.3 y 300 hz. En ningún caso ( $n = 12$ ) detectamos fluctuaciones rítmicas y solo se pudieron detectar cambios irregulares y no consistentes con una amplitud entre 8 y 15  $\mu\text{V}$  (fig. 10A). Los espectros de potencias no mostraron componentes individuales sobresalientes y/o consistentes (fig. 10B y C).

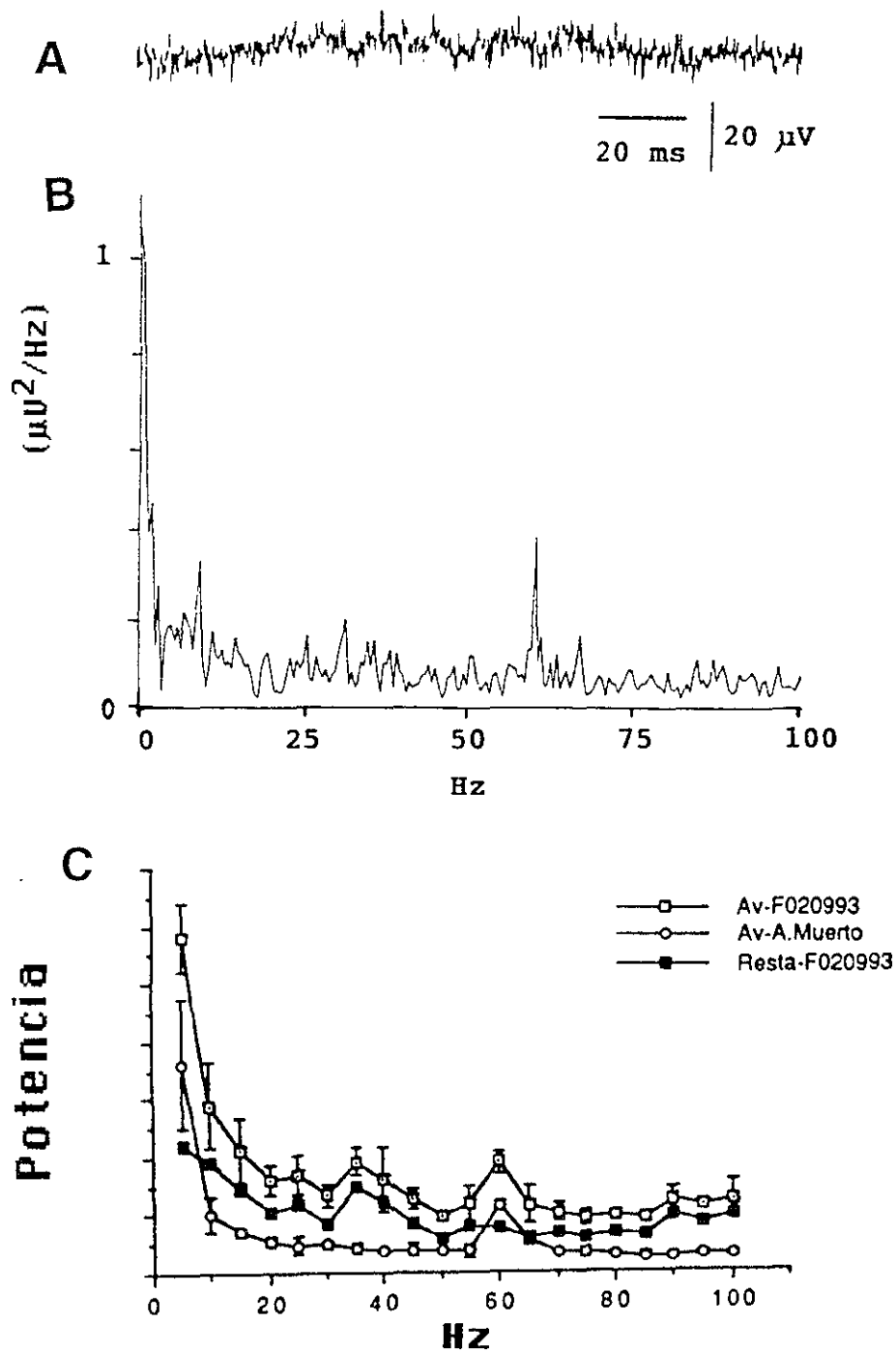




**Fig. 9** Espectro de potencias del animal basal. **A.** Espectro de potencias de 1 seg de actividad espontánea. **B.** Integral de segmentos de 50 Hz del espectro anterior. **C.** Espectro de las integrales obtenidas en B mostrando el promedio (y D.E.) de un total de 6 segundos en cada uno de 3 animales vivos y 3 muertos. **D.** Resta de los promedios de las curvas mostradas en C.

Cuadro 1. Integrales de 5 bandas de frecuencia de los espectros de potencia de animales basales. Los valores de Potencia son el promedio  $\pm$  DS (n = 17).

Frecuencia (Hz)	Potencia ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ )
2-10	11.8 $\pm$ 4.6
20-40	22.5 $\pm$ 9.1
100-200	395 $\pm$ 14
200-500	4,100 $\pm$ 151
500-1,000	10,170 $\pm$ 398



**Fig. 10** Ondas lentas. **A.** Registro de actividad espontánea con el animal inmóvil filtrando en 0.3 y 300 Hz. **B.** Espectro de potencias de 1 segundo de actividad como la mostrada en **A.** **C.** Espectro de potencias obtenido, como en figuras anteriores, calculando la integral (en este caso de segmentos de 5 Hz), promediando los valores y restándolos del animal muerto. ( $n = 6$  seg de registro).

### 3. Carácter temporal

Contrario a lo reportado en el pulpo (Bullock, 1984), en donde existen periodos de gran actividad cerebral alternados con periodos de “silencio eléctrico”, en este estudio se observó que aunque existen variaciones en la amplitud de los componentes, el patrón eléctrico espontáneo del cerebro del acocil es muy regular y consistente en el tiempo (con el animal en reposo), es decir, no muestra grandes variaciones de un momento a otro; sin embargo, cuando el acocil se mueve o bien cuando se presentan estímulos sensoriales, aparecen en el registro espigas de gran amplitud y generalmente en forma de ráfagas que son fácilmente identificables (ver adelante). Esta regularidad en el registro del animal no estimulado permitió el registro de la actividad espontánea durante ciclos de 24 horas (ver sección II).

### 4. Registros crónicos.

Numerosos animales fueron registrados a diferentes tiempos (semanas-meses) después de habérseles implantado el electrodo. En todos ellos se observó la misma tendencia en los registros. Durante todo este tiempo los animales mostraron un comportamiento “normal” dentro del acuario (deambulaci3n, alimentaci3n, huida, pelea, apareamiento, etc.) y no se detectaron cambios importantes en la amplitud, duraci3n y frecuencia de las espigas, car3cter temporal o contenido de ondas lentas. En la fig. 11 se presenta un histograma donde se observa que el n3mero de espigas/s ( $n = 6$  segundos) no varía en forma significativa ( $p > 0.9$ ) a diferentes tiempos (0, 1 día, 1 semana y 1 mes) en el mismo animal. La mayor parte de los animales ( $n = 50$ ) se mantuvieron vivos, en buenas condiciones y con el electrodo puesto por más de treinta días (ver Discusi3n). En tres animales se pudieron obtener registros cerebrales a los nueve meses de haberse implantado el electrodo. Estos datos sugieren que no se produce un aislamiento eléctrico en la punta del electrodo y que el sistema de registro no produce alteraciones neuronales significativas en el animal, secundarias a reacciones inmunol3gicas.

### 5. Influencia del estado de excitaci3n motora

Con el objeto de determinar la influencia que ejerce el grado de excitaci3n del animal sobre la actividad espontánea del cerebro, se realizaron registros durante diversos estados conductuales del acocil. Se pudo observar que con relaci3n al control (inmovilidad; fig. 12A), la actividad del animal es mayor

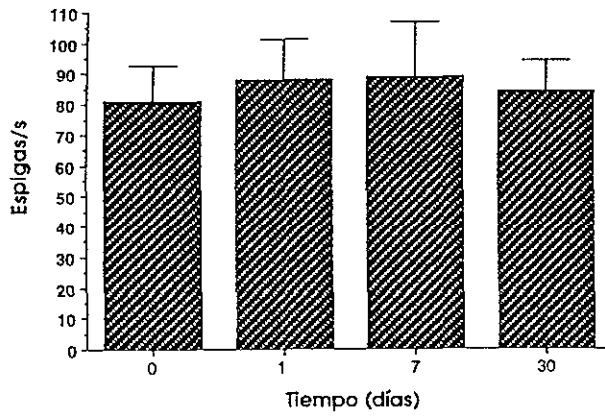
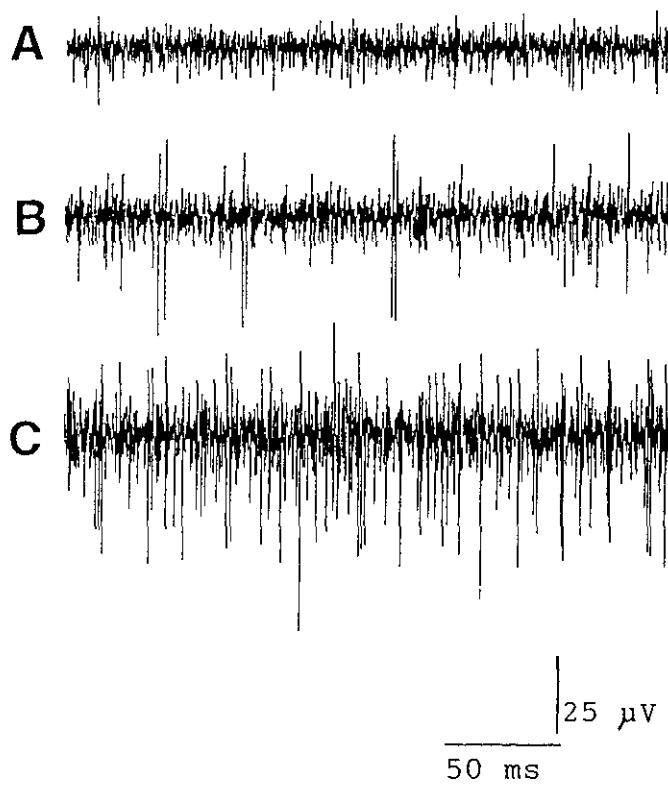


Fig. 11 Histograma de registros crónicos. Se presenta el promedio (y D.E.) de espigas/seg de un total de seis segundos registrados a distintos días en el mismo animal.



**Fig. 12.** Influencia del nivel de excitación motora sobre la actividad espontánea. **A.** Durante el reposo ( $V_{rms} = 4.701 \mu V$ ). **B.** Durante la deambulaci3n ( $V_{rms} = 6.348 \mu V$ ). **C.** Durante el reflejo de defensa ( $V_{rms} = 12.248 \mu V$ ).

durante la deambulaci3n (fig. 12B), en donde aparece un mayor n3mero de espigas, las cuales pueden ser 2 3 veces mayores que las observadas en reposo. Adicionalmente, cuando se registra la actividad espont3nea de un animal en reflejo de defensa o con movimientos vigorosos, se obtiene un incremento a3n mayor en el n3mero y tama1o de las espigas, algunas de las cuales llegan a ser 5-7 veces superiores que el control (fig. 12C).

Esta correlaci3n positiva entre el n3mero y amplitud de las espigas cerebrales con el grado de actividad motora no parece ser un fen3meno discreto, sino que se produce de forma continua, es decir, con peque1os movimientos la respuesta espont3nea es mayor; si el animal se mueve m3s intensamente aparecen espigas mayores y as3 sucesivamente. El incremento de actividad cerebral no es exclusivo del movimiento de todo el animal o de las patas, sino que se produce a3n con peque1os movimientos de las antenas, maxil3pedos o cualquier otro ap3ndice.

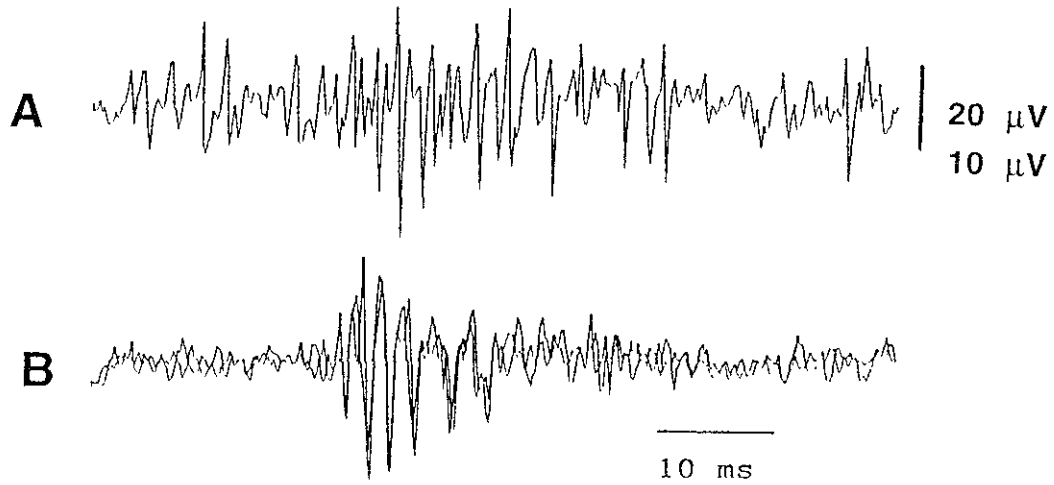
## **B. Actividad provocada por est3mulos sensoriales.**

El objetivo de estos experimentos fue demostrar que este m3todo permite el registro de potenciales el3ctricos asociados a un est3mulo sensorial, por lo que es factible el estudio a nivel cerebral de dichos sistemas sensoriales en el animal completo. Se exploraron los sistemas visual y mecanorreceptivo:

### **1. Respuesta a destellos de luz blanca.**

En la fig. 13A se puede observar que un cambio s3bito en la intensidad de la luz (1.4 lumen-s/pie cuadrado) sobre los ojos del animal produjo la aparici3n de una r3faga de espigas de gran amplitud (2-3 veces la actividad espont3nea). En estos casos es dif3cil evaluar con veracidad el inicio de la respuesta provocada debido a que se presenta una gran cantidad de actividad espont3nea. Las espigas provocadas por luz resultaron tener no solamente una amplitud mayor que las espont3neas sino tambi3n tener componentes de frecuencia generalmente mayores (m3xima energ3a en 600-800 hz).

Para evaluar correctamente la latencia de los potenciales provocados fue necesario promediar las respuestas. En la figura 13B se presentan dos respuestas promediadas al estimular con 100 destellos de luz blanca a 2 hz. En estos casos, es f3cilmente reconocible la latencia al primer pico que fluctu3 entre 15 - 30 ms en distintos animales (n = 12). La figura muestra las respuestas empalmadas con la finalidad de corroborar que dichos potenciales



**Fig. 13.** Potenciales provocados visuales (PPVs). **A.** Respuesta cerebral ante un destello de luz blanca difusa sobre el animal. El momento del estímulo corresponde al inicio del registro. Se puede observar que existen numerosas espigas, algunas de ellas provocadas por el estímulo y otras formando parte de la actividad espontánea. La identificación del inicio de estas espigas asociadas al destello es prácticamente imposible usando estímulos unitarios. **B.** PPVs promediados. Los registros corresponden al promedio de dos ensayos (empalmados) consistentes en 100 destellos de luz blanca difusa a 2 hz. Nótese que la promediación tiende a cancelar la actividad espontánea resaltando aquella sincronizada con el estímulo.



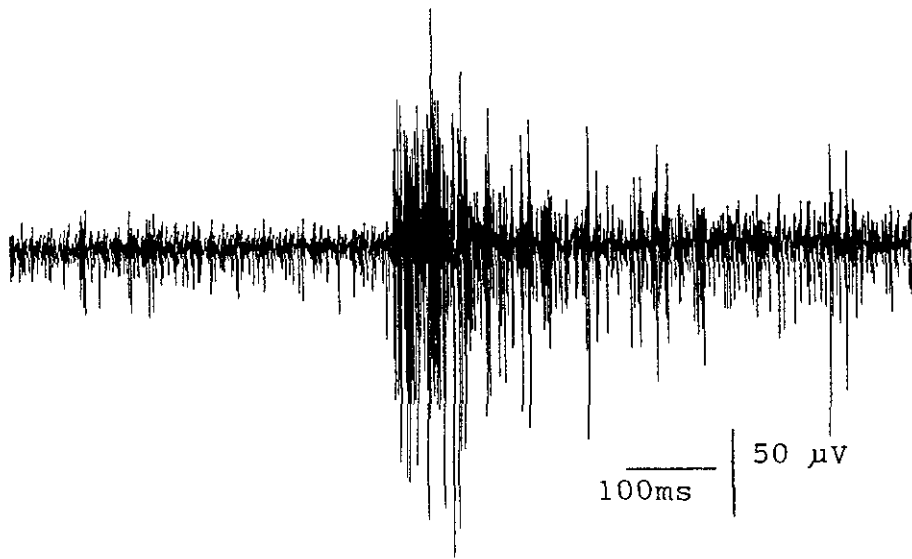
son reproducibles. También es posible observar que a pesar de haber promediado 100 respuestas, existen componentes residuales antes y después de las espigas sincronizadas con el estímulo, lo cual es debido a la gran actividad espontánea de fondo. Como se verá mas adelante, la latencia al primer pico y la duración de estos potenciales provocados visuales (PPVs) no es la misma en el ciclo de 24 horas.

## **2. Respuesta a objetos en movimiento.**

También se registraron potenciales eléctricos cerebrales asociados al movimiento de personas u objetos dentro del campo visual del animal. En la fig. 14 se puede observar la ráfaga de espigas de gran voltaje provocadas por el movimiento de la mano en frente de los ojos del animal. Estas descargas usualmente no tienen un patrón definido en cuanto a su presentación, latencia, número de espigas o morfología. La única característica consistente es la aparición de ráfagas de espigas de gran amplitud (hasta de 300  $\mu\text{V}$ ). Con frecuencia este estímulo fue capaz de provocar el reflejo de defensa del animal. Como parte del análisis de este tipo de respuesta, se observó que cuando se estimula el sistema visual del animal moviendo linealmente barras negras o blancas de varias anchuras, ángulos y velocidades, a través de un fondo claro u oscuro (o cuadros oscuros tan pequeños como de 2  $\text{cm}^2$ ) es posible activar neuronas cerebrales produciendo ráfagas cortas de espigas grandes (Hernández y cols., 1996b).

## **3. Respuesta a patrones visuales estructurados.**

A diferencia de las respuestas obtenidas en otros decápodos como la jaiba (*Callinectes sapidus*) o el cangrejo moro (*Menippe mercenaria*; Maldonado-León y Hernández, 2000), el acocil no responde a estímulos visuales espaciales estructurados, es decir, barras negras sobre un fondo blanco (o bien “tableros de ajedrez”) en la modalidad de transposición de patrones. Estos experimentos se realizaron mediante un generador de patrones visuales y un monitor (Grass mod. 10VPG). Se examinó una docena de animales cuyos registros cerebrales mostraban espigas espontáneas y PPVs ante estímulos luminosos, sin embargo, en ninguno de ellos se observaron potenciales que pudieran asociarse a los patrones estructurados. Desde luego, los resultados negativos de estos experimentos no descartan la posibilidad de que en otros sitios cerebrales no explorados se obtengan las fluctuaciones esperadas.

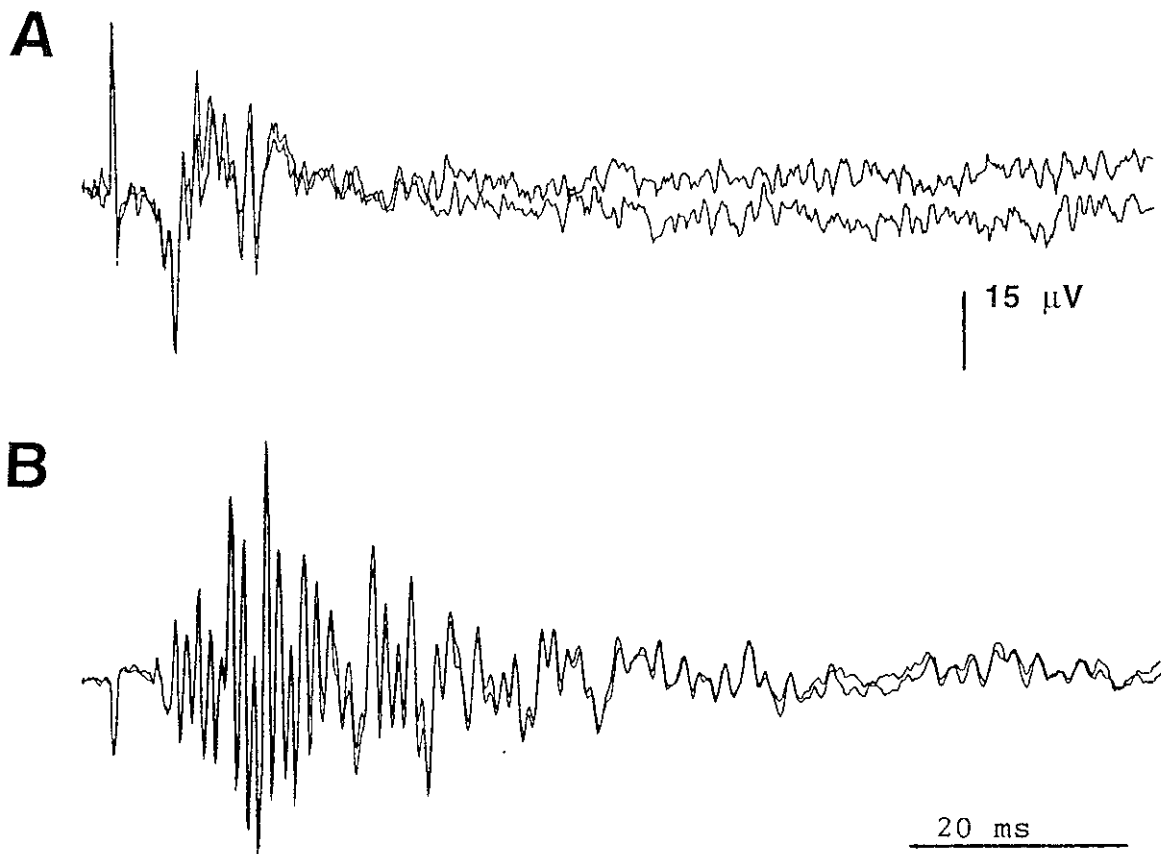


**Fig. 14** Respuesta cerebral a estímulos visuales en movimiento. Se presenta una ráfaga de espigas de gran amplitud y más de 100 msec de duración provocada por la entrada súbita de un objeto en movimiento (mano del explorador) al campo visual del animal. Desconocemos el momento preciso en que el animal detecta el estímulo.

#### 4. Respuesta a estímulos mecánicos.

Al igual que al estimular con objetos en movimiento, cuando se toca el cuerpo del animal en cualquiera de sus partes o de sus apéndices, o se aplica un estímulo mecánico (o “tap”) al agua o a las paredes de la pecera, se obtiene una ráfaga de espigas de gran amplitud (hasta de 100-300  $\mu$ V), sin embargo a diferencia de las respuestas al movimiento, estos potenciales sí están sincronizados con el estímulo, de tal forma que pueden ser sujetos a promediación. En la fig. 15A se presenta la respuesta cerebral promediada al aplicar estímulos mecánicos a la pecera experimental. Como se puede observar, la respuesta consistió de un primer potencial bifurcado o bifásico negativo claramente definido, con latencia al pico entre 6-8 mseg. Posteriormente aparecen otras espigas montadas en una onda lenta positiva, siendo la duración de la respuesta completa de aproximadamente 14 mseg. El empalme de las respuestas muestra su reproducibilidad. En la fig. 15B se muestra la respuesta del solenoide al estímulo. No se realizaron intentos adicionales para relacionar la fuerza del estímulo con las características de la respuesta. Tampoco se evaluó la latencia, duración o amplitud de los potenciales en el ciclo de 24 hrs, lo cual sería de mucho interés cronobiológico debido a los hallazgos de que otro sistema sensorial (visual) sí presenta ciclos circadianos en la latencia y duración de los PPVs (ver adelante).

En conjunto, los resultados experimentales anteriores muestran que es posible registrar en forma crónica (meses) en animales semi-intactos, la actividad extracelular de las neuronas cerebrales del acocil. El patrón eléctrico está dominado por espigas breves; las ondas lentas son escasas e irregulares. La actividad espontánea (multiunitaria) es uniforme con el animal inmóvil pero presenta actividad en ráfagas cuando se mueve o se estimula. Algunos potenciales provocados por estímulos sensoriales (luz y vibración) aparecen con latencia y morfología estable sincronizadas por el estímulo, por lo que pueden ser sujetos a promediación. Otros potenciales aparecen en forma irregular (respuestas a objetos en movimiento) o nula (patrones visuales estructurados). Una vez que esta actividad eléctrica fue caracterizada, se procedió a examinar su comportamiento durante los ciclos de 24 horas.



**Fig. 15.** Aplicación de estímulos mecánicos. **A.** Se presenta un par de respuestas cerebrales promediadas al aplicar estímulos mecánicos (“taps”). Cada promedio fue producido por 20 “taps” a 1 hz a la parte externa de una de las paredes de la pecera experimental de vidrio mediante una varilla de plástico acoplada y movida por el solenoide de una bocina, disparada desde la computadora. La primera deflexión grande (bifásica) corresponde al artificio del estímulo. **B.** Actividad del transductor electromecánico por medio del cual fue monitoreado el estímulo. Este transductor fue colocado en la pared interna de la pecera opuesta al sitio donde se aplicaron las percusiones.

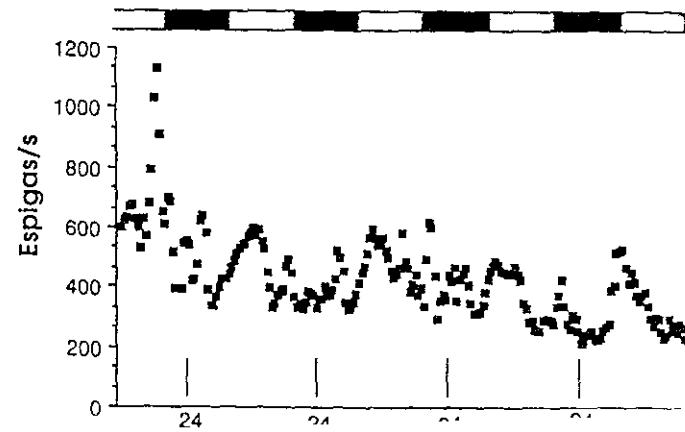
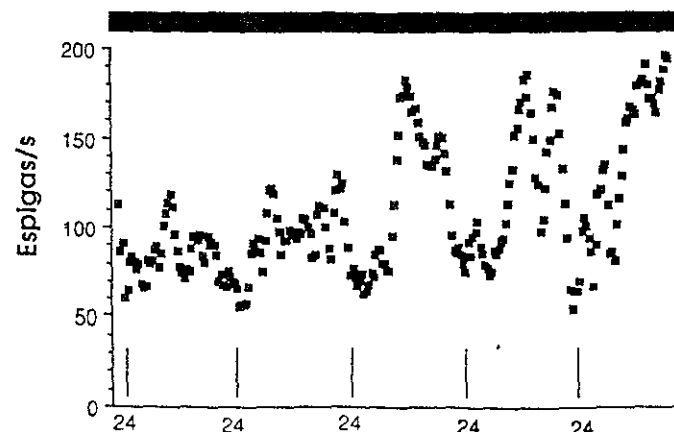
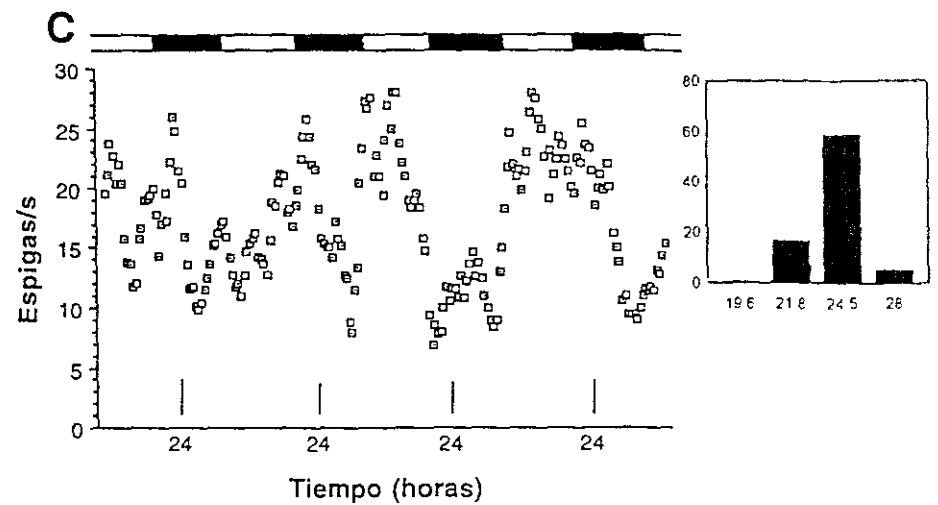
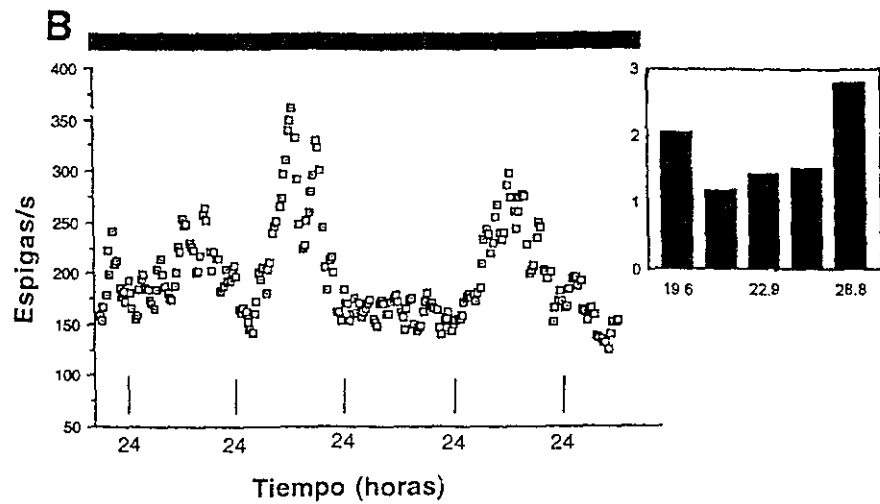
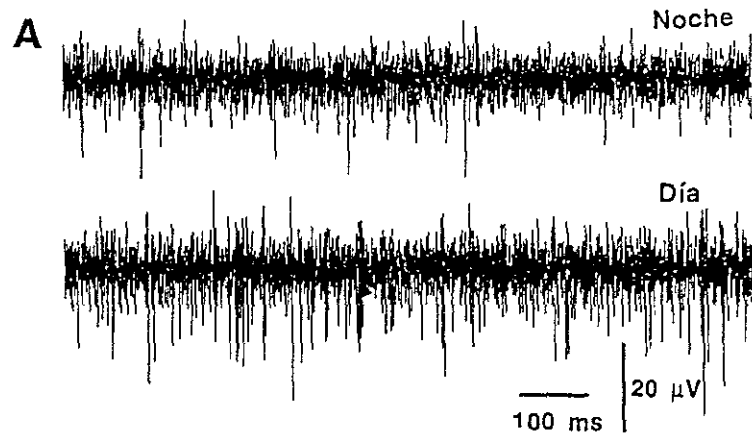
## II. Ritmos circadianos en la actividad espontánea.

