

LA ACCIÓN DE LA HORMONA DISPERSORA DEL PIGMENTO EN LA GENERACIÓN Y LA
EXPRESIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS DEL ACOCIL

PRESENTA

BIOL. MIGUEL ANGEL VERDE VALADEZ

TUTORES

DRA. BEATRIZ FUENTES PARDO

DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

DRA. VICTORIA CHAGOYA HAYAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margarita Gonzáles del Pliego, por su gran compromiso, apoyo y colaboración en el trabajo histológico.

A la M. en C. Elsa Aguirre Benítez por su valiosa enseñanza y en el trabajo histológico e inmunológico de las diferentes técnicas usadas.

A la Dra. Graciela Porras, por su trabajo histológico y la comprobación de los resultados histológicos fluorescentes del ganglio cerebroide.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	4
Antecedentes generales	4
Los ritmos circadianos.....	5
Las características del reloj biológico	7
Los ritmos circadianos en el acocil.....	12
La organización del sistema visual del acocil.....	13
El ojo compuesto.....	13
El tallo ocular	15
Sistema órgano X-glándula sinusal.....	16
Ganglio supraesofágico	17
Protocerebro.....	17
Deutocerebro.....	17
Tritocerebro.....	18
La organización del sistema locomotor	19
Hormona dispersora del pigmento	21
Distribución de la HDP en crustáceos	22
Bioquímica de la HDP en crustáceos	23
Efecto fisiológico de la HDP en crustáceos.....	24
La HDP en insectos	25
Receptor de HDP.....	26
Antecedentes directos.....	27
Planteamiento del problema	28
OBJETIVO	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
HIPÓTESIS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Generalidades.....	32
Animales	32
Presencia de la HDP en el sistema nervioso central del acocil.....	32
Distribución de la HDP en el sistema nervioso del acocil	32
Procedimiento histológico	32
Inclusión en parafina.....	32
Inclusión en congelación.....	32
Cortes	33
Técnica de hematoxilina-eosina	33
Técnica de vogt (tinción de gránulos de nissl con violeta de cresilo).....	33
Técnica de sinaptofisina	33
Procedimiento inmunocitoquímico (inmunoperoxidasa indirecta).....	34
Procedimiento inmunocitoquímico (inmunofluorescencia)	35
Generación de la ritmicidad biológica	36
Registro del ERG.....	36
Registro del ritmo motor.....	37
Análisis de los datos	37
Lesión del ganglio cerebroide.....	37
Acción de la HDP como sincronizador del ritmo del ERG y del ritmo motor	38
RESULTADOS	40
Distribución de la HDP en el sistema nervioso del acocil	40
Tallo ocular.....	40
Ganglio cerebroide	46

Sobre la generación de los ritmos circadianos	56
Lesión del ganglio cerebroide	56
Sincronización de la ritmicidad biológica	63
Curvas de respuesta del ritmo del ERG	63
Curvas de respuesta del ritmo motor	66
DISCUSIÓN	69
Localización de la HDP en el sistema nervioso del acocil	69
Tallo ocular	69
Observaciones extras	70
Ganglio cerebroide	71
Lesión del ganglio cerebroide	73
Sincronización de los sistemas circadianos	76
CONCLUSIÓN	80
Presencia de HDP en tallo ocular y ganglio cerebroide (marcas histológicas)	80
Lesión del ganglio cerebroide	81
Sincronización del ritmo del ERG y motor	82
PROPUESTA	83
APÉNDICE	85
Soluciones	85
Solución amortiguadora de fosfatos	85
Tratamiento del tejido para inclusión en parafina	85
Tratamiento del tejido para inclusión en congelación	85
Tratamiento del tejido para tinción de hematoxilina y eosina	85
Tratamiento del tejido con violeta de cresilo (vogt)	86
Tratamiento del tejido para inmunoperoxidasa indirecta	86
Tratamiento del tejido para inmunofluorescencia	86
Tratamiento del tejido para inmunohistoquímica para sinaptofisina	87
Curva dosis respuesta para HDP	88
AGRADECIMIENTOS	91
BIBLIOGRAFÍA	92

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES GENERALES

A los fenómenos biológicos que se presentan a intervalos regulares de tiempo se les llama ritmos biológicos, expresión que incluye una amplia gama de fenómenos periódicos.

Los ritmos biológicos están presentes en todos los seres vivos, desde los más simples hasta los más complejos.

El hombre utiliza los relojes para medir intervalos de tiempo; algo semejante sucede en la naturaleza. De ahí ha surgido la idea de “reloj biológico”, que es una entidad anatómica y funcional por medio de la cual los organismos miden intervalos temporales que van desde las horas hasta los años.

La organización de los relojes biológicos está poco comprendida, sin embargo, cualquiera que sea el estado del conocimiento sobre los relojes, se puede asegurar que una de sus características esenciales es que generan funciones que no sólo requieren tiempo para llevarse a cabo. Fundamentalmente están organizadas para medirlo.

De especial interés son los cambios periódicos que se producen en concordancia con algún ciclo geofísico prominente como por ejemplo las mareas (con ciclos de 12 horas), el día y la noche (con ciclos de 24 horas), las fases de la luna (con ciclos de 28 días) o las estaciones del año (con ciclos de 365 días). Se habla entonces de ritmos tipo “circa” ya que al ser registrados en situaciones en las que no están presentes las correspondientes oscilaciones geofísicas, los ritmos muestran un periodo cercano aunque diferente al de las mencionadas oscilaciones. De este tipo de oscilaciones, las circadianas (del latín *circa*, cerca; *diem*, día) han sido las más estudiadas.

LOS RITMOS CIRCADIANOS

En 1959, Halberg propuso el término de circadiano para calificar a todo aquel fenómeno periódico que, en condiciones constantes de luz u oscuridad expresa una oscilación cercana a las 24 horas.

Los experimentos de Edwin Bünning (1935) y otros autores (Pittendrigh, 1960, 1965; Aschoff, 1960, 1965) en la década de los años 60 pusieron de manifiesto las características esenciales de los ritmos circadianos:

- Tienen periodos circadianos (periodos cercanos pero no iguales a 24 horas).
- Tienen oscilación libre (se expresan en condiciones ambientales constantes).
- No dependen de reacciones enzimáticas (poseen mecanismos de compensación de la temperatura).
- Son sincronizables (son capaces de ajustar su periodo endógeno al periodo de alguna señal externa).
- Siguen la regla de Aschoff (la frecuencia entre los niveles de actividad-reposo y la amplitud dependen de la cantidad de luz).
- Tienen una base genética y son innatos.

Gracias a los estudios realizados por estos y otros investigadores se pudo generalizar el manejo de los parámetros mediante los cuales se cuantifica la actividad periódica. Así, los ritmos circadianos quedan determinados por los valores de periodo, amplitud, frecuencia y nivel de actividad que presenten las oscilaciones.

Los ritmos circadianos se han podido detectar en todos los niveles de organización de los seres vivos, de tal manera que están presentes en células individuales, (Chen y cols., 1998; Ramsdale y Lakin-Thomas, 2000; Xu y col., 2000), en organismos unicelulares, organismos multicelulares, e incluso en poblaciones de organismos. Todos los componentes esenciales del reloj generador de los ritmos pueden estar contenidos en una célula individual lo que supone que los mecanismos en los que se expresa su acción deben de estar basados en reacciones moleculares dentro de la célula en vez de interacciones intercelulares (Hall y Sassone-Corsi, 1998; Hardin, 1998; Giebultowicz, 2000).

La respuesta de los organismos a señales externas que les indican el paso del tiempo se conoce como sincronización, es decir, la condición en la cual el periodo endógeno y la fase del oscilador interno, se ajustan al periodo y la fase del oscilador externo.

Acorde con muchos autores (Aschoff, 1965; Pittendrigh, 1965a, 1981; Bruce, 1960; Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983; Fuentes-Pardo y cols., 1992.), la sincronización puede observarse a través de señales

externas únicas periódicas que perturban la oscilación endógena. Diversos factores externos pueden actuar como señales sincronizadoras: la alternancia entre la luz y la oscuridad, los cambios de temperatura, el sonido, algunas sustancias químicas, el alimento, los fármacos, las señales sociales y algunos agentes homeostáticos. El ciclo de luz-oscuridad ha sido catalogado como el más potente sincronizador de los ritmos biológicos de prácticamente todas las especies, por su regularidad casi imperturbable.

La importancia de la sincronización radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico y del tiempo geofísico. De acuerdo con Pittendrigh (1960) la sincronización provee a los relojes biológicos de un mecanismo que les permite reconocer la hora local, propiedad sin la cual éstos no tendrían relevancia adaptativa.

LAS CARACTERÍSTICAS DEL RELOJ BIOLÓGICO

A la fecha, nadie ha llegado a establecer con precisión cómo está organizado un reloj biológico, por lo que se han propuesto modelos para representarlo. En todos los modelos propuestos, el sistema circadiano está formado por los siguientes elementos básicos:

- a) un marcapaso o estructura con capacidad de oscilar en forma endógena.
- b) un sistema encargado de detectar las señales externas y enviarlas al marcapaso (sincronizador) y
- c) las vías y estructuras mediante las cuales se expresa la oscilación (efector).

Por muchas décadas se ha buscado el sustrato anatómico de los relojes biológicos y se han encontrado conglomerados celulares capaces de producir ritmicidad circadiana. Diversos criterios se han aplicado para calificar a una estructura como responsable de la generación de algún ritmo. El primero de estos criterios es el de lesión o ablación. Cuando se lleva a cabo este procedimiento en alguna(s) estructura (s), en particular del sistema nervioso central, se ha confirmado la pérdida de la ritmicidad circadiana. Un segundo criterio para determinar si una estructura es un posible marcapaso circadiano es el de la implantación. Es decir, si a la supresión de un ritmo como consecuencia de la lesión o extirpación de una estructura, le sigue la recuperación de la conducta periódica perdida, después de la implantación de la parte dañada, se puede proponer a la estructura implantada como un buen ejemplo de reloj circadiano.

Otro criterio de identificación de un marcapaso circadiano es su capacidad de seguir oscilando después de haber sido explantado del organismo y mantenido en condiciones *in vitro*.

En algunas especies se ha podido establecer el lugar genético donde radica la capacidad de que la especie muestre algún tipo de ritmo circadiano e inclusive se han producido modificaciones en el mismo, gracias a manipulaciones sobre los genes correspondientes (Konopka y Banzer; 1971).

Diversos investigadores han identificado en *Drosophila melanogaster* dos tipos de ritmos circadianos; uno de ellos afecta el ciclo de actividad y otro el de eclosión de las pupas. Un método basado en mutagénesis química permitió a Konopka y Banzer (1971) obtener relojes mutantes de *Drosophila*. En su trabajo clásico estos autores obtuvieron moscas alteradas en sus sistemas circadianos. Las mutaciones simples en un gen denominado *per* (por periodo) producen cuatro fenotipos característicos: el tipo silvestre (*per*⁺) con un ritmo de actividad y eclosión cercanos a las 24 horas; mutantes de periodo corto (*per*^s), cercano a las 19 horas; mutantes de periodo largo (*per*^l), que alcanza hasta 29 horas y finalmente mutantes arrítmicos (*per*⁰) que se caracterizan porque carecen de un patrón circadiano en los ritmos de eclosión y de actividad (Konopka y Banzer, 1971; Konopka, 1979). Gracias a la ingeniería genética, en las últimas décadas se han logrado notables progresos en la elucidación de los papeles del gen y la proteína Per en la ritmicidad circadiana. Se ha demostrado

que el gen *per* es un protooncogén que codifica la síntesis de una proteína de 1,200 aminoácidos. Su ausencia suprime la expresión de ritmos circadianos como el de eclosión y el locomotor. La cantidad de RNA mensajero varía en forma circadiana, en fase con el ritmo del comportamiento del individuo; es decir, en un mutante de período corto, el ritmo de RNAm es también corto, y la duración del período circadiano es inversamente proporcional al número de copias de Per (Bayles y cols., 1987); además, es sincronizable por la luz (Ceriani y cols., 1999; Stanewsky y cols., 1998). Su transfección en mutantes arrítmicos restituye la ritmicidad (Bargiello y cols., 1994), lo cual también constituye un caso singular en cronobiología, que es la transferencia completa de un programa conductual por inserción de un gen. Inicialmente se localizó la expresión de *per* en células específicamente relacionadas con la generación de la ritmicidad; es decir, en aquellos órganos que, según los criterios mencionados anteriormente, contienen marcapasos circadianos. Tal fue el caso del cerebro de *Drosophila* (Ewer y cols., 1992; Vosshall y Young, 1995), el ojo de *Aplysia* y *Bulla* (Siwicki y cols., 1989) y la retina y el pedúnculo ocular de crustáceo (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998); sin embargo, más recientemente se le ha identificado y se ha demostrado su ritmicidad en otros órganos de *Drosophila* (Plautz y cols., 1997).

En años pasados, diversas contribuciones importantes han reforzado el papel del gen *per* en la generación de la ritmicidad circadiana en *Drosophila*. Primeramente, la proteína Per se localizó inmunocitoquímicamente en el sistema nervioso central de esta especie (Ewer y cols. 1992). La proteína Per ha sido identificada en áreas que se sabe están relacionadas con la actividad rítmica. En segundo lugar se ha observado la presencia de Per en las células gliales, las que nunca han sido incluidas en modelos fisiológicos de generación rítmica. Es factible que la glía sea un sitio donde se lleva a cabo un mecanismo de interacción con la neurona, enfocado a la generación de algún proceso circadiano. En tercer lugar se realizaron análisis de microscopía electrónica, donde la proteína Per se identificó como una proteína nuclear (Liu y cols. 1992) lo que sugiere que la proteína actúa en ciertos genes que podrían influir sobre los ritmos circadianos.

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

Por otra parte, la inserción de la proteína Per bloquea la expresión del gen *per*, lo que ha llevado a proponer como mecanismo básico generador de la ritmicidad a un circuito de retroalimentación negativo, con una red de duración cercana a las 24 horas. Luego se identificó, también en *Drosophila*, otro gen llamado *tim* (del inglés, *timeless* –carente de tiempo–), cuya proteína forma un dímero con Per y facilita la entrada de esta

proteína al núcleo celular y, por tanto, funcionan como factor negativo de transcripción (Arechiga, 2003) (Figura 1).

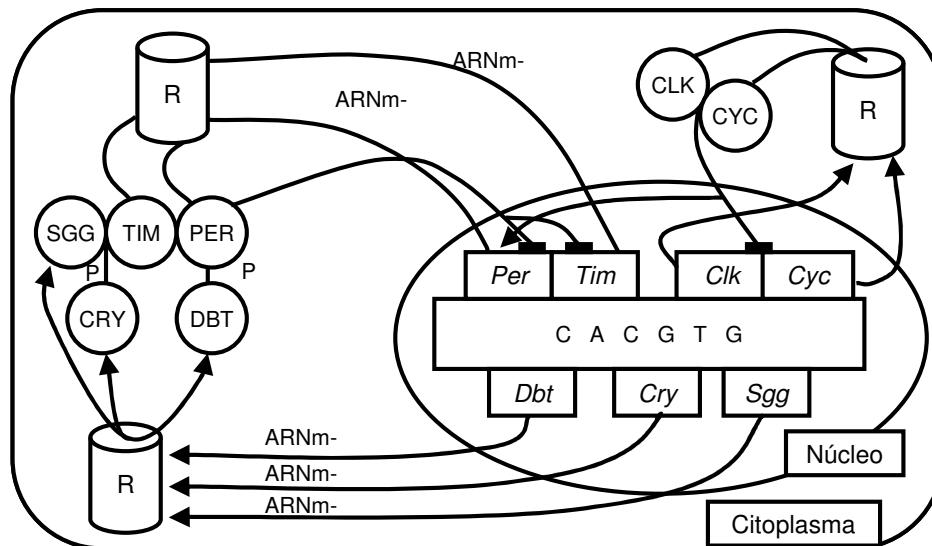


Figura 1 Esquema ilustrativo de las interacciones genómicas subyacentes a la generación del ritmo circadiano en células de insectos. Como puede verse, el mecanismo fundamental consta de dos redes de retroalimentación negativa. Las proteínas Per y Tim por una parte, y Clock (CLK) y Cycle (CYC) por otra, inhiben la expresión de los genes correspondientes. Además otras proteínas, como Doubletime (DBT) y Shaggy (SGG), aceleran la fosforilación (P) de TIM y PER. Hay interacciones positivas del dímero CLK-CYC con per y tim. El gen cry es sensible a la luz. R, ribosomas. Interacciones negativas (\perp); interacciones positivas (\rightarrow) (vease texto). (Aréchiga H., 2003).

Se han identificado, tanto en insectos como en mamíferos, otros genes que contribuyen a regular con gran finura la red fundamental de retroalimentación. Una técnica que ha resultado de gran utilidad para identificar genes comprometidos con la ritmicidad es el acoplamiento a “genes reporteros” que expresan proteínas fluorescentes, como la luciferasa (Brandes y cols., 1996).

Después del descubrimiento de *per* y *tim*, se ha caracterizado un complejo conglomerado de genes, cuyas proteínas promueven o reprimen la expresión de *per*. Otros dos genes del sistema son *Clock* (*clk*) (Circadian locomotor output cycle kaput) y *cycle* (*cyc*), que codifican proteínas con capacidad de unión al ADN. Estas dos proteínas se heterodimerizan y se unen directamente a los elementos promotores de *per* y *tim*, y activan su expresión. Esta activación es inhibida luego por Per y Tim, con lo que se cierra la red. Pero la red es todavía más compleja y se han identificado otros componentes: *doubletime* (*Dbt*), *shaggy* (*Sgg*) y *crille* (*Cry*), que codifican cinasas que se asocian con el complejo Per-Tim, y contribuyen a fosforilarlo y, con ello, hacerlo inestable y acelerar su degradación (Fig. 1).

En este proceso interviene la acción de proteosomas. Así, en el caso de *Drosophila*, durante el día, cuando Per se sintetiza en el citoplasma, forma un complejo estable con Dbt y Tim; entran al núcleo, al comienzo de la noche, y reprimen la transcripción de *per* y *tim*, con lo cual se reduce la síntesis del complejo Per-Tim-Dbt. Concomitantemente a la formación del complejo, Dbt promueve la fosforilación de Per, lo que causa su inactivación, y con ello se reactiva la expresión de *per* y *tim*. Por su parte, Sgg promueve la fosforilación de Tim. Finalmente, Cry, un factor de transcripción del zipper básico de leucina, cicla en la misma fase que Per y Tim y se le atribuye una función represora de *per* y *tim*. En *Drosophila*, Cyc no cicla; en cambio, Clk sí lo hace, casi en antifase con Per y Tim; así, Per promueve la transcripción de *clk* y da lugar a una segunda red. (Aréchiga, 2003).

Como ya se mencionó, otro gen importante en este modelo, es *cry* (por cifrar una proteína parecida a los criptocromos de plantas), que es sensible a la luz, e influye sobre la fosforilación de Per y Tim acelerando su degradación. Participa, así, en la sincronización del ritmo circadiano. Así pues, se trata de dos redes con elementos, tanto represores como activadores, que le confieren gran capacidad de regulación al sistema. (Aréchiga, 2003).

Hay muchos aspectos desconocidos en este modelo: El papel(es) de la proteína Per como un factor de transcripción que controla la fase y el periodo del RNAm de *per* necesita ser aclarado, la naturaleza de la retroalimentación así como los mecanismos de control de la transcripción y de la post-transcripción son desconocidas. El papel de *per* y otros genes que controlan varios ritmos circadianos tampoco está determinado. A pesar de las limitaciones, los descubrimientos sobre los mecanismos moleculares han sido contribuciones sustanciales para nuestro entendimiento de los procesos que subyacen a la ritmicidad. El funcionamiento del reloj puede ser entonces una propiedad emergente de diferentes actividades realizadas por la célula, con mecanismos de regulación que oscilan espontáneamente y que generan modificaciones que pueden formar un ciclo circadiano. De acuerdo con este modelo, se necesitan múltiples sistemas para construir la función del reloj.

Alternativamente, el reloj puede consistir de uno o más elementos especializados, cuya principal función es la generación de una señal circadiana. De acuerdo con el modelo la pérdida de esos elementos podría afectar únicamente al reloj y podría validar el hablar de “moléculas del reloj” y de “genes del reloj”.

Aaronson (1994) y sus colegas tienen evidencia en el hongo *Neurospora crassa* de un segundo ejemplo de este tipo de autorregulación en el “gen del reloj”, el gen de frecuencia (*frq*) que afecta la formación circadiana de esporas (conidiación) del hongo. Al igual que para *per*, se han aislado tanto el alelo de periodo largo como el de periodo corto. Como resultado el reloj de los organismos corre con mayor o menor velocidad que el tipo

silvestre, o normal y se han encontrado también organismos mutantes nulos para *frq*, donde los mutantes tienen dificultad para expresar un ritmo claro en condiciones de oscilación libre. (Aaronson y cols. 1994).

LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL ACOCIL

En la búsqueda por entender el funcionamiento del reloj biológico hemos utilizado un modelo vivo que nos ha permitido estudiar, de forma indirecta, el mecanismo de relojería que subyace a los ritmos circadianos. Este modelo es el acocil *Procambarus clarkii*, especie que, como muchas otras de acociles ha demostrado ser excelente modelo biológico debido a su capacidad de sobrevivir bajo las condiciones artificiales requeridas para registros a largo plazo (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993). Su sistema nervioso es grande y de fácil acceso lo que ha facilitado el registro de algunos ritmos circadianos que han sido descritos y caracterizados en detalle (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993).

Uno de estos ritmos circadianos es el que muestran las células fotorreceptoras visuales en respuesta a estímulos luminosos (es decir, el ritmo de amplitud del electroretinograma, ERG), el cual se ha estudiado en diferentes condiciones: en oscilación libre (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981); durante la aplicación de estímulos luminosos sincronizantes únicos (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983); o periódicos (Fuentes-Pardo y cols., 1997); en diferentes etapas del desarrollo ontogenético del acocil (Fanjul-Moles y cols., 1992; Lara-Aparicio y cols., 1993); en preparaciones aisladas (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Hernández O. H. y Fuentes-Pardo, 2001); en relación con estímulos no luminosos (Verde y Fuentes-Pardo en preparación).

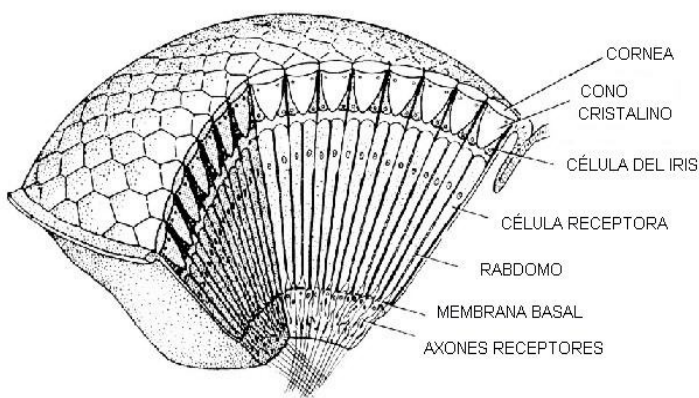
Otro ritmo bien caracterizado es el de actividad locomotora el cual también ha sido estudiado en oscilación libre (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981); durante la aplicación de estímulos luminosos (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994; Fuentes-Pardo y cols. 1996; Viccon-Pale y cols., 1997); durante el desarrollo ontogenético (Fuentes-Pardo y cols., 2001).

A pesar de que en éstos y muchos otros trabajos se aborda el tema de la organización que subyace a los sistemas responsables de la actividad periódica en el acocil, no se ha podido establecer con precisión qué estructuras conforman tales sistemas. De algunos de estos trabajos se puede inferir que en el acocil existen, por lo menos, dos estructuras fuertemente implicadas en la generación y expresión de la actividad circadiana: el sistema órgano X-glándula sinusal (contenido en el tallo ocular) y el ganglio cerebroide, en particular en la región que se conoce como protocerebro.

LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA VISUAL DEL ACOCIL

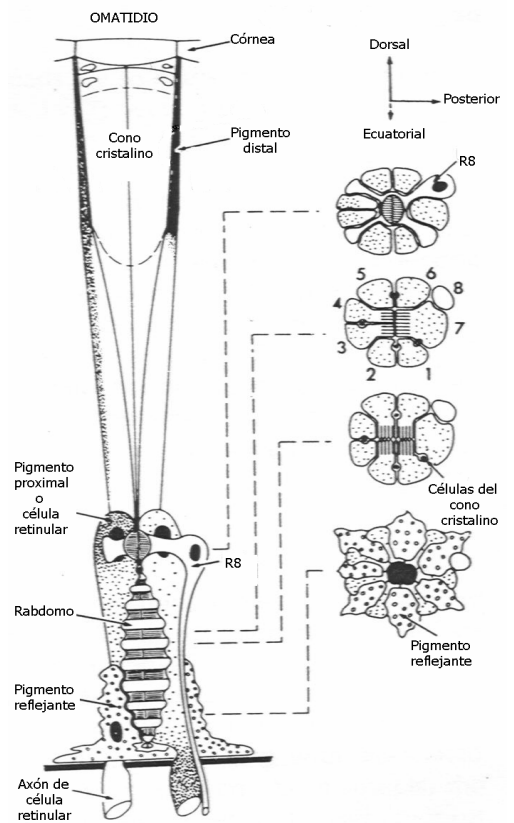
EL OJO COMPUESTO

En el acocil la omatidia es la unidad visual del ojo compuesto y esta formada por los fotorreceptores o células retinulares en donde se lleva a cabo el proceso de fototransducción; los fotorreceptores son estructuras especializadas en la captación de la energía luminosa la que transforma en señales eléctricas susceptibles de ser manejadas por el sistema nervioso; hay ocho en cada omatidio y su membrana presenta prolongaciones con pliegues o microvellosidades en las que se encuentra el pigmento fotosensible, la rodopsina (Wald, 1968). La fusión de las prolongaciones llamadas rabdómeros, constituyen el rabdomo, sitio en el que se lleva a cabo la transformación de la señal luminosa en señal eléctrica. (Fig. 2).



Estructura básica de un ojo compuesto, mostrando la constitución de los elementos de la omatidia. Modificado de Duke-Elder (1958)

Figura 2: Estructura del omatidio de crustáceos decápodos e insectos. (Shaw S. y Stowe S., 1982)



Al incidir la luz sobre los fotorreceptores retinianos se genera en ellos una respuesta eléctrica, el potencial de receptor. Si por medio de un registro extracelular se registra la respuesta eléctrica a la luz de un cierto número de fotorreceptores, se obtiene un electroretinograma.

Las células retinulares tienen axones que emergen desde el extremo proximal de la retínula, atraviesan la membrana basal y se proyectan hacia la lámina ganglionar donde establecen la primera sinapsis de la vía aferente.

El componente parareceptor está formado por una serie de estructuras localizadas en regiones cercanas a los fotorreceptores y que desempeñan un papel fotorregulador importante. Estas estructuras corresponden a las células del pigmento distal, las propias células fotorreceptoras, ya que en ellas está contenido el pigmento proximal y el pigmento de reflexión formado de cristales de pteridinas y pirimidinas que se ubican sobre la membrana basal. (Kleinholz, 1961).

La función reguladora de los tres pigmentos accesorios se expresa claramente mediante la migración que muestran los pigmentos distal y proximal hacia el centro de la célula retinular durante la iluminación o hacia los polos de la célula durante la oscuridad. En el primer caso el pigmento de reflexión quedaría cubierto por los pigmentos proximal y distal, lo que equivale a decir que la luz incidente tendría muy poca posibilidad de ser reflejada, en estas condiciones se tiene una “pseudopupila” pequeña. Si los pigmentos migran hacia los polos de las células retinulares, la luz incidente es reflejada en buena medida por el pigmento de reflexión y se genera así una pseudopupila de mayor tamaño.

La formación de la retina y del tallo ocular en el acocil ha sido descrita recientemente por Halfner y Tokarski (1998). El desarrollo de los ojos comienza en el final de la zona ventral anterior del embrión, desde los primordios ópticos. La retina se forma por la proliferación y diferenciación de células en la superficie del ectodermo que cubren el primordio óptico. Esta capa superficial de células post-mitóticas se organizan en dos racimos de células omatidiales.

Durante la diferenciación de la omatidia, se forman tanto las células retinulares como las células del pigmento distal sin que tengan en el citoplasma pigmento protector de blindaje. Inicialmente la pigmentación forma una banda arqueada en el borde lateral de la retina en desarrollo (Hafner y cols., 1982). Esta banda aparece cuando ya hay un 75% del desarrollo embrionario, y esta presente el rabdomo en el omatidio. Sin embargo, la recién formada región no pigmentada, continuación de esta banda, contiene los jóvenes rabdomos. El desarrollo del ojo embrionario en los primeros estadios contiene una banda de pigmento cubriendo levemente menos de la mitad de la retina. La retina completa su desarrollo durante los subsecuentes estados post-embrionarios completando la pigmentación.

Un proceso fundamental en el desarrollo de la retina y la diferenciación de los fotorreceptores en todos los animales es la síntesis del pigmento visual “opsina” y su incorporación dentro de las membranas especializadas en la recepción luminosa. Los eventos de genética molecular involucrados en el desarrollo de la retina y la expresión de genes de rodopsina han sido más extensamente estudiados en *Drosophila*. (Hafner y cols., 2003).

EL TALLO OCULAR

Entre el ojo y el sistema nervioso hay una estrecha relación estructural y funcional, de tal manera que los axones de las células retinulares se proyectan inmediatamente a su salida de la omatidia hacia la masa de tejido nervioso que ocupa la parte central del tallo ocular. En esta estructura se localizan cuatro ganglios distintos colocados de tal forma que constituyen una serie que se extiende desde la retina hasta el ganglio cerebroide.

El primer ganglio recibe el nombre de “lámina ganglionar” es relativamente delgado y en él se han descrito cuatro capas neuronales próximas a la base del omatidio (Bullock y Horridge, 1965). En cada una de estas capas los somas ocupan una porción superficial con las ramificaciones hacia la región central donde forman un neuropilo. Las fibras que salen de este ganglio conectan con el segundo ganglio llamado “médula externa”, el que es ligeramente más grueso que el anterior y en el que se encuentran somas neuronales que forman una masa puntiforme y axones que se proyectan hacia el tercer ganglio, la “médula interna”. Este ganglio tiene forma esférica similar a la del segundo ganglio y como él, está formado por somas periféricos y un neuropilo central. La conexión que establece con el cuarto ganglio o “médula terminal” es bastante irregular. Este último ganglio es el más grande de todos y mantiene la misma organización básica de los anteriores con un neuropilo en el centro y somas neuronales en la superficie. Las fibras que emergen del cuarto ganglio forman parte del nervio óptico y se proyectan directamente hasta el lóbulo óptico del ganglio supraesofágico (Sandeman y cols., 1992). (Fig. 3).

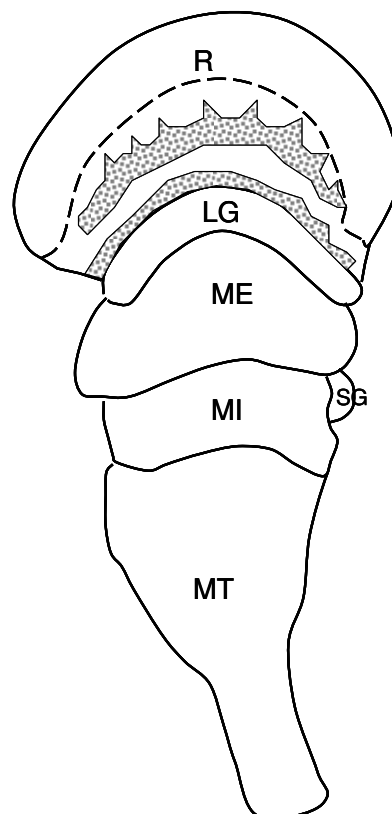


Figura 3: Estructura del tallo ocular de crustáceos decápodos. (Rodríguez-Sosa y cols., 1990)
Retina (R), lámina ganglionar (LG), médula externa (ME), médula interna (MI), glándula sinusal (SG), médula terminal (MT).

SISTEMA ÓRGANO X- GLÁNDULA SINUSAL

Desde hace tiempo se ha propuesto que uno de los posibles marcapasos circadianos del acócil se ubica en el tallo ocular, particularmente en el complejo que forman el órgano-X y la glándula sinusal. Este sistema es un complejo neuroendócrino donde las células del órgano X liberan, por exocitosis, neurosecreciones de muy diversa naturaleza química hacia la glándula sinusal, órgano neurohémico que libera periódicamente tales secreciones hacia la circulación general. (Fig. 4)

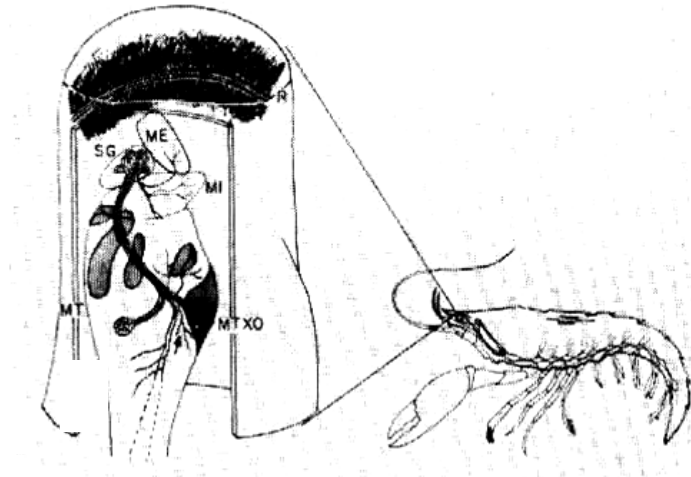


Figura 4: Estructura del tallo ocular de crustáceos decápodos. Mostrando el sistema órgano-X glándula sinusal. (Aréchiga y Rodríguez-Sosa., 1998)
Retina (R), médula externa (ME), médula interna (MI), glándula sinusal (SG), médula terminal (MT), órgano X (XO).

GANGLIO SUPRAESOFÁGICO

El ganglio cerebroide o supraesofágico integra la información visual (y de otros sentidos) en regiones específicas que se describirán a continuación. Son tres las principales divisiones del cerebro de los crustáceos denominadas protocerebro, deutocerebro y tritocerebro cada una de ellas formada de diferentes neuropilos y fibras quiasmáticas. El ganglio cerebroide conecta a su vez con el ganglio subesofágico, mediante las comisuras circunesofágicas.

PROTOCEREBRO

El protocerebro puede ser convenientemente subdividido en tres partes: el ganglio óptico, el protocerebro lateral y el protocerebro medio. El ganglio óptico contiene los neuropilos que ayudan en el procesamiento de la información recibida por los fotorreceptores y que ya se describieron con anterioridad (la lámina, la médula externa y la médula interna). El protocerebro lateral contiene dos neuropilos, la médula terminal que contiene células neurosecretoras del órgano X que se une a un órgano neurohémico que se conoce como la glándula sinusal para constituir juntos uno de lo más importantes sistemas neuroendócrinos de los crustáceos. El segundo neuropilo es el cuerpo hemielipsoide, que se ha postulado como un órgano homólogo al cuerpo pedunculado de los insectos.