### 1. Registro del protocerebro (oscilación libre y fotoperiodo).

En la fig. 16A se presenta un ejemplo de actividad espontánea del protocerebro del acocil a dos diferentes momentos del ciclo de 24 hrs (noche y día;  $n = 8$ ). Se puede observar que el registro de la fase nocturna (00 hrs) muestra una tendencia a presentar relativamente pocas espigas ( $V_{rms} = 5.812 \mu V$ ). Por el contrario, el trazo obtenido en el día (12 hrs) presenta numerosas deflexiones de mayor amplitud ( $V_{rms} = 9.403 \mu V$ ). En algunos registros hemos obtenido espigas hasta de 60-80  $\mu V$ .

Cuando esta actividad extracelular fue analizada durante los ciclos de 24 hrs los registros mostraron una periodicidad circadiana. En la fig. 16B se presentan como ejemplo dos gráficas (animales distintos) de la frecuencia de disparo vs tiempo de las neuronas cerebrales del protocerebro al mantener al acocil bajo condiciones de oscilación libre (oscuridad constante: OO). Puede observarse claramente que los picos de máxima frecuencia de disparo se producen durante el día subjetivo, mientras que por la noche (subjetiva) la actividad es menor. Tal como ocurre con otros registros circadianos como el locomotor y el ERG (Page y Larimer, 1975a y b) los ciclos registrados del cerebro del acocil mostraron variaciones en la amplitud, observándose algunos más claramente que otros. Tomando en consideración 30 ciclos que correspondieron a 8 animales, el periodograma (recuadro de la derecha) mostró que el principal periodo fue de 28.8 horas. El promedio (y d.e.) de la relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.6 \pm 0.6$  y de la amplitud relativa  $1.99 \pm 0.9$  (cuadro 2). De acuerdo a la posición del electrodo algunos registros fluctuaron en las decenas de espigas/seg., mientras que otros lo hicieron en las centenas, pero generalmente sin pasar de 800 espigas/s como valor máximo. La mayoría de los animales tuvieron una variabilidad en el número de espigas hasta de 2 a 3 veces su valor más bajo. Esto incluye también a los animales en que se registró de otras zonas del cerebro (ver adelante).

Las fluctuaciones circadianas observadas en OO (fig 16B) también fueron observadas durante el fotoperiodo (fig. 16C; animales distintos). En todos los casos de este estudio, los fotoperiodos fueron de 12 horas. Algunos animales como los de la figura 16C mostraron pequeñas fluctuaciones ultradianas (con periodos de 3-6 hrs) "montadas" sobre el ciclo principal circadiano. Es evidente que la máxima respuesta se produjo también durante las horas de luz.



**Fig. 16.** Ritmos circadianos registrados del protocerebro del ganglio cerebroide. **A.** Actividad eléctrica espontánea registrada a dos diferentes horas del día: 00:00 hrs (**noche**) y 12:00 hrs (**día**). **B.** Gráficas de frecuencia de disparo en función del tiempo (en horas) de la actividad multiunitaria de un par de acociles no restringidos mantenidos bajo condiciones de oscuridad constante durante varios días. **C.** Gráficas de frecuencia de disparo vs tiempo de la actividad multiunitaria en condiciones de luz:oscuridad. Los insertos de la derecha muestran los periodogramas (abscisa: período propuesto en horas; ordenada: amplitud relativa del estimador) construidos con 30 ciclos para B y 28 ciclos para C. En esta y las siguientes gráficas, la barra horizontal arriba de cada figura muestra las condiciones de luz durante los registros (el área blanca indica luz y el área negra indica oscuridad).

Asimismo, es posible observar que hay una diferencia significativa en la frecuencia de disparo entre estos dos experimentos. Sin embargo, al normalizar los datos y someterlos al análisis del periodograma se obtuvo un periodo principal (28 ciclos; 8 animales) de 24.5 horas. La relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.2 \pm 0.3$  y la amplitud relativa de  $2.1 \pm 0.4$  (cuadro 2).

En algunos registros la frecuencia de disparo de la actividad multiunitaria se incrementa gradualmente después de que la luz se ha prendido pero en otros hay un aumento súbito en la frecuencia que alcanza el pico durante el periodo de luz y entonces empieza a disminuir para alcanzar el mínimo alrededor de la medianoche. En este estudio no se pudo establecer un patrón de amortiguamiento de los ritmos con el tiempo ya que hubo mucha variabilidad en la amplitud relativa de un ciclo a otro.

## 2. Registro de otras zonas cerebrales.

El ganglio cerebroide ha sido postulado como la estructura que realiza la integración de los ritmos circadianos de respuesta a la luz en el acocil (Page y Larimer, 1975A; Aréchiga y cols., 1993), sin embargo, hasta ahora no se conocen los elementos celulares responsables de la generación de dicho ritmo. Dado que el cerebro del acocil se encuentra profusamente comunicado por numerosos contactos electrotónicos (Glantz, 1978a) a través de arborizaciones dendríticas extensas (Glantz y cols., 1981), aquí se registraron distintas regiones del cerebro para probar la hipótesis de que cualquier región del ganglio cerebroide puede presentar actividad rítmica circadiana, en la frecuencia de disparo espontáneo de la actividad multiunitaria. En la fig. 17A se presentan las gráficas de dos animales distintos en donde se muestra la frecuencia del disparo neuronal vs tiempo con el electrodo colocado en el deutocerebro, bajo condiciones de oscilación libre (OO). Se puede observar claramente que existe una actividad rítmica. El periodograma (fig. 17B) construido con 24 ciclos (5 animales) mostró un periodo predominante en 18.4 hrs. La relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.9 \pm 0.8$  y la amplitud relativa de  $1.4 \pm 0.3$ .

En el tritocerebro también fue posible observar oscilaciones circadianas. En la figura 18A se presentan las gráficas de dos experimentos en oscuridad constante. Aquí también se observa un comportamiento rítmico de los valores. El periodograma (29 ciclos; 5 animales) mostró el componente principal en 24.4 horas. La relación  $\alpha/\rho$  fue de  $2.2 \pm 0.4$  y la amplitud relativa de  $1.6 \pm 0.3$ . También es posible ver pequeñas oscilaciones ultradianas. En los registros de esta zona como del deutocerebro, los valores del periodo bajo condiciones de



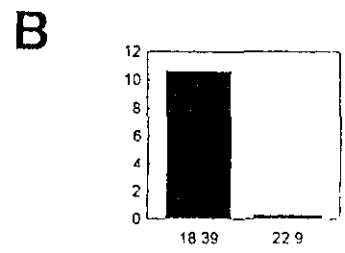
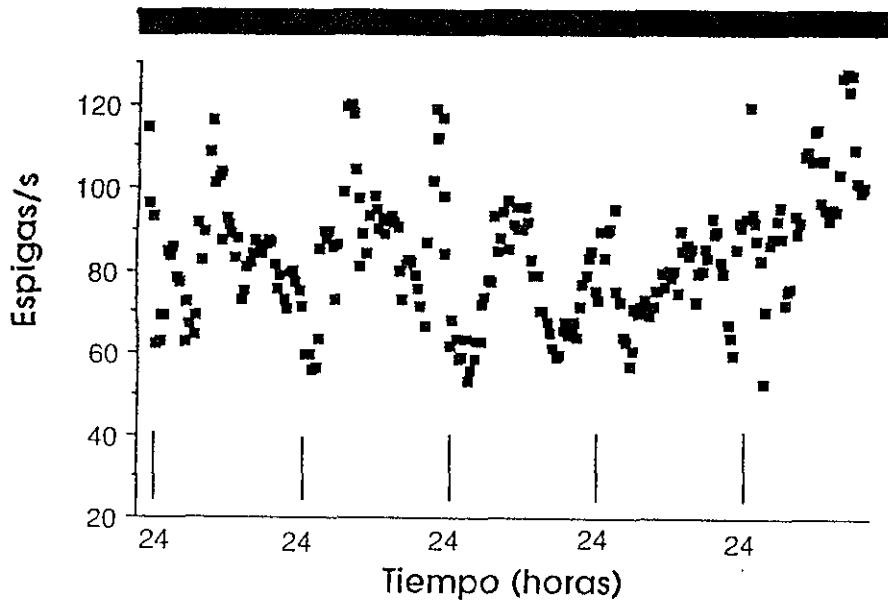
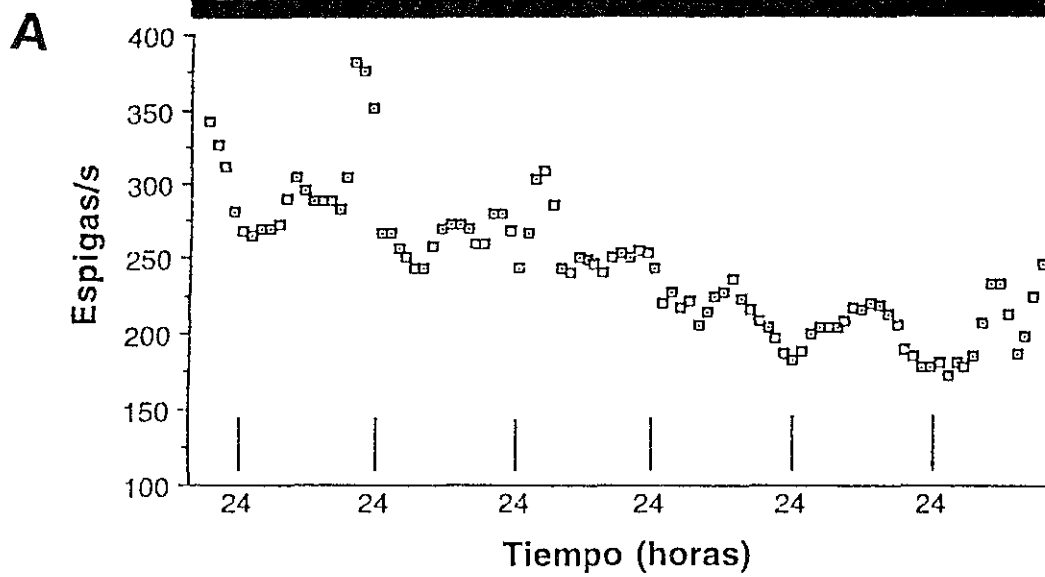
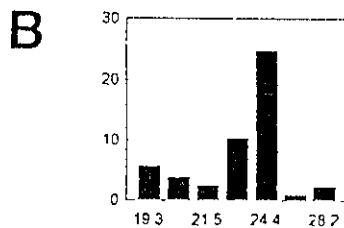
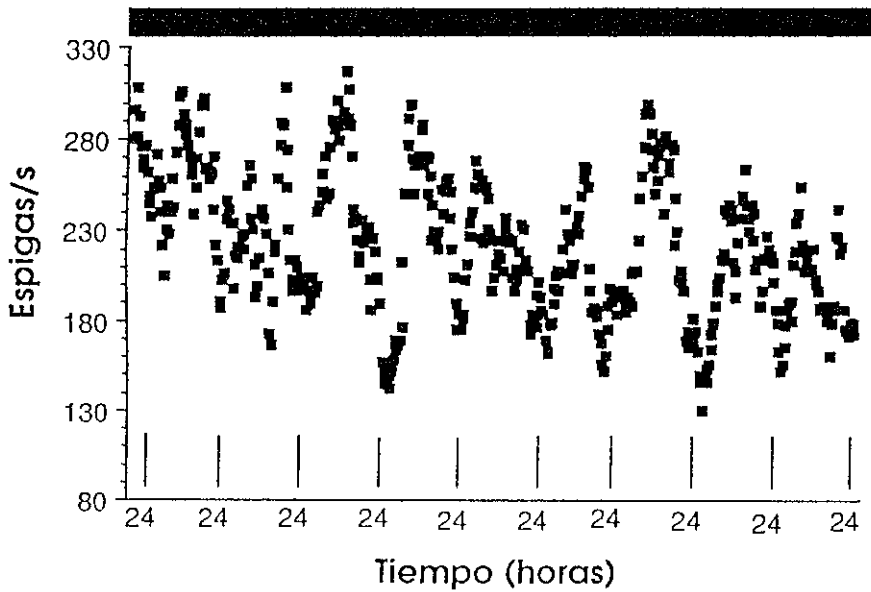
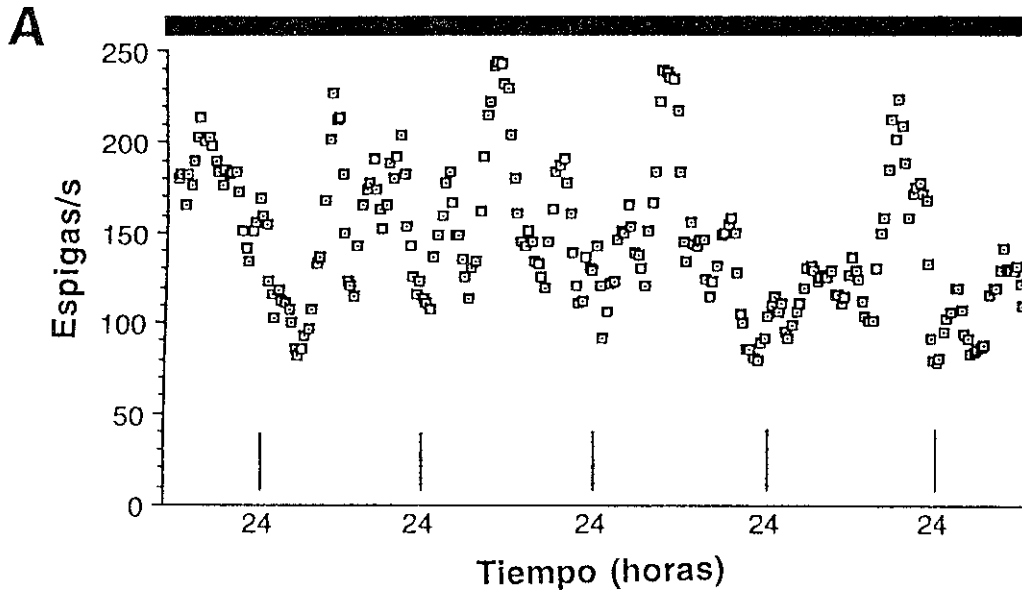


Fig. 17. A. Gráficas de la frecuencia de disparo vs tiempo de la actividad multiumtaria registrada del deutocerebro de dos acociles diferentes mantenidos en oscuridad constante durante varios días. En B se muestra el periodograma construido con 24 ciclos (abscisa: período propuesto en horas; ordenada, amplitud relativa del estimador).



**Fig. 18.** **A.** Gráficas de la frecuencia de disparo y tiempo de la actividad multiunitaria registrada del tuitocerebro de dos acociles diferentes mantenidos en oscuridad constante durante varios días. En **B** se muestra el periodograma construido con 29 ciclos (abscisa: período propuesto en horas; ordenada, amplitud relativa del estimador).

fotoperiodo resultaron también circadianos con un máximo durante las horas del día (cuadro 2).

Además de las distintas zonas cerebrales también fue posible registrar un patrón de disparo circadiano a nivel de los conectivos circunnesofágicos (fig. 19A) bajo condiciones de oscuridad constante. El periodograma (fig. 19B) de 34 ciclos (5 animales) mostró un periodo principal de 25.3 hrs (relación  $\alpha/\rho$ :  $1.9 \pm 0.5$ ; amplitud relativa:  $2.2 \pm 0.4$ ) En estas gráficas se mantiene el esquema general de mayor activación durante el día subjetivo y menor durante la noche subjetiva.

### **3. Los ritmos de las distintas zonas del cerebro están sincronizados.**

Con el propósito de probar que existe una relación de fase entre las diversas regiones del cerebro que muestran ritmos circadianos, se registró en forma simultánea la actividad espontánea de dos zonas del cerebro en condiciones de luz:oscuridad. En la fig. 20A se observan los trazos obtenidos simultáneamente de protocerebro (superior) y tritocerebro (inferior) en el mismo animal. Se puede observar que aunque existen coincidencias temporales en algunas deflexiones, debidas probablemente a propagación de potenciales de acción a través de las neuropilas del ganglio, la información que detecta cada canal no es la misma, lo cual nos permite descartar la posibilidad de un corto circuito entre las puntas del electrodo. Cuando se grafica la frecuencia de disparo de las dos zonas cerebrales en el ciclo de 24 horas (fig. 20B) se puede observar que existen diferencias en la amplitud de los ciclos, pero ambas curvas fluctúan en forma más o menos paralela manteniendo una relación de fase. Esto apoya la idea de que las señales circadianas (donde quiera que se generen) son capaces de propagarse a distintas zonas del ganglio cerebroide. El principal periodo circadiano calculado de 26 ciclos (4 animales) fue para ambos ritmos de 24.5 horas. La relación  $\alpha/\rho$  fue de  $2.4 \pm 0.6$  para el protocerebro y  $1.6 \pm 0.7$  para el tritocerebro. La amplitud relativa alcanzó  $3.0 \pm 0.7$  en el protocerebro y  $2.4 \pm 0.8$  en el tritocerebro.

### **4. Semi-aislamiento quirúrgico del cerebro.**

Un procedimiento comúnmente utilizado para indagar sobre la localización precisa de los marcapasos circadianos es el aislamiento quirúrgico y registro del tejido en que se postula que existen las neuronas generadoras. Sin embargo, dado que el ganglio cerebroide es muy susceptible a la hipoxia

**CUADRO 2**  
**EXPERIMENTOS CIRCADIANOS**

SITIO DE REGISTRO	NUMERO DE ANIMALES	CONDICION EXTERNA	NUMERO DE CICLOS	PERIODO CIRCADIANO	RELACION $\alpha/p$	AMPLITUD RELATIVA	REGISTRO ELECTRICO
PROTOCEREBRO	8	OO	30	28.8	$1.6 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.9$	AMU
	8	LO	28	24.5	$1.2 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.4$	(Frecuencia)
DEUTCEREBRO	5	OO	24	18.4	$1.9 \pm 0.8$	$1.4 \pm 0.3$	AMU
	4	LO	20	24.4	$2.6 \pm 0.7$	$1.9 \pm 0.4$	(Frecuencia)
TRITOCEREBRO	5	OO	29	24.4	$2.2 \pm 0.4$	$1.6 \pm 0.3$	AMU
	4	LO	26	24.5	$2.1 \pm 0.5$	$1.8 \pm 0.4$	(Frecuencia)
CCE's	5	OO	34	25.3	$1.9 \pm 0.5$	$2.2 \pm 0.4$	AMU (Frecuencia)
PROTOCEREBRO OJOS ATADOS	5	LO	28	18.8	$0.8 \pm 0.3$	$1.8 \pm 0.4$	AMU
CCE's CORTADOS	5	OO	32	23.3	$0.6 \pm 0.2$	$3.2 \pm 0.8$	(Frecuencia)
PROTOCEREBRO TRITOCEREBRO	4	LO	26	24.5	$2.4 \pm 0.6$	$3.0 \pm 0.7$	AMU (Frecuencia)
PROTOCEREBRO	9	OO	38	26.0	$1.3 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.4$	PPV's
	5	LO	38	18, 24.8	$1.1 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.3$	(Latencia)
PROTOCEREBRO	7	OO	32	24.4	$1.6 \pm 0.4$	$1.4 \pm 0.4$	PPV's (Duración)
PROTOCEREBRO MAS RETINA	6	OO	30	25.2	$1.4 \pm 0.3$	$2.8 \pm 0.3$	PPV's (Latencia)
		OO	30	25.2	$1.3 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.5$	ERG (Amplitud)

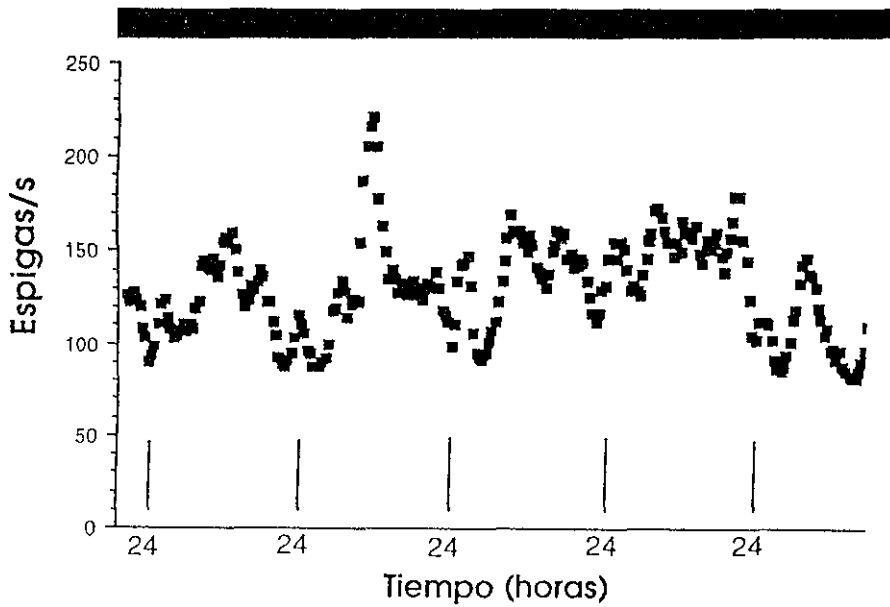
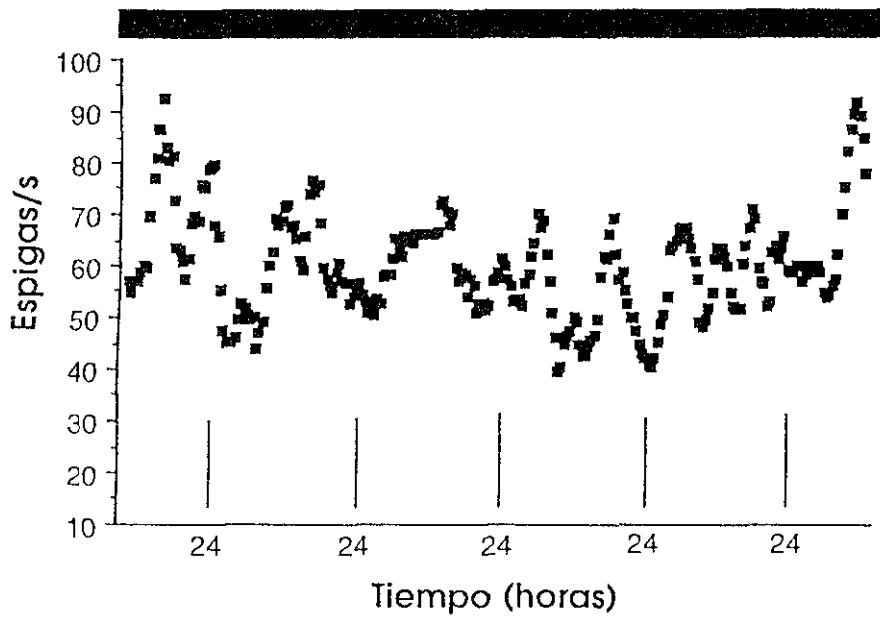
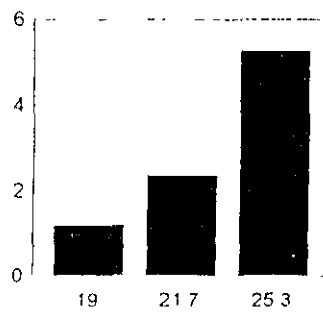
**A****B**

Fig. 19 Gráficas de la frecuencia de disparo vs tiempo de la actividad multunitaria registrada de los conectivos circunmesofágicos (CCEs) de acoriles mantenidos en oscuridad constante. En B se muestra el periodograma construido con 34 ciclos (abscisa: período propuesto en horas, ordenada: amplitud relativa del estimador).

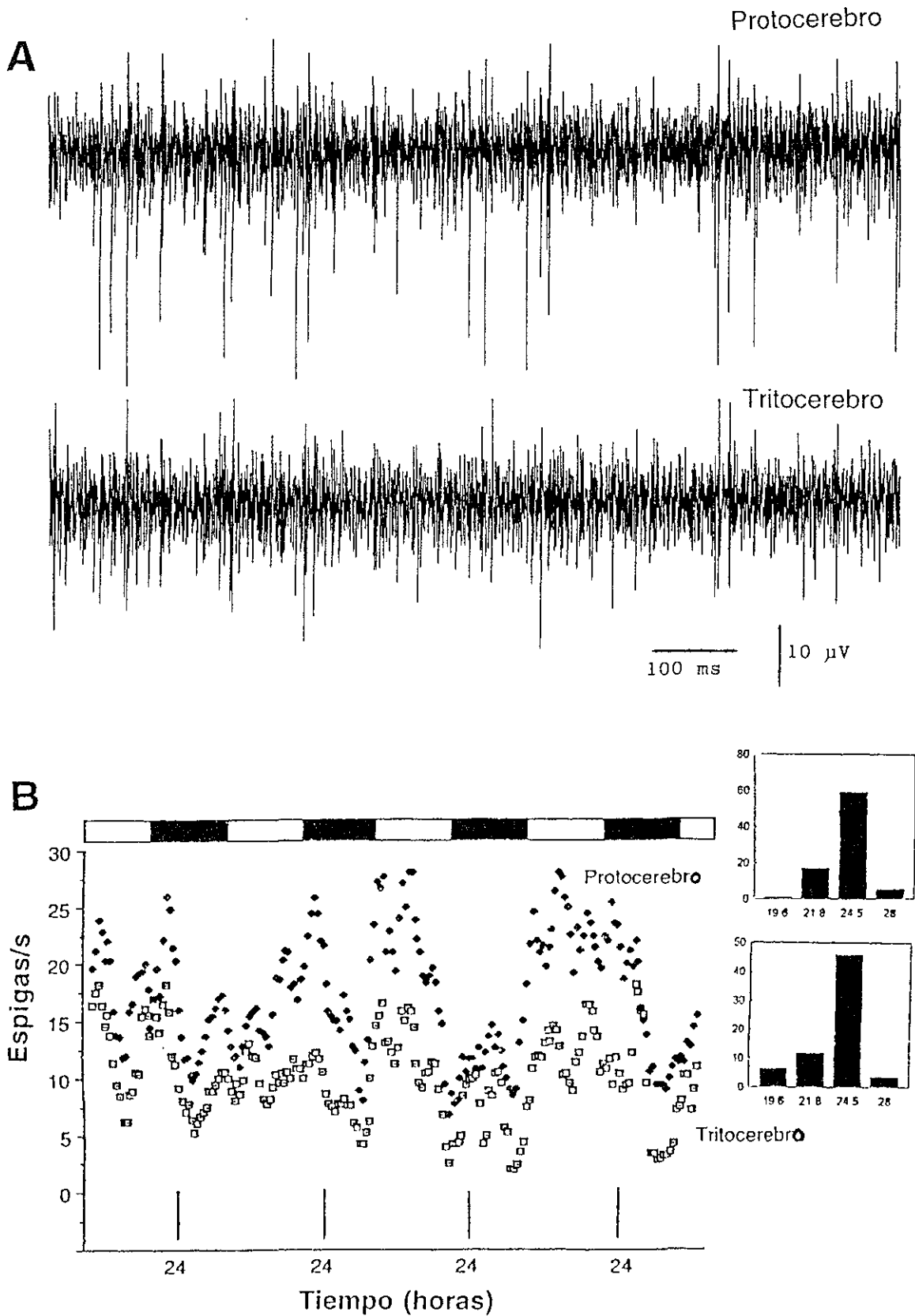


Fig. 20. Registro simultáneo de dos regiones cerebrales. A. Actividad espontánea del protocerebro (**superior**) y del tritocerebro (**inferior**) de un animal mantenido en régimen de L/O. Nótese que aunque algunas espigas coinciden en ambos registros, éstos no son iguales. B. Gráfica de la frecuencia de disparo en función del tiempo del animal referido en A. Los insertos muestran los periodogramas de 26 ciclos cada uno (abscisa: período propuesto en horas, ordenada: amplitud relativa del estimador).