El protocerebro medio está formado por dos pares de neuropilos, los anteriores y los posteriores los cuales se ubican a cada lado de la línea media del protocerebro. Los dos anteriores están conectados por el puente protocerebral y las dos partes anteriores y posteriores por el cuerpo central (Fig. 5).

DEUTCEREBRO

El deutocerebro está formado por el lóbulo olfatorio, un lóbulo esférico que contiene áreas densamente empaquetadas por campos sinápticos que se apiñonan hacia el centro de la esfera. El lóbulo olfatorio recibe las terminaciones aferentes primarias de los quimiorreceptores del primer par de antenas (antenas I). Además se encuentran los neuropilos laterales de las antenas I, las cuales consisten de dos claras subdivisiones que reciben diferentes mecanorreceptores, estatocistos y quimiorreceptores no estáticos, y contienen campos sinápticos de neuronas motoras que controlan los movimientos de las antenas. Otros neuropilos del deutocerebro son los neuropilos del segundo par de antenas (antenas mediales I), y los lóbulos accesorios, que suelen ser más grandes que los lóbulos olfatorios, los neuropilos de las comisuras deutocerebrales, y los tractos globulares accesorios (Fig. 5).

TRITOCEREBRO

La región última del ganglio cerebroide se denomina tritocerebro la cual está compuesta de los neuropilos de las antenas II, el neuropilo tegumentario, que son nervios aferentes de diferentes regiones del caparazón dorsal y los tractos esofágicos. (Sandeman y cols., 1992). (Figura 5).

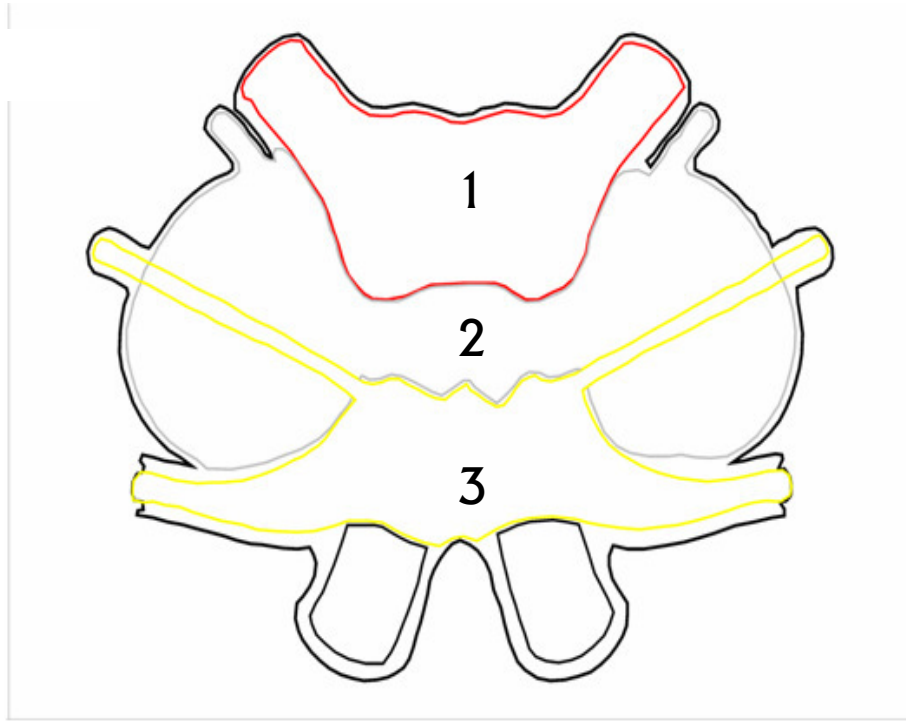
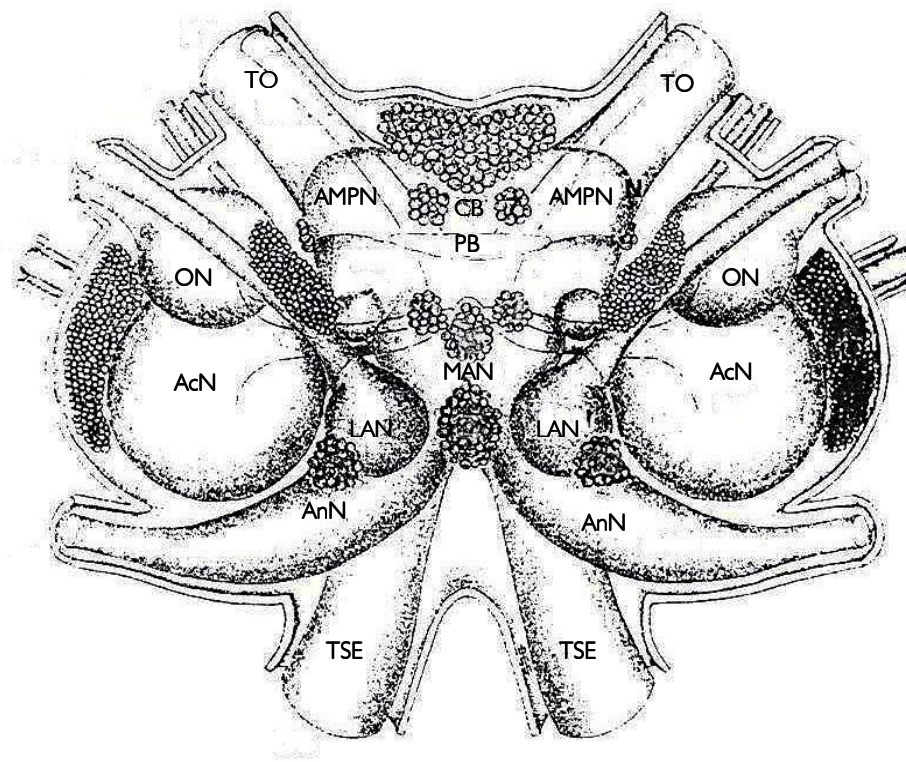


Fig. 5: Estructura del ganglio cerebroide de *Procambarus clarkii*. (Sandeman y cols., 1992)

1.- Protocerebro
2.- Deutocerebro
3.- Tritocerebro



TO	Tracto óptico
AMPN	Neuropilos mediales anteriores
CB	Cuerpo central
PB	Puente protocerebral
ON	Lóbulo olfativo
AcN	Lóbulo accesorio
MAN	Antenas mediales
LAN	Neuropilo antenular lateral
AnN	Neuropilo de antenas II
TSE	Tracto circunesofágico

LA ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA LOCOMOTOR

La actividad más comúnmente estudiada del comportamiento del acocil es la actividad motriz. Se conoce que la actividad motriz en muchas especies muestra variaciones cíclicas, siendo las más evidentes las de tipo circadiano.

Los estudios de comportamiento necesariamente expresan conductas motoras, las cuales suelen mostrar periodicidades de tipo circadiano. En el acocil, por ejemplo, se despliega una gran variedad de actividades motoras que reflejan fundamentalmente cambios en el sistema circadiano; caminar, correr, comer, pelear, todas estas son conductas que se llevan a cabo de modo discreto en sistemas de centros nerviosos y endócrinos (aunque no necesariamente bien establecidas). Esto implica que sin importar que sea un centro nervioso o un centro endócrino, los animales tienen actividades rítmicas con diferentes propósitos adaptativos.

En el caso del acocil, se trata de un crustáceo decápodo, cuyo sistema nervioso está distribuido en forma de ganglios; el ganglio supraesofágico o cerebroide, que se encarga de la integración de la información sensorial de la cabeza, controla las antenas 1 y 2, los ojos, la información táctil, pulsátil, olfativa, etc. Este ganglio se comunica a su vez por dos comisuras circumesofágicas que rodean a la boca y despliegan una gran cantidad de nervios y axones que regulan algunas funciones digestivas, excretoras. Estas dos grandes comisuras se vuelven a unir en el ganglio subesofágico, que también se le conoce como ganglio estomatogástrico y que controla la mayoría de movimientos masticadores, incluyendo las mandíbulas, los pleópodos oxigenadores y masticadores etc. procesos digestivos, reproductores, respiratorios y circulatorios principalmente.

A continuación existen cinco ganglios más que corren ventralmente conectados entre sí por cientos de fibras; cada ganglio controla diferentes procesos pero se dice comúnmente que son ganglios torácicos o caminadores ya que controlan las quelas y las patas caminadoras (pleópodos), también birramias, unas de ellas (los endopoditos) forman las branquias. En la parte caudal están otros cinco ganglios de menor tamaño que los anteriores y que controlan los músculos de la cola y el telson, además de las patas nadadoras birramias o pereiópodos. (Fig. 6).

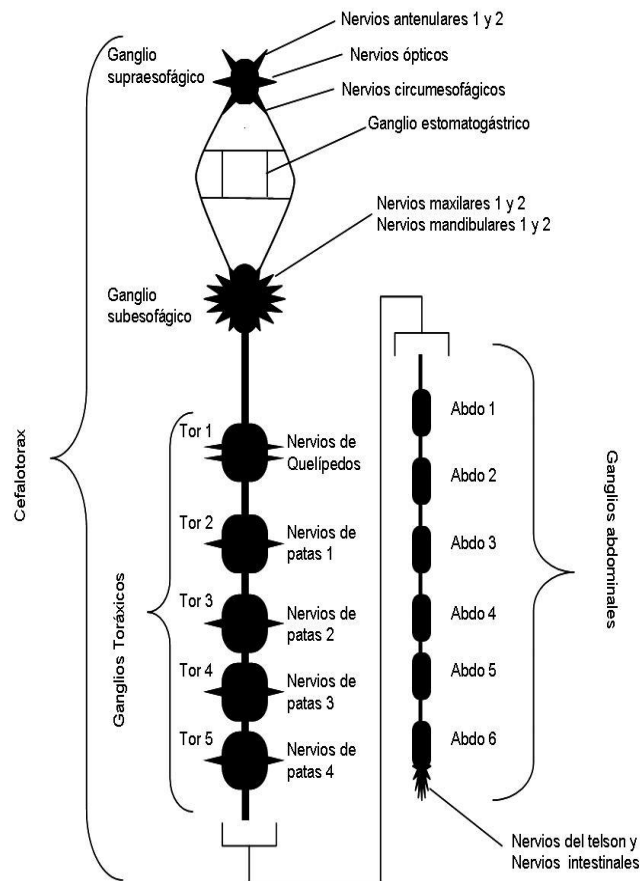


Figura 6: Estructura del sistema nervioso central del acocil *Procambarus clarkii* se muestra sus regiones, ganglios y raíces nerviosas que lo conforman.

HORMONA DISPERSORA DEL PIGMENTO

Los ojos compuestos de los crustáceos cuentan con un complejo sistema de pigmentos de protección y de reflexión a la luz. Es de particular interés el pigmento retiniano distal alrededor de los conos cristalinos del omatidio. Dependiendo de las condiciones de iluminación ambiental, el pigmento distal migra desde las zona polares a la central dentro de las células pigmentarias, modificando la cantidad de luz y protegiendo a las células receptoras. Esos movimientos están bajo el control de una de varias formas de una molécula que actúa tanto como una hormona de adaptación a la luz y como un pigmento dispersor del pigmento de los cromatóforos (cromatoforotropina). La hormona fue nombrada formalmente como “hormona de adaptación a la luz” (HAL) (Kleinholz y cols. 1962), después se conoció como “hormona del pigmento retiniano distal” (HPRD) y ahora es conocida como “hormona dispersora del pigmento” (HDP) (Kleinholz y cols. 1986).

Los antecedentes acerca del papel de la HDP en crustáceos están relacionados con el desarrollo de la cronobiología de los crustáceos. El papel de la HDP como precursor hormonal fue estudiado por Köller (1925 y 1927) y colaboradores. Las primeras investigaciones mostraron que había algunas sustancias presentes en la hemolinfa de crustáceos que provocaban el cambio de coloración en la epidermis. Perkins (1928) y Carlson (1935) encontraron que la inyección de extractos de los tallos oculares revertía el cambio de color inducido previamente en *Palaemonetes* y *Uca pugilator*. Al mismo tiempo, Welsh (1930) observó cambios periódicos en la migración del pigmento retinal de la langosta *Macrobrachium*. Basados en estos procedimientos experimentales se llegó a la conclusión de que el sistema nervioso central así como algunos elementos sanguíneos, están involucrados en la persistencia del ritmo del pigmento distal.

Los trabajos de Kleinholz (1966) mostraron que la luz provoca la migración de los pigmentos: extractos crudos de tallos oculares de varios crustáceos, inyectados a langostas *Palaemonetes* puestas en oscuridad “provocó la migración de los pigmentos distales y de reflexión a la posición de adaptación a la luz”. Además, propuso que la sustancia activa probablemente provenía de la glándula sinusal. En 1939, Welsh propuso la existencia de una relación entre la presencia de una hipotética hormona producida en los tallos oculares del acocil *Cambarus bartoni* y los cambios diarios en la posición de los pigmentos retinianos. Después, el mismo autor propuso que el ritmo circadiano motor del acocil *C. bartoni* se modifica por la aplicación de los extractos oculares de los tallos oculares (Welsh, 1939).

Fue el grupo de Brown y colaboradores (Welsh, 1941; Brown y Edestron, 1940; Brown y Wulff, 1941; Brown y Saigh, 1946) quien presentó evidencias concluyentes acerca de una hormona antagonista que controla los cromatóforos de los crustáceos en la langosta *Crangon crangon*. Los dos factores hormonales fueron la hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH) y la hormona dispersora del pigmento (HDP).

DISTRIBUCIÓN DE LA HDP EN CRUSTÁCEOS

Se han usado varias técnicas para establecer la presencia de la HDP en diversas especies de crustáceos. Por ejemplo, se usaron bioensayos para medir el contenido de HDP en el tallo ocular de crustáceos. Estas investigaciones abrieron el camino para conocer la distribución y posterior cuantificación de la HDP (Rao, 1985). Estudios inmunocitológicos, usando antisuero de conejo contra β -HDP revelaron la presencia de neuronas HDP-inmunorreactivas en el sistema nervioso del cangrejo *Carcinus maenas* (Dircksen y cols., 1987). Los autores encontraron que la HDP está asociada a gránulos en la membrana; los gránulos positivos a otras hormonas como la hormona hiperglucemiante aparecen en axones adyacentes (Mangerich y Keller, 1988). Los autores pudieron encontrar que la HDP se asocia con figuras exocíticas en forma de orquillas (Ω), en terminales ascendentes de la lámina basal. Otro hecho interesante es que tres días de oscuridad continua causan un incremento en el contenido de los gránulos en los axones y estos a su vez se engrosan al aproximarse a la glándula sinusal.

La distribución de la HDP en los tallos oculares ha sido estudiada en dos decápodos: *Carcinus maenas* y *Orconectes limosus* (Mortin y Marden, 1991). En ambas especies numerosos somas de neuronas inmunoreactivas a HDP se encontraron en la base de la lámina ganglionar, entre la médula interna y en la médula terminal, dorsalmente o centralmente (25-31 somas en *C. maenas* y 20-25 en *O. Limosus*). La arborización de las células es similar en ambas especies. Las células están localizadas en la base de la lámina que se ramifican a la misma. Las células colocadas entre ambas médulas (la interna y terminal) tienen ramificaciones originadas en todo el tallo. Las fibras están distribuidas en varios niveles algunas distribuidas tangencialmente y llegan de modo restringido. Un importante descubrimiento es que en algunas especies (*Carcinus maenas*, *Orconectes limosus*, *Cancer pagurus* y *Uca pugnator* (Mangerich y Keller, 1988)), algunas células colocadas entre la médula interna y la médula terminal mandan axones sobre la superficie de la médula interna a la glándula sinusal, donde tienen pequeñas terminales neurosecretoras, que son usualmente esparcidas. Las mismas estructuras están analizadas con microscopía electrónica. Las fibras van en dirección proximal al deutocerebro, por una ruta paralela al nervio óptico.

La distribución de HDP en el sistema nervioso central (SNC) fue primeramente estudiada en *C. maenas* y *O. limosus* (Dircksen y cols. 1987). Como en el caso de los lóbulos ópticos, la distribución de las células y los patrones generales de arborización en el SNC son similares en ambas especies estudiadas. En el ganglio cerebroide, las células están presentes en dos regiones: anteromedialmente (6 células), y posteriorlateralmente (llamada *soma angular*, 4 células). En *O. limosus*, el ganglio subesofágico presenta células con HDP en las regiones anterior y posterior (dos células bilateralmente en cada terminación).

BIOQUÍMICA DE LA HDP EN CRUSTÁCEOS

La presencia de la hormona dispersora del pigmento a través de distintos neuropilos sugiere que su papel podría ser de un neurotransmisor/neuromodulador necesario en las células. La HDP en el ganglio cerebroide y en los cordones nerviosos ventrales indica a favor de esta aserción. La presencia de HDP a través del sistema nervioso, se ha encontrado por diferentes autores en diversos trabajos que sugieren la función de un neuromodulador y neurotransmisor (Yang y cols. 1999; Mangerich y Keller, 1988).

La HDP fue aislada para sus primeros estudios por Fernlund en 1971 (Fernlund 1971; 1976) de los tallos oculares de *Pandalus borealis*. Tiempo después, la HDP fue aislada y secuenciada de varias especies de crustáceos: *Cancer magister* (Kleinholz y cols. 1986), *Pandalus aztecus* (Phillips y cols. 1988), y *Penaeus japonicus* (Yang y cols. 1999). Todas las hormonas dispersoras son octadecapéptidos y difieren entre ellas en su potencia para la dispersión de los pigmentos accesorios y tegumentarios, debido a la posición de alguno de sus aminoácidos. Particularmente, la HDP obtenida de *P. borealis*, difiere de todas las otras en más de 6 posiciones de los 18 residuos de aminoácidos. Esta HDP en *P. borealis* está referida como α -HDP y todas las otras son conocidas como β -HDP. De acuerdo a muchos estudios, se ha propuesto que hay una diferencia en la potencia entre la α -HDP y la β -HDP debido a la diferencia en los aminoácidos en la posición 3 (Gly en α -HDP y Glu en β -HDP) (Rao, 1985; Rao y cols. 1987; Rao y Riehm, 1988; 1989; Riehm y cols. 1985; Semmes y cols. 1985; Jorenby y cols. 1987). En la Tabla I se muestran las secuencias de aminoácidos de diferentes HDP encontradas en diferentes crustáceos. (Tabla I).

<i>Penaeus vannamei</i>	N S E L I N S L L G I P K V M N D A NH ₂
<i>Penaeus aztecus</i>	N S E L I N S L L G I P K V M N D A NH ₂
<i>Penaeus vannamei</i>	N S E L I N S L L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Uca pugilator</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Carcinus maenas</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Cancer magister</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Callinectes sapidus 1</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N D A NH ₂
<i>Orconectes limosus</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N E A NH ₂
<i>Orconectes immunis</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N E A NH ₂
<i>Procambarus clarkii</i>	N S E L I N S I L G L P K V M N E A NH ₂
<i>Callinectes sapidus 2</i>	N S E L I N S L L G I S A L M N E A NH ₂
<i>Pandalus jordani</i>	N S E L I N S L L G L P K V M I D A NH ₂
<i>Armadillidium vulgare</i>	N S E L I N S L L G A P R V L N N A NH ₂
<i>Achaeta domestica</i>	N S E I I N S L L G L P K V L N D A NH ₂
<i>Bombylium microptera</i>	N S E I I N S L L G L P K L L N D A NH ₂
<i>Periplaneta americana</i>	N S E L I N S L L G L P K V L N D A NH ₂

Tabla I: Secuencia primaria del octadecapéptido beta-HDP de diferentes especies de crustáceos decápodos e insectos.

EFECTO FISIOLÓGICO DE LA HDP EN CRUSTÁCEOS

La HDP fue descubierta en crustáceos y hay sólo unos cuantos trabajos acerca de su acción fisiológica. Algunos autores han estudiado la acción de la HDP en varios sistemas fisiológicos encontrando que en el acocil *Procambarus clarkii*, por ejemplo, es la responsable, tanto de su conocida acción sobre los cromatóforos, como de los cambios periódicos en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma ERG) (Moreno-Sáenz y cols., 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1992; Gaus y Stieve 1992); de los cambios periódicos en el tamaño de la pseudopupila (Hernández-Falcón y cols., 1987); así como de la actividad motora (Moreno-Sáenz y cols., 1987).

Su papel como sincronizador circadiano en el acocil *P. clarkii* ha sido recientemente descrito (Verde y cols., 2007). En el cangrejo *Chasmagnatus granulata* (Granato y cols., 2004) se ha propuesto que el ritmo circadiano de la migración de los pigmentos depende tanto del ritmo de síntesis de HDP en los tallos oculares como de la liberación de la HDP. El ritmo endógeno de la hormona es el responsable del cambio en la concentración del pigmento en los melanóforos.

En otros invertebrados, la HDP ha sido implicada en el control de los cromatóforos (Josefsson, 1975, Keller, 1992, Rao, 1992).

Se ha propuesto que la acción de la HDP en los crustáceos es un reflejo neuroendócrino que se inicia cuando la luz alcanza a los fotorreceptores y termina cuando la HDP es liberada de la glándula sinusal. Bajo el efecto de la HDP los pigmentos accesorios de protección se mueven a la posición de adaptación de la luz (Hernández-Falcon y cols., 1987, Kleinholz, 1966; Moreno-Sáenz y cols., 1992).

LA HDP EN INSECTOS

En los insectos la concentración y dispersión de los pigmento ocurre como en los crustáceos. Un octadecapéptido capaz de inducir la dispersión de los pigmentos en los cromatóforos del cangrejo *Uca pugilator* fue aislado de cabezas liofilizadas del grillo *Romalea microptera*. Es un péptido de composición 78% similar a la β -HDP de *Uca pugilator* y *Cancer magister* y 50% a la α -HDP de *Pandalus borealis* (Rao y cols. 1987). Este péptido fue denominado un factor dispersor de los pigmentos (FDP) para diferenciarlo de las hormonas dispersoras del pigmento (HDPs) producido por crustáceos. Comparando la FDP y la HDP de los crustáceos, quedó clara una secuencia evolutiva en la organización de crustáceos a insectos.

Desde los trabajos de Rao y cols. (1987) hasta la fecha, muchos autores han estado interesados en buscar neuronas inmunorreactivas a FDP en el sistema nervioso de los insectos. Así, se ha estudiado la distribución de la FDP en células, fibras y diferentes partes del sistema nervioso en más de 40 especies de varias clases de insectos.

RECEPTOR DE FDP

En *Drosophila*, la FDP es secretada de manera circadiana en el cerebro dorsal; cuando se detienen la expresión ectópica de FDP, se modifica el ritmo; cuando se muta la expresión de FDP, se producen tanto una arritmia como periodos alterados. Las moscas con elevados niveles de FDP presentan periodos largos, mientras que las que tienen niveles escasos exhiben periodos cortos (Renn y cols., 1999). Estos resultados sugieren que la FDP tiene una retroalimentación sobre las propias neuronas marcapaso.

Hasta hace poco tiempo algunos autores empezaron la búsqueda de un receptor a FDP en particular; Taghert y sus colegas identificaron un posible candidato; los primeros resultados apuntaron a una serie de moléculas que forman una familia llamada GPCRs de las cuales encontraron 44 posibles receptores a partir del genoma de *Drosophila*. Todas estas proteínas forman péptidos transmembranales con siete dominios acopladas a una proteína G en su dominio intermembranal. Taghert y sus colaboradores decidieron sistemáticamente probar los 32 mejores candidatos, por su sensibilidad a la FDP, y después de probar a 26 candidatos en un ensayo de membrana *in vitro* identificaron un receptor codificado por CGI3758. El receptor mostró una alta sensibilidad a 24 formas de FDP (Mertens y cols., 2005).

CGI3758 es parte de una subfamilia de receptores clásicamente hormonales. Todos los miembros de esta subfamilia están regulados por AMPc acoplado a adenilatociclasa a través de la estimulación de una proteína G. Después de la caracterización farmacológica de CGI3758, Mertens y cols., (2005) determinaron sus patrones de expresión por inmunocitoquímica encontrando que hay grupos de neuronas asociadas al marcapaso así como en los cuerpos celulares del protocerebro lateral y dorsal, así como en el ganglio subesofágico. Otros grupos como Hyun y cols., (2005) y Lear y cols., (2005) han llegado a resultados similares con mutagénesis dirigida para CGI3758. Incluso experimentos de hibridación *in situ* con antisuero para CGI3758 reveló que en el cerebro dorsal hay neuronas marcapaso dorsales con terminales a FDP. (Helfrich-Förster, 2005)

ANTECEDENTES DIRECTOS

En años recientes, la FDP se ha relacionado de forma importante con la actividad de los marcapasos circadianos en invertebrados. Algunos estudios a nivel molecular han puesto de manifiesto que al menos un par de marcapasos circadianos son los responsables del ritmo circadiano motor en *Drosophila*, se encuentran en el complejo central abarcando hasta la médula accesoria. En esta región existe un pequeño grupo de neuronas llamadas neuronas laterales que contienen la proteína PER (Siwicki y cols., 1989). Las mismas neuronas son inmunorreactivas a la HDP (Helfrich-Förster y Homberg, 1993; Helfrich-Förster, 1995). Este hecho se ha interpretado en el sentido de que las neuronas que contienen esta hormona estarían fuertemente implicadas en la actividad circadiana de estos organismos, ya sea en forma directa o mediante la influencia que ejercerían sobre la actividad de PER.

Estudios en el lóbulo óptico de algunos crustáceos como *Carcinus maenas* (Dirksen y cols., 1987) y *Romalea microptera* (Rao y Riehm, 1989) han demostrado inmunorreactividad a la HDP en interneuronas y células neurosecretoras que tienen sus terminales en la glándula sinusal. Esta misma sustancia también ha sido localizada en axones y fibras nerviosas que interactúan con otros neurotransmisores y neuromoduladores (Mangerich y cols., 1987).

La FDP se ha relacionado en forma importante con la actividad de marcapaso que, se supone, posee la médula accesoria del ganglio cerebroide de los insectos (Stangel y Homberg, 1994; Helfrich-Förster, 1995). En la cucaracha *Leucophaea maderae*, por ejemplo, las arborizaciones de neuronas inmunorreactivas a la FDP localizadas en el cerebro medio se han correlacionado con la presencia de actividad circadiana locomotriz en esta especie (Petri y Stengel, 1997).

En experimentos de lesión de los tallos oculares de cucaracha, al desaparecer las arborizaciones de las neuronas también desaparece la oscilación circadiana; más aún, los organismos en los que se regeneran las arborizaciones inmunoreactivas a FDP, presentan claras muestras de recuperación de la conducta periódica motriz (Stangel y Homberg, 1994).

En otros experimentos se ha demostrado que la HDP aplicada localmente en los sitios de la médula accesoria identificados como generadores del ritmo circadiano motor de la cucaracha *Leucophaea maderae*, produce esencialmente atrasos de fase del ritmo que dependen de la hora de aplicación de la hormona (Petri y Stengel, 1997). Esto implica que, por lo menos en esta especie, la HDP funciona como un sincronizador no-luminoso.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los ritmos circadianos ha sido abordado de múltiples maneras por un gran número de investigadores; sin embargo, poco se conoce sobre la ubicación de las estructuras que conforman las partes del reloj biológico en invertebrados, así como su funcionamiento. En este trabajo pretendemos ahondar en estos dos aspectos (ubicación y funcionamiento del reloj circadiano) para lo cual utilizaremos al acocil *Procambarus clarkii* como modelo biológico.

Por otro lado, la hormona dispersora del pigmento parece estar ampliamente distribuida en el sistema nervioso de invertebrados y en particular de crustáceos, sin embargo no se conoce su distribución y mucho menos su funcionamiento a largo plazo en los centros generadores de ritmicidad circadiana. Durante mucho tiempo la información experimental ha sugerido que los tallos oculares son un centro importante de la ritmicidad, sin embargo, no el único. Parece ser que el ganglio cerebroide y en particular el protocerebro del acocil es otro centro generador de actividad circadiana. Muy probablemente estos centros osciladores actúen conjuntamente bajo la acción de neuropéptidos como podría ser la HDP, generando, sincronizando o regularizando el orden temporal interno de los animales.

Debido a los antecedentes que hemos presentado, nuestro trabajo establecerá la distribución anatómica de la HDP en el sistema nervioso del acocil, en particular en el ganglio cerebroide y en el tallo ocular. Debido a los trabajos de De Kleijn (1993, 1995) donde se han realizado algunos experimentos con hibridación *in situ*, se encontró ARN mensajero que codifica HDP, así como otras herramientas moleculares, creemos que estos sitios son productores de hormona. En este trabajo utilizaremos técnicas inmunológicas, las cuales resultarán una valiosa herramienta para conocer los lugares donde pudiera ubicarse “la sustancia” que hasta ahora sigue siendo el candidato más viable para ser la expresión directa de la actividad de un marcapaso en los crustáceos.

Utilizaremos una señal de peroxidasa y una señal inmunológica fluorescente para ubicar con precisión a los grupos de células que sintetizan y liberan la HDP. Las técnicas inmunohistológicas en las que se utilizará sinaptofisina así como las tinciones específicas con violeta de cresilo, se emplearán para distinguir con precisión entre los distintos tipos celulares como glía y tejido conjuntivo o muscular.

Una vez localizadas las fibras secretoras o productoras de HDP procederemos a lesionarlas, con el fin de probar la hipótesis de que son esas mismas fibras las que mediante la secreción de HDP generan y hacen posible la expresión de la actividad circadiana en el acocil.

Se harán registros a largo plazo del ERG y del ritmo motor para observar si los animales lesionados pierden la capacidad de manifestar cambios periódicos de la amplitud del ERG o cambios periódicos en la actividad motora.

Si se logra observar una pérdida de la actividad rítmica en el ERG o en la actividad motora, los registros se harán algunas semanas (al menos 10) después de la lesión, para distinguir si hay recuperación (aunque sea sólo parcial) en la capacidad de oscilar, lo que llevaría a la interpretación de una posible reconexión anatómica y funcional de los animales lesionados.

Por último, probaremos la acción de la hormona como un sincronizador de tipo no-luminoso. Para ello se aplicarán dosis únicas de HDP en diferentes momentos del día (diferentes horas circadianas) para medir la susceptibilidad del sistema circadiano en los animales en registros a largo plazo, tanto del electroretinograma así como de los movimientos espontáneos. En cada caso, se analizará el efecto (atrasos, adelantos o ausencia de cambios) producidos por la aplicación de la HDP. Con los resultados que se obtengan se construirán las correspondientes curvas de respuesta de fase a estímulos no luminosos de los ritmos circadianos motor y de respuesta a la luz.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de los ritmos circadianos ha sido abordado de múltiples maneras por un gran número de investigadores; sin embargo, poco se conoce sobre la ubicación de las estructuras que conforman las partes del reloj biológico en invertebrados, así como su funcionamiento. En este trabajo pretendemos ahondar en estos dos aspectos (ubicación y funcionamiento del reloj circadiano) para lo cual utilizaremos al acocil *Procambarus clarkii* como modelo biológico.

Por otro lado, la hormona dispersora del pigmento parece estar ampliamente distribuida en el sistema nervioso de invertebrados y en particular de crustáceos, sin embargo no se conoce su distribución y mucho menos su funcionamiento a largo plazo en los centros generadores de ritmicidad circadiana. Durante mucho tiempo la información experimental ha sugerido que los tallos oculares son un centro importante de la ritmicidad, sin embargo, no el único. Parece ser que el ganglio cerebroide y en particular el protocerebro del acocil es otro centro generador de actividad circadiana. Muy probablemente estos centros osciladores actúen conjuntamente bajo la acción de neuropéptidos como podría ser la HDP, generando, sincronizando o regularizando el orden temporal interno de los animales.

Debido a los antecedentes que hemos presentado, nuestro trabajo establecerá la distribución anatómica de la HDP en el sistema nervioso del acocil, en particular en el ganglio cerebroide y en el tallo ocular. Debido a los trabajos de De Kleijn (1993, 1995) donde se han realizado algunos experimentos con hibridación in situ, se encontró ARN mensajero que codifica HDP, así como otras herramientas moleculares, creemos que estos sitios son productores de hormona. En este trabajo utilizaremos técnicas inmunológicas, las cuales resultarán una valiosa herramienta para conocer los lugares donde pudiera ubicarse "la sustancia" que hasta ahora sigue siendo el candidato más viable para ser la expresión directa de la actividad de un marcapaso en los crustáceos.

Utilizaremos una señal de peroxidasa y una señal inmunológica fluorescente para ubicar con precisión a los grupos de células que sintetizan y liberan la HDP. Las técnicas inmunohistológicas en las que se utilizará sinaptofisina así como las tinciones específicas con violeta de cresilo, se emplearán para distinguir con precisión entre los distintos tipos celulares como glía y tejido conjuntivo o muscular.

Una vez localizadas las fibras secretoras o productoras de HDP procederemos a lesionarlas, con el fin de probar la hipótesis de que son esas mismas fibras las que mediante la secreción de HDP generan y hacen posible la expresión de la actividad circadiana en el acocil.

Se harán registros a largo plazo del ERG y del ritmo motor para observar si los animales lesionados pierden la capacidad de manifestar cambios periódicos de la amplitud del ERG o cambios periódicos en la actividad motora.

Si se logra observar una pérdida de la actividad rítmica en el ERG o en la actividad motora, los registros se harán algunas semanas (al menos 10) después de la lesión, para distinguir si hay recuperación (aunque sea sólo parcial) en la capacidad de oscilar, lo que llevaría a la interpretación de una posible reconexión anatómica y funcional de los animales lesionados.

Por último, probaremos la acción de la hormona como un sincronizador de tipo no-luminoso. Para ello se aplicarán dosis únicas de HDP en diferentes momentos del día (diferentes horas circadianas) para medir la susceptibilidad del sistema circadiano en los animales en registros a largo plazo, tanto del electroretinograma así

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

como de los movimientos espontáneos. En cada caso, se analizará el efecto (atrasos, adelantos o ausencia de cambios) producidos por la aplicación de la HDP. Con los resultados que se obtengan se construirán las correspondientes curvas de respuesta de fase a estímulos no luminosos de los ritmos circadianos motor y de respuesta a la luz.

OBJETIVO

Establecer el papel que desempeña la HDP en la generación y sincronización de los ritmos circadianos electrorretinográfico y motor del acocil.