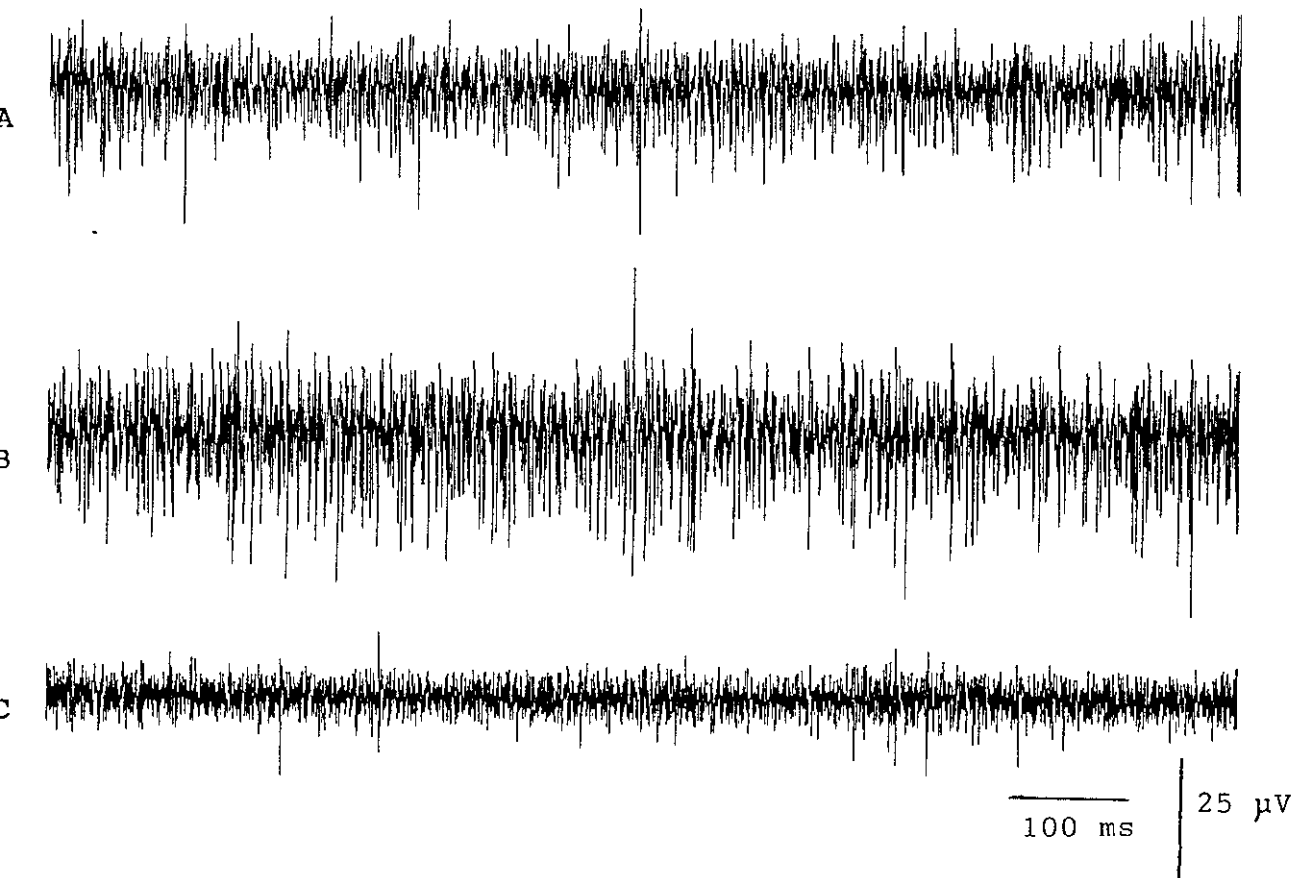
circulatoria no es posible aislarlo completamente para registrar de él *in vitro* (Waterman y cols., 1964). Por lo tanto, como una primera aproximación dirigida a corroborar que en el cerebro del acocil existen neuronas que funcionan como marcapasos circadianos, se realizaron registros bajo dos condiciones: con los tallos oculares (TO) atados ( $n = 5$  animales) y/o con los conectivos circumesofágicos (CCEs) cortados ( $n = 5$  animales). La primera observación fue que la ligadura de los tallos aumenta considerablemente (1-3 veces; fig. 21B) el número y el tamaño de espigas espontáneas con respecto al control (animal intacto; fig. 21A). Por otro lado, el corte de ambos CCEs reduce substancialmente la amplitud y frecuencia de las fluctuaciones. En la fig. 21C se observó que la mayor parte de las espigas desaparecen al suprimir la información ascendente hacia el cerebro. Cuando se evaluaron los patrones de disparo del ganglio cerebroide bajo estas circunstancias en el ciclo de 24 hrs, las gráficas mostraron que tanto con los tallos atados (fig. 22A) como con los CCEs cortados (fig. 22C) la ritmicidad circadiana de la actividad multiunitaria se mantiene, con una acrofase diurna, independientemente del régimen de luz aplicado (LO u OO). Con los tallos atados se obtuvo un periodo principal de 18.8 horas (28 ciclos; fig. 22B), la relación  $\alpha/\rho$  fue de  $0.8 \pm 0.3$  y la amplitud relativa de  $1.8 \pm 0.4$ . Con los CCE cortados (32 ciclos) el periodo principal fue de 23.3 horas (fig. 22D), la relación  $\alpha/\rho$  de  $0.6 \pm 0.2$  y la amplitud relativa de  $3.2 \pm 0.8$  (cuadro 2).

Los datos anteriores permiten concluir que el acocil presenta un ritmo circadiano en la frecuencia de disparo espontáneo poblacional (actividad multiunitaria) de las neuronas cerebrales. Este patrón circadiano muestra una acrofase diurna y se presenta tanto en condiciones de oscilación libre (oscuridad constante) como de fotoperiodo. Estas fluctuaciones ocurren en fase en el protocerebro, deutocerebro, tritocerebro y conectivos circunesofágicos (CCEs) y son capaces de persistir cuando el ganglio cerebroide se encuentra desprovisto de influencias neurales descendentes (TO) y ascendentes (CCEs).

### **III. Ritmos circadianos en la actividad provocada por luz.**

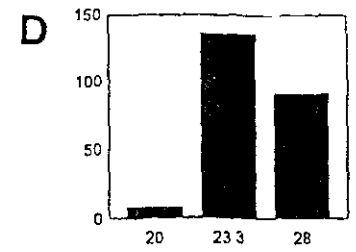
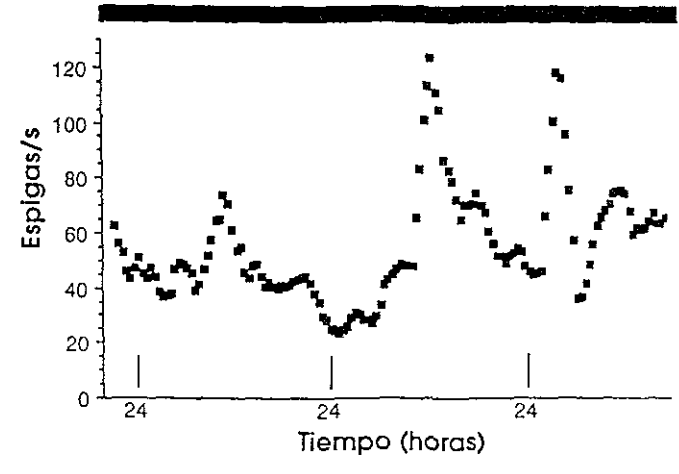
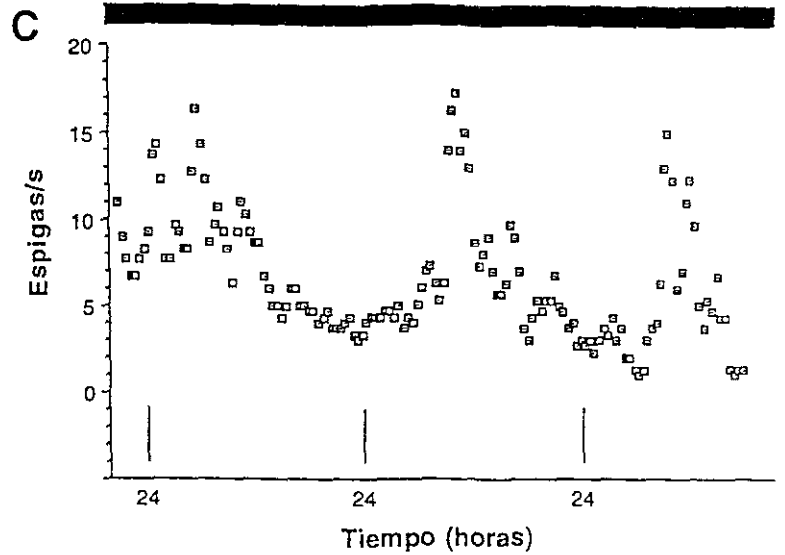
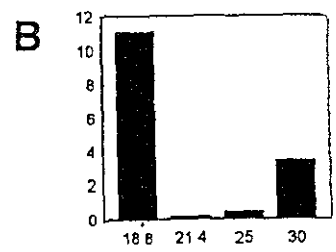
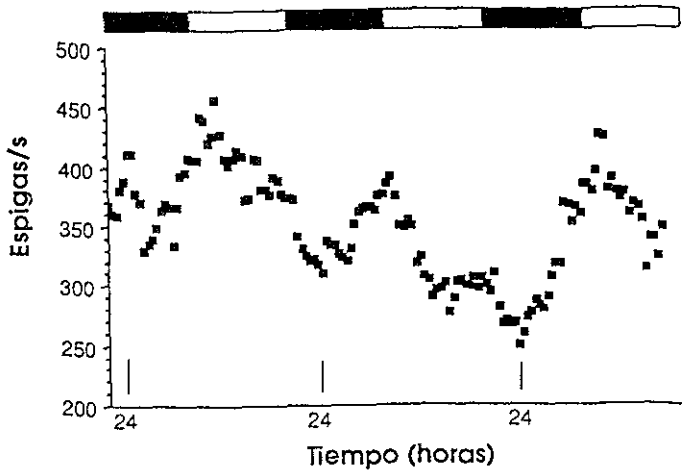
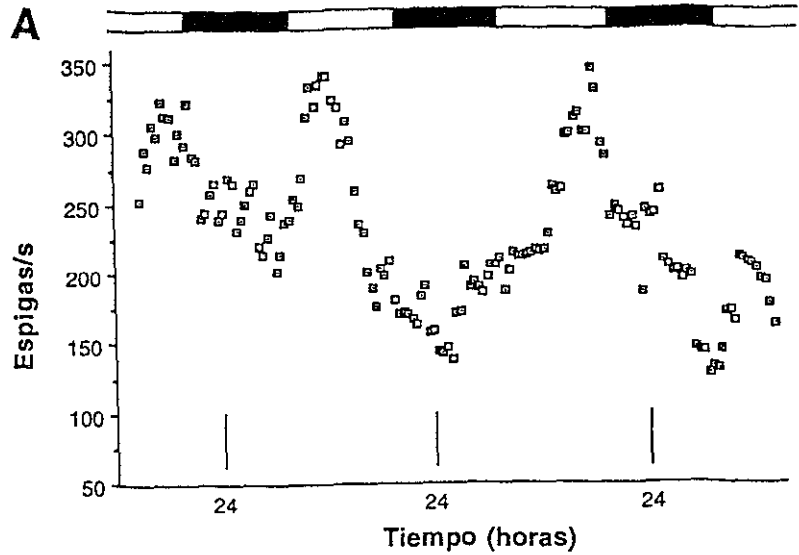
#### **1. Ritmos en la latencia y duración de los PPVs.**

En la caracterización de la actividad eléctrica cerebral del acocil se analizaron las respuestas promediadas ante destellos de luz blanca; sin embargo, la



**Fig. 21.** Efecto del semi-aislamiento del cerebro sobre la actividad espontánea. **A.** Animal intacto ( $V_{rms} = 4.948 \mu V$ ). **B.** Registro tomado después de la ligadura de ambos tallos oculares ( $V_{rms} = 7.135 \mu V$ ). **C.** Trazo obtenido posteriormente al corte de ambos conectivos circunsofágicos (CCEs;  $V_{rms} = 2.813 \mu V$ ).

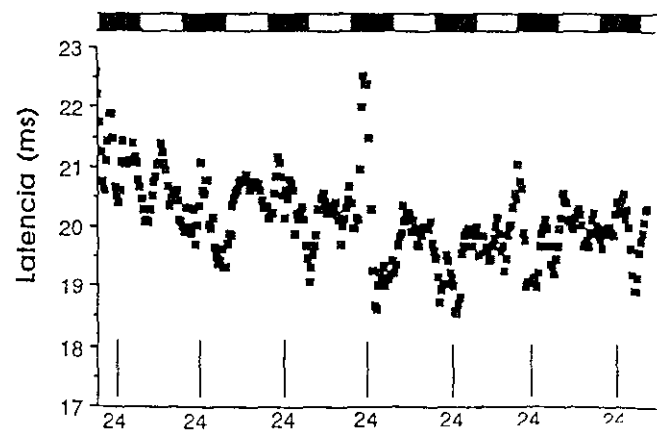
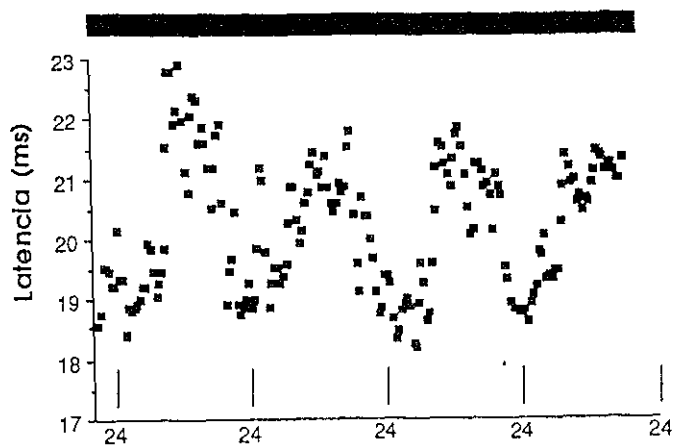
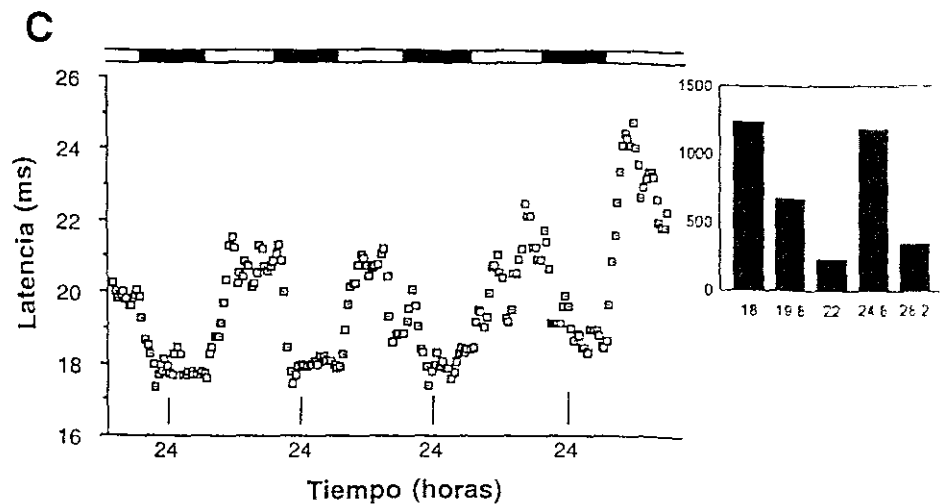
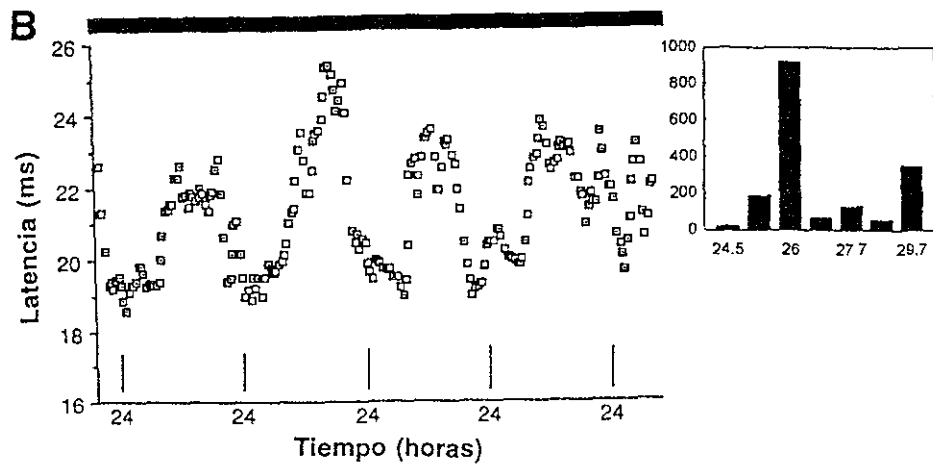
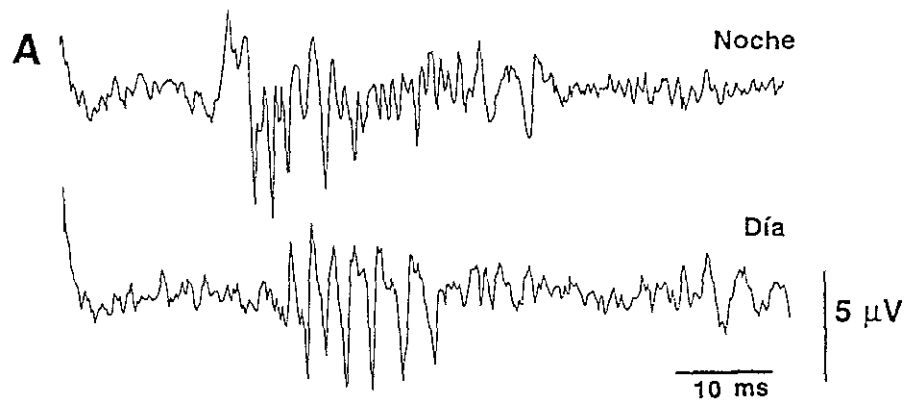




**Fig. 22.** Efecto del semi-aislamiento sobre la actividad circadiana. **A.** Número de espigas/s de la actividad multiunitaria cerebral en función del tiempo de dos acociles distintos con ambos tallos oculares atados, bajo régimen de fotoperíodo. **B.** Periodograma construido con 28 ciclos (abscisa: período propuesto en horas; ordenada: amplitud relativa del estimador). **C.** Frecuencia de disparo vs tiempo de dos animales con los conectivos circunsofágicos cortados en OO. **D.** Periodograma construido con 32 ciclos (abscisa: período propuesto en horas; ordenada: amplitud relativa del estimador).

latencia y morfología de los potenciales no es la misma durante el ciclo de 24 horas. En la fig 23A se muestran potenciales provocados visuales (PPVs) promediados ( $n = 100$  a 2 hz) obtenidos con 12 horas de diferencia (noche y día). Se puede observar claramente que existen diferencias en la latencia al primer pico y en la duración de dichos potenciales. Los PPVs registrados en la fase nocturna (superior) aparecen en el cerebro en forma más temprana y con un mayor número de componentes que los que se producen en la fase diurna (inferior). Con el objeto de evaluar las fluctuaciones en la latencia durante el ciclo de 24 hrs, se aplicaron estímulos luminosos cada 30 min ( $n = 100$  a 2 hz) durante varios días, bajo condiciones de OO (fig. 23B, dos ejemplos) y de LO (fig. 23C, dos ejemplos). Se midieron los valores de latencia al primer pico de cada respuesta promediada y se graficaron con respecto al tiempo. La latencia al primer pico en los distintos animales fluctuó entre los 15 y 25 ms, sin embargo en cada animal la variabilidad de las fluctuaciones fue generalmente menor de 7 ms. Bajo condiciones de oscilación libre (OO) los valores de latencia tienden a ascender rápidamente a partir del momento del “encendido” subjetivo de luz. Asimismo y aunque en forma un poco menos robusta, los valores descienden más rápidamente después del “apagado” subjetivo. Durante el fotoperiodo (LO) esta tendencia se acentúa en algunos animales (fig. 23C gráfica superior). Del mismo modo como ocurre con la actividad espontánea, los ciclos de latencia de los PPVs varían en amplitud y algunos son más conspicuos que otros. En condiciones de OO se obtuvo un periodo circadiano principal de 26.0 horas (38 ciclos; 9 animales), relación  $\alpha/\rho$  de  $1.3 \pm 0.2$  y amplitud relativa de  $1.3 \pm 0.4$ . Bajo condiciones de fotoperiodo se obtuvieron dos picos prominentes de periodo de 18.0 y 24.8 (ambos circadianos; 38 ciclos; 5 animales), la relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.1 \pm 0.2$  y la amplitud relativa de  $1.4 \pm 0.3$ .

Además de las diferencias en la latencia, en algunos animales ( $n = 7$ ) fue también posible observar cambios en la duración de las respuestas provocadas con respecto a la hora del día. En la fig. 24A se muestran dos grupos de registros tomados en el mismo animal durante la noche (superior) y durante el día (inferior), donde cada grupo se compone de seis trazos sobrepuestos y cada uno de éstos es la respuesta promediada ( $n = 100$  a 2 hz) producida por destellos de luz blanca difusa. Se puede observar que en horas de oscuridad las respuestas tienen una duración de aproximadamente 30-40 ms y están compuestas de espigas relativamente lentas (100-400 hz). En cambio durante las horas de luz, los potenciales muestran una velocidad de fluctuación superior (400-600 hz) y sus componentes de mayor amplitud ocurren en un lapso de no más de 25 ms. Similar a lo anterior, cuando la duración de las



**Fig. 23.** Ritmos circadianos en la latencia de los potenciales provocados visuales (PPVs). **A.** Respuestas provocadas promediadas ( $n = 100$ ; 2 Hz) registradas del protocerebro de un acocil no restringido a dos diferentes horas del día: 2:00 hrs (**noche**) y 14:00 hrs (**día**). El momento de los destellos corresponde al inicio de los trazos. **B.** Gráficas de la latencia al primer pico de los PPVs en función del tiempo de un par animales mantenidos en condiciones de oscuridad constante. **C.** Latencia vs tiempo de dos experimentos (animales distintos) bajo condiciones de fotoperiodo. Los insertos de la derecha muestran los periodogramas (abscisa: período propuesto en horas; ordenada: amplitud relativa del estimador) construidos con 38 ciclos para cada condición experimental.

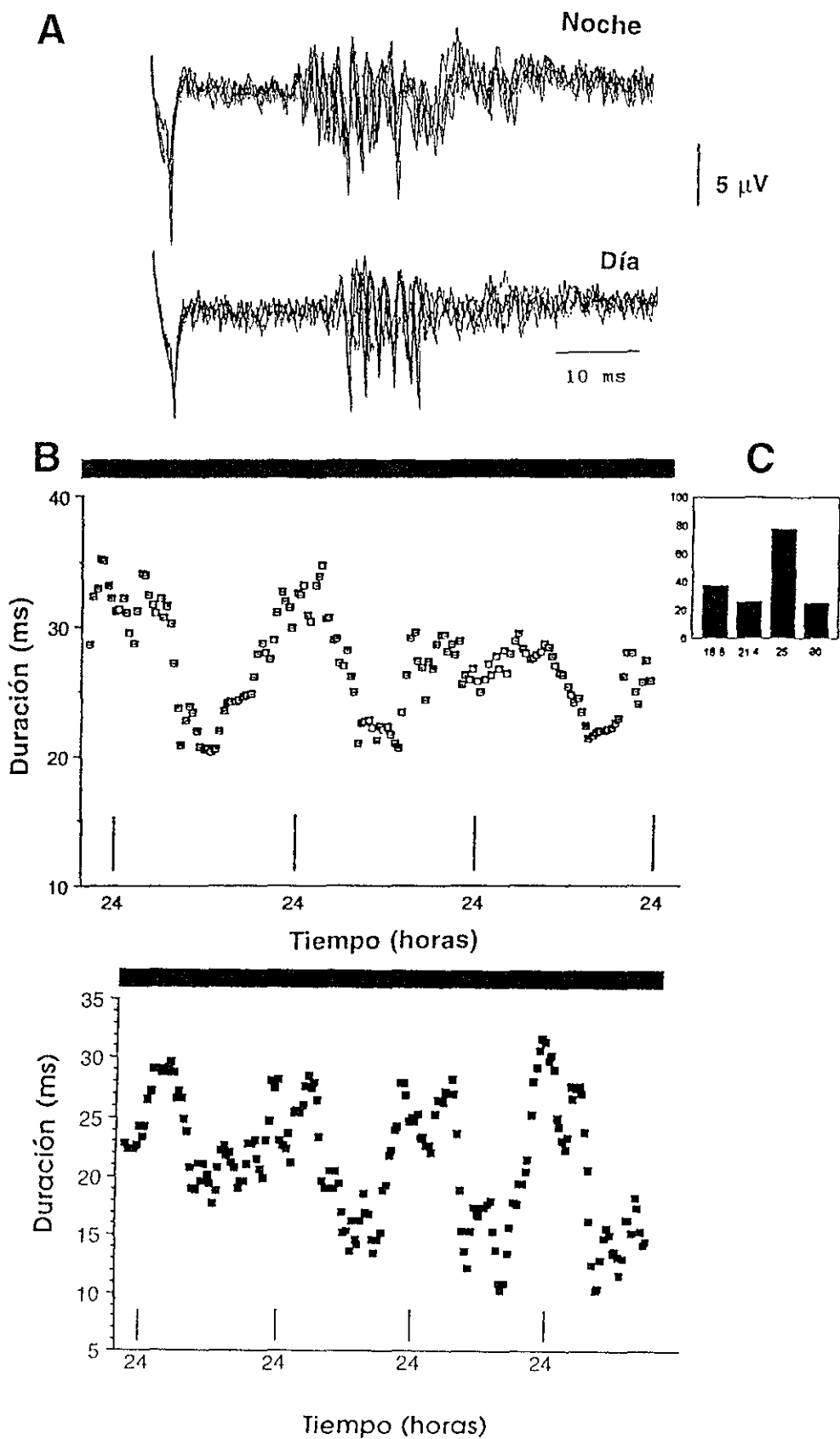


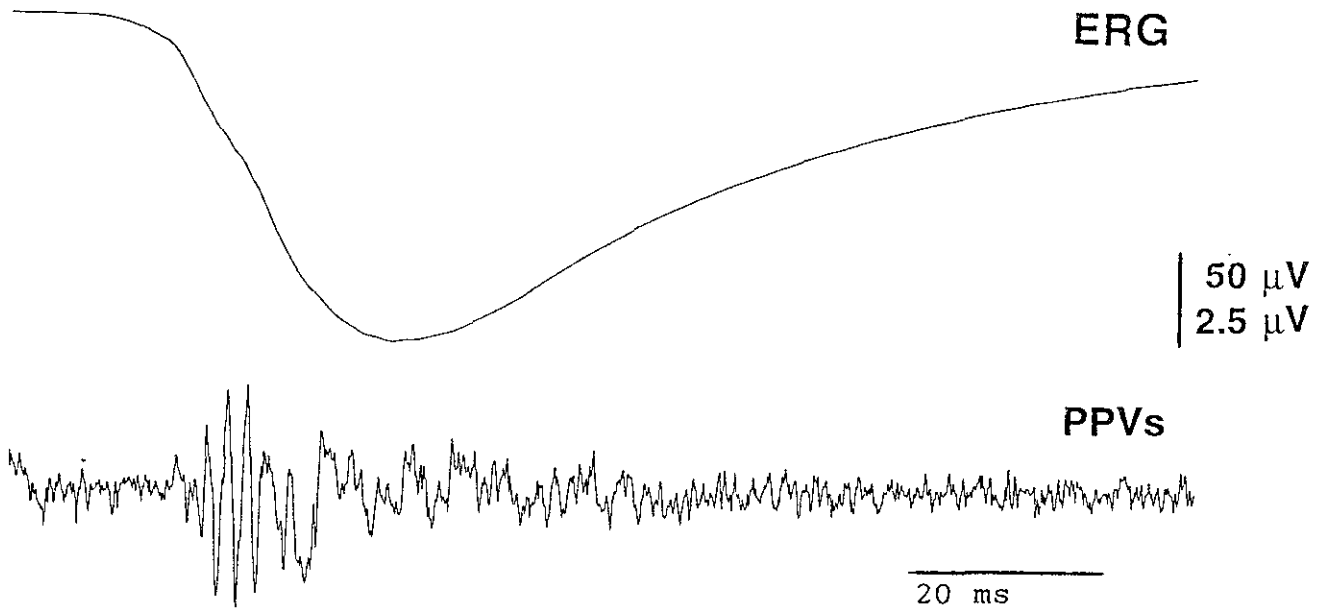
Fig. 24. Ritmos circadianos en la duración de los PPVs. A. Seis respuestas promediadas empalmadas ( $n = 100$ ; 2 Hz) registradas durante el periodo nocturno subjetivo (noche) y otras seis durante el diurno subjetivo (día) de un animal mantenido en oscuridad constante. El momento de los destellos corresponde al inicio de los trazos. B. Gráficas de la duración de las respuestas provocadas por los destellos luminosos en función del tiempo de dos aceiles en oscuridad constante. En C se muestra el periodograma construido con 32 ciclos (abscisa: periodo propuesto en horas; ordenada: amplitud relativa del estimador).

respuestas se analizó en el ciclo de 24 horas en OO se encontró una fluctuación claramente circadiana, con valores máximos alrededor de la medianoche (fig. 24B, dos ejemplos). En 32 ciclos el periodo principal fue de 24.4 horas (fig. 24C). La relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.6 \pm 0.4$  y la amplitud relativa de  $1.4 \pm 0.4$ .

## 2. Registro simultáneo del cerebro y la retina.

La respuesta eléctrica a la luz de los receptores retinianos (electrorretinograma: ERG) es bien conocida y sus fluctuaciones circadianas han sido ampliamente documentadas (Page y Larimer, 1975b; Barrera-Mera, 1976; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1980; Moreno-Sáenz y cols., 1987; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1992; Aréchiga y Rodríguez Sosa, 1997). Con el objeto de determinar el nivel de acoplamiento entre los ritmos de los fotorreceptores y del cerebro se registraron en forma simultánea los ERG y PPVs promediados. Para estos experimentos fue necesario fijar los ojos del animal y restringirlo en la pecera para evitar el dislocamiento del electrodo de la retina (ver métodos). En la fig. 25 se presentan el ERG (registro superior) y el PPV (inferior) producidos por la aplicación de 100 destellos de luz a 2 Hz, bajo condiciones de oscuridad constante. Se puede observar que las respuestas provocadas en el cerebro aparecen apenas ~8 mseg después de haberse iniciado el ERG y sus principales componentes ocurren antes de que el ERG haya alcanzado su pico máximo de amplitud.

Al graficar la amplitud máxima del ERG y la latencia al primer pico de los PPVs con respecto al tiempo podemos observar que ambas curvas son rítmicas, circadianas y se encuentran con un desfase cercano a  $180^\circ$  (fig. 26A, dos ejemplos). En 30 ciclos (6 animales), el ritmo del ERG tuvo un periodo principal en 25.2 horas (igual que el de los PPVs), su relación  $\alpha/\rho$  fue de  $1.3 \pm 0.2$  y su amplitud relativa de  $2.5 \pm 0.5$ . La relación  $\alpha/\rho$  y la amplitud relativa de los PPVs fueron similares ( $1.4 \pm 0.3$  y  $2.8 \pm 0.3$  respectivamente). El nivel de acoplamiento se observa mejor en la fig. 26B, en donde se han empalmado los valores de amplitud del ERG y de la latencia de los PPVs (la cual se ha graficado con una escala invertida, es decir, descendente) en un ciclo de 24 hrs. Puede observarse que ambas curvas presentan el mismo curso temporal desde el inicio hasta alcanzar el máximo.



**Fig. 25.** ERG y PPVs. Registro simultáneo del electroretinograma (ERG; **superior**) y PPVs (**inferior**) al aplicar destellos de luz blanca difusa ( $n = 100$ ; 2 Hz) sobre el animal restringido, durante un régimen de oscuridad constante. El momento de los destellos corresponde al inicio de los trazos.



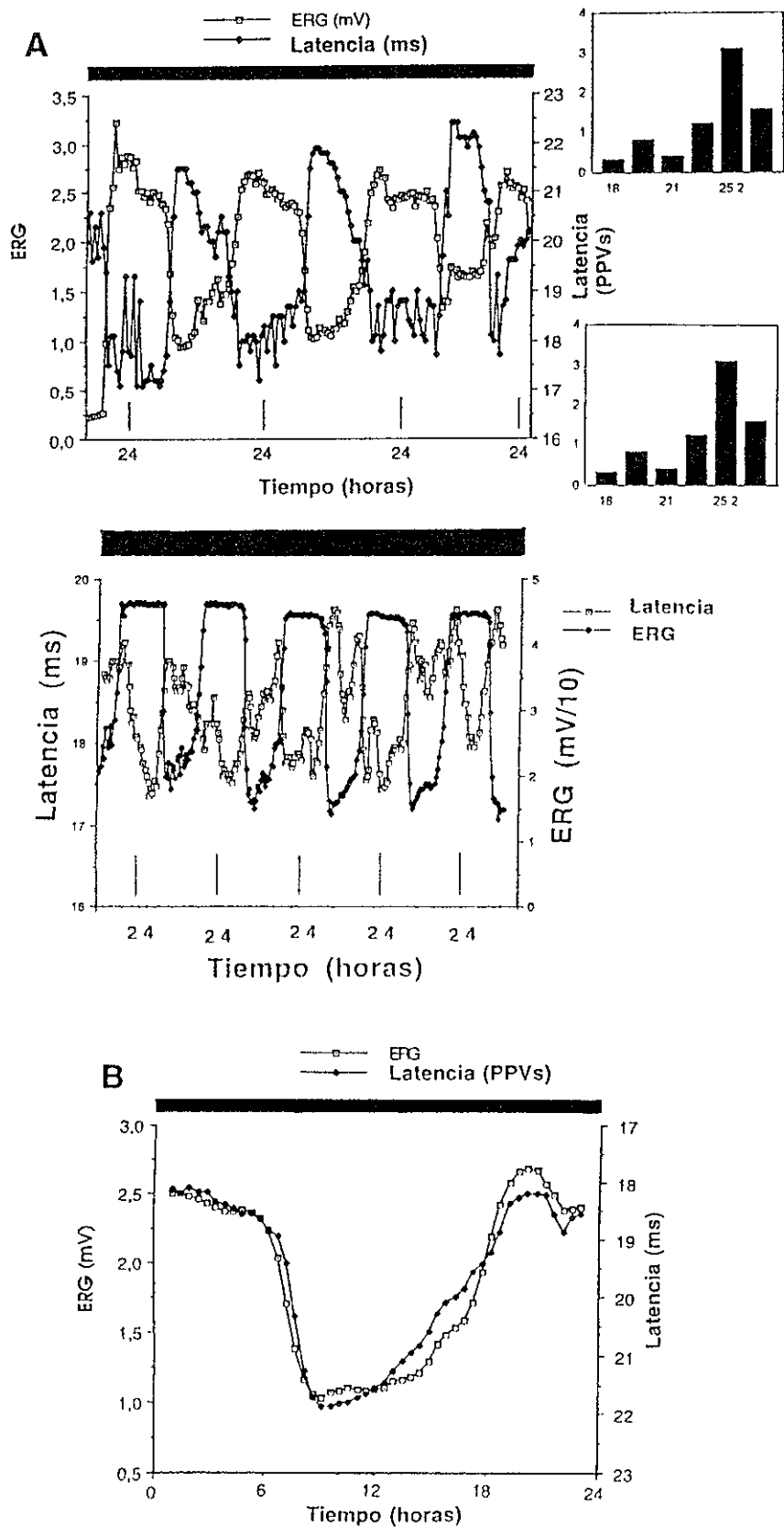


Fig. 26. Acoplamiento ERG-PPVs. A. Dos ejemplos de la relación temporal entre la amplitud del ERG y la latencia a la primera deflexión de los PPVs en el protocerebro en oscuridad constante durante varios días. Los insertos muestran los periodogramas construidos con 30 ciclos (abscisa, período propuesto en horas, ordenada, amplitud relativa del estímulo). B. Curso temporal de la amplitud del ERG (eje izquierdo) y la latencia (eje derecho) de los PPVs en un ciclo de 24 horas. Note que la escala de la Latencia ha sido colocada en orden descendente para poder empalmar ambas curvas.

Los datos anteriores indican que la sensibilidad a la luz del ojo del acocil, medida como el recíproco de la latencia de los potenciales provocados visuales (PPVs), presenta un ritmo circadiano tanto en condiciones de oscuridad constante como de fotoperiodo. Los potenciales eléctricos son de mayor duración y llegan al cerebro más rápido en la noche que en el día, por lo que existe un máximo de sensibilidad durante las horas de oscuridad. Este ritmo de sensibilidad a la luz muestra un desfase de aproximadamente  $180^\circ$  con el ritmo de actividad espontánea multiunitaria y coincide temporalmente con la máxima sensibilidad a la luz de los fotorreceptores retinianos.

## DISCUSION

### I. Preparación crónica.

Al inicio de este estudio, uno de los problemas experimentales que se debió de resolver fue la sobrevivencia de los animales. Algunos factores importantes a considerar para obtener preparaciones cada vez más duraderas y saludables son los siguientes: a) evitar en lo posible el sangrado del animal durante el procedimiento quirúrgico, b) no dejar al animal en hielo por más de una hora, ya que el restablecimiento de sus funciones es incompleto o nulo, c) dejar intacta la vascularización que nutre el ganglio, de lo contrario el animal quedará en malas condiciones o morirá, d) la lesión de los órganos digestivos y urinarios es causa frecuente de fracaso debido a la proximidad anatómica que tienen con el ganglio cerebroide, e) la muda constituye otro factor importante en los índices de mortandad de los animales, ya que la presencia del electrodo impide completar el proceso, con la consiguiente muerte del animal, f) el movimiento del animal antes del secado completo del cemento dental puede producir la dislocación o ubicación errónea del electrodo. Otra causa que impide el registro crónico en algunos animales es la rotura del alambre de plata en el sitio de unión con su conector o bien la corrosión del alambre utilizado para conectar al tubo de acero inoxidable.

A diferencia del bloqueo eléctrico secundario a la formación de tejido entre el ganglio cerebroide y el electrodo en *M. mercenaria*, (otro decápodo donde hemos implementado esta técnica de registro), en el acocil se han obtenido registros de la actividad eléctrica cerebral hasta por periodos de nueve meses, sin haber observado bloqueo eléctrico alguno.

### II. Controles.

Fue importante determinar que los registros obtenidos del acocil representan fluctuaciones reales del potencial cerebral del animal y no variaciones por artificios. Las evidencias presentadas en los experimentos control (ver Apéndice) permiten excluir razonablemente los artificios, la actividad muscular u otro tipo de actividad de origen extraganglionar.

### III. Caracterización de la actividad eléctrica cerebral.

En este estudio se ha mostrado que es posible registrar la actividad eléctrica poblacional del ganglio cerebroide del acocil no anestesiado ni restringido en sus movimientos y con capacidad conductual propia (deambulante). Una vez que los organismos se han recuperado del procedimiento quirúrgico muestran un comportamiento normal en el acuario alimentándose, moviéndose, deambulando y reaccionando en forma refleja a estímulos externos (escape, defensa).

#### 1. Actividad espontánea.

Como parte inicial del estudio de patrones eléctricos cerebrales en el acocil, se consideró importante caracterizar primero la actividad del animal en condiciones "basales" o de "reposo", por lo que los registros fueron tomados cuando el acocil se encontraba en posición horizontal y no se le observaba movimiento alguno. Se procuró registrar a una misma hora del día con el fin de evitar influencias humorales circadianas presentes en estos animales (Aréchiga y Wiersma, 1969; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Fanjul-Moles y cols., 1991; Aréchiga y cols., 1993). Se mantuvieron en la pecera experimental un mínimo de 2 machos y 2 hembras por dos razones: la primera fue impedir que los animales quedaran aislados, con lo que se reduce la probabilidad de que se presente la muda; la otra razón fue que al mantener juntos animales de uno y otro sexo, siempre estuvieran presentes en el acuario posibles influencias provenientes de los sistemas secretores neurohumorales. Los animales fueron mantenidos a la misma temperatura (de 20 a 22 °C) antes y durante los experimentos. Finalmente, por razones obvias sólo se utilizaron aquellos animales que tuvieron una recuperación satisfactoria del proceso quirúrgico (colocación del electrodo) y mostraron un comportamiento normal los días de registro de acuerdo a los criterios de Ache y Sandeman (1980).

La velocidad de muestreo que se utilizó para los registros fue de 8 khz. Este valor (frecuencia crítica de Nyquist) permitió el registro durante 6 segundos y observar con 8 puntos fluctuaciones de 1 ms. En el dominio de la frecuencia, permitió obtener componentes tan rápidos como 4 khz (según el teorema de muestreo; Stevens, 1975) y una resolución de 0.5 hz. Con una velocidad de muestreo mayor se puede obtener más puntos en cada registro y ver componentes más rápidos, pero existe la limitante de que el tiempo de muestreo se vuelve menor y se pierde resolución de la frecuencia. Además,

como se puede observar en la fig. 7B, no existen componentes eléctricos en el ganglio por arriba de 2 khz.

En virtud de que una señal de tipo electroencefalográfica proporciona mayor información si además del análisis temporal se realiza un análisis en el dominio de la frecuencia (Nuñez y Katznelson 1981), en este estudio se obtuvieron los espectros de potencia mediante el cálculo de la transformada rápida de Fourier (FFT), el cual es un método eficiente que permite la conversión de una función en el tiempo en ondas seno y coseno de diferentes amplitudes y frecuencias (Stevens, 1975). Así, con este método se calcularon las amplitudes correspondientes a cada componente de frecuencia que está contenido en el segmento temporal seleccionado (Nuñez y Katznelson, 1981).

A la fecha, casi todos los registros electrofisiológicos del cerebro de invertebrados se han realizado en rebanadas de tejido (Williamson y Budelmann, 1991), en preparaciones aisladas (Adrian, 1931, 1937; Adrian y Buytendijk, 1931; Prosser, 1936; Roeder, 1939; Jahn y Wulff, 1942; Bullock, 1945; Laverak, 1980; Bullock y Basar, 1988), o en animales fuertemente restringidos (Bullock y Uter, 1976; Bullock, 1984). Antes de este trabajo no había reportes en la literatura sobre la actividad cerebral crónica de artrópodos y los únicos estudios de este tipo que se habían realizado en invertebrados son los de Bullock (1984) y Bullock y Budelmann (1991) en cefalópodos. Estos investigadores observaron que el pulpo y la sepia tienen un patrón eléctrico compuesto primordialmente de ondas lentas (<70 hz), lo que los hace similares a los vertebrados. Tanto la sepia como el pulpo son moluscos y junto con los anélidos y los artrópodos están considerados como los invertebrados más evolucionados. Por lo tanto, desde un punto de vista neurológico comparativo fue importante indagar sobre el patrón eléctrico cerebral de otro tipo de invertebrado "superior" para conocer cuales son los componentes principales, el carácter temporal y el segmento o segmentos del espectro de potencias en el que se encuentra la actividad principal. Es bien conocido el hecho de que la Fisiología Comparativa no sólo ha contribuido a una mejor comprensión del animal bajo estudio, sino que también ha participado en la solución de problemas fundamentales de índole general para los sistemas vivos.

Bullock y Basar (1988) mencionan que aquellos investigadores que han realizado registros extracelulares en el sistema nervioso central aislado de invertebrados han observado mas espigas unitarias y menos ondas lentas que en los vertebrados y que esta característica no se debe al tamaño del ganglio o

de las células, al número o densidad de células o al grado de laminación, sino a actividad intrínseca relacionada con la organización de las funciones de la neuropila, es decir, a la cooperatividad o propiedades de ensamblaje de las neuronas. Utilizando ya sea semi-microelectrodos metálicos con impedancia  $>10\text{ M}\Omega$ , alambres metálicos con puntas hasta de  $200\ \mu\text{m}$  y  $<1\text{ M}\Omega$ , y micropipetas de vidrio, unas finas con un diámetro en la punta menor de  $1\ \mu\text{m}$  y  $>10\text{ M}\Omega$  y otras gruesas con  $30\ \mu\text{m}$  en la punta y  $<1\text{ M}\Omega$  de impedancia, Bullock y Basar (1988) determinaron que el patrón eléctrico registrado de los centros superiores de invertebrados es independiente de las características y/o tamaño del electrodo.

Es generalmente aceptado que no existen diferencias cualitativas en el patrón eléctrico de las ondas cerebrales a lo largo de la escala filogenética de los vertebrados (mamíferos, reptiles, aves, anfibios y peces), en donde se puede encontrar la mayor parte de la energía ubicada por debajo de los 50 hz, con picos usualmente entre 5 y 15 hz y sin espigas unitarias (Adrian y Buytendijk, 1931; Gerard y Young, 1937; Bremer y cols., 1939; Enger, 1957; Schadé y Weiler, 1959; Hunsaker II y Lansing, 1962; Parsons y Huggins, 1965; Segura y De Juan, 1966; Walker y Burger, 1973; Laming, 1980; Bullock, 1984; Huntley, 1987; Bullock y Basar, 1988). Sin embargo y en contraste con lo reportado en vertebrados, los invertebrados exhiben un tipo diferente de actividad espontánea, la cual es dominada por espigas y su espectro de potencias se extiende hacia las centenas de hertz (Bullock, 1945, 1984; Bullock y Basar, 1988). Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido conocer que la actividad eléctrica espontánea basal de decápodos (acocil) también está dominado por espigas, cuyo espectro de potencias muestra un máximo alrededor de 450 hz y cae a nivel de ruido entre 1.5 y 2 khz. En estudios recientes utilizando decápodos marinos (*Menippe mercenaria* y *Callinectes sapidus*) Maldonado-León y Hernández, 2000 han encontrado valores similares de actividad cerebral, de tal manera que es probable que este patrón represente una generalización para todos los decápodos.

¿Cuál es el significado de esta actividad cerebral? Es una pregunta difícil de contestar. De hecho aun en vertebrados, el origen y significado de las ondas cerebrales han constituido un enigma para los neurofisiólogos desde el descubrimiento de este tipo de actividad eléctrica por parte de Hans Berger en 1929. Con base en numerosos estudios principalmente en mamíferos, la evidencia actual es que esta actividad representa potenciales de campo compuestos que son el resultado de la actividad sincrónica de varios generadores neuronales en un conductor de volumen, sin embargo, su

significancia en la mayor parte de los casos se basa en correlaciones empíricas. Así, una de las preguntas centrales en la evolución de las ondas cerebrales es ¿por qué en el cerebro de invertebrados predominan las espigas y en vertebrados las ondas lentas?. Así como a la fecha no se sabe por qué los registros del telencéfalo y tectum de vertebrados simples como los peces son tan similares a los de reptiles y mamíferos a pesar de sus diferencias en laminación y organización, tampoco se conoce la razón por la cual los registros de los invertebrados (aparte del pulpo) son tan diferentes a los de los vertebrados a pesar de la similitud que existe en los potenciales de células individuales (Bullock y Basar, 1988). Una posibilidad es que exista una menor capacitancia general del tejido de invertebrados secundaria a la escasa presencia de mielina en las neuronas (Cohen, 1969). Como la frecuencia depende en forma inversa de la capacitancia [ $f = (1/C)^2$ ], la presencia de valores bajos de ésta en los tejidos de invertebrados favorecería la aparición de componentes de alta frecuencia. Sin embargo, esto no ha sido demostrado.

Se sabe que la amplitud de un potencial en un conductor de volumen varía en forma inversa con el cuadrado de la distancia y es dependiente del ángulo que forma la línea que une al electrodo con el dipolo generador, con respecto al eje de dicho dipolo (Geddes y Baker, 1968). Dado que la ubicación del electrodo sobre el cerebro no fue la misma en las diferentes preparaciones experimentales, la magnitud de los componentes eléctricos registrados en el cerebro de cada animal fue variable. En este trabajo rara vez se observaron espigas espontáneas con amplitud mayor a 60  $\mu\text{V}$ , a diferencia de las espigas provocadas por estímulos sensoriales, donde se observaron amplitudes hasta de 300  $\mu\text{V}$ .

En registros del cerebro de *Aplysia*, Bullock y Basar (1988) obtuvieron potenciales con una amplitud de alrededor de 10  $\mu\text{V}$ , al filtrar entre 3 y 300 hz. Al registrar el acocil con los mismos filtros (3-300 hz) se obtuvieron resultados similares. En donde se observaron diferencias significativas es en las espigas que ocasionalmente aparecen en el pulpo, las cuales llegan a ser de varios de cientos de  $\mu\text{V}$  (Bullock, 1984). A pesar de la gran variabilidad y número de factores que pueden influenciar la amplitud de los componentes eléctricos, Bullock y Basar (1988) sugieren la existencia de una correlación positiva entre el grado de laminación cerebral y la amplitud de los potenciales eléctricos. Esto es debido a que en la corteza de mamíferos (con un alto grado de laminación), se observan fluctuaciones mayores que en el pallium de elasmobranquios (raya, tiburón), teleósteos (carpa, pez gato) o anfibios (rana), cuyo grado de laminación es comparativamente pobre. En los invertebrados, el

grado de laminación a nivel del cerebro es muy pobre, aunque en el ganglio óptico de algunos insectos, crustáceos y cefalópodos existen neuropilas altamente laminadas (Bullock y Basar, 1988).

A diferencia del carácter episódico encontrado en el pulpo (Bullock, 1984), el tipo de actividad eléctrica que presenta el cerebro del acocil es bastante constante en el tiempo. En otros estudios de insectos y moluscos (Adrian 1931; Bullock y Budelmann, 1991) o aun de vertebrados (Enger, 1957; Hunsaker II y Lansing, 1962; Gilbert y cols., 1964; Parsons y Huggins, 1965; Segura y De Juan, 1966, Laming, 1980; Bullock y Basar, 1988) tampoco se reporta una actividad episódica. No obstante, debido al tamaño del electrodo y a la localización gruesa del punto de contacto con el ganglio, en este trabajo no se puede descartar que haya sitios específicos en el ganglio cerebral del acocil que presenten este carácter episódico.

En este estudio se han presentado evidencias de que el registro cerebral del acocil deambulatorio contiene ondas lentas de pequeña amplitud y de aparición irregular. Desde 1945 Bullock ha hecho énfasis en que los ganglios de los invertebrados contienen pocas ondas lentas. Sin embargo, se sabe que bajo ciertas circunstancias varios de ellos son capaces de generar ondas excitatorias de baja frecuencia debido probablemente a la sincronización de poblaciones de células. Adrian (1931, 1937) en el escarabajo y Jahn y Wulff (1942) y Roeder (1939, 1940) en el saltamontes han observado que existen "ritmos visuales" compuestos por ondas lentas que son disparados por estímulos luminosos. Posteriormente Glantz y Nudelman (1976) demostraron que con altos niveles de iluminación, las unidades visuales denominadas fibras de respuesta sostenida (SFs, por sus siglas en inglés) son capaces de mostrar una descarga oscilatoria mantenida. En el ganglio cerebroide del acocil no se observaron este tipo de ondas, únicamente algunos componentes lentos irregulares los cuales son inferiores a los reportados en el pulpo (30 a 40  $\mu\text{V}$ ; Bullock, 1984), la sepia (hasta 200  $\mu\text{V}$ ; Bullock y Budelmann, 1991) y en vertebrados (20 a 160  $\mu\text{V}$  en el bacalao, Enger, 1957; 60 a 180  $\mu\text{V}$  en el pez dorado, Schadé y Weiler, 1959; 10 a 50  $\mu\text{V}$  en la lagartija, Hunsaker II y Lansing, 1962; 30 a 60  $\mu\text{V}$  en el tiburón, Gilbert y cols., 1964; 20 a 40  $\mu\text{V}$  en el caimán, Parsons y Huggins, 1965; 150 a 500  $\mu\text{V}$  en el sapo, Segura y De Juan, 1966 y de 85  $\mu\text{V}$  en la corteza del gato, Bullock y Basar, 1988). No obstante, los potenciales por omisión de estímulo que se producen al final de un tren de destellos luminosos y se han documentado a nivel de los tallos



oculares del acocil muestran componentes lentos importantes (Hernández y cols., 1999; Ramón y cols., 2000).

Los datos que correlacionan el nivel de actividad cerebral con el estado de excitación del acocil son congruentes con lo reportado por Aréchiga y Wiersma (1969) y Wood y Glantz (1980a y b). En este trabajo se ha observado que durante el reflejo de defensa y la deambulación del animal existe un aumento en la actividad cerebral que no está contaminado por espigas de origen muscular, ya que las espigas musculares son más lentas y tienen un pico en el espectro de potencias en 60-70 hz.

Wiersma y Yamaguchi (1966) han señalado la existencia de ciertas interneuronas eferentes del tracto óptico denominadas fibras de actividad (activity fibres, AFs), que también existen a varios niveles de la cadena ganglionar. En contraste con interneuronas mecanorreceptoras más simples, las AFs disparan siempre que el animal es excitado, pero no necesariamente responden a estímulos primarios; además, una vez que su frecuencia se ha incrementado considerablemente, solamente regresan al nivel de reposo de una manera gradual. En cambio, las interneuronas de los mecanorreceptores se silencian tan pronto cesa el estímulo (Aréchiga y Wiersma, 1969). Las AFs suman información de varias fuentes en lugar de responder en forma particular a alguna de ellas y muestran un incremento en la frecuencia de disparo por periodos prolongados.

Wood y Glantz (1980b) observaron que en las interneuronas visuales descendentes que se originan en el cerebro del acocil también se producen cambios de excitabilidad asociados al nivel de excitación del animal. Sin embargo, su efecto difiere en una forma cualitativa del efecto que se produce sobre las fibras de respuesta sostenida (SFs). El estado excitado aumenta la respuesta de las SFs a la iluminación pero no tiene efecto alguno en la oscuridad. En cambio, la excitación está asociada con un incremento de la descarga en la oscuridad de todas las neuronas descendentes, por lo que se sugiere que las interneuronas ascendentes que median el estado de excitación del animal (AFs) hacen conexiones independientes, tanto en el cerebro como en el tracto óptico.

Aquí se observó un incremento en la actividad espontánea con el mayor nivel de excitación del animal, independientemente del nivel de luz durante el registro. Por lo tanto, es probable que la actividad registrada se deba a la activación de células cerebrales silentes que son activadas por las AFs. Una

segunda opción es que el aumento de actividad eléctrica que aparece en los registros sea debido al propio disparo de las AFs durante el aumento de actividad motora. Ambas opciones no son mutuamente excluyentes.

## **2. Respuestas provocadas por estímulos sensoriales.**

El registro de la actividad eléctrica neuronal sincronizada por estímulos fisiológicamente relevantes es una herramienta de investigación poderosa que permite la activación de varias unidades neuronales en paralelo (Landau, 1967). En este trabajo se ha registrado por primera vez en un artrópodo potenciales provocados visuales (PPVs) promediados del cerebro. Cuando el electrodo está ubicado en el protocerebro es posible registrar la respuesta visual incluso sin necesidad de adaptar al animal a la oscuridad. Los PPVs del acocil están compuestos de un tren de espigas rápidas (0.5-2 ms), lo cual difiere de los PPVs encontrados en vertebrados en los que se observan "espigas" mayores de 5 milisegundos de duración (Schadé y Weiler, 1959; Prosser, 1965; Karamian y cols., 1966; Sutterlin y Prosser, 1970; Platt y cols., 1974; O'Benar, 1976; Matsumoto y Bando, 1981; Bullock cols., 1991). Los PPVs obtenidos del pulpo y en la sepia son, al igual que su actividad espontánea, similares a los de vertebrados, es decir, muestran una carencia de espigas y duran varias decenas de ms (Bullock, 1984; Bullock y Budelmann, 1991).

Wiersma (1966) registró respuestas visuales del tracto protocerebral del acocil en preparaciones agudas restringidas, obteniendo latencias de 25 ms. Los valores de latencia de este estudio son similares (15-25 ms), sin embargo, como los PPVs fueron tomados con filtro pasa altos en 100 hz (para ver solo espigas), no hay manera de cotejar la latencia de las espigas con las obtenidas en otras especies. Al abrir los filtros pasa altos para ver ondas lentas, se pudo observar que en ocasiones las espigas van montadas sobre una onda lenta negativa, la cual no se observa en barridos simples pero es identificable en el promedio. La latencia al pico de esta onda ocurrió entre los 40-50 ms, valores similares a los reportados en el pulpo (40 ms; Bullock, 1984) y en la sepia (35 ms; Bullock y Budelmann, 1991). Estos valores fueron también parecidos a los encontrados en el tectum óptico de algunos peces, principalmente elasmobranquios: pez guitarra, 40-64 ms; tiburón gato y cazón, 40-70 ms; tiburón arrecife, 36-53 ms; tiburón limón, 50-60 ms (Bullock y Corwin, 1979; Bullock y cols., 1991). No obstante, los valores obtenidos en el acocil resultan ser mayores que los de algunos teleósteos (lisa, robalo de arena, atún, salmonete) con latencias por debajo de 20 ms y menores que los de la raya

(65-150 ms) y la lamprea (de más de 100 ms; Karamian y cols., 1966; Bodznick y Northcutt, 1981).

La latencia al pico de la primera deflexión prominente del potencial provocado ha sido considerada como la medida más confiable de una propiedad temporal para ser comparada entre individuos de diferentes especies (Regan, 1972; Bullock y cols., 1991), por lo cual en este trabajo, se obtuvieron dichos valores de latencia registrando el potencial de campo provocado a nivel del protocerebro medio, que es uno de los sitios de procesamiento visual central del acocil. Bullock y cols., (1991) han hecho énfasis en que es probable que exista una correlación entre la latencia al primer pico y los hábitos de vida de algunas especies. Así, las especies que dependen de una visión rápida para cazar presas en movimiento (atún), tienen latencias visuales más breves, comparadas con las de los que se alimentan de animales poco móviles en el fondo del mar, como la raya. En este contexto, dado que el acocil es también un animal acuático cuya respuesta en espigas es aún más temprana que la onda lenta (cuando aparece), es posible agrupar al acocil junto a animales de visión rápida o intermedia, en los que el sistema visual es importante para algunos reflejos de defensa o escape (Wine y Krasne, 1972) pero más lento que el de algunos depredadores. De hecho, se ha sugerido que para el acocil es más relevante el sistema olfatorio que el sistema visual (Ache y Sandeman, 1980; Derby y Blaustein, 1988; Mellon y cols., 1992). No obstante lo anterior, es importante considerar que debido a que es aun escaso el conocimiento de los órganos visuales de todas las especies anteriormente mencionadas, este tipo de correlaciones se deben tomar con cautela (Bullock y cols., 1991).

El origen de los PPVs es desconocido. En vertebrados las respuestas primarias de los potenciales provocados corticales consisten de un componente presináptico producido por impulsos de fibras aferentes y un componente postsináptico, producido por el disparo de neuronas intracorticales. Existen también evidencias que sugieren que los PPVs son respuestas postsinápticas centrales (Landau, 1967), sin embargo, hay quien apoya la idea de que los PPVs reflejan la actividad retiniana y de los axones del tracto óptico (Bullock y cols., 1991). Registros obtenidos a tres niveles de la vía visual (fotoreceptores, tallo ocular y cerebro) del acocil estimulando con pulsos de luz monocromática han permitido suponer que se trata de una respuesta combinada en la cual, parte de la información visual originada en la periferia ha llegado al cerebro casi sin modificación y parte es el reflejo de interacciones neuronales intrínsecas, posiblemente postsinápticas, asociadas al

estímulo (Serrato y cols., 1996). Es posible entonces que el componente periférico de los PPVs del cerebro del acocil (o sea, el inicio de los PPVs) sea debido a la activación de las fibras de respuesta sostenida (SFs). Esta proposición se sustenta en que las terminales de estas fibras llegan al cerebro haciendo contacto monosináptico excitatorio con motoneuronas de los músculos oculares y con interneuronas tónicas de alto orden que descienden por los conectivos circumesofágicos (CCEs; Kirk y cols., 1982). Además, se ha establecido que en el acocil *Procambarus clarkii* la respuesta de las SFs se detecta con una latencia muy corta (15-20 ms) a nivel del nervio óptico (Glantz y Nudelman, 1976). Finalmente, cuando se registra en forma simultánea de las SFs (empaladas en el cerebro) y de los CCEs, la descarga de las primeras aparece en el cerebro del acocil 3 mseg antes del inicio de la descarga en los CCEs (Wood y Glantz, 1980a), es decir, el paso de las descargas por el cerebro están en el orden de latencia de los PPVs observados en este trabajo (15-25 ms), lo cual apoya que la activación de las SFs sea el origen de los potenciales promediados del cerebro.

Wiersma y Yanagisawa (1971) encontraron al menos once tipos de interneuronas reactivas a estímulos visuales en diferentes especies de decápodos. Sin embargo, este número debe ser mayor con base en que las unidades caracterizadas han sido predominantemente las de mayor diámetro, o sea que no se conoce qué tipo de información sensorial llevan las fibras más pequeñas (Wiersma y Roach, 1977). De las más comunes (aparte de las SFs) encontradas en el tallo ocular de acociles, langostas y cangrejos, se encuentran aquellas que disparan cuando algún cuerpo en movimiento entra o sale del campo visual del animal. Estas fibras han sido llamadas fibras de movimiento agitado (jittery movement fibres; JMF; Wiersma y Yamaguchi, 1966). Se sabe que estas fibras son de habituación rápida, no tienen un patrón definido de disparo y establecen contactos sinápticos en el cerebro con interneuronas de más alto orden, mediando la aparición del reflejo de defensa (Glantz, 1977). Por lo tanto, es probable que las espigas que hemos observado al estimular con objetos en movimiento sean debidas al disparo de JMF y/o neuronas activadas por ellas mismas.

El no encontrar respuestas provocadas como consecuencia de la estimulación con patrones visuales estructurados (que cambian en su forma pero no en la intensidad) de ninguna manera establece que el sistema visual del acocil es incapaz de percibir esta modalidad de estimulación. La ausencia de PPVs en los registros puede ser debida a que el electrodo de registro no estaba ubicado en el sitio correcto sobre el cerebro o bien que la respuesta no es muy robusta.

es decir, que no siempre aparece o que no está suficientemente sincronizada con el estímulo, de tal manera que se pierde en la promediación. A diferencia de lo que ocurre con los PPVs, el animal fue capaz de responder al final de trenes de estímulos luminosos produciendo potenciales por omisión de estímulo (OSPs; Hernández y cols., 1999; Ramón y cols., 2000) lo cual sugiere la llegada de este tipo de estímulos al cerebro. En decápodos marinos (*C. sapidus* y *M. mercenaria*), Maldonado-León y Hernández (2000) han observado OSPs sin que exista una descripción o identificación anatómica de las fibras responsables.