OBJETIVOS PARTICULARES

Para establecer el papel de la hormona dispersora del pigmento en la generación de la actividad circadiana consideramos necesario localizarla en el sistema nervioso central del acocil:

1. Localizar los conjuntos de neuronas en el ganglio cerebroide y en el tallo ocular que sean inmunorreactivos a la hormona dispersora del pigmento.
2. Establecer la distribución de las ramificaciones de las neuronas antes mencionadas.
3. Lesionar las regiones del ganglio cerebroide que muestren ramificaciones inmunorreactivas a la HDP y comprobar el efecto de esta lesión en la actividad circadiana.
4. Registrar a largo plazo la actividad circadiana de la amplitud del ERG inmediatamente antes y después de la lesión de las zonas del protocerebro, en donde se ubicarían ramificaciones reactivas a la HDP, supuestamente implicadas en la generación de este ritmo.
5. Registrar a largo plazo la actividad circadiana de amplitud del ERG y motor de animales lesionados para observar las modificaciones en el ritmo del ERG y motor del acocil, dejando a los animales recuperarse por un tiempo para que se reestablezcan las conexiones nerviosas entre las estructuras lesionadas y así poder observar la reaparición de los ritmos circadianos considerados.

Para establecer el papel de la hormona dispersora del pigmento como un posible sincronizador no-luminoso o acoplador interno de la actividad circadiana consideramos necesario:

6. Construir la curva de respuesta de fase del ritmo del ERG, a partir de la aplicación exógena de HDP durante el ciclo de 24 horas.
7. Construir la curva de respuesta de fase para el ritmo locomotor, a partir de la aplicación exógena de HDP durante el ciclo de 24 horas.

HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes que se han presentado, la hormona dispersora del pigmento (HDP) es una sustancia claramente implicada en la actividad circadiana del acocil, ya que:

Neuronas del ganglio cerebroide y del tallo ocular, producen esta hormona y la liberan en forma rítmica actuando como neuronas marcapaso. La destrucción de los principales sitios productores de esta hormona da como resultado la desaparición de la actividad circadiana.

La aplicación exógena de esta hormona induce cambios de fase en la actividad circadiana del acocil. Estos hechos nos llevan a proponer a la HDP como una sustancia que se relaciona directamente con la generación y la sincronización de los ritmos circadianos en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALIDADES

ANIMALES

Se utilizaron 193 acociles de la especie *Procambarus clarkii*, adultos, sin distinción de sexo, comprados a proveedores locales, en estado de intermuda, de acuerdo con la dureza del exoesqueleto. Los animales fueron mantenidos en acuarios con agua bien oxigenada, a temperatura controlada de 16°C y alimentados con vegetales, bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LO12:12) con encendido de la luz a las 7 de la mañana.

PRESENCIA DE LA HDP EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ACOCIL

Se utilizaron 98 acociles para diferentes técnicas histológicas; 30 para la técnica indirecta de peroxidasa (PAP), 30 para la técnica de inmunofluorescencia, y 38 más para técnicas de control (hematoxilina-eosina, Vogt, sinaptofisina); en cada experimento se hicieron disecciones del sistema nervioso central y de los tallos oculares.

DISTRIBUCIÓN DE LA HDP EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL

PROCEDIMIENTO HISTOLÓGICO

Los animales fueron anestesiados por frío y sacrificados por decapitación en dos horas extremas del día, a las 12 del día y 12 de la noche. Se obtuvieron quirúrgicamente los tallos oculares y el ganglio cerebroide; se retiró el exceso de tejido conectivo manteniendo el tejido nervioso. Las piezas de material biológico fueron sumergidas en fijador de formaldehído al 10% durante 24 horas.

Una vez fijado, el tejido fue sometido a un procedimiento típico de inclusión que podía ser en parafina o en medio de congelación.

INCLUSIÓN EN PARAFINA

El proceso típico de una inclusión en parafina conlleva la deshidratación alcohólica del tejido desde el 30% hasta el 100% y luego a disolventes como el xilol, para después ser incluido en parafina líquida a 56°C. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

INCLUSIÓN EN CONGELACIÓN

El material fijado se introduce en una disolución de sacarosa al 30% durante 1 hora y una solución de sacarosa al 15% por 15 minutos, esta crio-protección mantiene estables a las células. Los órganos son colocados en pequeños viales de plástico (cápsulas beam) con líquido de congelación (tissue freezing medium); posteriormente los bloques fueron sumergidos en nitrógeno líquido por unos minutos y guardados a -70°C hasta su proceso de corte.

CORTES

Los bloques de parafina fueron cortados en un microtomo, en láminas de 10 a 15 μ m de grosor las cuales fueron colocadas en laminillas de vidrio (portaobjetos) previamente cubiertos con poli-L-lisina para mantenerlos fijos.

Los bloques de congelación fueron cortados en un crióstato a -18°C en láminas de 10 a 15 μ m de grosor las cuales fueron colocadas en laminillas de vidrio (portaobjetos) previamente cubiertas con gelatina alcohólica al 3% para mantenerlos fijos. Los cortes de tallo ocular mantuvieron una orientación longitudinal anterior-posterior, mientras que los cortes de ganglio cerebroide mantuvieron una orientación transversal dorso-ventral.

Una vez que se tenían los cortes, pasaron a una tinción específica.

TÉCNICA DE HEMATOXILINA-EOSINA

Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar los cortes se someten a la acción de la hematoxilina, colorante básico, que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfato del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, se someten a la acción de la eosina, colorante débilmente ácido, que colorea a las estructuras básicas. Como resultado, los núcleos se tiñen de color azul con la hematoxilina, mientras que la eosina tiñe de rosa más o menos intenso ciertas estructuras dependiendo de su grado de acidofilia. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

TÉCNICA DE VOGT (TINCIÓN DE GRÁNULOS DE NISL CON VIOLETA DE CRESILO)

La sustancia de Nissl consiste en gránulos que se distribuyen en todo el citoplasma del cuerpo celular excepto en la región del axón. Las micrografías muestran que la sustancia de Nissl está compuesta por retículo endoplasmático rugoso dispuesto en forma de cisternas anchas apiladas unas sobre otras. Dado que los ribosomas contienen RNA, la sustancia de Nissl es basófila y puede verse muy bien con tinción azul de toluidina u otras anilinas básicas y microscopio óptico.

En este trabajo se realizaron algunas tinciones con esta técnica para dilucidar las zonas de tallo ocular y de ganglio cerebroide donde no podían definirse como tejidos gliales, o nerviosos. La técnica demostró que las zonas laxas de protocerebro y algunas del deutocerebro son en realidad neuronas. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

TECNICA DE SINAPTOFISINA

La sinaptofisina es una glicoproteína integral ácida de 38 kDa que se une al Ca⁺⁺ de membrana, pesa y es parte de las vesículas presinápticas, con una importante función en la exocitosis. Se ha demostrado también su presencia a lo largo del pericarion de las neuronas del asta anterior medular, reflejando la riqueza de axosinapsis de la zona. También es denominada SVP38 y p38. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

PROCEDIMIENTO INMUNOCITOQUÍMICO (INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA)

Las técnicas inmunohistoquímicas se basan en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, la cual permite la identificación de una proteína (el antígeno), cuya presencia se quiere demostrar, mediante su unión con un anticuerpo específico (anticuerpo primario).

En este caso se ha utilizado el método de la inmunodetección indirecta en dos etapas. En un primer paso, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario, el cual se une a su antígeno específico donde quiera que esté presente.

En un segundo paso, se aplica otro anticuerpo (anticuerpo secundario) contra el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario está unido covalentemente (se dice que está marcado), en este caso, a la enzima peroxidasa (una enzima que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno, altamente oxidante). Finalmente, el producto de reacción de esta enzima se revela con el empleo del sustrato 3,3'diaminobencidina (DAB) el cual al oxidarse, forma un producto marrón insoluble. Este paso permite amplificar el resultado de la reacción, ya que varias moléculas del anticuerpo secundario marcado pueden unirse a una molécula del anticuerpo primario. En consecuencia, el sitio donde se localiza el antígeno presenta más moléculas de la enzima lo que permite una mejor detección de la reacción.

Los métodos inmunocitoquímicos de puente se basan en la gran afinidad que existe entre la avidina y la biotina. La avidina es una glicoproteína de 67 kDa, tetramérica, que presenta en su superficie regiones hidrofóbicas a las que se une la biotina con gran afinidad. Las cadenas glucídicas de la avidina tienen una carga tal que las hace unirse a regiones cargadas del tejido lo que aumentan el ruido de fondo. La biotina es una proteína soluble en agua (vitamina H) de peso molecular bajo (244). Presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los grupos amino de las proteínas. La biotilización es una reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas como enzimas, lectinas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. La adición de biotina no modifica drásticamente las propiedades de la molécula. La característica principal es que el anticuerpo biotilado puede ser utilizado como elemento primario (método directo), o secundario (método indirecto), y puede visualizarse mediante tres métodos diferentes:

Con avidina (o estreptavidina) marcada.

Con avidina actuando como puente para enzimas biotilados.

Con el complejo avidina-biotina-peroxidasa u otro marcador (sistema ABC).

El método ABC es el más utilizado ya que tiene la máxima sensibilidad. Requiere la preparación *in vitro* del complejo avidina-biotina-peroxidasa dejando libre al menos uno de los cuatro lugares de unión de la superficie de la avidina, para que se una a las moléculas del anticuerpo (primario o secundario). El complejo se

añade después del anticuerpo biotinilado. Otra ventaja adicional del sistema ABC es su universalidad ya que la tercera capa es siempre la misma independientemente de la especie en que se haya obtenido el anticuerpo primario.

El cromógeno más popular de la actividad peroxidásica es el tetracloruro de la diaminobenzidina (DAB). En esta reacción el agua oxigenada actúa como un sustrato enzimático y el DAB es el donante de electrones. Como resultado el DAB se oxida y forma un precipitado coloreado marrón e insoluble.

El anticuerpo primario (Anti HDP) se compró a los laboratorios Genemed Synthesis Inc. (San Francisco, California, E.U.A.) y se utilizó a una concentración de 1:5000; los kits de anticuerpos secundarios (UltraTek HRP anti-rabbit) se compraron a los laboratorios ScyTek (Utah, E.U.A.) y se utilizaron de acuerdo con las especificaciones recomendadas por ellos mismos (Ver apéndice). Como control algunas laminillas no fueron tratadas con el anticuerpo primario. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

PROCEDIMIENTO INMUNOCITOQUÍMICO (INMUNOFLUORESCENCIA)

En la actualidad existen diferentes protocolos que permiten unir anticuerpos a compuestos fluorescentes. Se utilizan numerosos fluoró cromos entre los que destacan el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), la diclorotriazinilaminofluoresceína (DTAF), el rojo Texas, el bimane y otros. Los más empleados son los dos primeros. Tienen capacidad de reacción con los grupos amino primarios de los anticuerpos en las condiciones adecuadas.

Los fluoró cromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica. Por ejemplo, el isotiocianato de fluoresceína tiene un máximo de absorción a 490 nm y un máximo de emisión a 520 nm.

Uno de los problemas de la utilización de fluoró cromos en microscopía de fluorescencia es la pérdida de ésta debido a las grandes intensidades de luz empleadas. Las muestras empleadas en esta técnica no pueden ser observadas durante largos periodos de tiempo debido a la desaparición de la fluorescencia.

La ventaja de los métodos de fluorescencia es su gran sensibilidad y poder de resolución en el microscopio de fluorescencia. Este microscopio es similar al microscopio convencional, a excepción de que la luz incidente que procede de una potente fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. La luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) atraviesa un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

El marcaje fluorescente presenta dos grandes inconvenientes:

No permite la tinción de las preparaciones, tinción de contraste, por lo que se han de visualizar por contraste de fases o contraste interferencial.

Las preparaciones tienen una corta vida por la pérdida de la fluorescencia, a pesar del uso de reactivos retardadores.

El marcaje fluorescente puede emplearse con todo tipo de métodos, directos, indirectos y de puente. La inmunofluorescencia es una técnica cuantitativa que permite comparar la señal entre preparaciones similares, aunque no permite la medida absoluta pues la señal es muy dependiente de la preservación morfológica, la accesibilidad de los anticuerpos a los lugares antigénicos, etc.

El anticuerpo fluorescente fue adquirido a los laboratorios ScyTek (Utha, E.U.A.) (Ver apéndice). Como control algunas laminillas no fueron tratadas con el anticuerpo primario. (Véase apéndice para detalles de la técnica).

GENERACIÓN DE LA RITMICIDAD BIOLÓGICA

REGISTRO DEL ERG

Durante los registros fisiológicos a largo plazo, los acociles usados en el ritmo del ERG se mantuvieron en condiciones similares al inicio del procedimiento, es decir, fueron anestesiados por frío, se les colocó una base de corcho pegado al caparazón dorsal con acrílico dental de secado rápido (Nic-ton RV5).

Los animales se sujetaron del corcho por medio de una pinza de fémur y se les introdujo en un acuario, con el fin de que el agua les cubriera las branquias. El acuario se colocó en una cámara a temperatura controlada ($16 \pm 2^\circ\text{C}$) y oscuridad constante donde se registró en forma individual y durante un tiempo mínimo de diez días consecutivos, la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales.

Para obtener las respuestas eléctricas a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma, ERG) se colocó un semi-microelectrodo de metal, de aproximadamente $5\mu\text{m}$ de diámetro en la punta, a través de la superficie de la córnea; el electrodo de referencia se sumerge en el agua (Wiersma y Yamaguchi, 1967). El otro extremo del electrodo se conecta a un preamplificador GRASS modelo PS22, el que emite un destello de 1.8 lux de intensidad y $10\mu\text{s}$ de duración cada 3 minutos; la activación del fotoestimulador depende de un programa instalado en una computadora (Pentium, Windows 98). Una vez que el ERG ha sido amplificado, la señal se envía a un osciloscopio (Tektronix TDS 460) para cuantificar su amplitud, y en paralelo a una tarjeta analógica-digital

(MP100 Biopac Systems). Los resultados se almacenan en un programa de software (Aqknowledge, Biopac Systems) para su análisis posterior.

REGISTRO DEL RITMO MOTOR

Los acociles permanecieron dentro de un acuario colocado en una cámara de temperatura controlada ($16 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y oscuridad constantes donde se registró, en forma individual y durante un tiempo mínimo de diez días consecutivos, la actividad motriz espontánea. Bajo un sistema de luz infrarroja y un circuito cerrado de televisión se registran los movimientos del acocil.

Los desplazamientos de los animales dentro del acuario se grabaron y se digitalizaron por un sistema de cómputo (Videomex-V), cada 15 minutos. Los datos sobre la cantidad de movimiento se imprimieron cada 15 minutos.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos de cada registro de ritmo del ERG como de ritmo motor fueron manejados en programas de software (Statgraphics) para medir el periodo (periodograma, Enrigh, 1965).

El periodograma es una técnica estadística ampliamente usada en cronobiología que permite la comparación de datos y observar la frecuencia con la que estos aparecen. Nosotros utilizamos esta herramienta para observar las características circadianas de una serie de valores que se ajustan entre periodos de 20 a 30 horas en los que son considerados circadianos. Otros aspectos como el cambio de fase, el cambio de periodo o los histogramas de frecuencia pueden observarse con este instrumento matemático antes de la maniobra experimental y después de la misma (la lesión o la estimulación luminosa, química, etc).

LESIÓN DEL GANGLIO CEREBROIDE

Se utilizaron 41 acociles los cuales fueron anestesiados por enfriamiento. Con un taladro Mototool se abrió una ventana de 5mm aproximadamente en la región del exoesqueleto que se localiza sobre el rostrum. Con unas tijeras muy finas se cortó la musculatura superior y con unas pinzas se separó el tejido conectivo, después de limpiar el área con un algodón, se absorbió el exceso de hemolinfa hasta exponer el ganglio cerebroide.

Cuando el ganglio estuvo visible bajo la ventana se introdujo una punta de acero inoxidable de $5\mu\text{m}$ de diámetro y se pinchó la región superior, correspondiente al protocerebro del lado izquierdo. Después del

pinchazo se cerró la ventana colocando el fragmento del caparazón en su sitio y se selló con acrílico dental. Los animales se dejaron reposar por algunas horas hasta que recuperaron la movilidad.

Una vez transcurridos algunos días después de la operación los animales fueron colocados en condiciones de registro, en acuarios independientes con temperatura constante (17°C), y en oscuridad continua se registró del ERG o de la actividad locomotriz durante los siguientes cuatro días.

Después de obtener los respectivos registros, los animales se dividieron en dos lotes; en uno de ellos los acociles se sacrificaron y se obtuvo el ganglio cerebroide, a fin de tener el control histológico del lugar preciso donde se realizó la lesión; en el otro lote, los animales permanecieron en condiciones de reposo y fueron regresados a acuarios individuales con las condiciones iniciales, donde se les alimentó y cuidó por un periodo de varias semanas para su recuperación.

Cuatro a ocho semanas después, los animales del segundo lote fueron regresados a las peceras de registro donde nuevamente se obtuvo la actividad del ERG o la actividad motriz durante cuatro días. El proceso se repite en dos ocasiones más, es decir a los 30 días o 60 días después de la lesión, con la finalidad de observar cambios en la actividad rítmica de los animales lesionados.

Los resultados obtenidos de estos experimentos se analizaron por medio de un periodograma, el cual compara la actividad rítmica antes e inmediatamente después de la lesión, así como a los 30 y 60 días posteriores a ella (Enrigh, 1965).

ACCIÓN DE LA HDP COMO SINCRONIZADOR DEL RITMO DEL ERG Y DEL RITMO MOTOR

Para el ritmo del ERG se utilizaron 32 acociles los cuales fueron colocados en acuarios individuales en condiciones de temperatura (17°C) y oscuridad constantes, a los que se les registró el ERG durante 10 días consecutivos.

En el caso del ritmo motor se utilizaron 22 acociles colocados en acuarios individuales en condiciones de temperatura (17°C) y oscuridad constantes, de los cuales se obtiene la actividad locomotora espontánea durante 10 días.