La respuesta a la vibración puede ser considerada como una forma de mecanorrecepción y está presente probablemente en forma universal en todo el reino animal. Esta sensibilidad está ampliamente difundida en invertebrados y se considera que tiene una importancia vital en algunos procesos conductuales, por ejemplo, el *Chaetognatha* lo usa para atrapar a sus presas (Horridge y Boulton, 1967). Tal como sucede en las arañas tejedoras, algunos artrópodos están provistos de receptores sensibles a la vibración en la región de las patas. Un buen ejemplo de la forma en que este sistema funciona con un alto grado de precisión es el observado en insectos que se posan sobre la superficie del agua, los depredadores localizan a sus presas mediante la agitación del agua que producen (Wiersma y Roach, 1977). Es bien sabido que el exoesqueleto de los artrópodos y sobre todo sus antenas se encuentran cubiertos por una gran cantidad de receptores sensibles al tacto y a la vibración (Sandeman y cols., 1992). Así, una buena parte de la información vibratoria llega mediante fibras aferentes a la región cerebral encargada de la integración y procesamiento de las señales táctiles (tritocerebro). Aunque las antenas II del animal son el órgano sensorial principal de esta modalidad sensorial, existen mecanorreceptores prácticamente en toda la superficie del cuerpo (Sandeman y cols., 1992), de tal manera que el animal es capaz de sentir estímulos vibratorios/táctiles provenientes de los 360 grados alrededor de su cuerpo.

Existen reportes sobre actividad extracelular del nervio de la antena del acocil (Taylor, 1975), pero se desconoce de antecedente alguno en que se haya registrado la respuesta provocada promediada del cerebro del animal completo ante estímulos mecánicos. Por otro lado, sin embargo, las respuestas promediadas obtenidas en el acocil se correlacionan bien con las registradas en la *Sepia officinalis*, donde se obtuvieron latencias al primer pico entre 4 y 8 ms y duraciones entre 10 y 15 ms (Bullock y Budelmann, 1991). Ya que en el presente trabajo el electrodo de registro se colocó en diferentes sitios del

cerebro (protocerebro, tritocerebro y deutocerebro) en las distintas preparaciones y que en prácticamente todas se pudieron observar las ráfagas de espigas provocadas, es evidente que el campo sensorial del cerebro para esta modalidad es bastante amplio. Queda para estudios subsecuentes evaluar las respuestas cerebrales a estímulos mecánicos en los ciclos de 24 horas para determinar la existencia de un comportamiento circadiano en esta modalidad sensorial.

#### **IV. Ritmos circadianos en la actividad espontánea.**

##### **1. Registros de actividad multiunitaria.**

El registro extracelular de la actividad neuronal en preparaciones intactas y crónicas permite explorar el funcionamiento de células (Aréchiga y Wiersma, 1969a) o poblaciones celulares (Bullock, 1984; Bullock y Budelmann, 1991; Bullock y cols., 1991) en situaciones en las que el animal mantiene sus funciones regulatorias, particularmente del sistema nervioso central a través de sus sistemas corporales (circulatorio, endocrino, etc.) intactos. En este estudio se ha podido observar que la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas del protocerebro del acocil muestra claramente un comportamiento rítmico.

Debido a que los ritmos no son senoidales perfectas pues poseen distinta amplitud y diversos componentes de frecuencia (“ruido biológico”) es muy difícil calcular a mano sobre el papel el componente armónico fundamental. En cambio es común en cronobiología la utilización del periodograma, que es una técnica matemática por medio de la cual puede establecerse el valor exacto del periodo de mayor significación estadística de un conjunto de mediciones obtenido de un fenómeno periódico (Enright, 1965; Fuentes-Pardo y Ortega, 1979; Vega, 1993). De esta manera, a través de los valores numéricos se obtiene el estimador de mayor valor para un periodo dado, el cual es el componente principal de la función; la altura de las barras representa los valores de la desviación estándar correspondientes a cada periodo. Por lo tanto, en este estudio hemos determinado que los ciclos rítmicos registrados en las distintas zonas del cerebro del acocil son circadianos.

La actividad multiunitaria registrada en este estudio constituye una muestra de la actividad eléctrica de una población de neuronas en la vecindad inmediata de la punta del electrodo y fue utilizada como una medida de la actividad neuronal en cada área del cerebro explorada. Uno de sus principales méritos como indicador de actividad cerebral fue sin duda la duración de los registros,

pues como ya ha sido mencionado, la técnica permite registros crónicos sin un deterioro aparente del animal o un bloqueo eléctrico en la interfase electrodo-cerebro. A comparación de otras preparaciones en mamíferos donde se ha registrado la actividad espontánea multiunitaria hasta por 18 días (Inouye y Kawamura, 1979), en el acocil se han obtenido buenos registros por periodos de meses. Esto abre la posibilidad de realizar estudios a largo plazo buscando posibles ritmos circa-mensuales o circa-estacionales en la actividad eléctrica del cerebro (espontánea o provocada).

Los datos aquí obtenidos mostraron que la frecuencia de disparo espontáneo de las neuronas cerebrales muestra una periodicidad circadiana. Tanto en vertebrados como en invertebrados la frecuencia de disparo espontáneo de neuronas individuales o de poblaciones ha sido útil para evaluar la presencia de actividad rítmica circadiana. Así, en estudios experimentales dirigidos a probar que el núcleo supraquiasmático (suprachiasmatic nucleus; SCN) del hipotálamo de la rata funciona como marcapaso circadiano autónomo, Inouye y Kawamura (1979, 1982) registraron la actividad multiunitaria del cerebro mediante electrodos extracelulares. De igual forma Sato y Kawamura (1984a y b) en la ardilla y Kurumilla y Kawamura (1988) en el cobayo demostraron ritmos circadianos en la actividad multiunitaria del SCN. En invertebrados, Strumwasser (1967, 1974) encontró ritmos circadianos en los registros multiunitarios del nervio pericárdico de *Aplysia*. En preparaciones aisladas de este mismo animal, Jacklet (1969) descubrió que la frecuencia de aparición del potencial de acción compuesto del nervio óptico presenta un ritmo circadiano cuando se deja en oscuridad constante. También han sido descritos ritmos circadianos en registros multiunitarios de las raíces motoras de la cadena nerviosa abdominal aislada del acocil (Block, 1976). De igual forma, Eskin y Harcombe (1977) encontraron un ritmo poco robusto en la actividad espontánea neuronal del nervio óptico del gastrópodo marino *Navanax inermis*. Otros ejemplos son los trabajos de Colwell y Page (1990) en la cucaracha *Leucophaea maderae*; Kass y Barlow (1992) en *Limulus polyphemus*; Geusz y Page (1990) y Block y cols., (1995) en el molusco *Bulla gouldiana*, entre muchos otros.

## **2. Acrofase diurna en oscilación libre y fotoperiodo.**

En el campo de la cronobiología es común evaluar la ritmicidad circadiana no sólo bajo condiciones de fotoperiodo, que es cuando los ritmos son sincronizados por luz, sino bajo condiciones ambientales constantes (principalmente de luz y temperatura), con el objeto de establecer su posible

carácter endógeno (Fuentes-Pardo y Moreno-Sáenz, 1988). Aquí se ha mostrado que la actividad multiunitaria de distintos sitios del cerebro del acocil presenta ritmos circadianos tanto en condiciones de oscuridad constante (OO) como de fotoperiodo (LO). Los animales primero se registraron en condiciones de OO y luego en LO con el objeto de observar un cambio del periodo hacia valores exactamente de 24 horas, debido a la sincronización por la luz (“entrainment”). Los datos de este estudio muestran que bajo condiciones de LO, los periodos tuvieron valores más cercanos (pero no exactos) a 24 horas que bajo condiciones de OO, particularmente en protocerebro (24.5 horas) y deutocerebro (24.4 horas). Estos minutos de diferencia pueden ser debidos a la influencia de factores moduladores endógenos o factores externos como la alimentación que pueden influir influyen en los sistemas circadianos de organismos completos (Fernández de Miguel y Aréchiga, 1994).

En común también evaluar la ritmicidad circadiana bajo condiciones de luz constante (LL; Fernández de Miguel y Aréchiga, 1994), aunque en estos casos, algunos sistemas circadianos (como el locomotor) tienden a amortiguarse más rápidamente (Aréchiga y cols., 1993). Enright (1981) menciona que la luz constante frecuentemente inhibe la expresión de la ritmicidad circadiana en organismos de todos los niveles filogenéticos. Sin embargo, la evaluación en LL permite una mejor caracterización circadiana del sistema estudiado y contribuye a determinar el grado de modificación de la frecuencia de los ciclos, la relación alfa/rho y la amplitud relativa bajo dos niveles constantes de luz (OO y LL). De acuerdo a la regla de Aschoff, estos tres parámetros tienden a ser mayores bajo condiciones de OO que de LL en organismos nocturnos. En el presente estudio la persistencia de los ritmos bajo condiciones de iluminación constante fue evaluada únicamente en oscuridad constante. Sin embargo la evaluación eléctrica del ganglio cerebroide bajo condiciones de LL constituye uno de los pasos siguientes en esta línea de investigación.

Los registros de actividad espontánea multiunitaria mostraron un mayor número de espigas durante la fase diurna del ciclo. Es decir, a pesar de ser el acocil un animal nocturno (Kalmus, 1938) con un ritmo de actividad motora que alcanza el máximo durante la noche (Page and Larimer 1975a), la frecuencia de disparo espontáneo de neuronas cerebrales fue superior en las horas de luz que en las horas de oscuridad. El encontrar mayor actividad espontánea del sistema nervioso central (SNC) durante el día en animales nocturnos no es un evento raro. En varias especies en que se ha evaluado la



frecuencia de disparo de potenciales de acción, se ha encontrado que existe un pico de actividad neural durante el día subjetivo sin importar si el organismo muestra un patrón de actividad conductual diurno o nocturno (Colwell y Page, 1990). Tanto en *Aplysia* (Jacklet, 1969) como en *Bulla* (Geusz y Page, 1990), se han observado valores máximos de actividad neural durante el día. También en la cucaracha, Colwell y Page (1990) detectaron un incremento diurno de actividad neural a nivel de los lóbulos ópticos, donde supuestamente se encuentran los osciladores circadianos. Contrariamente, la actividad visual eferente de *Limulus* presentó acrofase nocturna (Kass y Barlow, 1992).

Es interesante que este fenómeno no se limita a invertebrados, sino que pareciera ser un mecanismo evolutivamente conservado, pues tanto en vertebrados nocturnos como la rata (Inouye y Kawamura, 1979) o diurnos como la ardilla (Sato y Kawamura, 1984) se han documentado ritmos circadianos en la actividad multiunitaria del núcleo supraquiasmático con un máximo durante el día. Aún en el cobayo, donde la conducta manifiesta no muestra un ritmo circadiano claro, Kurumiya y Kawamura (1988) encontraron un pico de actividad multiunitaria del SNC durante el día. Desafortunadamente no es claro aun el papel que juega el disparo espontáneo predominantemente diurno de las neuronas.

### **3. Proto-, deuto- y tritocerebro.**

Aunque estudios previos señalan al ganglio cerebroide como el sitio que aloja a los osciladores circadianos de respuesta a la luz (Page y Larimer, 1975b; Barrera-Mera, 1976; Aréchiga y cols., 1993), se carece de registros eléctricos cerebrales poblacionales durante el ciclo de 24 horas. Principalmente por estudios de lesión, se ha llegado a la sugerencia de que en el protocerebro se encuentran las células responsable de la ritmicidad circadiana (Barrera-Mera y cols., 1980; Barrera-Mera y Block, 1990; Puche y cols., 1993); sin embargo, también otras zonas como el deutocerebro y el tritocerebro han sido considerados como responsables del origen de los ritmos (Page y Larimer, 1975b). Los datos aquí obtenidos mostraron que existe actividad rítmica circadiana en las distintas regiones del cerebro donde se ha colocado un electrodo de registro, no solamente en el proto-, deuto- y tritocerebro, que son sitios donde se postula que se pueden ubicar los generadores, sino incluso en los conectivos circunesofágicos. En todos estos lugares se obtuvieron fluctuaciones circadianas en fase y con mayor actividad durante el día. Se ha considerado para estudios subsecuentes una descripción cuantitativa del grado

de interacción de las distintas estructuras cerebrales mediante análisis de autocorrelación cruzada.

La razón por la cual la actividad espontánea del cerebro parece funcionar como un todo es desconocida. Singer (1999) menciona que las redes neuronales transmiten con mayor eficiencia actividad sincronizada que actividad asincrónica. Los ritmos circadianos en la actividad neural pueden ser consecuencia de la interacción poblacional de neuronas con capacidad oscilatoria endógena (Jacklet y Gerónimo, 1971). En este sentido existe la evidencia de que en el protocerebro del acocil funcionan interneuronas con actividad periódica y mecanismos intrínsecos generadores de patrones de disparo, es decir, con propiedades marcapaso (Glantz, 1978b). Además, se ha determinado que existe en el cerebro del acocil una gran cantidad de conexiones excitatorias recíprocas y hay una gran sincronización entre interneuronas debido a la presencia de numerosos contactos electrotónicos (Glantz, 1978a; Wood y Glantz, 1980a; Glantz y cols., 1981). Cada neurona cerebral posee un nivel subumbral bastante reducido, de tal manera que pequeños cambios en el patrón espaciotemporal de otras sinapsis convergentes pueden ser suficientes para provocar su disparo (Wood y Glantz, 1980b). Así, con base en la gran proporción de interacciones recíprocas junto con la evidencia de que una determinada neurona individual puede estar involucrada en múltiples interacciones, Wood y Glantz, (1980a y b), han sugerido que la población está organizada a manera de una cadena de distribución, en donde las sinapsis recíprocas pueden servir para sincronizar una determinada descarga poblacional y establecer entradas convergentes preferenciales hacia centros motores inferiores (Wood y Glantz, 1980b). Desde el punto de vista anatómico se sabe que la mayoría de las interneuronas descendentes de crustáceos decápodos tienen árboles dendríticos extensos con proyecciones bilaterales asimétricas que inervan dos o los tres segmentos cerebrales embriológicos (proto-, deuto- y tritocerebro; Fraser, 1974) y se ha establecido que en la mayoría de los casos la sola presencia de una dendrita implica la existencia de un contacto sináptico (Glantz y cols., 1981)

Estos datos en conjunto permiten suponer que algunas interneuronas del ganglio cerebroide del acocil pueden actuar como marcapasos circadianos. Al encontrarse extensamente comunicadas tanto anatómicamente como funcionalmente, las neuronas cerebrales pueden sincronizarse con otras y enviar su información a los efectores de los ritmos circadianos manifiestos. Esta sincronización puede realizarse no solamente entre segmentos de un mismo hemiganglio sino entre ambos lados del cerebro (Barrera-Mera, 1978).

como se postula que ocurre en *Limulus* (Kass y Barlow, 1992), *Aplysia* (Olson y Jacklet, 1985) o *Blaps gigas* (Koehler y Fleissner, 1978). Desafortunadamente, los datos de este estudio no permiten discriminar entre si la actividad circadiana difusa es generada en un solo oscilador maestro, en una población de osciladores circadianos o bien en una población de osciladores no circadianos (probablemente ultradianos), que actuando en conjunto producen una salida circadiana, tal y como se postula que sucede en el ojo de *Aplysia* (Jacklet y Gerónimo, 1971). Los estudios de lesión (Barrera-Mera, 1976; Barrera-Mera y Block, 1990) apuntan hacia la existencia de dos marcapasos circadianos localizados en el protocerebro. Aunque la actividad multiunitaria espontánea es notable en todo el ganglio cerebroide, el ritmo de respuesta a la luz (de los PPVs) únicamente se obtuvo en registros de protocerebro, por lo que es probable que sea en este sitio donde se encuentren alojadas las células generadoras de la ritmicidad circadiana. Las numerosas interacciones anatómicas y fisiológicas pueden ser la base de la sincronización de los diferentes ritmos enviando la información a los efectores correspondientes.

Como ya se mencionó, Colwell y Page (1990) observaron un nivel máximo de actividad neural en axones del tracto óptico de la cucaracha durante el día. Sin embargo, a nivel de conectivos cervicales (o sea por debajo del ganglio subesofágico), la actividad máxima ocurrió en la noche. En este trabajo se mostró que el ritmo de actividad espontánea cerebral y descendente presenta una acrofase diurna y aunque no registramos más debajo de los CCEs está plenamente establecido que el ritmo de actividad locomotora en el acocil tiene una acrofase nocturna (Page y Larimer, 1975a y b). O sea que al igual que en la cucaracha, en el acocil existe un desfase cercano a 180 grados entre ambos ritmos. En vertebrados también se ha observado una inversión de fase entre ritmos de actividad multiunitaria registrados dentro y fuera del núcleo supraquiasmático (Inouye y Kawamura, 1979; Sato y Kawamura, 1984; Kurumiya y Kawamura, 1988). Es probable por lo tanto, que las señales descendentes del cerebro del acocil ejerzan una influencia inhibitoria sobre las estructuras torácicas y/o abdominales relacionadas con movimientos del animal, tal como ha sido postulado por Colwell y Page (1990) en la cucaracha. Esta aseveración se fundamenta en la presencia de fibras descendentes (visuales y no visuales) inhibitorias (Wiersma y Mill, 1965) y en que al registrar la frecuencia de disparo multiunitario espontáneo de la segunda raíz del sexto ganglio abdominal del acocil, se encontró una actividad circadiana con un máximo cercano al amanecer. Esto implica que cuando la actividad

cerebral empieza a ascender, la correspondiente a nivel abdominal empieza a disminuir.

#### 4. Ganglio semi-aislado.

La facilidad con la cual algunas porciones de tejido nervioso de invertebrados pueden sobrevivir varios días o semanas *in vitro*, ha llevado a la identificación de algunos marcapasos circadianos (Page, 1981). Así, uno de los criterios que se ha utilizado para establecer la identidad de un reloj circadiano a nivel de órgano, ha sido la presencia de ritmicidad endógena en aislamiento (Aréchiga y cols. 1993). Una dificultad existente en los trabajos de investigación usando cerebros de crustáceos es el hecho bien conocido de que estos sistemas son extremadamente sensibles a la anoxia (Waterman y cols., 1964), por lo que hasta ahora no se conocen intentos de explorar posibles ritmos circadianos en ganglios cerebroides aislados (Aréchiga y cols., 1993). En este trabajo tampoco se intentó registrar del ganglio aislado, sin embargo, como una primera aproximación al aislamiento quirúrgico, se registró la actividad espontánea con ambos tallos oculares (TOs) ligados y/o con los conectivos circumesofágicos (CCEs) cortados.

El fundamento del semi-aislamiento es el siguiente: después de haber activado la población de fotorreceptores, las señales luminosas llegan al cerebro a través de las fibras de respuesta sostenida (SFs) que se originan en los TOs. Tanto los fotorreceptores como las SFs muestran ritmos circadianos en fase (ver introducción; Aréchiga y Wiersma, 1969b; Aréchiga y Fuentes-Pardo, 1970). Además de las conexiones cerebrales centrípetas, existen en los TOs fibras eferentes que por medio de acoplamientos hormonales y/o neurales sincronizan la sensibilidad de la retina de ambos ojos (Larimer y Smith, 1980). Por otro lado, se sabe que casi el 50% de las interneuronas de los CCEs llevan información ascendente, desde los centros motores inferiores hacia el cerebro (Wiersma y Mill, 1965), estableciendo comunicación funcional entre los fotorreceptores caudales y los fotorreceptores visuales, relacionados con la sincronización del ritmo circadiano de la amplitud del ERG, a través de la liberación de la hormona dispersora de pigmentos distales de la glándula sinusal (ver adelante; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987). Por lo tanto, aunque es claro que una sincronización hormonal no puede ser descartada por estos procedimientos quirúrgicos, se consideró que al suprimir estas dos vías fundamentales de sincronización neuronal se debía observar una persistencia del ritmo de actividad multiunitaria, lo cual es sugestivo de que es en el ganglio cerebroide donde se originan las fluctuaciones circadianas. Es

interesante también de que a pesar de haberse evaluado con fotoperiodo la frecuencia de disparo con los TO atados, el periodograma no mostró un valor principal de 24 horas, lo cual indica que esta actividad nunca fue sincronizada por la luz. Así, estos datos apoyan fuertemente la naturaleza endógena de los ritmos.

## **V. Ritmos circadianos en las respuestas provocadas por luz.**

### **1. Ritmos en la sensibilidad a la luz.**

En este trabajo se ha demostrado que tanto en condiciones de oscilación libre (oscuridad constante) como de fotoperiodo (luz-oscuridad), la latencia y morfología de los PPVs varía con el ciclo de 24 hrs. En análisis preliminares correspondientes a una etapa posterior de esta línea de investigación, se ha podido observar que también existe un ritmo circadiano en el voltaje ( $V_{rms}$ ) de los PPVs. La aplicación de destellos de luz blanca difusa ha mostrado que durante la noche las respuestas promediadas son de mayor duración y con valores de latencia menores que durante el día. Esto sugiere que en la oscuridad las señales luminosas llegan más rápido al cerebro y que éste tiene que realizar un mayor número de interacciones neuronales para seleccionar la salida conductual más adecuada. La mayor duración de las respuestas nocturnas es congruente con el hallazgo de Aréchiga y Wiersma (1969b) de que el número de espigas provocadas en las SFs por pulsos de luz durante la noche es mayor que durante el día, lo cual es un dato adicional a favor de las fibras de respuesta sostenida como contributarias de los PPVs.

Como ya se mencionó, el ritmo de respuesta a la luz en el acocil ha sido evaluado eléctricamente a nivel de los receptores retinianos, mediante la medición de la amplitud del ERG (Aréchiga y Fuentes-Pardo, 1970; Aréchiga y cols., 1973; Aréchiga, 1974; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981) y de interneuronas visuales, mediante el análisis de la descarga de las SFs (Aréchiga y Wiersma, 1969b). En ambos casos se han detectado fluctuaciones circadianas con un máximo de actividad durante la fase nocturna, lo cual va de acuerdo con los hábitos nocturnos del acocil. Por lo tanto, los datos encontrados en este estudio van en la misma dirección, ya que sugieren que también a nivel cerebral, la respuesta poblacional de las neuronas relacionadas con el sistema visual requiere una mayor sensibilidad en la noche, que es cuando el animal está más activo, se reproduce, se socializa, se alimenta y evita ser presa de sus depredadores. La persistencia de los ritmos en la latencia

y duración de los PPVs bajo condiciones de oscilación libre apoya fuertemente la naturaleza endógena de estas fluctuaciones circadianas.

## **2. Nivel de acoplamiento.**

Un criterio para identificar la fuerza de acoplamiento entre dos osciladores es que éstos puedan ser desincronizados (acoplamiento débil) o bien, que sean capaces de permanecer en fase (acoplamiento fuerte) cuando son evaluados bajo condiciones de oscilación libre (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993). Mediante registros simultáneos del ERG en ambos ojos del acocil, Page y Larimer (1975a y b) han mostrado que existe una fuerte relación de fase en la amplitud de las fluctuaciones, tanto en ciclos luz-oscuridad como en oscuridad constante, de tal manera que en animales intactos, los ritmos del ERG de ambos ojos están sincronizados. En este estudio se evaluó el nivel de acoplamiento entre el ritmo de amplitud del ERG y el de la latencia de los PPVs, en condiciones de oscilación libre. Se observó que ambos ritmos conservan un alto nivel de acoplamiento y el mismo curso temporal, lo que sugiere la posibilidad de que ambos ritmos puedan estar bajo la influencia del mismo generador endógeno. Sin embargo, dado que estos experimentos fueron realizados restringiendo al animal para evitar la dislocación del electrodo del ERG y en estas circunstancias el animal se deteriora a los pocos días, no podemos descartar la existencia de un desacoplamiento entre estos dos ritmos en experimentos de mayor duración.

El ritmo circadiano de los PPVs pudiera ser el resultado de la existencia de un sistema circadiano en el centro cerebral de integración visual (protocerebro) y/o ser el reflejo de variaciones circadianas producidas en estructuras periféricas que responden a la luz (retina y fibras aferentes). Aunque los datos actuales no son suficientes para confirmar dónde se genera el ritmo circadiano de los PPVs, su gran relación de fase con el ritmo del ERG sugiere fuertemente que ambos ritmos son originados por el mismo marcapaso circadiano (Pittendrigh, 1981) el cual puede estar ubicado en el protocerebro.

## **3. Neuronas neurosecretoras.**

Se ha establecido que la glándula sinusal es un elemento determinante en la generación de las fluctuaciones circadianas del ERG a través de la liberación de la hormona dispersora de pigmentos distales (HDPD) o de un neuropéptido relacionado (hormona dispersora de pigmentos, HDP), principalmente por células neurosecretoras del órgano X (Hernández-Falcón y cols., 1987;

Moreno-Sáenz y cols., 1992; Aréchiga y cols., 1993; Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón 1993). Se ha sugerido que esta secreción de HDP puede estar modulada por neuronas neurosecretoras cuyos axones proyectan desde el ganglio supraesofágico a lo largo del tracto óptico (Barrera y Block, 1990) y hacen contacto sináptico con dendritas proximales del complejo órgano X-glándula sinusal (Larimer y Smith, 1980). Además de las evidencias morfológicas que establecen la existencia de fibras eferentes desde el cerebro hacia los tallos oculares (Bliss y cols., 1954; Andrew y cols., 1978; Jaros, 1978; Glantz y cols., 1981; Mellon y cols., 1992), Aréchiga y Mena (1975) observaron que la HDPD es liberada en forma circadiana con un pico máximo durante el día, de tal manera que esta hormona mueve los pigmentos retinianos accesorios hacia el estado de "adaptación a la luz". Esto reduce la respuesta de los fotorreceptores visuales y en consecuencia disminuye los valores de amplitud del ERG. Mas recientemente se ha postulado que la hormona dispersora de pigmentos desempeña un papel importante tanto en las vías de entrada como en las de salida de los sistemas circadianos (Petri y Stengl, 1997; Kaneko, 1998). Por lo tanto, estos datos nos permiten especular sobre si la acrofase diurna de actividad espontánea observada en este trabajo, pudiera ser el reflejo del disparo de tales neuronas neurosecretoras eferentes, las cuales además de liberar HDP tuvieran propiedades de marcapaso. Probablemente, un buen candidato para esto serían las neuronas eferentes ópticas bilaterales (BOE, Glantz y cols., 1981), cuyo cuerpo celular se localiza en el protocerebro, tienen proyección bilateral a ambos tallos oculares y muestran decusación de su neurita principal, la cual desciende por su conectivo circunesofágico contralateral. Será interesante determinar mediante estudios inmunohistoquímicos si algunas de estas fibras eferentes liberan HDP en sus terminales remotas (como en los balanos; Webster, 1998) y si su frecuencia de disparo espontáneo se correlaciona con la actividad multiunitaria observada en este trabajo. Además de las funciones establecidas de la HDP en el acocil, recientemente se ha encontrado que esta hormona juega un papel muy importante en la generación, sincronización y expresión de los ritmos circadianos de insectos (Homberg y cols., 1991; Stengl y Homberg, 1994; Helfrich-Fröster, 1995; Petri y Stengl, 1997).

Con todo lo anterior es posible establecer que el ganglio cerebroide del acocil participa en la expresión de los ritmos circadianos de respuesta a la luz produciendo una mayor actividad espontánea en el día que en la noche. Esta actividad tiene un carácter endógeno y está sincronizada en las distintas regiones del cerebro. En cambio, la sensibilidad cerebral a la luz presenta un

comportamiento circadiano con un máximo durante la oscuridad, coincidiendo temporalmente con el ritmo de los fotorreceptores y fibras visuales aferentes.



## CONCLUSIONES

1. El electrodo implantado en el cerebro del acocil no produce reacción de cuerpo extraño ni es aislado eléctricamente, lo que permite registros confiables de la actividad eléctrica por periodos de meses.
2. El patrón básico de actividad eléctrica espontánea del cerebro del acocil es distinto al de vertebrados y al de algunos invertebrados (moluscos). En condiciones de inmovilidad conductual consta de pocas ondas lentas y numerosas espigas unitarias. Su espectro de potencias es amplio y ubica la máxima energía alrededor de 450 hz.
3. Esta preparación crónica abre la posibilidad de estudiar diversos aspectos de los sistemas sensoriales del animal (visual, táctil) a través de potenciales provocados promediados.
4. Existen ritmos circadianos de actividad espontánea multi-unitaria en el proto-, deuto- y tritocerebro del acocil, tanto en condiciones de oscilación libre como de fotoperiodo. Estos ritmos se encuentran en fase y con una actividad máxima durante el día o la fase de iluminación.
5. La persistencia de los ritmos de actividad espontánea sin las conexiones neurales de los tallos oculares y conectivos circunesofágicos sugiere fuertemente que las neuronas del ganglio cerebroide funcionan como marcapasos circadianos.
6. La sensibilidad a la luz del sistema visual, medida como el recíproco de la latencia de los potenciales provocados visuales (PPVs) muestra un comportamiento circadiano tanto en condiciones de oscilación libre como de fotoperiodo, con un máximo durante la noche o la fase de oscuridad.
7. El ritmo de sensibilidad a la luz muestra un desfase de cerca de  $180^\circ$  con los ritmos de actividad multiunitaria y coincide temporalmente con la máxima sensibilidad a la luz de los fotorreceptores detectada por medio del electroretinograma (ERG).
8. Es plausible proponer que el ritmo circadiano de los PPVs refleja las variaciones circadianas en la sensibilidad a la luz de las estructuras visuales.

## APENDICE

### I. CONTROLES.

#### 1. Nivel de ruido.

Para determinar el nivel de ruido eléctrico de nuestro sistema hicimos registros en solución salina o bien, registrando animales muertos. En el primer caso colocamos el electrodo de registro dentro de una caja de petri llena con solución salina y tomamos 6 segundos de registro; en el segundo caso, el electrodo estaba en el mismo lugar dentro del animal y había sido utilizado para registrar el cerebro durante varios días antes. Se consideró muerto a un animal cuando dejó de presentar durante horas movimientos espontáneos y reflejos. En estos momentos se colocó al animal en la pecera experimental y se tomaron 6 segundos de registro. En ambos casos el nivel de ruido fluctuó entre 5-8  $\mu\text{V}$  pico a pico (fig. 27). La FFT mostró la mayor energía alrededor de 60 hz, los cual corresponde al ruido de la línea eléctrica.

Consideramos que la determinación del nivel de ruido mediante el registro del animal muerto constituye un mejor control debido a que las condiciones de registro son exactamente las mismas que en el animal vivo. Tanto en los registros con solución salina como en los del animal muerto el ruido fluctuó entre 5 y 8  $\mu\text{V}$  al filtrar entre 1 y 3000 hz. Aunque al cambiar los filtros (sobre todo el pasa altos) se modifica el nivel de ruido, nunca observamos "ruido" con amplitud mayor de 8  $\mu\text{V}$ , por lo que consideramos adecuado hacer nuestras mediciones con este límite. Para comparar el nivel de ruido electrónico con el obtenido por Bullock y Basar (1988) en *Aplysia* ( $2.2 \pm 0.05 \mu\text{V}$ ), hicimos registros con filtros entre 3 y 300 hz. Obtuvimos un nivel de ruido electrónico de  $2.3 \pm 0.1 \mu\text{V}$ , lo que consideramos que es satisfactorio para este trabajo.

#### 2. Electrodo.

Como la impedancia está relacionada directamente con el voltaje ( $V=IZ$ ) consideramos importante conocer en nuestro sistema, el grado de atenuación de los potenciales que se originan en el ganglio y son registrados por nuestro electrodo a diferentes frecuencias, así como el punto donde se alcanza el valor constante. Para lo anterior utilizamos animales enteros y un electrodo con dos puntas activas. Aplicamos pulsos senoidales de 40 mV a frecuencias entre 1 y

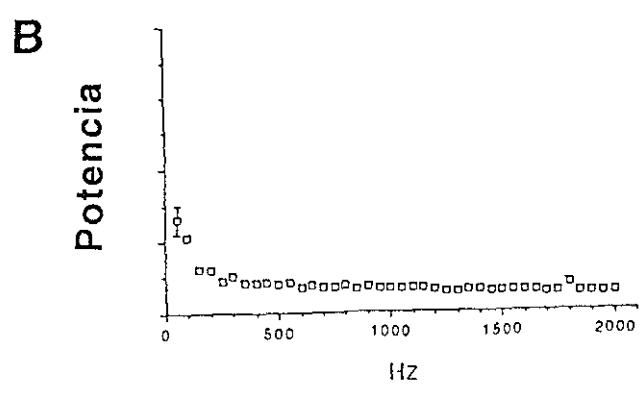
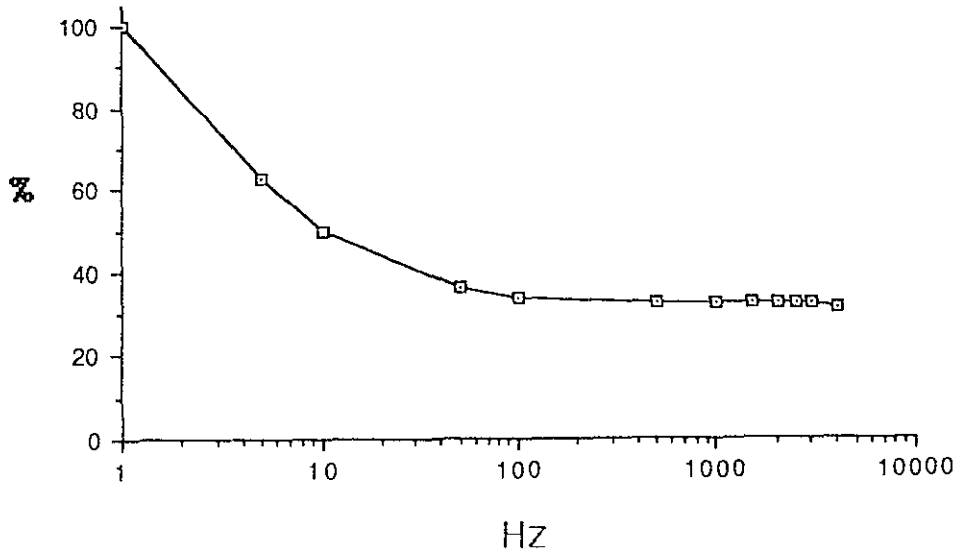


Fig. 27 Nivel de ruido. **A.** Registro tomado colocando el electrodo en solución salina (**superior**) y en un animal muerto (**inferior**). **B.** Espectro de potencias de un animal muerto. Se tomaron seis segundos de registro calculando a cada uno su espectro de potencias mediante la Transformada Rápida de Fourier (FFT) y se determinaron los valores de la integral de segmentos de 50 Hz de cada espectro. Cada punto en la gráfica es entonces el promedio (y D.E.) de las seis integrales de cada segmento de 50 Hz.

4000 hz por uno de los alambres y determinamos la amplitud de las ondas por el otro, manteniendo conectado el blindaje a tierra. Monitoreando en paralelo las ondas senoidales en el osciloscopio, se ajustó la intensidad del generador para mantener una amplitud de salida constante en toda la escala de frecuencias. En la fig. 28 se ilustra la curva de atenuación del voltaje con la frecuencia, tomando como 100% el valor obtenido a 1 hz. Se observó una caída en la amplitud de la respuesta en la región de bajas frecuencias, la cual empieza a estabilizarse a partir de los 50 hz. La linealidad de la curva por arriba de los 100 hz sugiere que los valores de impedancia se mantienen constantes a esas frecuencias y por lo tanto los cambios de potencial de alta frecuencia (> 100 hz) observados en los animales experimentales no son debidos a artificios en la interfase electrodo-electrolito.

En el diseño del electrodo de registro un aspecto obvio a considerar es el tipo de metales que se debe usar, tanto para el "activo" como para el blindaje. En 1957, Fischer y cols. estudiaron la respuesta del tejido cerebral de gatos a la implantación crónica (por 4 semanas) de electrodos hechos de cobre, plata clorurada y acero inoxidable. Estos autores concluyen que el acero inoxidable no produce reacción alguna, a diferencia de la plata y el cobre los cuales son tóxicos para el cerebro del mamífero. Otros autores han realizado estudios semejantes y han llegado a las mismas conclusiones (Collias y Manuelidis, 1957; Robinson y Johnson, 1961). Se sabe que en todo tipo de electrodo existe una interfase metal-electrolito y que la estabilidad eléctrica de un electrodo está relacionada con la solidez de las regiones de gradiente de carga. La firmeza de la interfase metal-electrolito impide el desarrollo de voltajes electroquímicos variables y una buena manera de obtenerla es clorurando los electrodos de plata. Existe un consenso general con relación a que los electrodos de Ag/AgCl son los que presentan la mayor estabilidad electroquímica (Janz y Taniguchi, 1953; Geddes y Baker, 1968, 1975).

Existen en la literatura diversos trabajos en animales no mamíferos que han utilizado varios tipos de metales en el registro crónico de la actividad neuronal. Algunos investigadores han usado con éxito acero inoxidable en peces (Laming, 1980), anfibios (Segura y de Juan, 1966), reptiles (Parsons y Huggins, 1965) y acociles (Aréchiga y Wiersma, 1969a y b) o bien electrodos de plata clorurada en peces (Enger, 1957; Gilbert y cols., 1964) y reptiles (Hunsaker II y Lansing, 1962). Por lo anterior y con base en que nuestros registros serían fluctuaciones (o sea registro en a.c.) consideramos que el blindaje (conectado a tierra) que representa una gran área puede ser de acero inoxidable y el alambre activo que está en contacto con el ganglio puede

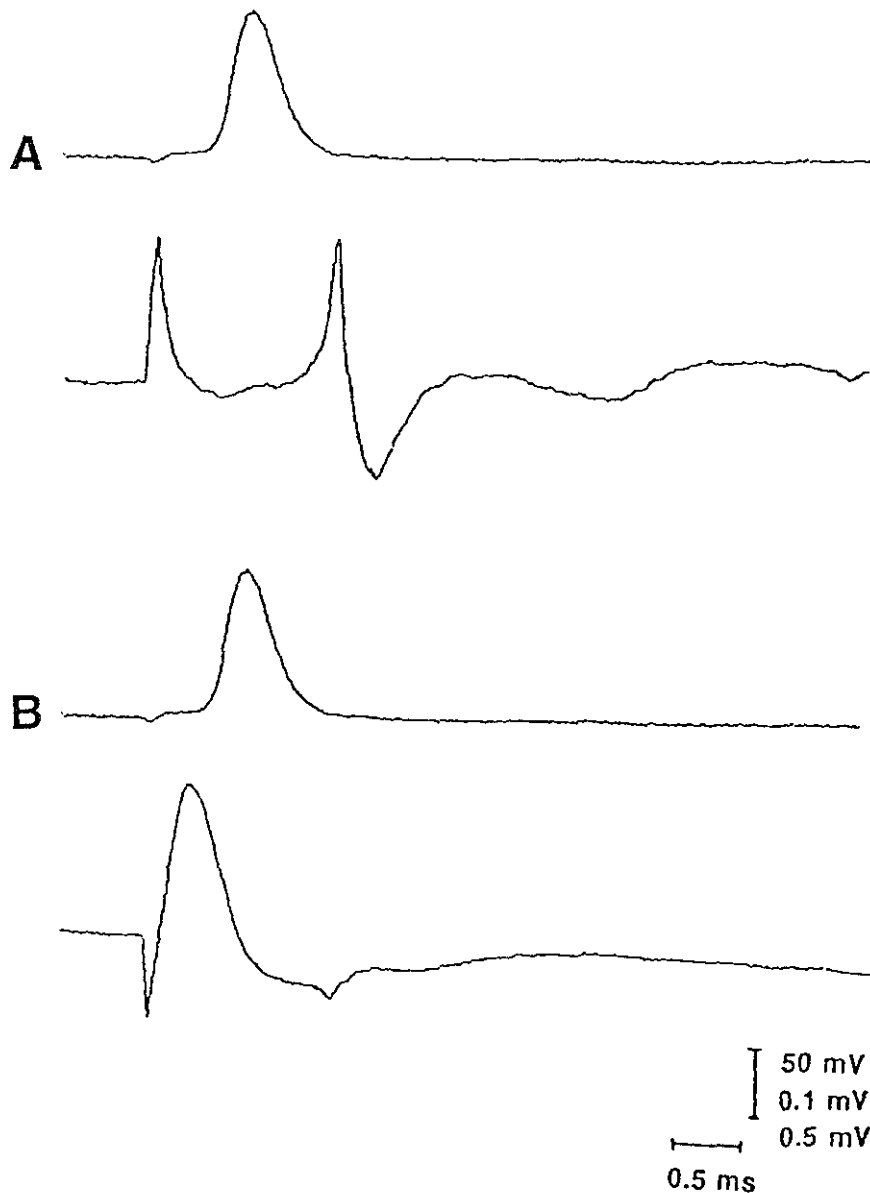


**Fig. 26** Atenuación del voltaje con la frecuencia. Se aplicaron ondas senoidales de amplitud constante (40 mV) y diferente frecuencia (1 - 4000 Hz) a través de una punta del electrodo (implantado en el animal) y se registró la amplitud de salida a través de otra punta. La amplitud fue normalizada con respecto a la máxima (1 Hz).

hacerse de plata clorurada (o acero inoxidable). Adicionalmente, Bullock y Basar (1988) al estudiar las diferencias entre la actividad espontánea de vertebrados e invertebrados con diferentes electrodos (material, dimensiones, impedancia, etc.), llegaron a la conclusión de que las características del electrodo en sí no desempeñan un papel importante en el patrón de actividad observado. A la fecha desconocemos informes sobre reacciones tóxicas asociadas con la implantación de electrodos crónicos de plata en invertebrados.

Era muy importante estar seguros de que el electrodo que diseñamos en el laboratorio funcionara en la forma esperada, es decir, que el tubo conectado a tierra impidiera que el alambre "activo" registrara la mayor parte de la actividad eléctrica generada por fuera de dicho tubo. Para lo anterior utilizamos una preparación de SNC aislado en el que se disecciona toda la cadena ganglionar. Estimulamos eléctricamente con electrodos externos uno de los axones mediales a nivel del quinto ganglio abdominal y registramos intracelularmente como control el potencial de acción propagado a nivel del tercer ganglio abdominal y extracelularmente con nuestro electrodo a nivel del segundo ganglio abdominal, tanto en configuración normal (alambre de plata activo, tubo de acero a tierra; fig. 29A) como en configuración invertida (alambre de plata a tierra, tubo activo; fig. 29B). Se puede observar claramente que en la configuración normal aparece el potencial de acción intracelular (fig. 29A; reg. superior) y el bifásico característico de registros extracelulares (reg. inferior), después del artefacto del estímulo. Contrariamente, cuando el tubo de acero se torna "activo" se registra un potencial artificial de gran amplitud desde el inicio del estímulo (fig 29B; reg. inf.), mientras que el potencial de acción intracelular se mantiene sin cambios (reg. sup.) Por lo tanto, estos registros resultaron satisfactorios para el bloqueo de las señales originadas fuera del blindaje, permitiendo solamente el paso de las señales eléctricas que se generan por debajo del alambre de plata.

Debido a la ausencia de informes acerca de la impedancia del ganglio cerebroide y en virtud de que el electrodo de registro está elaborado con dos metales diferentes (acero inoxidable y plata clorurada) cuya área de contacto con el ganglio es también diferente, fue importante estudiar el comportamiento de la interfase electrodo-electrolito para asegurarnos de que los cambios de voltaje observados en los animales no constituyen elementos artificiales. Una forma indirecta de estudiar esto es midiendo la impedancia del tejido ganglionar a distintas frecuencias, sin embargo, como lo que nos interesaba en concreto es conocer el comportamiento de la interfase en



**Fig. 29** Registro de la cadena ganglionar aislada. **A.** Configuración normal del electrodo extracelular. Se presenta un registro simultáneo intracelular (**superior**) y extracelular (**inferior**) de un potencial de acción ascendente (ver texto). En este caso el tubo de acero inoxidable del electrodo estaba conectado a tierra. **B.** Configuración invertida. El registro intracelular permanece sin cambios (**superior**) mientras que en el extracelular (**inferior**) se registra del tubo de acero y el alambre de plata se conecta a tierra. La escala superior del voltaje es para ambos registros intracelulares, la de en medio para el extracelular de A y el de abajo para el extracelular de B.

presencia de fluctuaciones de diferentes frecuencias, optamos por medir el porcentaje de decaimiento del voltaje al aplicar señales senoidales. Los resultados nos indicaron claramente que existe una caída del voltaje en el segmento de bajas frecuencias seguramente como consecuencia de cambios en los valores de impedancia (Geddes y Baker, 1975); sin embargo, por arriba de este valor la curva se hace lineal, lo que indica que no hay amortiguamiento del voltaje secundario a reacciones electroquímicas en la interfase electrodo-electrolito y por lo tanto tampoco se amortiguan los componentes de alta frecuencia originados dentro del ganglio.

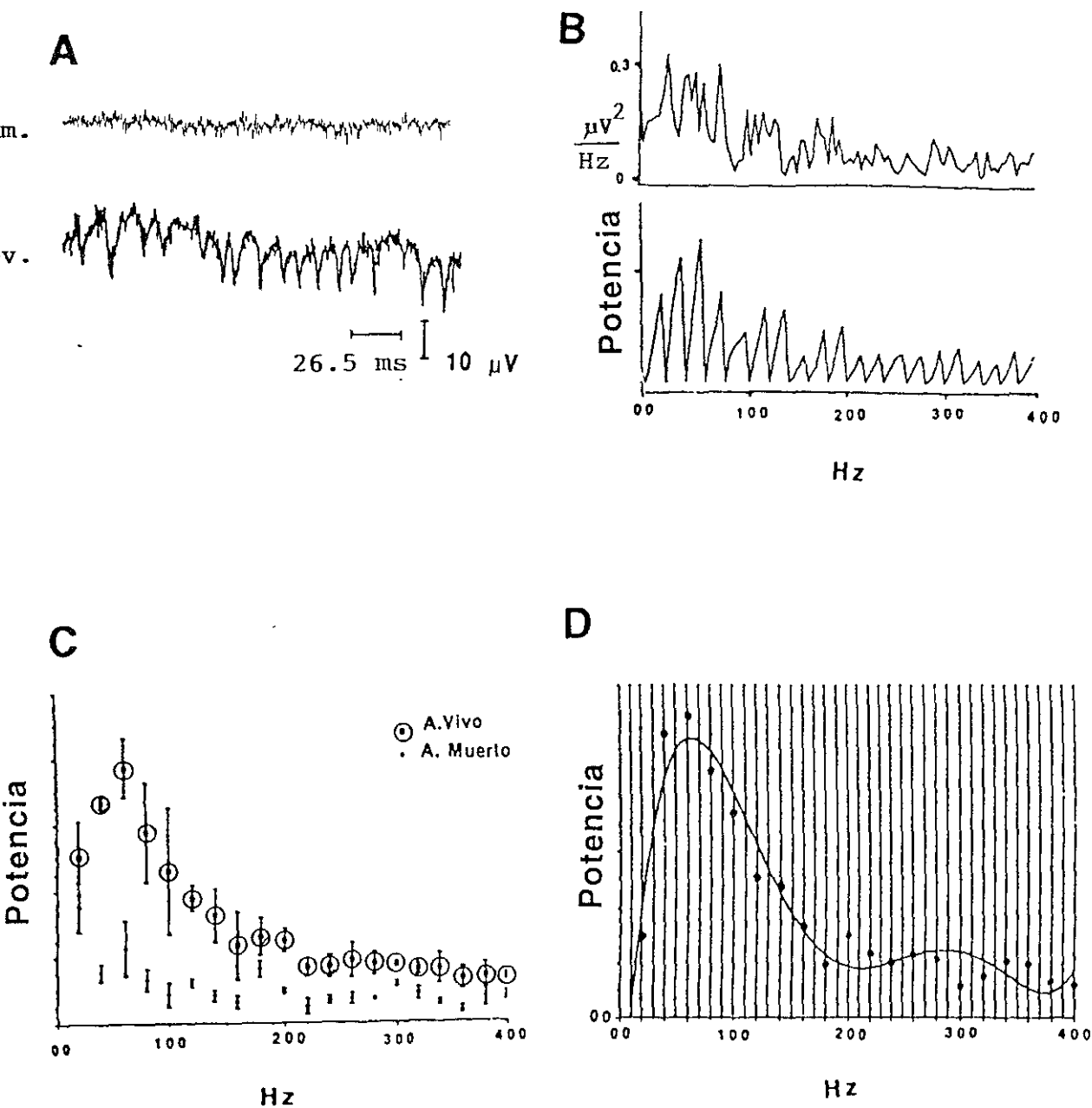
Los registros realizados en la cadena aislada del acocil nos permitieron confirmar que el blindaje del electrodo actúa en la forma esperada, amortigua la actividad eléctrica que se origina por fuera del tubo y detecta principalmente los cambios de potencial que se generan en su interior.

### **3. Actividad de origen muscular.**

Cuando el animal presenta movimientos vigorosos aparecen en el registro fluctuaciones de gran voltaje que son fácilmente identificables por su tamaño. Durante la deambulación u otro tipo de movimientos se produce un incremento de la actividad cerebral (ver adelante). Un aspecto que se debe tener en cuenta es que en la cabeza del acocil, cerca del ganglio cerebroide, existen masas musculares encargadas del movimiento de las antenas I y II y de los tallos oculares (Mellon, 1977, Sandeman y cols., 1990), las cuales generan corrientes eléctricas que podrían ser registradas por el electrodo colocado sobre el cerebro. Por lo tanto, era importante determinar si esta actividad muscular pudiera confundir y/o contaminar las señales neurales del cerebro. Para este propósito realizamos dos tipos de procedimientos. En uno, colocamos el electrodo directamente en contacto con los músculos que mueven una de las antenas II y registramos su actividad. En el segundo tipo, buscamos en los registros del cerebro durante los movimientos del animal, espigas similares a las observadas durante el desplazamiento de la antena. En ambos casos calculamos el espectro de potencias de la actividad registrada.

Cuando el flagelo de la antena está inmóvil, registramos una línea casi isoelectrica (fig. 30A, reg. superior), pero cuando se mueve dicha antena, aparecen espigas de gran duración (~8 mseg) y amplitud alrededor de 10  $\mu$ V, con una fase de subida rápida y caída lenta (fig. 30A, reg. inferior). Al calcular el espectro de potencias se encontró la mayor parte de la energía por debajo de los 100 hz (fig. 30B). Al restar esta actividad del nivel de ruido (fig. 30C) se





**Fig. 30** Actividad de origen muscular. **A.** Registro de la masa muscular de la antena II izquierda en un animal completo durante el reposo (**imm.**) y durante el movimiento del flajelo (**mov.**). **B.** Espectro de potencias de un segundo de registro (**superior**) y valores de la integral de segmentos de 20 Hz (**inferior**). **C.** Espectro de potencias de los promedios (y D.E.;  $n = 6$ ) de las integrales de cada segmento de frecuencia. A. vivo se refiere a la actividad registrada durante el movimiento de la antena. A. muerto se refiere al nivel de ruido o a la actividad registrada durante la inmovilidad de la antena. **D.** Resta de la actividad A. vivo - A. muerto para visualizar mejor el pico de máxima energía.

puso en evidencia que la actividad predominante tiene un pico alrededor de 50-70 hz (fig. 30D) y un segundo pico de actividad insignificante y poco consistente alrededor de los 300 hz.

Por otro lado, en el cerebro de sólo dos animales (n=10) observamos que esporádicamente aparecían espigas con duración mayor a 3 ms, con una morfología y espectro de potencias similares a las obtenidas de la antena. Es posible suponer entonces que algunas de las espigas mayores de 3 ms registradas en el cerebro puedan tener un origen muscular. Sin embargo, debido a que son fácilmente identificables por su morfología y su espectro, los registros que contenían este tipo de fluctuaciones fueron descartados, así que consideramos que la actividad muscular no contamina el registro de la actividad eléctrica proveniente de neuronas.

También pusimos atención en descubrir algunos potenciales aún más lentos (25-50 mseg), regulares (2/s) y episódicos, que han sido registrados en la *Sepia officinalis* y se atribuyen a actividad originada en el esófago (Bullock y Budelmann, 1991), el cual es un órgano que atraviesa el sistema nervioso central de los invertebrados, dividiéndolo en las regiones sub- y supraesofágica. En estos registros en que utilizamos un ancho de banda de 1 a 3000 hz no observamos este tipo de potenciales, aún registrando durante la ingesta, momento en el cual la masa muscular esofágica está activa.

Pusimos un interés especial en descartar la posibilidad de que nuestros registros estén contaminados con potenciales de acción de origen muscular. Bullock (1984) y Bullock y Budelmann (1991) han registrado en el cerebro de moluscos potenciales de acción que pudieran ser generados en algún músculo, ya sea esquelético o liso con una duración entre 5 y 200 ms. En los registros electromiográficos de la antena del acocil pudimos observar que al igual que en los moluscos las fluctuaciones de origen muscular son más lentas que las de origen neural. En ocasiones registramos del ganglio cerebroide potenciales eléctricos de frecuencia y duración similares a los observados en la antena, los cuales aparecen de forma súbita y esporádica. Es muy probable que este tipo de actividad se origine en masas musculares localizadas por debajo del ganglio cerebral, como las que se encuentran por debajo de la membrana artrodial y se encargan de rotar los tallos oculares en el eje horizontal (Sandeman y cols., 1990) o bien aquellas relacionadas con el movimiento de las anténulas (Mellon, 1977). En vertebrados también se han documentado espigas musculares con duración mayor a 2 ms y un espectro de potencias con un máximo alrededor de 70 hz (Desmedt, 1981). Por lo tanto, aquí sólo

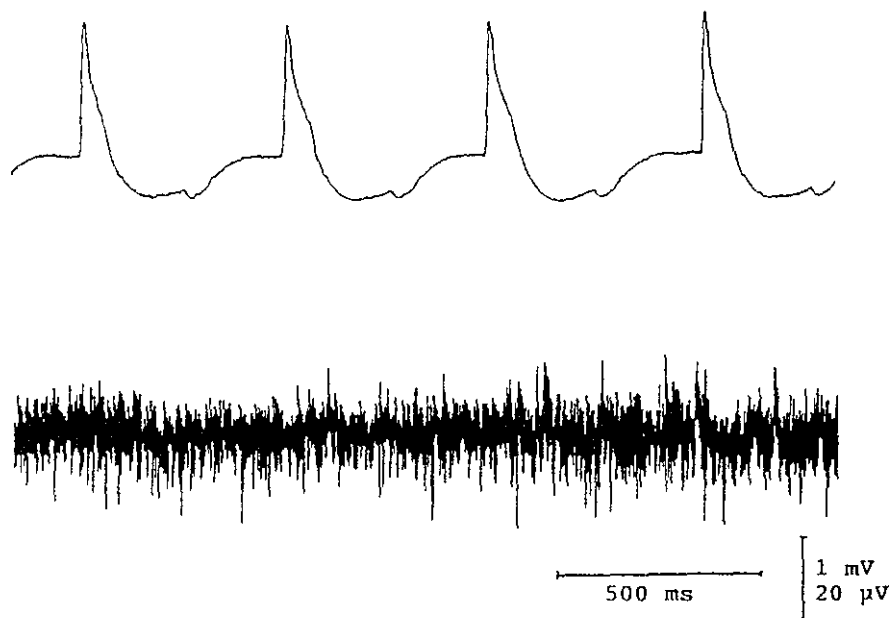
tomamos en cuenta como potenciales neurales aquellos con duración menor a 2 ms y espectro de potencias arriba de 100 hz. En ningún animal registramos potenciales lentos durante la ingesta o durante el periodo de inmovilidad del acocil.

#### **4. Electrocardiograma (EKG).**

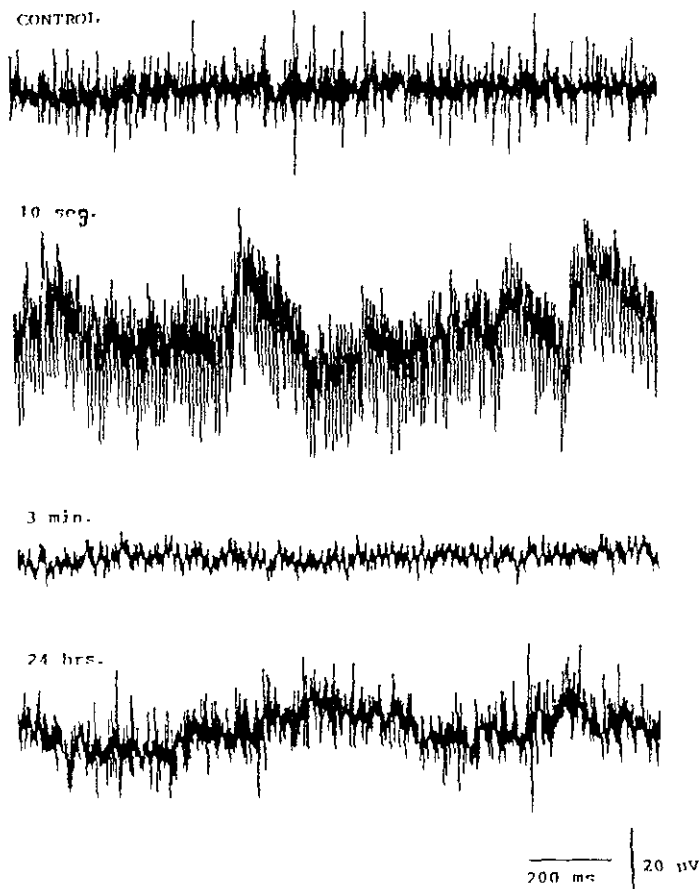
Otro control fue el registro simultáneo de la actividad eléctrica del corazón y del cerebro. A 24 °C el corazón del acocil late a una frecuencia aproximada de 120 por minuto (aunque es muy inestable) y se registra una señal bifásica con cada contracción muscular (fig. 31, reg. superior). Como se puede observar en el trazo inferior de la fig. 31, el registro simultáneo del cerebro no muestra espigas prominentes sincrónicas con el latido cardiaco, lo cual es indicativo que la actividad eléctrica cardiaca no contamina los registros de neuronas cerebrales. Esto es lógico si tomamos en cuenta que el blindaje del electrodo funciona de manera adecuada y que las espigas neuronales tienen un curso temporal mucho más rápido que las cardíacas. Sin embargo, en las ocasiones en las que el tubo de acero no hace buen contacto con el tejido del ganglio, debido a una implantación defectuosa, es posible detectar en el registro, pequeñas ondas lentas (<10 hz) sincrónicas con el EKG.

#### **5. Actividad neuronal.**

Después de observar las espigas de gran duración registradas de los músculos y en ocasiones del cerebro, necesitábamos tener una evidencia directa de que las espigas rápidas registradas del cerebro son de origen neuronal. Para esto, colocamos una cánula de plástico (1 mm d.i.) por dentro del tubo de acero inoxidable del electrodo que quedó junto al alambre de plata de registro. Este tubo de plástico fue utilizado para aplicar una solución 3M de KCl mientras registrábamos la actividad eléctrica del cerebro (fig. 32, control; n = 4). A los 10 segundos después de la aplicación del KCl registramos un incremento en la frecuencia y amplitud de los potenciales, debido seguramente a una despolarización masiva de las neuronas. Minutos después, dicha actividad eléctrica fue reducida hasta el nivel de ruido y recuperada después de varias horas (fig. 32). En otros animales (n=4) utilizamos solución salina fría (2 °C) en vez de KCl a través de la cánula. Se observó también una atenuación de la actividad espontánea la cual fue restablecida varias horas después (no se ilustra). Consideramos que por ser ésta una respuesta característica de neuronas ante dichas sustancias, estos resultados confirman el origen bioeléctrico neuronal de los potenciales registrados.



**Fig. 31** Registro simultáneo del corazón y del cerebro. Electrocardiograma (**superior**) y actividad espontánea cerebral (**inferior**). Figura de Hernández y cols., 1996a.



**Fig. 32** Aplicación de KCl. En el registro superior (**control**) se presenta la actividad espontánea del acocil inmediatamente antes de la aplicación de la sal. Se aplicó 1 ml de KCl 3M a través de una cánula insertada en el electrodo y se tomaron registros a diferentes tiempos. Nótese que a los **10 segundos** se produjo un incremento importante en la actividad espontánea, la cual posteriormente fue disminuyendo hasta llegar a niveles de ruido (**3 min**). El registro de **24 hrs** muestra la reversibilidad del proceso. Figura de Hernández y cols., 1996a.

El cambio considerable de actividad eléctrica que se observa durante la aplicación de KCl y solución salina fría nos permitió confirmar el origen neuronal de los potenciales. En el primer caso se produce una despolarización celular masiva que más tarde desaparece asociada seguramente con la apertura e inactivación subsecuente de canales de sodio; posteriormente las espigas aparecen nuevamente, lo que indica que el primer efecto no se debe a lesión del tejido, sino que se trata de un proceso inocuo y totalmente reversible. Este procedimiento experimental ha sido realizado en el cerebro de anfibios (Segura y De Juan, 1966) y otros animales con el mismo fin. Por otro lado, el efecto también reversible que se observa al poner en contacto la solución salina fría con la superficie del ganglio es similar a lo reportado por Murphy y Heath (1983), quienes observan que la frecuencia de disparo de neuronas del ganglio protorácico de la cucaracha disminuye en forma notable con el decremento de temperatura. Por último, la clara diferencia que observamos entre los registros de los animales vivos y muertos nos sugiere fuertemente que las fluctuaciones de potencial registradas son biológicas y no debidas a fuentes externas de ruido.