Al quinto día de registro se inyectó, entre el 5° pereiópodo y el primer pleópodo, una dosis única de HDP. La hormona fue proporcionada por los laboratorios Genemed Systems Inc. (San Francisco, California, E.U.A.) y se utilizó a la concentración de 1µl de una disolución 1nM disuelta en solución van Harreveld (vH). La

inyección se aplicó en un momento determinado del día (hasta cubrir todo el ciclo circadiano) y el registro se continuó durante 5 días más.

Este protocolo se repitió en todos los experimentos con la única diferencia del momento del ciclo circadiano de aplicación de la hormona. En los experimentos control se aplicaba 1 μ l de solución salina de vH.

El análisis de los resultados consiste en construir los periodogramas antes y después de la inyección de HDP (o solución vH) en cada experimento y se elaboraban los respectivos histogramas de frecuencia lo que permite detectar los cambios en el ritmo producidos por la hormona.

Los cambios de fase se midieron manualmente. Midiendo la distancia de un ciclo en su amplitud máxima (cresta) a la del ciclo siguiente. Esta medida de periodo se continúa en los ciclos siguientes como si no se hubiera aplicado el estímulo hormonal.

El 5° día después de la inyección se comparó la fase esperada (la que se hubiera mantenido de no haber ningún estímulo) contra la fase observada (la que se muestra ante el cambio de la estimulación). Las diferencias entre ambas eran consideradas como atrasos de fase (si la observada apareció después de la esperada) o adelantos de fase (si la observada apareció antes de la esperada).

Con los cambios de fase producidos por la inyección de la HDP se construye una curva de respuesta de fase, misma que muestra en el eje de las ordenadas la magnitud y la dirección de los cambios de fase, atrasos o adelantos, medidos en el estado estable del ritmo, vs la hora circadiana a la que se aplica la hormona en las abscisas.

RESULTADOS

DISTRIBUCIÓN DE LA HDP EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL

TALLO OCULAR

En la figura 7 se muestran cortes del tallo ocular teñidos con dos técnicas diferentes que permiten la inmunolocalización e identificación de fibras y células que contienen HDP.

En los fotorreceptores la marca de peroxidasa (fig. 8-b) se encuentra con mayor intensidad, lo que sugiere que la HDP se concentra sobre los pigmentos accesorios de protección. La retina y las fibras nerviosas provenientes de los fotorreceptores adquieren una tinción pálida. Cabe mencionar que hay algunas células que aunque son grandes y llamativas no se tiñen ante la anti-HDP.

Con la tinción fluorescente los fotorreceptores se observan claramente con una marca verde brillante y la distribución de los pigmentos accesorios a través del cono cristalino es evidente (fig. 8-c).

En la lámina ganglionar se forman dos bandas claras por la acción de los anticuerpos; una banda está presente en la parte superior y una más delgada en la parte media. Los somas en ambas bandas son de diversos tamaños, algunos grandes de entre $11.7 \mu\text{m}$ en promedio y otras más pequeñas de $5.17 \mu\text{m}$ en promedio con diversas fibras que se proyectan hacia la parte inferior de la lámina (fig. 9-b). Lo mismo puede observarse en la marca fluorescente; nótese además una gran cantidad de gránulos pequeños entre las fibras de la banda (fig. 9-c).

En los primeros cortes realizados en la médula externa se observaron neuronas y fibras que forman un círculo (figuras no mostradas). Al profundizar los planos de los cortes la distribución circular cambia y se forman dos bandas claras, una en la parte superior del neuropilo y otra en la parte central. En estas bandas se aprecian cuerpos neuronales pequeños de $4.56 \mu\text{m}$ en promedio y muchas fibras, algunas de ellas conectando a las dos bandas entre sí (fig. 10-b). El mismo patrón de bandas aparecieron en la reacción fluorescente, pero las fibras se mostraron mucho más evidentes incluso conectando los neuropilos de médula externa e interna. (fig. 10-c).

En la médula interna también se observó la distribución de somas y fibras reactivas formando una zona circular en los primeros planos de corte. Al ahondar en los cortes las fibras forman tres bandas intensas hacia el interior del neuropilo, una superior, una medial y una inferior. En las bandas pueden observarse nuevamente una gran cantidad de somas de $4.5 \mu\text{m}$ en promedio y fibras distribuyéndose de modo horizontal y vertical conectando las franjas reactivas entre sí. El mismo patrón se observó con la marca fluorescente (fig. 11-a y 11-c).

En la médula terminal se observan somas y fibras dispersas por todo el neuropilo sin que se diferencie una distribución clara entre ellas a excepción del sistema órgano X, el cual es claro en varios cortes (figs. 12-b, 12-c y 13-a) y la glándula sinusal (fig. 13-c); las fibras del sistema neurohumoral se marcaron con peroxidasa y con el fluoróforo claramente a un costado de la médula terminal (fig. 13-b, 13-d); estas fibras llegan hasta la glándula sinusal en la que se encontró una marca muy intensa pero no se observaron somas (figs. 13-c, 14-b y 14-c).

Los patrones de bandas en los diferentes neuropilos (lamina ganglionar, médula externa y médula interna) son tan claros y evidentes que se supuso que podrían ser lugares específicos de sinapsis entre diferentes niveles de los neuropilos. Para dilucidar si estas zonas granulosas correspondían a contactos sinápticos se llevaron a cabo pruebas inmunológicas contra la proteína sinaptofisina. Sin embargo las pruebas demostraron que los puntos sinápticos están distribuidos homogéneamente en cada uno de los neuropilos.

RESULTADOS..... FIGURA 7

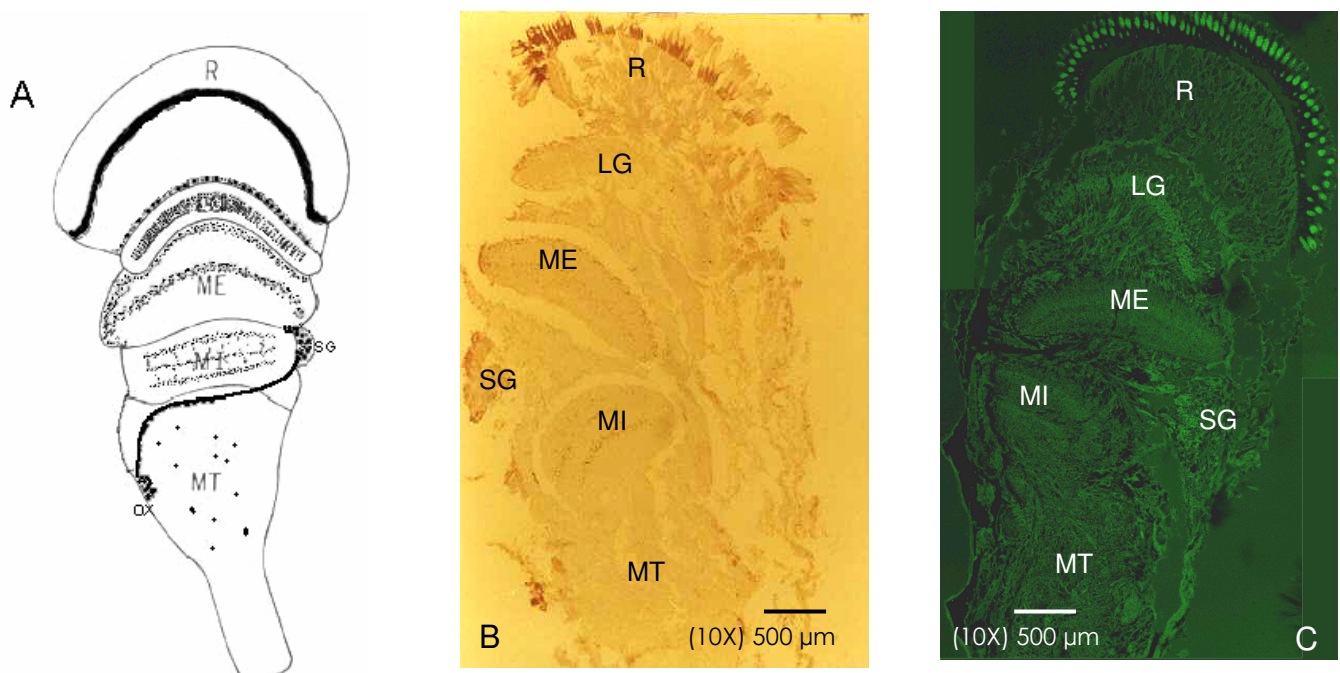


Figura 7: Tallo ocular. (A) Esquema. (B) Micrografía con la reacción de peroxidasa. (C) Micrografía con la reacción fluorescente. Se representan los neuropilos y las células inmunorreactivas a la HDP.
 (R) Retina; (LG) Lámina Ganglionar; (ME) Médula Externa; (SG) Glándula Sinusal; (MI) Médula Interna; (MT) Lámina Terminal (OX) Órgano-X.

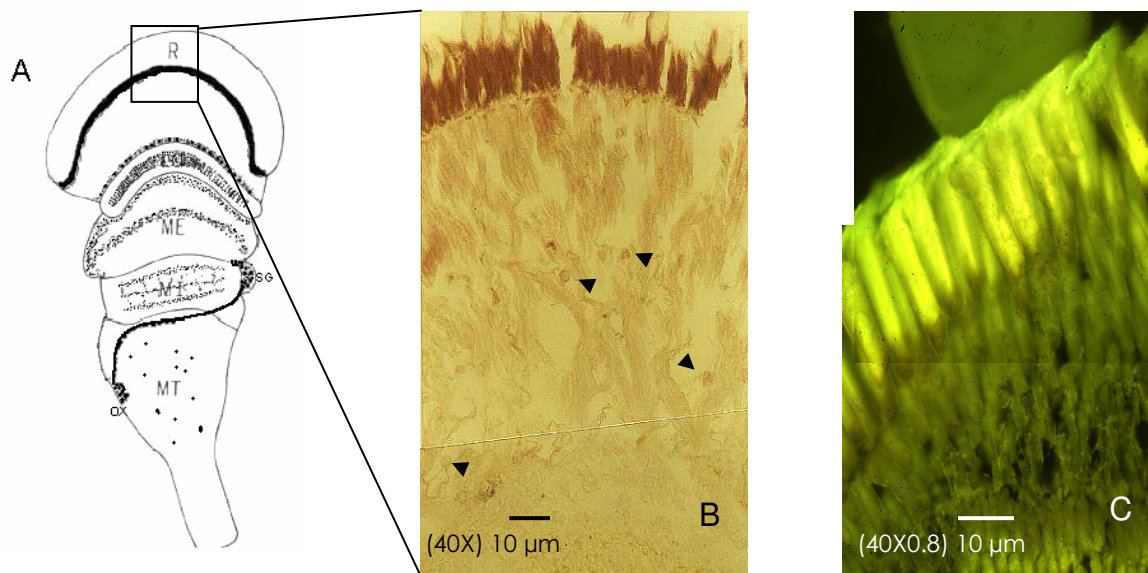


Figura 8: (A) Esquema de tallo ocular señalando la sección de retina que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C). Las flechas indican células de gran tamaño que no fueron reactivas a la HDP y que no han sido descritas .

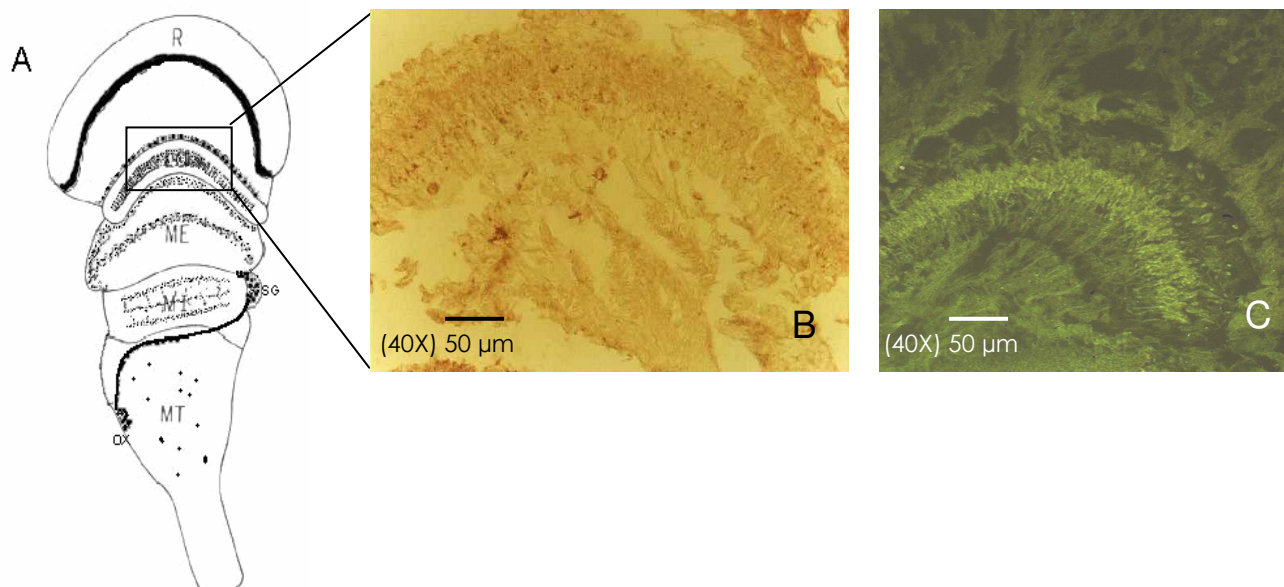


Figura 9: (A) Esquema de tallo ocular señalando la sección de lámina ganglionar que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C).

RESULTADOS FIGURA 10

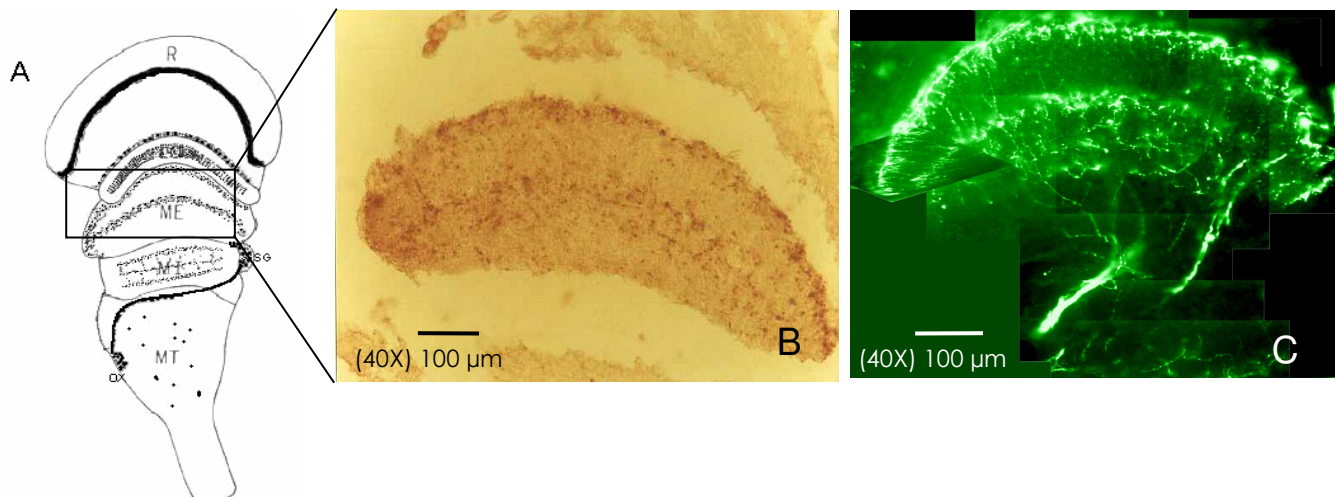


Figura 10: (A) Esquema de tallo ocular señalando la sección de médula externa que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C).

RESULTADOS FIGURA 11

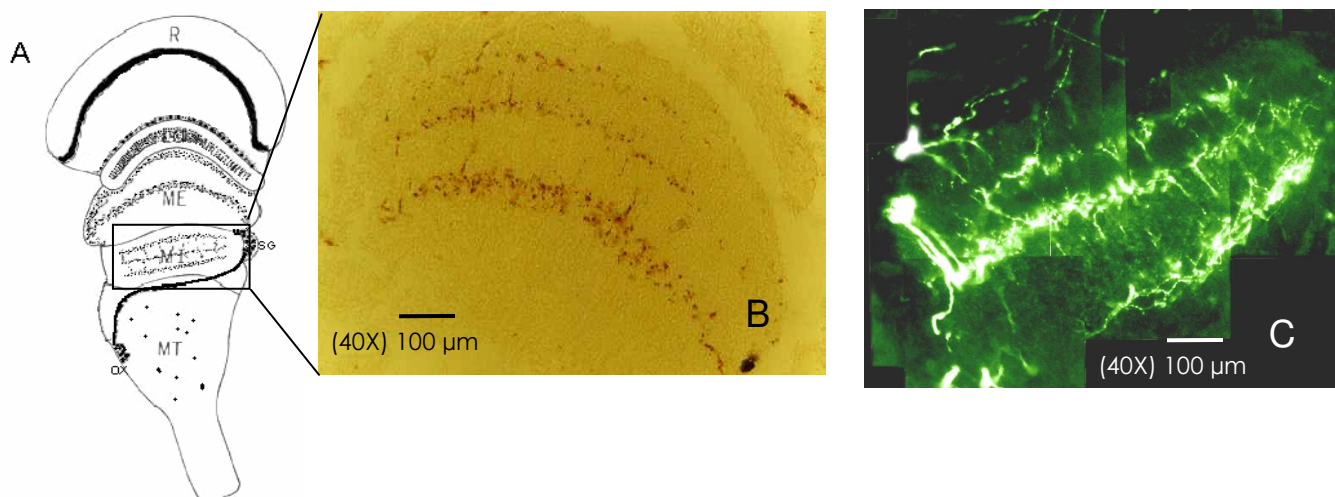


Figura 11: (A) Esquema de tallo ocular señalando la sección de médula interna que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C).