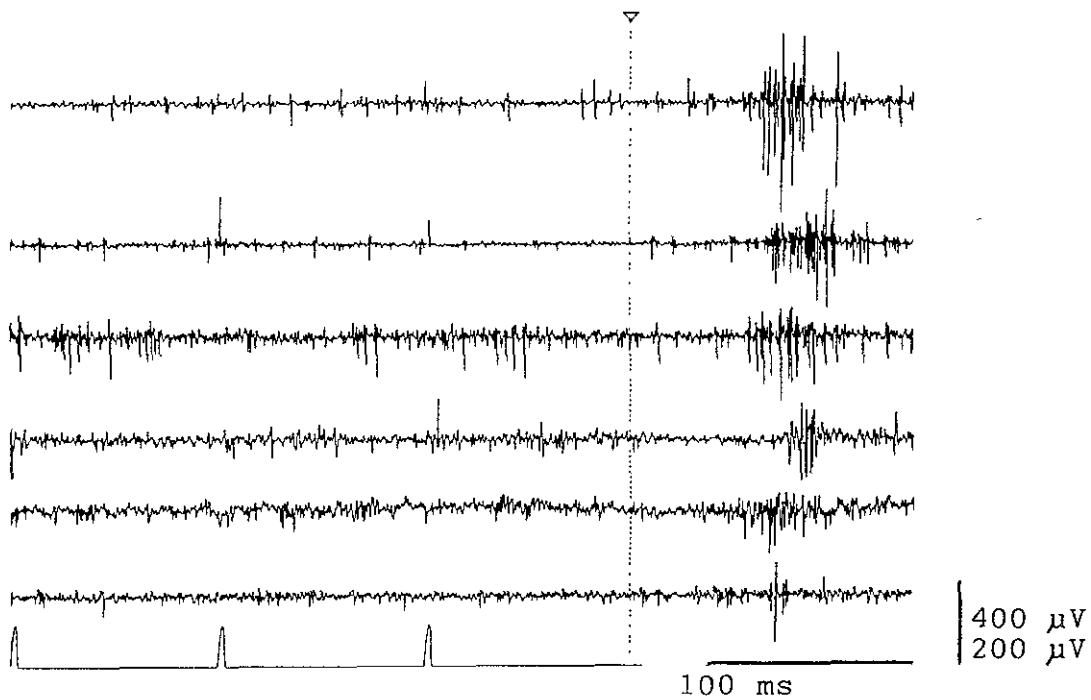
## **II. POTENCIALES RELACIONADOS CON UN SUCESO (ERPs).**

Como parte de una línea de investigación paralela en la que pretendemos entre otras cosas caracterizar el comportamiento circadiano de los potenciales por omisión del estímulo (OSPs, por sus siglas en inglés), parte de mi trabajo doctoral se realizó en colaboración con el Dr. Theodore H. Bullock, de la Universidad de California en San Diego. Aquí se presentan brevemente algunos resultados. Los detalles pueden ser consultados en Hernández y cols., 1999; Ramón y cols., 1999, 2000.

Las funciones cognitivas presuntamente representan procesos cerebrales a niveles neuronales relativamente superiores. En vertebrados algunas de estas funciones han sido asociadas con “ondas eléctricas” o “potenciales relacionados con un suceso” (ERPs por sus siglas en inglés), los cuales se distinguen de simples potenciales evocados por cada estímulo. Con el objeto de probar la hipótesis de que los invertebrados también tienen este tipo de señales cognitivas, investigamos los efectos al “apagado” de trenes de destellos luminosos, los cuales implican un modo de expectativa.

En la fig. 33 se presenta el final de un tren de 5 seg de duración a 10 hz aplicado a seis diferentes animales. Puede observarse que aún cuando en ninguno de ellos se observan PPVs con cada estímulo, al final del tren y con una latencia más o menos fija desde el primer pulso omitido (línea vertical) aparecen ráfagas de espigas de gran amplitud (hasta 8-10 veces mayores que las espontáneas) y duración variable. Este tipo de ráfagas es un potencial por omisión de estímulo (OSP por sus siglas en inglés) e implica que el sistema aprende a esperar un cierto evento en el intervalo interestímulo (ISI), que cuando “falla”, libera el OSP. Se puede observar que los patrones de respuesta son variados pero la latencia se mantiene más o menos constante desde el primer estímulo omitido (alrededor de 60 mseg). En la búsqueda de los factores que modulan este fenómeno hemos encontrado que la duración del tren condicionante (fig. 34), la intensidad de los destellos (fig. 35) y la frecuencia de estimulación (entre 4 y 60 hz; fig. 36) no parecen ser relevantes para modificar en forma sustantiva la latencia. En esta última figura es interesante señalar la ausencia de OSPs en bajas frecuencias (1-3 hz); asimismo, con frecuencias relativamente altas (25-60 hz) los OSP son generalmente más lábiles, de tal manera que su aparición es más errática. Hasta ahora hemos encontrado que la latencia de los OSP sí depende de la temperatura. En la fig. 37 se presenta una curva de latencia en función de la temperatura del agua de la pecera. Se puede observar una relación inversa en la cual a medida que sube la temperatura la latencia tiende a disminuir.

A diferencia de los potenciales provocados, que son dependientes del estímulo, los ERPs, en el entendido habitual, son más endógenos, es decir, más dependientes del estado del animal y del cerebro. Los ERPs han sido registrados principalmente del cerebro de humanos y han sido considerados como signos de procesamiento neuronal de alto nivel jerárquico (Bullock y cols., 1994). Un tipo de ERPs que se produce cuando un estímulo esperado no ocurre es un potencial por omisión de estímulo (omitted stimulus potential; OSP). La hipótesis actual que estamos probando es que al menos algunos invertebrados avanzados como los crustáceos decápodos revelarán OSPs cuando son sometidos a regímenes de estímulos apropiados, manifestando un evento neural que puede ser considerado cognitivo. Esto al principio podría parecer disparatado con base en que los OSPs habían sido registrados por varios años sólo del cráneo humano, como signos corticales de expectativa consciente y que requieren atención voluntaria (Takasaka, 1985; Alain y cols., 1989; Mangun y cols., 1993). Sin embargo, posteriormente Bullock y cols., (1990, 1993) mostraron algo objetivamente equivalente a nivel del tallo cerebral inferior y aún en retina de peces (raya) y reptiles (tortuga; Prechtl y



**Fig. 33** Potenciales por Omisión de Estímulo (OSPs). Se presenta la respuesta cerebral al OFF de un tren condicionante de destellos de luz blanca difusa en seis animales distintos. Nótese la aparición de ráfagas de espigas de gran amplitud con una latencia más o menos fija desde el primer destello omitido (línea vertical). Cada trazo es una respuesta individual no promediada. El tren consistió de 5 seg de duración, 10 Hz de frecuencia y 1.375 lumen  $\text{seg}/\text{pie}^2$  de intensidad (registro inferior). Sólo se muestra la parte final del tren. La escala de voltaje superior aplica para los dos primeros trazos (de arriba hacia abajo) y la inferior para los restantes.



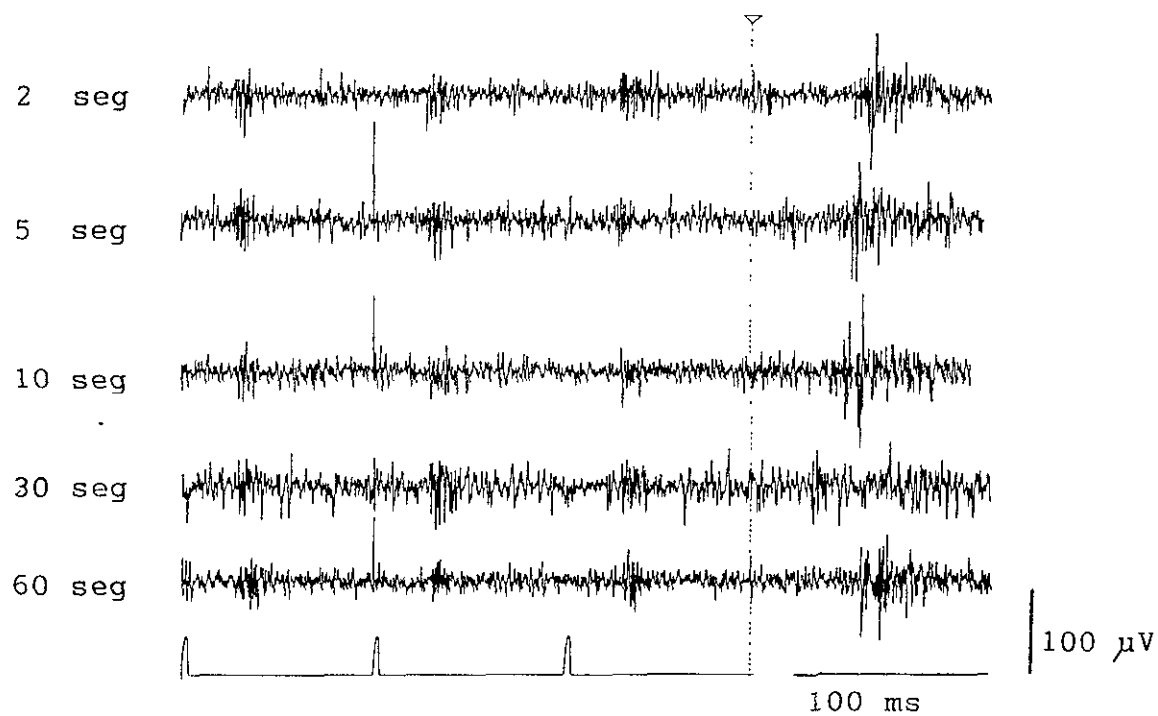
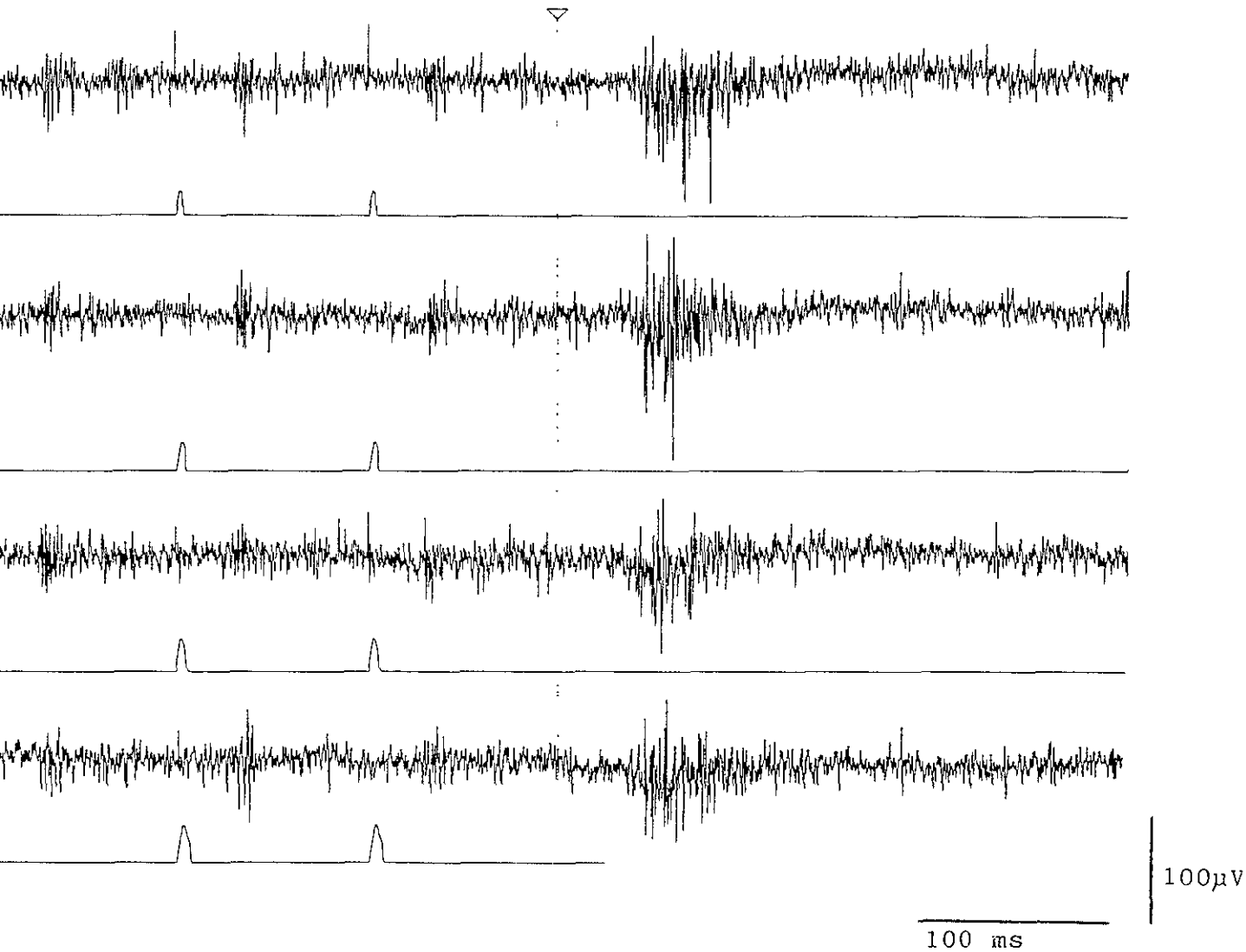
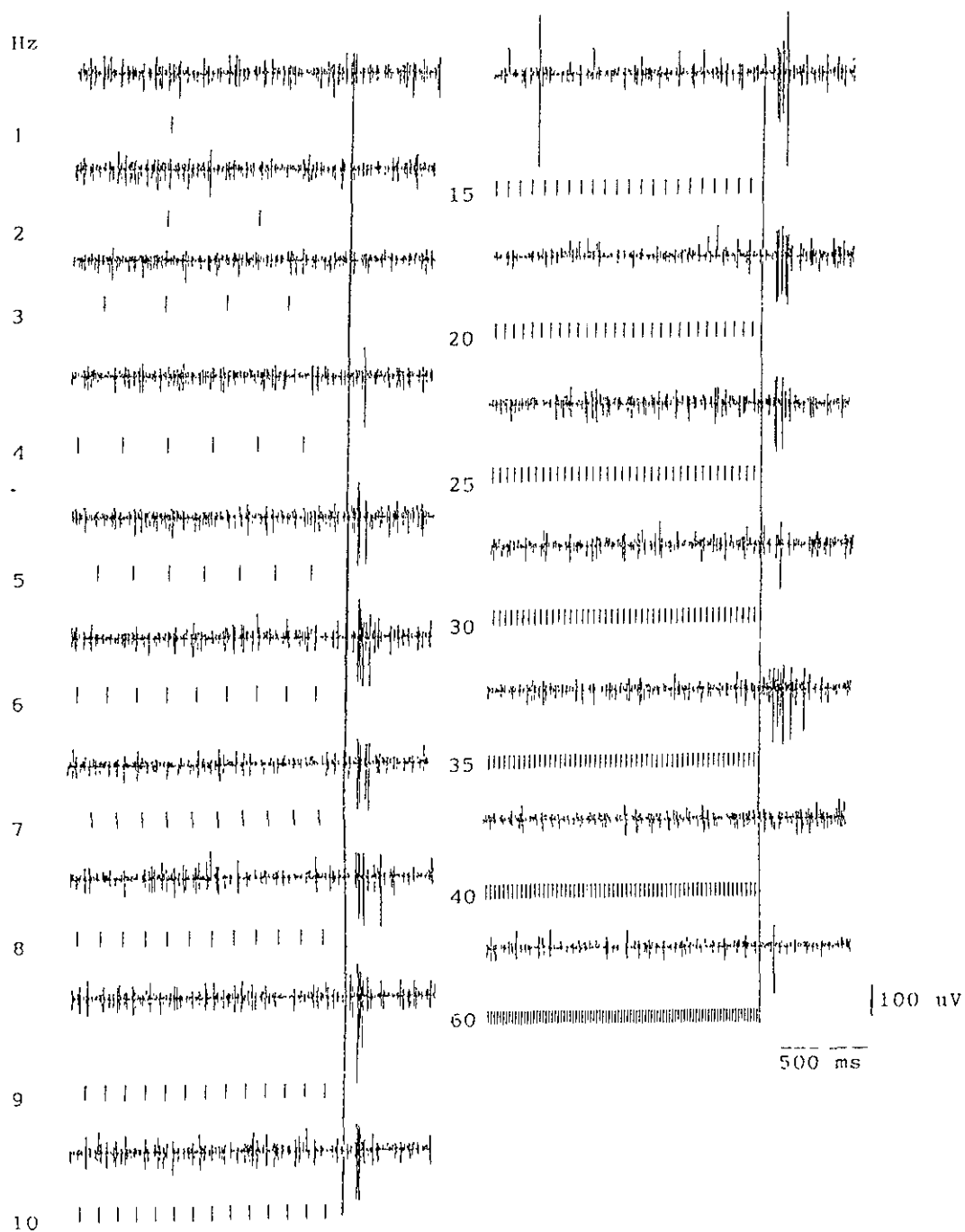


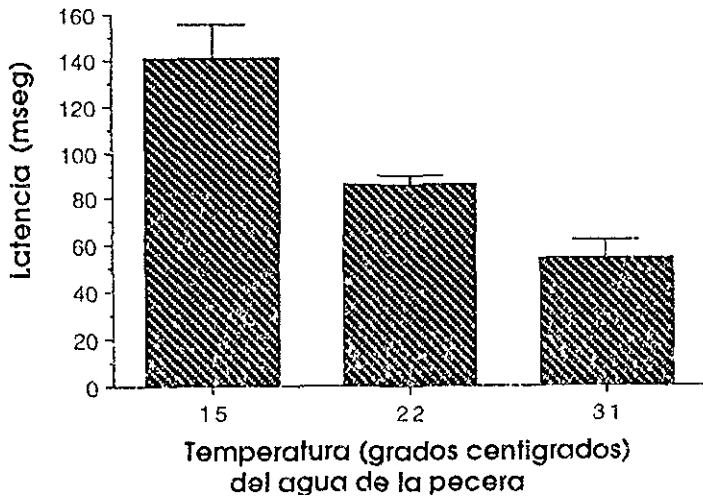
Fig. 34 Trenes de distinta duración. Se aplicaron trenes condicionantes de estímulos luminosos similares a los anteriores pero con duración distinta (señalada en el extremo derecho de cada trazo) en un mismo animal. Puede observarse la presencia de OSPs en todos ellos con aproximadamente la misma latencia. Adicionalmente, esta figura muestra que los OSPs son distintos a los PEVs que se producen como consecuencia de cada estímulo. La línea vertical corresponde al primer destello omitido. Sólo se muestra la parte final del tren.



**Fig. 35** Trenes de distinta intensidad. Se presenta la parte final de trenes de destellos luminosos, los cuales tuvieron una duración de 5 seg, 10 Hz de frecuencia e intensidades de 1.375 (1), 2.75 (2), 5.5 (4) y 11 (8) lumen  $\text{seg}/\text{pie}^2$ . En todos los trazos se observan claros OSPs con latencias similares desde el primer estímulo omitido (línea vertical). También se observan los correspondientes PEVs con cada destello.



**Fig. 36** Trenes de distinta frecuencia. Respuestas del ganglio cerebroide a trenes de estímulos luminosos (5 seg, 1.375 lumen  $\text{seg}/\text{pie}^2$ ) con diferente frecuencia (señalada en el extremo izquierdo de cada tren). Los trazos están alineados con respecto al primer destello omitido (líneas verticales). Sólo se presenta la parte final de cada tren. De 5 a 25 Hz los OSPs son más consistentes y con aproximadamente la misma latencia; son más lábiles con frecuencias de estimulación por arriba de 25 Hz. y están completamente ausentes a bajas frecuencias (1 y 2 Hz).



**Fig. 37** Efecto de la temperatura sobre la latencia de los OSPs. Gráfica que relaciona la latencia promedio (y D.E.;  $n = 5$ ) de los OSPs desde el primer pulso omitido con respecto a tres niveles de temperatura del agua de la pecera (15, 22 y 31 °C). Note la relación inversa que guardan estas dos variables.

Bullock, 1992, 1994). Los hallazgos de este estudio indican un estado central *como si* una expectativa fuera originada por los patrones de estimulación previa.

Así, en humanos, peces y reptiles se ha mostrado que al final de un breve tren de estímulos, el primer estímulo omitido va seguido de un tipo de respuesta al apagado (OFF) cuya característica principal es su latencia constante, no desde el último estímulo dado sino desde el tiempo donde debió haberse producido el primer estímulo faltante, sin importar la frecuencia del tren condicionante (Bullock y cols., 1993; Karamürsel y Bullock, 1994; Prechtl y Bullock, 1994). La escala efectiva en la frecuencia de trenes condicionantes mostró en el acócil ser similar a la obtenida en las otras especies de vertebrados, es decir, dentro de lo denominado OSPs “rápidos”, cuyas frecuencias efectivas son mayores de 3 Hz. En humanos se han documentado otro tipo de respuestas denominadas OSPs “lentos”, que aparecen con frecuencias condicionantes entre 0.3-1.6 Hz. En el acócil estos potenciales no fueron observados.

En conjunto, en el acócil hemos encontrado hasta ahora que aparecen OSPs tanto en el tracto óptico (TO), como en el cerebro o en los conectivos circunsofálgicos, incluyendo sitios con y sin PEVs. En algunos lugares como en el TO, los OSPs muestran un componente lento; en otros sólo espigas. Las respuestas OSPs pueden demandar un cierto nivel de luz ambiental pero muestran poca dependencia de la intensidad de los destellos o de la duración del tren condicionante. Pueden ser igualmente grandes durante cualquier hora del día pero abruptamente dejan de aparecer durante la noche o en la oscuridad. La latencia fija característica de cada preparación varía entre preparaciones, lugar del electrodo o condiciones como la temperatura. Además pueden estar presentes durante la deambulacion, alimentacion o el reflejo de defensa pero generalmente están ausentes en un acócil que queda “inerte” hasta que éste es “despertado”. Tal como se mencionó anteriormente, a pesar de no haber podido registrar PPVs mediante estímulos espaciales estructurados (barras o “tableros de ajedrez”), el acócil mostró OSPs con una latencia dos veces mayor que la obtenida con destellos luminosos. Los OSPs no parecen ser producidos a través de mecanorreceptores. Estos resultados sugieren que el tren de estímulos condicionante tiene un efecto inhibitorio sobre un circuito que aprende rápidamente el intervalo del estímulo, de tal manera que el OSP (listo para ocurrir después del intervalo aprendido), es nulificado por cada estímulo y solamente es liberado cuando se omite uno de ellos.

Los OSPs son fluctuaciones eléctricas cerebrales que están asociadas en el mamífero con transacciones neuronales de alto nivel jerárquico (es decir, con interneuronas de alto orden). Hasta ahora hemos encontrado que en el acocil aparecen OSPs en forma de espigas de gran amplitud cuya latencia no parece depender de la duración, intensidad o frecuencia del tren condicionante, pero sí de la temperatura del medio ambiente y la hora del día. Los detalles de este trabajo pueden ser consultados en Hernández y cols., 1999; Ramón y cols., 1999, 2000.

## BIBLIOGRAFIA

- Ache BW and Sandeman DC (1980). Olfactory-induced central neural activity in the Murray crayfish, *Euastacus armatus*. J. Com. Physiol. A., 140: 295-301.
- Adrian ED (1931). Potential changes in the isolated nervous system of *Dytiscus marginalis*. J. Physiol. (London), 72: 132-151.
- Adrian ED (1937). Synchronized ractions in the optic ganglion of *Dytiscus*. J. Physiol. (London), 91: 66-89.
- Adrian ED and Buytendijk FJ (1931). Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish. J. Physiol. (London), 71: 121-135.
- Adrian ED and Matthews BHC (1934). The interpretation of potential waves in the cortex. J. Physiol. (London), 81: 440-471.
- Alain C, Richer F, Achim A and Saint Hilaire JM (1989). Human intracerebral potentials associated with target, novel and omitted auditory stimuli. Brain Topog. 1: 237-245.
- Alvarado-Alvarez R, García U and Aréchiga H (1993). Electrotonic coupling between neurosecretory cells in the crayfish eyestalk. Brain Res. 613: 43-48.
- Ambros V (2000). Control of developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Curr. Opin. Genet. Dev. 10: 428-433.
- Andrew RD, Orchard I, Saleuddin ASM (1978). Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. Cell. Tissue Res. 190: 235-246.
- Arbas EA, Humphreys CJ y Ache BW (1988). Morphology and physiological properties of interneurons in the olfactory midbrain of the crayfish. J. Com. Physiol. A. 164: 231-241.
- Aréchiga H (1974). Circadian rhythm of sensory input in the crayfish. In The Neuroscience Third Study Program. F.O. Smitt (Ed.). M.I.T. Press, 517-523.

- Aréchiga H (1993). Circadian Rhythms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 1005-1010.
- Aréchiga H (1996). Neuronal mechanisms of biological rhythms. *Time, Internal Clocks and Movement*. Pastor MA and Artieda J (Eds). Elsevier Sci. B.V. pp 95-114.
- Aréchiga H and Rodriguez-Sosa L (1997). Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behavior in decapod crustaceans. *J. Mar. Biol. Ass U.K.* 77: 17-29.
- Aréchiga H and Wiersma CAG (1969a). The effect of motor activity on the reactivity of single visual units in the crayfish. *J. Neurobiol.* 1: 53-69.
- Aréchiga H and Wiersma CAG (1969b). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71-85.
- Aréchiga H and Fuentes-Pardo B (1970). Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist* 13, 137.
- Aréchiga H and Fuentes-Pardo B (1974). Hormonal influence on the nervous system of invertebrates. *Bol. Estud. Med. Biol. Suppl.* 1 : 261-285.
- Aréchiga H and Mena F (1975). Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A: 581-584.
- Aréchiga H, Fuentes B and Barrera B (1973). Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: *Biological rhythms in Invertebrates*. J. Salanki (De) Budapest: Plenum press pp. 403-421
- Aréchiga H, Huberman A and Naylor E (1974). Hormonal modulation of circadian neural activity in *Carcinus maenas* (L.). *Proc. R Soc. Lond. B.* 187: 299-313.
- Aréchiga H, Atkinson RJA and Williams JA (1980). Neurohumoral basis of circadian rhythmicity in *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Behav. Physiol.* Vol. 7: 185-197.



- Aréchiga H, Fernández-Quiróz F, Fernández de Miguel F and Rodríguez-Sosa L (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* Vol. 10 No. 1: 1-20.
- Aschoff J (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In *Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- Aschoff J (1981). A survey on Biological Rhythms. In Aschoff ed. *Handbook of Behavioral Neurobiology.* Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, pp. 3-10.
- Barrera-Mera B (1976). Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. and Behav.* 17: 59-64.
- Barrera-Mera B (1978). Neural coupling between left and right electroretinographic circadian oscillation in the crayfish *P. bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A: 427-432.
- Barrera-Mera B, Block GD (1990). Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* 522: 241-245.
- Barrera-Mera B, Cibrian-Tovar J, García-Díaz DE (1980). The role of protocerebrum in the modulation of circadian rhythmicity in the crayfish visual system. *Brain Res. Bull.* 5:6 pp 667-672.
- Bennit R (1932). Diurnal rhythm in the proximal cell of the crayfish retina. *Physiol. Zool.* 5: 65-69.
- Bharath S, Gangadhar BN and Janakiramaiah N (2000). P300 in family studies of schizophrenia: review and critique. *Int. J. Psychophysiol.* 38: 43-54.
- Bleckman H, Budelman BU and Bullock TH (1991). Peripheral and central nervous responses evoked by small water movements in a cephalopod. *J. Com. Physiol. A* 168: 247-257.
- Bliss DE, Durand JB, Welsh JH (1954). Neurosecretory systems in decapod crustacea Z. *Zellforsch.* 39: 520-536.

- Block GD (1976). Evidence for an entrainable circadian oscillator in the abdominal ganglia of crayfish. *Neuroscience Abstracts*. 2: 315.
- Block GD, Geuz M, Khalsa S, Michael S and Whitmore D (1995). Cellular analysis of a molluscan retinal biological clock. *Ciba Found Symp*. 183: 51-66.
- Bodznick D and Northcutt RG (1981). Electroreception in lampreys: Evidence that earliest vertebrates were electroreceptive. *Science*, 212: 465-467.
- Bremer H, Dow RS and Moruzzi G (1939). Physiological analysis of the general cortex in reptiles and birds. *J. Neurophysiol*. 2: 476-487.
- Brady J (Ed.) (1982). *Biological Timekeeping*, Society of Experimental Biology Seminar Series, No. 14. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bullock TH (1945). Problems in the comparative study of brain waves. *Yale J. Biol. Med*. 17: 657-679.
- Bullock TH (1981). Neuroethology deserves more study of evoked responses. *Neurosci*. 6: 1203-1215.
- Bullock TH (1984). Ongoing compound field potentials from octopus brain are labile and vertebrate-like. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 57: 473-483.
- Bullock TH (1993). Integrative systems research on the brain: Resurgence and new opportunities. *Annu. Rev. Neurosci*. 16: 1-15.
- Bullock TH and Uter TG (1976). Brain waves of octopus. *Soc. Neurosci. Abstr*. 2: 236.
- Bullock TH and Corwin JT (1979). Acoustic evoked activity in the brain of sharks. *J. Comp. Physiol. A.*, 129: 223-234.
- Bullock TH and Basar E (1988). Comparison of ongoing compound field potentials in the brain of invertebrates and vertebrates. *Brain Res. Rev*. 13: 57-75.

- Bullock TH and Budelmann BU (1991). Sensory evoked potentials in unanesthetized unrestrained cuttlefish: a new preparation for brain physiology in cephalopods. *J. Com. Physiol. A* 168: 141-150.
- Bullock TH, Hofman MH, Nahm FK, New JG and Prechtl JC (1990). Event-related potentials in the retina and optic tectum of fish. *J. Neurophysiol.* 64:3:903-914.
- Bullock TH, Hofman MH, New JG and Nahm FK (1991). Dynamic properties of visual evoked potentials in the tectum of cartilaginous and bony fishes, with neuroethological implications. *J. Exp. Zool. Suppl.* 5: 142-155.
- Bünning E (1973). *The Physiological clock*. NY : Springer Verlag pp. 168.
- Campbell RA (1973). Studies on the biology of the life cycle of *Cotylurus flabelliformis* (Trematoda : Strigeidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92 (4) : 629-640.
- Chang HT (1959). The evoked potentials. *Handbook of Physiology. Section I: Neurophysiology, Vol. 1.* Am. Physiol. Society, Bethesda, Maryland. pp 299-313.
- Chen YB, Dominic B, Mellon MT and Zehr JP (1998). Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain IMS 101. *J. Bacteriol.* 180: 3598-3605
- Cohen MJ (1969). A comparison of invertebrate and vertebrate central neurons. In 2<sup>nd</sup> Study Program of Neuroscience 70: 798-812.
- Collias JC and Manuelidis EE (1957). Histopathological changes produced by implanted electrodes in cat brains. *J. Neurosurg-* 14: 302-328.
- Colwell C and Page TL (1990). A circadian rhythm in neural activity can be recorded from the central nervous system of the cockroach. *J. Comp. Physiol. A.* 166:643-649.
- Combes D, Meyrand P and Simmers J (1999). Motor pattern specification by dual descending pathways to a lobster rhythm-generating network. *J. Neurosci.* 19: 3610-3619.