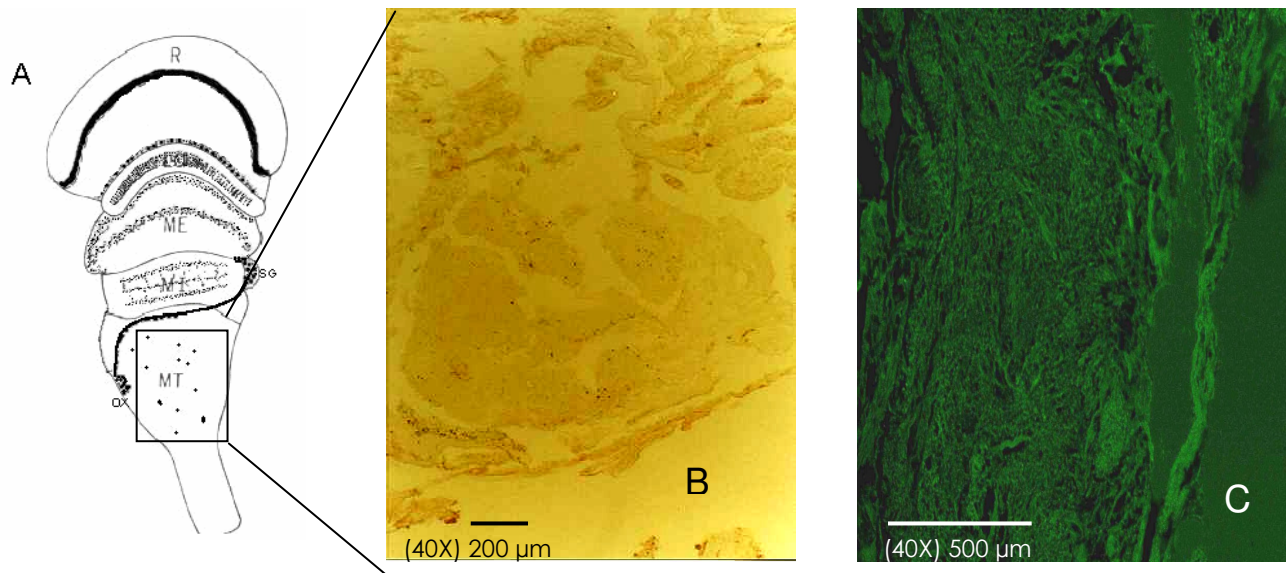


Figura 12: (A) Esquema de tallo ocular señalando la sección de médula terminal que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C).

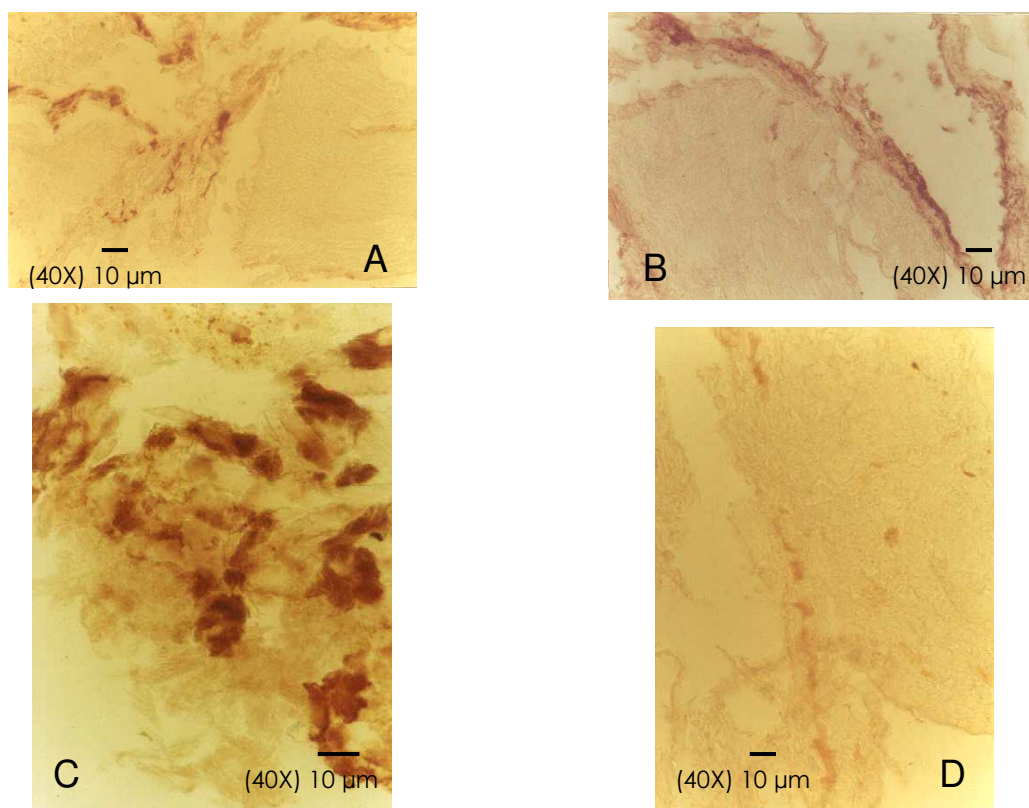


Figura 13: (A) Fotografía de células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa correspondientes al órgano X inmunoteñidas con peroxidasa. (B) y (D) Fibras del tracto órgano X-glándula sinusal. (C) Glándula sinusal.

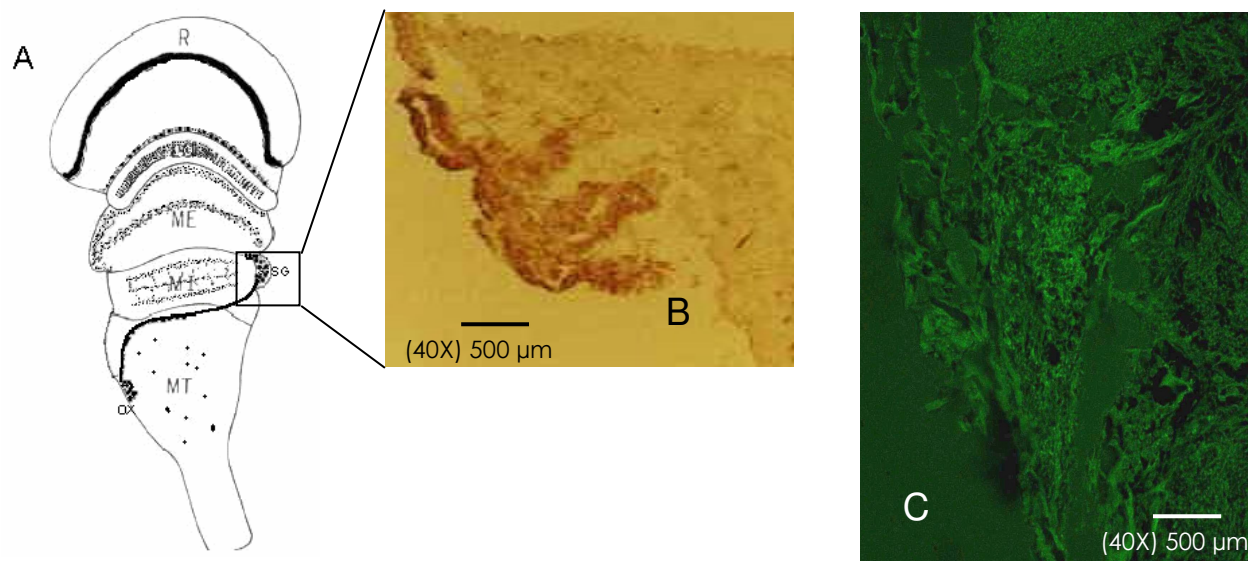


Figura 14: Glándula Sinusal del tallo ocular que muestra las células reactivas a la HDP con la reacción de peroxidasa (B) y con la reacción fluorescente (C).

GANGLIO CEREBROIDE

En un corte de ganglio cerebroide pueden distinguirse distintas secciones (protocerebro, deutocerebro y tritocerebro) con reacciones al anticuerpo de HDP. El corte se muestra dorsoventral teñido con una reacción de peroxidasa y teñido con una reacción inmunofluorescente (fig. 15). La figura muestra un esquema representando el nivel aproximado en donde se realizó el corte.

RESULTADOS FIGURA 15

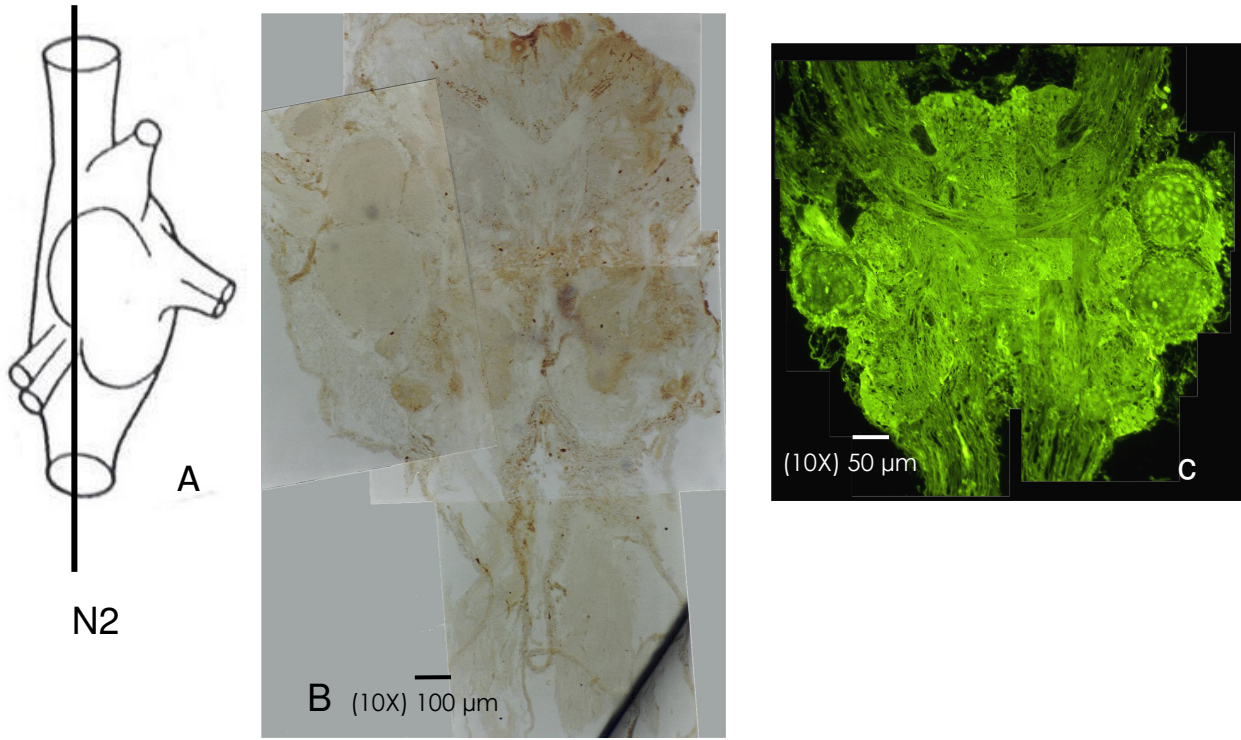


Figura 15: (A) Esquema del ganglio cerebroide (Nivel 2); (B) Fotografías del ganglio cerebroide marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP y (C) marcado con la inmunoreacción fluorescente vs. HDP.

En la figura 16 se pueden observar los esquemas de ganglio cerebroide en los que se señala la profundidad del corte (que en este caso sería el nivel I, más dorsal) y la sección ilustrada que en este caso corresponde a protocerebro; aquí se puede observar una marca en varios somas de la parte superior de las fibras del tracto óptico, mismas que aparecen en la parte central del protocerebro (fig. 16-c).

RESULTADOS FIGURA 16

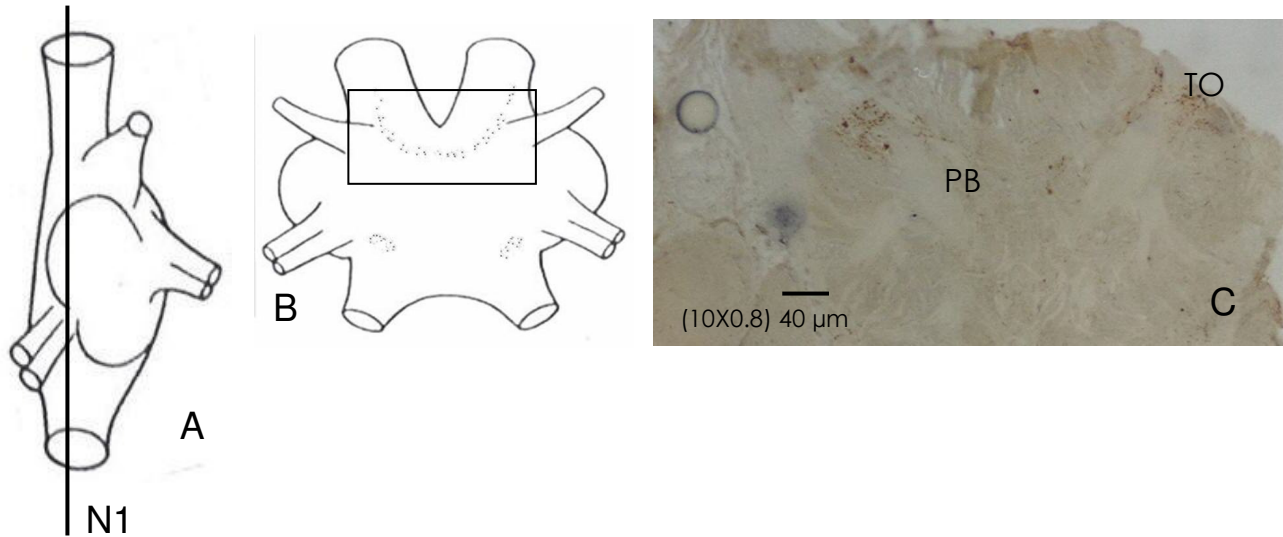


Figura 16: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral, nivel I) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de la sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que las células se proyectan desde el tracto óptico (TO) hacia regiones del puente protocerebral (PB) y decusan entre el lado derecho e izquierdo.

Al cambiar la profundidad en el nivel del corte del ganglio (nivel 2) las células del protocerebro aparecen marcadas con peroxidasa en la parte del citoplasma. Las células son de diversos tamaños (desde 7.82 μm hasta 13.4 μm en promedio) y resaltan algunas de tamaño grande (58 μm), que reaccionaron a la tinción fluorescente (fig. 17-c; 18-c y 19-c). Cabe mencionar que con la tinción fluorescente se aprecian algunas células donde son los núcleos los inmunoteñidos más intensamente (figs. 19-c y 20-c).

En el tracto óptico se observaron marcas claras que corresponden a fibras, aunque en este momento no puede determinarse la direccionalidad de las mismas. Es obvio que tienen conexiones con centros nerviosos del protocerebro (figs. 18-c y 20-d).

Las fibras inmunomarcadas aparecen además en ambos lados del ganglio y parecen cruzar de un lado al otro formando una especie de unión entre ambos lados al nivel del neuropilo denominado *puente protocerebral* (PB); además, el arreglo parece rodear el tracto y el quiasma óptico (fig. 17), las fibras provenientes del neuropilo también se marcan intensamente tanto las internas como las superiores, el tejido laxo que cubre el ganglio cerebroide reaccionó del mismo modo mostrando cuerpos celulares. Este tejido laxo no se ha reportado

hasta ahora por lo que no recibe un nombre en particular pero incluyen varias neuronas dentro del protocerebro (fig. 18-c). Para asegurarnos que este tejido en forma de red perteneciera al sistema nervioso y no al soporte glial se realizaron pruebas inmunohistoquímicas de identificación de tejido nervioso con tinciones específicas para sinaptofisina y tinciones dirigidas a los gránulos de Nissl. Los resultados mostraron que esta zona es de tipo nervioso y que los somas son importantes en la inmunoreacción a HDP (figuras no mostradas).

RESULTADOS FIGURA 17

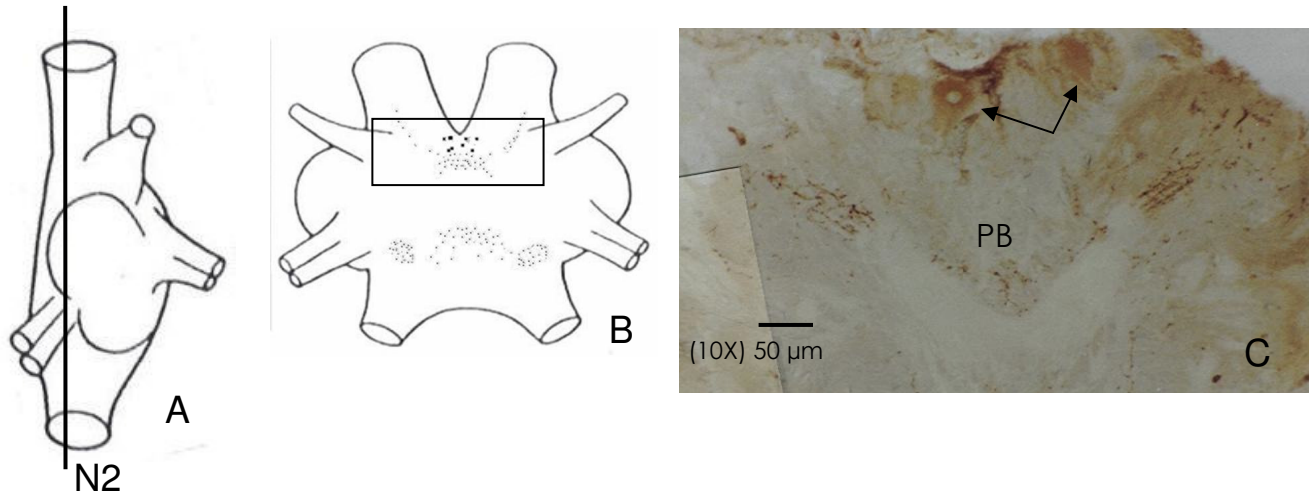


Figura 17: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 2) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que las fibras son más prominentes en el puente protocerebral (PB). Células de gran tamaño aparecen en protocerebro (→).