- Dement W and Kleitman N (1957). Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 9: 673-690.
- Derby CD (1982). Structure and function of articular sensilla of the lobster *Homarus americanus*. *J. Crustacean Biol.* 2: 1-21.
- Derby CD and Ache BW (1984). Quality coding of a complex odorant in an invertebrate. *J. Neurophysiol.* 51:5: 906-924.
- Derby CD and Blaustein DN (1988). Morphological and physiological characterization of individual olfactory interneurons connecting the brain and eyestalk of the crayfish. *J. Comp. Physiol. A.* 163: 777-794.
- Desmedt JE (1981). Motor unit types, recruitment and plasticity in health and disease. In *Progress in Clinical Neurophysiology* (Desmedt Ed.) Vol. 9. S. Karger.
- Dewsbury DA (1978). *Comparative animal behavior*. McGraw-Hill, Inc.
- Edmunds LN Jr (1984). Physiology of circadian rhythms in micro-organisms. *Adv. Microb. Physiol.* 25 : 61-148, 301-303.
- Enger PS (1957). The electroencephalogram of the codfish (*Gadus callarias*). *Acta Physiol. Scand.* 39: 55-72.
- Enright JT (1965a). Accurate geophysical rhythms and frequency analysis. In Aschoff J ed., *Circadian Clocks*. North-Holland, Amsterdam. pp. 31-41.
- Enright JT (1965b). The search for rhythmicity in biological time-series. *J Theor. Biol.* 8: 426-468.
- Enright JT (1981). Methodology. In Aschoff ed. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, pp. 145-172.
- Eskin A and Harcombe E (1977). Eye of Navamax: Optic activity circadian rhythm and morphology. *Comp. Biochem. Physiol.* 57A: 443-449.

- Fanjul-Moles ML, Prieto-Sagredo JA and Fuentes-Pardo B (1991). Sinus gland regulates the spectral sensitivity in the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 98A No. 2 pp.317-322.
- Fénelon VS, Casasnovas B, Simmers J and Meyrand P (1998). Development of rhythmic pattern generators. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 705-709.
- Fernández de Miguel F and Aréchiga H (1992). Sensory inputs mediating two opposite behavioral responses to light in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* 164: 153-169.
- Fernández de Miguel F and Aréchiga H (1994). Circadian locomotor activity and its entrainment by food in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J. Exp. Biol.* 190: 9-21.
- Fischer G, Sayre GP and Bickford RG (1957). Histologic changes in the cat's brain after introduction of metallic and plastic coated wire used in EEG. *Proc. Staff Mtgs. Mayo Clinic.* 32: 14-22
- Fraser PJ (1974). Interneurons in crab connectives (*Carcinus maenas L.*): directional statocyst fibres. *J. Exp. Biol.* 61: 615-628.
- Fuentes-Pardo y Vargas-Ortega (1979). El empleo de las matemáticas en el estudio de los ritmos biológicos. I. El periodograma. *Biol. Estud. Med. Biol.* 30: 217-224.
- Fuentes-Pardo B and Inclán-Rubio V (1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythm in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Com. Biochem. Physiol.* 68A: 477-485.
- Fuentes-Pardo B and Inclán-Rubio V (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A pp.523-527.
- Fuentes-Pardo B and Moreno-Sáenz E (1988). Los relojes biológicos. En *Teorías y Hechos Sobre la Vida*. Muñoz-Martínez y Viesca (Ed.) SMCF-SEP.
- Fuentes-Pardo B, Hernández-Falcón J (1993). Neurobiology of the circadian clock of crayfish. *Trans. Com. Biochem. Physiol.* 1: 635-673.

- García U, Onetti C, Valdiosera R and Aréchiga U (1994). Excitatory action of aminobutyric acid (GABA) on crustacean neurosecretory cells. *Cell Mol. Neurobiol.* 14: 69-86.
- Geddes LA and Baker LE (1968). Principles of applied biomedical instrumentation. John Wiley & Sons, Inc.
- Geddes LA and Baker LE (1975). Principles of applied biomedical instrumentation. John Wiley & Sons, Inc.
- Gerard RW and Young JZ (1937). Electrical activity of the central nervous system of the frog. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, 122: 343-352.
- Geusz ME and Page TL (1990). The circadian rhythm and photosensitivity of small impulses of the Bulla eye. *J. Comp. Physiol. A* 166(6): 795-801.
- Geusz ME, Stephan M and Block GD (1994). Intracellular calcium responses of circadian pacemaker neurons measured with fura-2. *Brain Res.* 638: 109-116.
- Giebultowics JM (2000). Molecular mechanisms and cellular distribution of insect circadian clocks. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 769-794.
- Gilbert PW, Hodgson ES and Mathewson RF (1964). Electroencephalograms of sharks. *Science* 145: 949-951.
- Glantz RM (1971). Peripheral versus central adaptation in the crustacean visual system. *J. Neurophysiol.* 34: 485-492.
- Glantz RM (1977). Visual input and motor output of command interneurons of the defense reflex pathway in the crayfish. In *Identified Neurons and Behavior of Arthropods*. Ed. G. Hoyle. Plenum Press, N.Y. pp. 259-274.
- Glantz RM (1978a). Crayfish antennal neuropil. I. Reciprocal synaptic interactions and input-output characteristics of first-order interneurons. *J. Neurophysiol.* 41: 1297-1313.
- Glantz RM (1978b). Crayfish antennal neuropil. II. Periodic bursting elicited by sensory stimulation and extrinsic current in interneurons. *J. Neurophysiol.* 41: 1314-1327.

- Glantz RM and Nudelman HB (1976). Sustained, synchronous oscillation in discharge of sustaining fibers of crayfish optic nerve. *J. Neurophysiol.* 39 (6): 1257-1271.
- Glantz RM, Kirk M, Viancour T (1981). Interneurons in the crayfish brain: The relation between dendrite location and afferent input. *J. Neurobiol.* 12: 311-328.
- Hall JC (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction and clock functions subserving circadian systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 456-466.
- Hall JC and Sassone-Corsi P (1998). Molecular clocks. *Current Opinion Neurobiol.* 8: 633-636.
- Hall MR and Van-Ham EH (1998). Diurnal variation and effects of feeding on blood glucose in the giant tiger prawn *Panaeus monodon*. *Physiol. Zool.* 71: 574-583.
- Hamm CW, Ali JS and Herr DW (2000). A system for simultaneous multiple subject, multiple stimulus modality and multiple channel collection and analysis of sensory evoked potentials. *J. Neurosci. Meth.* 102: 95-108.
- Hanström B (1925). The olfactory centers of crustaceans. *J. Comp. Neurol.* 38: 221-250.
- Hardin PE (1998). Activating inhibitors and inhibiting activators: a day in the life of a fly. *Curr. Opinion Neurobiol.* 8:642-647.
- Harrevelt A van (1936). A physiological solution for fresh water crustacea. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34: 428-432.
- Helfrich-Förster C (1995). The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 612-616.
- Hendricks JC, Sehgal A and Pack AI (2000). The need for a simple animal model to understand sleep. *Prog. Neurobiol.* 61: 339-351.

- Hernández-Falcón J, Moreno-Sáenz E, Farías JM and Fuentes-Pardo B (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity. Pseudopupil circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 87A No. 1 pp. 111-118.
- Hernández OH and Fuentes-Pardo B (1997). Circadian electrical activity in the crayfish brain. Annual Meeting de la Society For Neuroscience. New Orleans La.
- Hernández OH and Fuentes-Pardo B (1999). Cerebroid ganglion is the presumptive circadian pacemaker of electrical response to light circadian rhythm in the crayfish. V Latin American Symposium in Chronobiology. Buenos Aires, Arg.
- Hernández OH and Fuentes-Pardo B (2000). Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of electrical response to light in the crayfish. *Biol. Rhythm Res.* (En prensa).
- Hernández OH, Serrato J, Elenes S and Ramón F (1993). Chronic recording of the electrical activity of the brain from unrestrained crayfish. Annual Meeting de la Society For Neurosciences. Washington D.C. USA
- Hernández OH, Serrato J Ramón F (1996a). Chronic recording of electrical activity from the brain of unrestrained crayfish: The basal, unstimulated activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 114A: 219-226.
- Hernández OH, Serrato J, Hernández-Falcón J and Ramón F (1996b). Electrical activity evoked at the crayfish brain in response to visual stimulation with moving bars. Annual Meeting de la Society For Neurosciences. Washington D.C. USA.
- Hernández OH, Ramón F and Bullock TH (1999). Expectation in invertebrates: Crayfish have "omitted stimulus potentials". *Proc. of the Sixth Joint Symp. on Neur. Comp.*
- Homberg U, Würden S, Dircksen H, Rao KR (1991). Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cells Tissue Res.* 266: 343-357.
- Horridge GA and Boulton PS (1967). Pray detection by *Chaetognatha* via a vibration sense. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B* 168: 413-419.



- Hubbard JJ, Llinás R and Quastel DMJ (1969). Electrophysiological analysis of synaptic transmission. Edward Arnold (Pub) LTD. The Camelot Press LTD.
- Hunsaker II D and Lansing RW (1962). Electroencephalographic studies of reptiles. *J. Exp. Zool.* 149: 21-32.
- Huntley AC (1987). Electrophysiological and behavioral correlates of sleep in desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis* Hallowell. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A: 325-330.
- Inclán-Rubio V and Fuentes-Pardo B (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish-II. Functional relationship between caudal and visual photoreceptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A: 529-536.
- Inouye ST and Kawamura H (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5962-5966.
- Inouye ST and Kawamura H (1982). Characteristics of a circadian pacemaker in suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5962-5966.
- Itoh MT and Sumi Y (2000). Circadian clock controlling egg hatching in the cricket (*Gryllus bimaculatus*). *J. Biol. Rhythms* 15: 241-245.
- Iwasaki H and Dunlap JC (2000). Microbial circadian oscillatory systems in *Neurospora* and *Synechococcus*: models for cellular clocks. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:189-196.
- Jacklet JW (1969). Circadian rhythm of optic nerve impulse recorded in darkness from isolated eye of *Aplysia*. *Science* 164: 562-563.
- Jacklet JW, Geronimo J (1971). Circadian rhythm: population of interacting neurons. *Science.* 174: 299-302.
- Jahn TL and Crescitelli F (1938). The electrical response of the grasshopper eye under conditions of light and dark adaptation. *J. Cell Comp. Physiol.* 12: 39-55.

- Jahn TL and Wulff VJ (1942). Allocation of electrical responses from the compound eye of grasshoppers. *J. Gen. Physiol.* 16: 75-88.
- Janz GJ and Taniguchi H (1953). The silver-silver halide electrodes. *Chem. Rev.* 53: 397-437.
- Jaros PP (1978). Tracing of neurosecretory neurons in the crayfish optic ganglia by cobalt iontophoresis. *Cell Tissue Res.* 194: 297-302.
- Jing J and Gillette R (1999). Central pattern generator for escape swimming in the notaspid sea slug *Pleurobranchaea californica*. *J. Neurophysiol.* 81: 654-667.
- Kalmus H (1938). Aktogram des Flusskrebs und seine Beeinflussung durch Organextrakte. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 689-802.
- Kaneko M (1998). Neural substrates of *Drosophila* rhythms revealed by mutants and molecular manipulations. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8: 652-658.
- Kaneko M, Park JH, Cheng Y, Hardin PE and Hall JC (2000). Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioral rhythms. *J. Neurobiol.* 43: 207-233.
- Karamian AI, Vesselkin MG, Belekhova MG and Zagorulko TM (1966). Electrophysiological characteristics of tectal and thalamo-cortical divisions of the visual system in lower vertebrates. *J. Comp. Neurol.* 127: 559-576.
- Karamürsel S and Bullock TH (1994). Dynamics of event-related potentials to trains of light and dark flashes: responses to missing and extra stimuli in elasmobranch fish. *Electroencephalogr. and Clin. Neurophysiol.* 90: 461-471.
- Kass L and Barlow RB (1992). A circadian clock in the *Limulus* brain transmits synchronous efferent signals to all eyes. *Vis. Neuroscience* 9(5): 493-504.
- Katz PS and Harris-Warrick RM (1999). The evolution of neural circuits underlying species-specific behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 628-633.

- Kenemans JL, Baas JMP, Mangun GR, Lijffijt M and Verbaten MN (2000). On the processing of spatial frequencies as revealed by evoked-potential source modeling. *Clin Neurophysiol.* 111: 1113-1123.
- Kennedy F, Naylor E and Jaramillo E (2000). Ontogenetic differences in the circadian locomotor activity rhythm of the talitrid amphipod crustacean *Orchestoidea tuberculata*. *Marine Biol.- Berlin- Springer Verlag* 137 part 3 pp 511-518.
- Khalsa SBS, Ralph MR and Block GD (1990). Chloride conductance contributes to period termination of a neuronal circadian pacemaker. *Brain Res.* 520: 166-169.
- Khalsa SBS, Michel S and Block GD (1995). The anesthetic agents pentobarbital and chloralose block phase shifts of a neuronal in vitro circadian pacemaker. *Neurosc. Lett.* 187: 41-44.
- Kirk MD, Waldrop B and Glantz RM (1982). The crayfish sustaining fibers. I. Morphological representation of visual receptive fields in the second optic neuropil. *J. Comp. Physiol.* 146: 175-179.
- Kleinholz LH (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. In Bernhard CG ed., *The Functional Organization of the Compound Eye*. Pergamon. pp 89-101.
- Koehler WK and Fleissner G (1978). Internal desynchronization of bilaterally organized circadian oscillators in the visual system of insects. *Nature* 274 : 708-710.
- Kreps JA, Muramatsu T, Furuya M and Kay SA (2000). Fluorescent differential display identifies circadian clock-regulated genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Rhythms* 15: 208-217.
- Kurumilla S and Kawamura H (1988). Circadian oscillation of the multiple unit activity in the guinea pig suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol. A.* 162: 301-308.
- Laming PR (1980). Electroencephalographic studies of arousal in the goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94: 238-254.

- Landau WM (1967). Evoked Potentials. In The Neurosciences Study Programs. 469-482.
- Larimer JL, Smith JTF (1980). Circadian rhythm of the retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. J. Comp. Physiol. 136: 313-326.
- Laverack MS (1980). Electrophysiology of the isolated central nervous system of the northern octopus *Eledone cirrhosa*. Mar. Behav. Physiol. 7: 155-169.
- Lee K, Loros JJ and Dunlap JC (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. Science. 289: 107-110.
- Lin S and Carpenter EJ (1998). Identification and preliminary characterization of PCNA gene in the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* and *Isochrysis galbana*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 7: 62-71.
- Liu Y, Loros J and Dunlap JC (2000). Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 234-239.
- Lorne J, Scheffer J, Lee A, Painter M and Miao VPW (2000). Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 189: 129-133.
- Maldonado-León K y Hernández OH (2000). Estudio electrofisiológico en el cerebro del cangrejo moro (*Menippe mercenaria*) semi-intacto, no anestesiado ni restringido. Investigaciones Marinas. En prensa (Vol. 20).
- Mangun GR, Hillyard SA and Luck SJ (1993). Electrocortical substrates of visual selective attention: synergies in experimental psychology, artificial intelligence and cognitive neuroscience. In: D.E. Meyer and S. Kornblum (Eds.) Attention and performance XIV. MIT Press, Cambridge, MA, 1993: 219-243.
- Matsumoto N and Bando T (1981). Long-lasting evoked potential and repetitive firing recorded from the carp *Cyprinus carpio* optic tectum in chloride deficient medium in-vitro. Brain Res. 225: 437-441.

- Mellon DeF (1977). The anatomy and motor nerve distribution of the eye muscles in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 121: 349-366.
- Mellon DeF, Sandeman DC and Sandeman RE (1992). Characterization of oscillatory olfactory interneurons in the protocerebrum of the crayfish. *J. Exp. Biol.* 167: 15-38.
- Mergenhagen D (1980). Circadian rhythms in unicellular organisms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 90 : 123-147.
- Michel S, Manivannan K, Zaritski JJ and Block GD (1999). A delayed rectifier current is modulated by the circadian pacemaker in *Bulla*. *J. Biol. Rhythms* 14: 141-150.
- Millar AJ (2000). Clock proteins: Turned over after hours? *Curr. Biol.* 10: R529-R531.
- Minors DS and Waterhouse JM (1988). Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. *Psychoneuroendocrinol.* 13: 443-464.
- Miranda-Anaya M, Bartell PA, Yamazaki S and Menaker M (2000). Circadian rhythm of ERG in Iguana iguana: role of the pineal. *J. Biol. Rhythms.* 15: 163-171.
- Moreno-Sáenz E, Hernández-Falcón J and Fuentes-Pardo (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity- II. ERG circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A Vol. 1 pp. 119-125.
- Moreno-Sáenz E, Fuentes-Pardo B, Hernández-Falcón J (1992). Photoentrainment of the circadian rhythm in the electroretinogram of the crayfish and its dependence on the sinus gland. *J. Exp. Zool.* 264: 144-152.
- Murphy BF and Heath JE (1983). Temperature sensitivity in the prothoracic ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*, and its relationship to thermoregulation. *J. Exp. Biol.* 105: 305-315.
- Naka K and Kuwabara M (1956). The component analysis of the e.r.g. from the compound eye of *Cambarus*. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. E.* 2: 75-86.

- Nicolau MC, Akaarir M, Gamundi A, González J and Rial RV (2000). Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. *Prog. Neurobiol.* 62: 379-406.
- Nuñez PL and Katznelson RD (1981). *Electric fields of the brain*. Oxford University Press. Inc.
- O'Benar JD (1976). Electrophysiology of neural units in goldfish optic tectum. *Brain Res. Bull.* 1: 529-541.
- Ohkuma M, Katagiri Y, Nakagawa M and Tsuda M (2000). Possible involvement of light regulated gonadotropin-releasing hormone neurobiological clock for reproduction in the cerebral ganglia of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Neurosc. Lett.* 293: 5-8.
- Okamoto OK, Shao L, Hastings JW and Colepicolo P (1999). Acute and chronic effects of toxic metals on viability, encystment and bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123: 75-83.
- Olson L and Jacklet JW (1985). The circadian pacemaker in the eye of *Aplysia* sends axons throughout the central nervous system. *J. of Neurosci.* 5: 3214-3227.
- Page TL (1981). Neural and endocrine control of circadian rhythmicity in invertebrates. In Aschoff ed. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4 *Biological Rhythms*. Plenum Press, New York, pp. 145-172.
- Page T and Larimer JL (1975a). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97: 59-80.
- Page T and Larimer JL (1975b). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97: 81-96.
- Palmer JD, Brown FA Jr and Edmunds LN Jr (1976). *An introduction to biological rhythms*. Academic Press, NY, San Francisco, London.

- Parsons LC and Huggins SE (1965). A study of spontaneous electrical activity in the brain of *Caiman sclerops*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119: 397-400.
- Petri B and Stengl M (1997). Pigment-dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. J. Neuroscience. 17: 4087-4093.
- Prechtl JC and Bullock TH (1992). Barbiturate sensitive components of visual ERPs in a reptile. Neuroreport 3: 801-804.
- Prechtl JC and Bullock TH (1994). Event-related potentials to omitted visual stimuli in a reptile. Electroencephalog. and Clin. Neurophysiol. 1-13
- Platt CJ, Bullock TH, Czéh G, Kovacevic N, Konjevic DJ and Goikovic M (1974). Comparison of electroreceptor, mechanoreceptor and optic evoked potentials in the brain of some rays and sharks. J. Comp. Physiol. 95: 323-355.
- Pittendrigh CS (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harbor Quant. Biol. 25 : 159-182.
- Pittendrigh CS (1981). Circadian systems: General perspective. In Aschoff ed. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, pp. 145-172.
- Prieto-Sagredo J, Ricalde-Recchia I, Duran-Lizarraga ME, Gonsebatt ME and Fanjul-Moles ML (2000). Change in hemolymph glutathione status after variation in photoperiod and light-irradiance in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti*. Photochem. Photobiol. 71: 487-492.
- Prosser CL (1936). Rhythmic activity in isolated nervous centers Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 4: 339-346.
- Prosser CL (1965). Electrical responses of fish optic tectum to visual stimulation: Modification by cooling and conditioning. Z. Vgl. Physiol. 50: 102-118.
- Ramón F, Hernández OH and Bullock TH (1999). Cognitive waves from crayfish: Omitted stimulus potential. Annual Meeting de la Society For Neuroscience. Miami Beach, Fla.

- Ramón F, Hernández OH and Bullock TH (2000). Event-related potentials in an invertebrate: crayfish emit omitted stimulus potentials. (en preparación).
- Ramsdale M and Lakin-Thomas PL (2000). *sn*-1,2-Diacylglycerol levels in the fungus *Neurospora crassa* display circadian rhythmicity. *J. Biol. Chem.* 275: 27541-27550.
- Refinetti R (2000). Circadian rhythm of locomotor activity in the pill bug, *Armadillidium vulgare* (Isopoda). *Crustaceana* 73: 575-584.
- Regan D (1972). Evoked potential in psychology, sensory physiology and clinical medicine. London Chapman and Hall LTD.
- Robinson FR and Johnson MT (1961). Histopathological studies of tissue reactions to various metals planted in cat brain. ASD Tech Rep. 61-397, 13 pp. USAF Wright-Paterson AFB, Ohio.
- Rodriguez-Sosa L, De la Vega T and Aréchiga H (1994). Circadian Rhythm of content of red pigment-concentrating hormone. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 1-9.
- Roeder K (1939). Synchronized activity in the optic and protocerebral ganglia of the grasshopper, *Melanoplus femur-rubrum*. *J. Cell Comp. Physiol.* 14: 299-307.
- Roeder K (1940). The origin of visual rhythms in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. *J. Cell Comp. Physiol.* 16: 399-401.
- Roeder T (1999). Octopamine in invertebrates. *Prog. Neurobiol.* 59: 533-561.
- Romani A, Bergamaschi R, Versino M, Zilioli A, Callieco R and Cosi V (2000). Circadian and hypothermia-induced effects on visual and auditory evoked potentials in multiple sclerosis. *Clin. Neurophysiol.* 111: 1602-1606.
- Rothenfluh A, Abodeely M, Price JJ and Young MW (2000). Isolation and analysis of six timeless alleles that cause short- or long-period circadian rhythms in *Drosophila*. *Genetics* 156: 665-675.



- Sánchez J and Fuentes-Pardo B (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Com. Biochem. Physiol.* 56A: 601-605.
- Sandeman DC and Denburg JL (1976). The central projections of chemoreceptor axons in the crayfish revealed by axoplasmic transport. *Brain Res.* 115: 492-496.
- Sandeman DC, Sandeman RE and Couet HG (1990). Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. of Neurobiol.* 21(4): 619-629.
- Sandeman DC, Sandeman RE, Derby C and Schmidt M (1992). Morphology of the brain of crayfish, crabs and spiny lobster: A common nomenclature for homologous structures. *Biol. Bull.* 183: 304-326.
- Satishohandra P and Ravishankar N (2000). Visual pathway abnormalities Wilson's disease: an electrophysiological study using electroretinography and visual evoked potentials. *J. Neurol. Sci.* 176: 13-20.
- Sato T and Kawamura H (1984a). Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (*Eutamias sibiricus*). *Neurosc. Res.* 1: 45-52.
- Sato T and Kawamura H (1984b). Effect of bilateral suprachiasmatic nucleus lesions on the circadian rhythm in a diurnal rodent, the Siberian chipmunk (*Eutamias sibiricus*). *J. Comp. Physiol. A* 155: 745-752.
- Sauman I and Reppert SM (1998). Brain control of embryonic circadian rhythms in the silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 20: 741-748.
- Schadé JP and Weiler IJ (1959). Electroencephalographic patterns of the goldfish (*Carassius auratus* L.). *J. Exp. Biol.* 36: 435-452.
- Scharrer B (1987). Insects as models in neuroendocrine research. *Ann Rev. Entomol.* 32: 1-16.
- Schmidt M, Orona E and Ache BW (1991). Parallel processing of chemosensory input in the brain of the spiny lobster. *Soc. Neurosci. Abstr.* 17: 17: 1018.

- Schmitz O, Katayama M, Williams SB, Kondo T and Golden SS (2000). CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* 289: 765-768.
- Segura ET and De Juan A (1966). Electroencephalographic studies in toads. *Electroencephalog. and Clin. Neurophysiol.* 21: 373-380.
- Serrato J, Hernández OH, Ramón F (1996). Integration of visual signals in the crayfish brain: Multiunit recordings in eyestalk and brain. *Comp. Biochem. Physiol.* 114A: 211-217.
- Singer W (1999). Time as coding space?. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9: 189-194.
- So WV, Sarov-Blat L, Kotarski CK, McDonald MJ, Allada R and Rosbash M (2000). takeout, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. *Mol. Cell Biol.* 20: 6935-6944.
- Stengl M and Homberg U (1994). Pigment dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach *Leucophaea maderae* share properties with circadian pacemaker neurons. *J. Comp. Physiol. A.* 175: 203-213.
- Stevens CF (1975). Principles and applications of fluctuation analysis: a nonmathematical introduction. *Fed. Proc.* 34(5): 1364-1369.
- Stowe S (1977). The retina-lamina projections in the crab *Leptograpsus variegatus*. *Cell Tissue Res.* 185: 515-525.
- Strausfeld NJ and Nüssel DR (1981). Neuroarchitectures serving compound eyes of Crustacea and Insects. In Autrum H. (Ed.) *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates. Invertebrate visual centers and behavior (Handbook of sensory physiol. Vol. VII/6B)*. Springer, Berlin Heidelberg New York pp 1-32.
- Strumwasser F (1967). Neurophysiological aspects of rhythm. In. Quarten GC, Melnechuk T, Schmitt RO, eds., *The Neuroscience, A Study Program*. NY Rockefeller Univ. Press., pp. 516-528.
- Strumwasser F (1974). Neuronal principles organizing periodic behaviors. In

Schmitt FO, Worden FG, eds., *The Neuroscience. Third Study Program.* Cambridge, Mass. MIT Press., pp. 459-478.

- Sutterlin AM and Prosser CL (1970). Electrical properties of goldfish optic tectum. *J. Neurophysiol.* 33: 36-45.
- Takasaka Y (1985). Expectancy-related cerebral potentials associated with voluntary time estimation and omitted stimulus. *Folia Psychiat. Neurol. Jpn.*, 39: 169-172.
- Taylor RC (1975). Integration in the crayfish antennal neuropile: Topographic representation and multiple channel coding of mechanoreceptive submodalities. *J. Neurobiol.* 6: 475-499.
- Thain SC, Hall A and Millar AJ (2000). Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression. *Curr. Biol.* 10: 951-956.
- Vega A (1993). Análisis estadístico en cronobiología. *Psiquis* 2: 139-149.
- Walker JM and Burger RJ (1973). A polygraphic study of the tortoise (*Testudo denticulata*). *Brain Behav. Evol.* 8: 453-457.
- Wang Y, Kong J, Tang X, Zhuang D and Li S (2000). Event-related potential N270 is elicited by mental conflict processing in human brain. *Neurosc. Lett.* 293: 17-20.
- Warner BF and Huggins SE (1978). An electroencephalographic study of sleep in young caimans in a colony. *Comp. Biochem. Physiol.* 59A: 139-144.
- Waterman TH, Wiersma CA, Bush BMH (1964). Afferent visual responses in the optic nerve of the crab, *Podophthalmus*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 63: 135-55.
- Webster SG (1998). Peptidergic neurons in barnacles: an immunohistochemical study using antisera raised against crustacean neuropeptides. *Biol. Bull.* 195: 282-289.
- Welsh J (1930). Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA.* 16: 386-395.

- Wiersma CAG (1958). On the functional connections of single units in the central nervous system of the crayfish *Procambarus clarkii* Girard. J. Comp. Neurol. 110: 421-471.
- Wiersma CAG (1966). Integration in the visual pathway of crustacea. Symp. Soc. Exp. Biol. 20: 151-177.
- Wiersma CAG and Mill PJ (1965). "Descending" neuronal units in the commissure of the crayfish central nervous system; and the integration of visual, tactile and proprioceptive stimuli. J. Com. Neurol. 125: 67-94.
- Wiersma CAG and Yamaguchi T (1966). The neural components of the optic nerve of the crayfish as studied by single unit analysis. J. Comp. Neur. 128: 333-358.
- Wiersma CAG and Yamaguchi T (1967). The integration of visual stimuli in the rock lobster. Vision Res. 7: 197-204.
- Wiersma, CAG and Yanagisawa K (1971). On types of interneurons responding to visual stimulation present in the optic nerve of the rock lobster, *Panulirus interruptus*. J. Neurobiol. 2: 291-309.
- Wiersma CAG and Roach JM (1977). Principles in the organization of invertebrate sensory system". In Handbook of Physiol. Sec. 1, The Nervous System. Vol. Part. 2 Am. Physiol. Soc. Bethesda, Maryland, Williams & Wilkins. pp. 1089-1135.
- Wiersma CAG, Bush BM and Waterman TH (1964). Efferent visual response of contralateral origin in the optic nerve of the crab *Podophthalmus*. J. Cell and Comp. Physiol. 64: 309-326.
- Williams BG (1998). The lack of circadian timing in two intertidal invertebrates and its significance in the circatidal/circalunidian debate. Chronobiol. Int. 15: 205-218.
- Williamson R and Budelmann BU (1991). Convergent inputs to octopus oculomotor neurones demonstrated in a brain slice preparation. Neurosci. Lett.
- Wine J.J. and Krasne F.B. (1972). The organization of the escape behavior in the crayfish. J. Exp. Biol. 56: 1-18.

- Wood HL, Glantz RM (1980a): Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. I. Response characteristics and synaptic interactions. *J. Neurophysiol.* 43: 729-740.
- Wood HL, Glantz RM (1980b): Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. II. Network organization and stimulus modulation of synaptic efficacy. *J. Neurophysiol.* 43: 741-753.
- Xu Y, Mori T and Johnson CH (2000). Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythm and phase setting. *EMBO Journal* 19: 3349-3357.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block JD, Sakaki Y, Menaker M and Tei H (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682-685.