RESULTADOS FIGURA 18

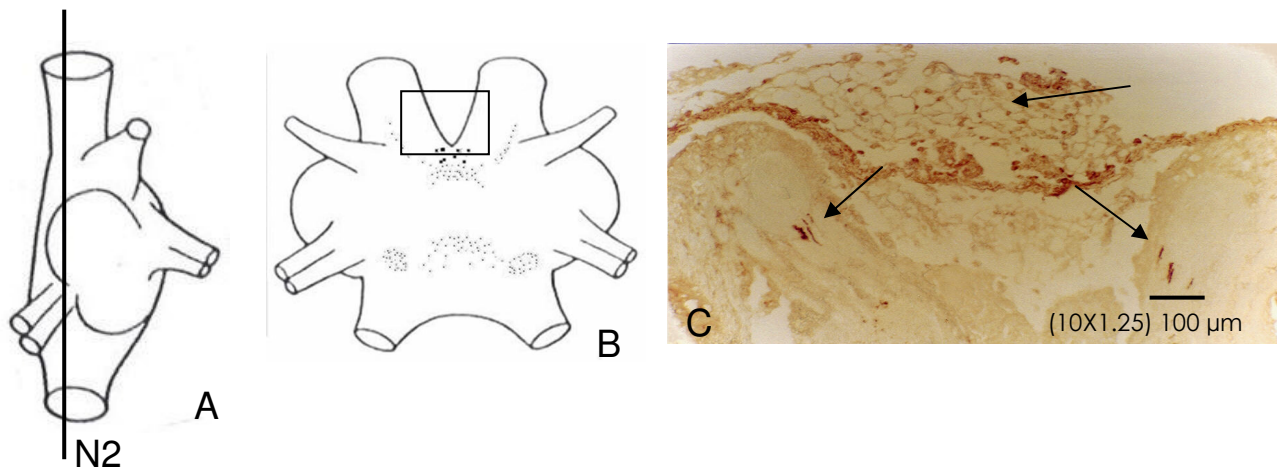


Figura 18: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 2) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que las fibras laxas sobre el protocerebro con células inmunomarcadas; las flechas indican fibras en la parte del tracto óptico.

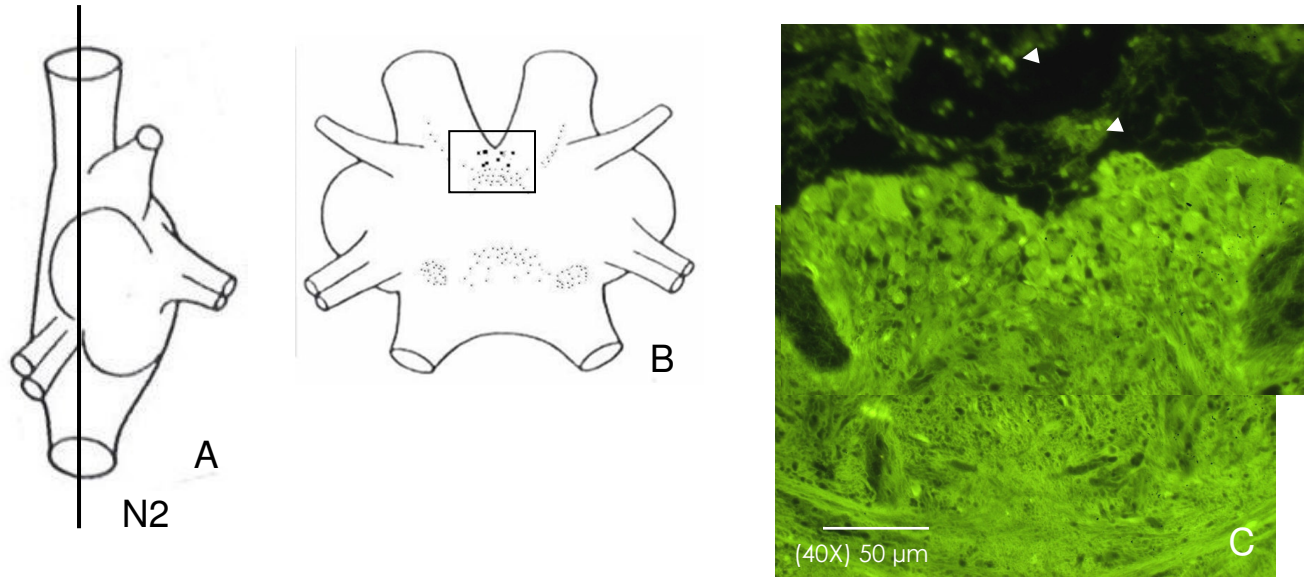


Figura 19: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 2) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción fluorescente vs. HDP (C). Las flechas indican células inmunorreactivas a la HDP. Nótese que en el tracto óptico hay fibras que cruzan de un extremo al otro y ramificaciones del protocerebro.

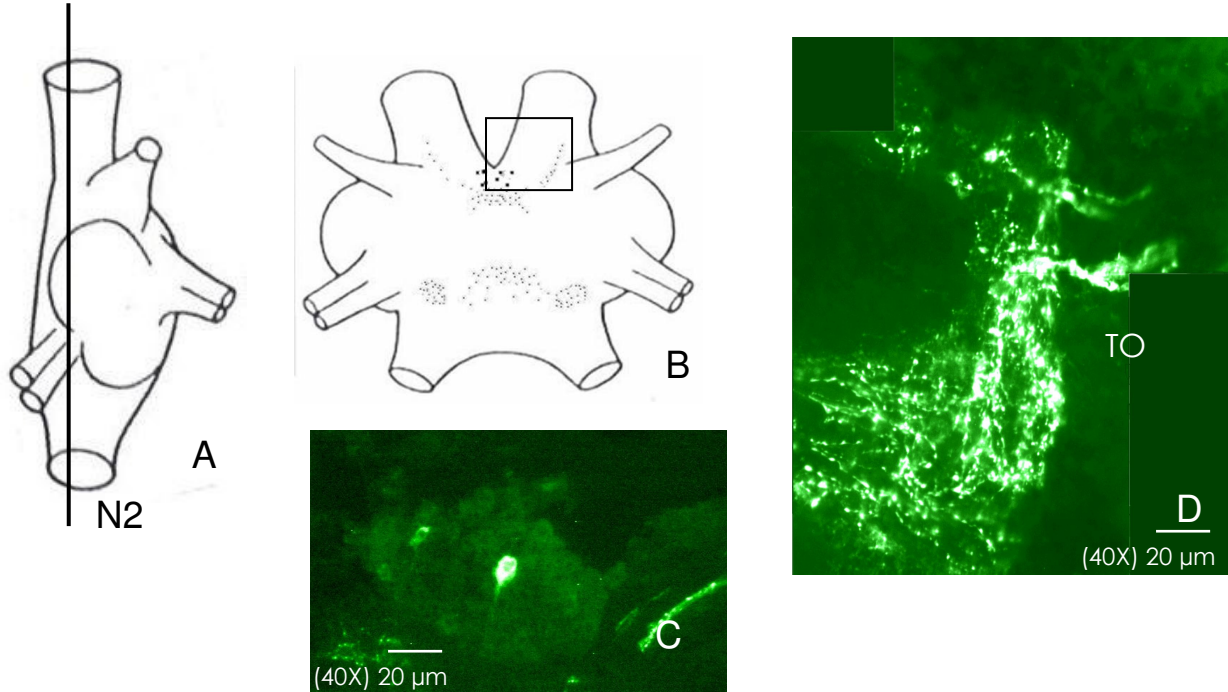


Figura 20: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 2) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción fluorescente vs. HDP donde se muestran células de la parte superior del protocerebro (C). Fibras que conectan la sección de tallo ocular con el protocerebro (TO) (D).

En el mismo corte se puede observar un segundo grupo de células inmunomarcadas en la zona de tritocerebro, se observan grupos de células en la parte superior de los neuropilos de *antenas II* (AnN) y el grupo central del neuropilo de *antenas mediales* (MAN); así como centros de los *neuropilos antenulares laterales* (LAN) (fig. 21), la cantidad de somas y fibras parecen aumentar al profundizar en los cortes más mediales del ganglio.

Algunas células del tritocerebro de tamaño grande (de 72 μm en promedio y algunas de hasta 125 μm de largo) aparecieron marcadas claramente con gránulos en el citoplasma, en la zona correspondiente al neuropilo *antenuar II* (AnN), pero a pesar de la marca intensa, en ninguna célula se marcó el núcleo; la tinción con peroxidasa es muy clara y se confirmó con la marca fluorescente (fig. 22 y 23-A).

RESULTADOS FIGURA 21

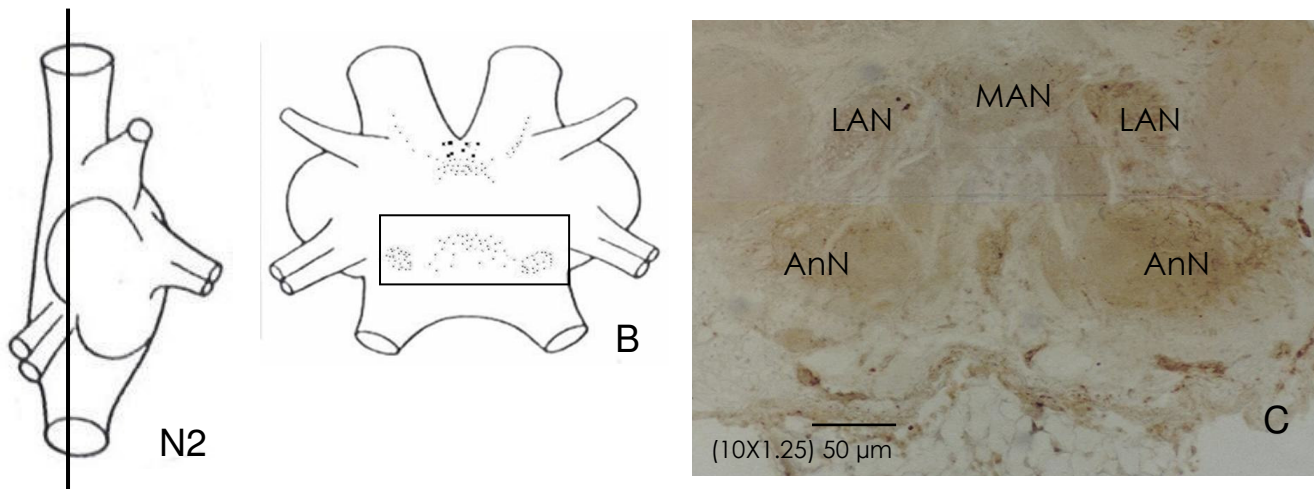


Figura 21: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 2) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de tritocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que se forman grupos en la parte de tritocerebro, especialmente en los neuropilos medial antenuar (MAN), antenuar lateral (LAN) y antenuar II (AnN).

RESULTADOS FIGURA 22

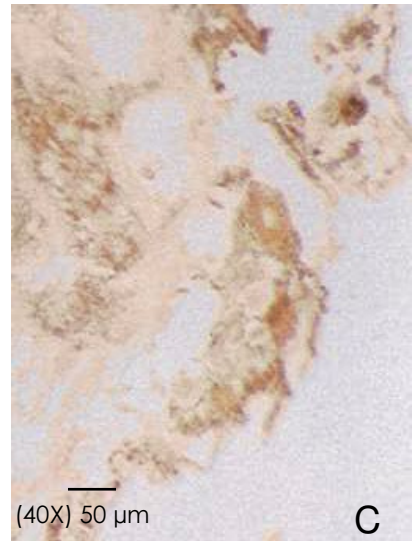
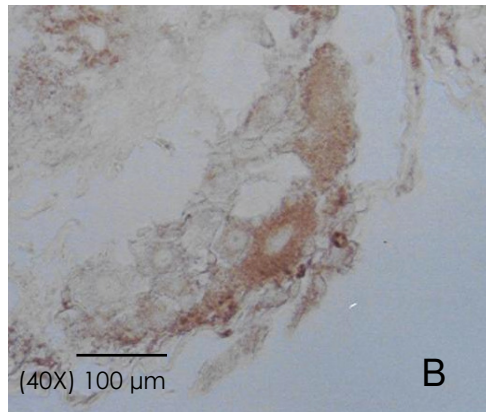
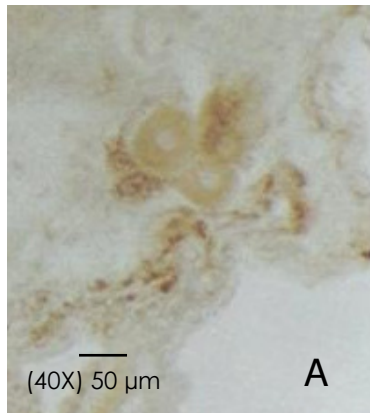


Figura 22: Detalle de células ubicadas en tritocerebro. A, B, y C corresponden a diferentes ejemplos tomados en diferentes cortes pero de la misma franja correspondiente al neuropilo Antenular II (AnN). Estas células de gran tamaño aparecen marcadas con la reacción con peroxidasa.

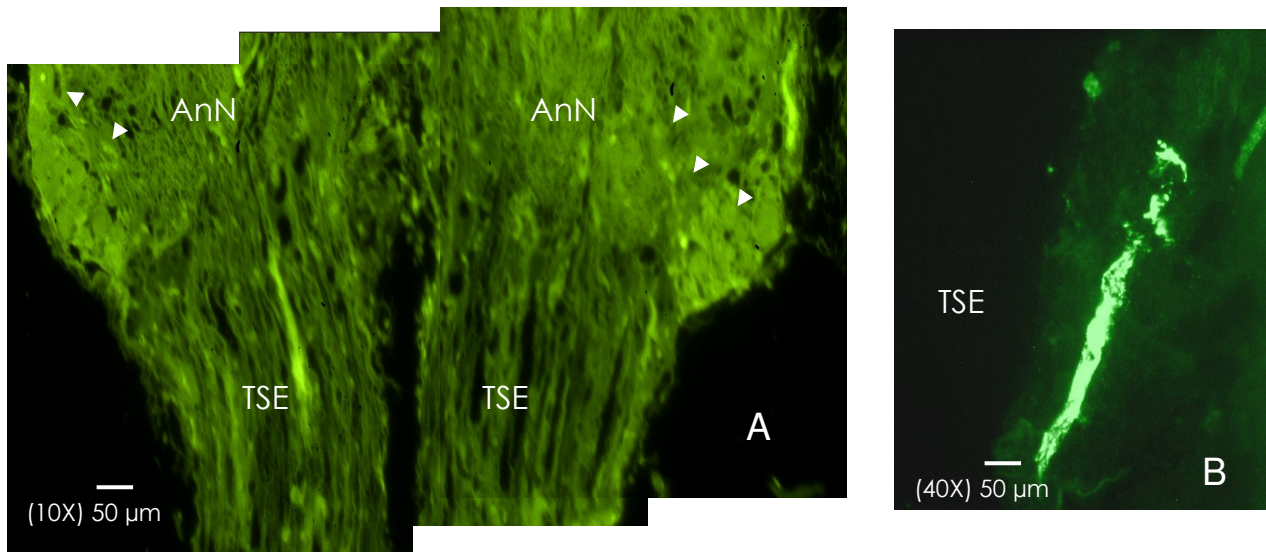


Figura 23: Zona de tritocerebro inmunorreactiva vs. HDP con la técnica de fluorescencia. Las flechas indican células inmunorreactivas del neuropilo antenular II (AnN) (A), y fibras del tracto circunesofágico (TSE) (B).

Conforme los cortes del ganglio profundizan el nivel (nivel 3) aumenta el número de somas y fibras inmunoreactivas contra la HDP en las partes de protocerebro. Lo que puede observarse es que la cantidad de neuronas parece aumentar en las partes laterales que corresponderían a los *neuropilos mediales anteriores* (AMPN), mientras que en la parte central parece disminuir en la parte correspondiente al *cuerpo protocerebral central* (CB), rodeando claramente el tracto óptico (fig.24).

Otra zona que aparece repetidamente marcada es la zona de tritocerebro. En los siguientes planos (nivel 3) se puede observar a las células del neuropilo de *antenas II* (AnN) y el grupo del neuropilo *antenular medial* (MAN), así como el *neuropilo antenular medial* (LAN), donde se define mejor la organización de los neuropilos manteniendo los somas en las partes superiores y las fibras se proyectan a la parte inferior (fig. 25). Cabe mencionar que muchas células y fibras aparecen en las partes centrales del ganglio conectando regiones del protocerebro con grupos del deutocerebro y del tritocerebro. Aunque no pudieron seguirse las conexiones entre una zona y otra se pudieron observar fibras inmunoreactivas entre las secciones.

RESULTADOS FIGURA 24

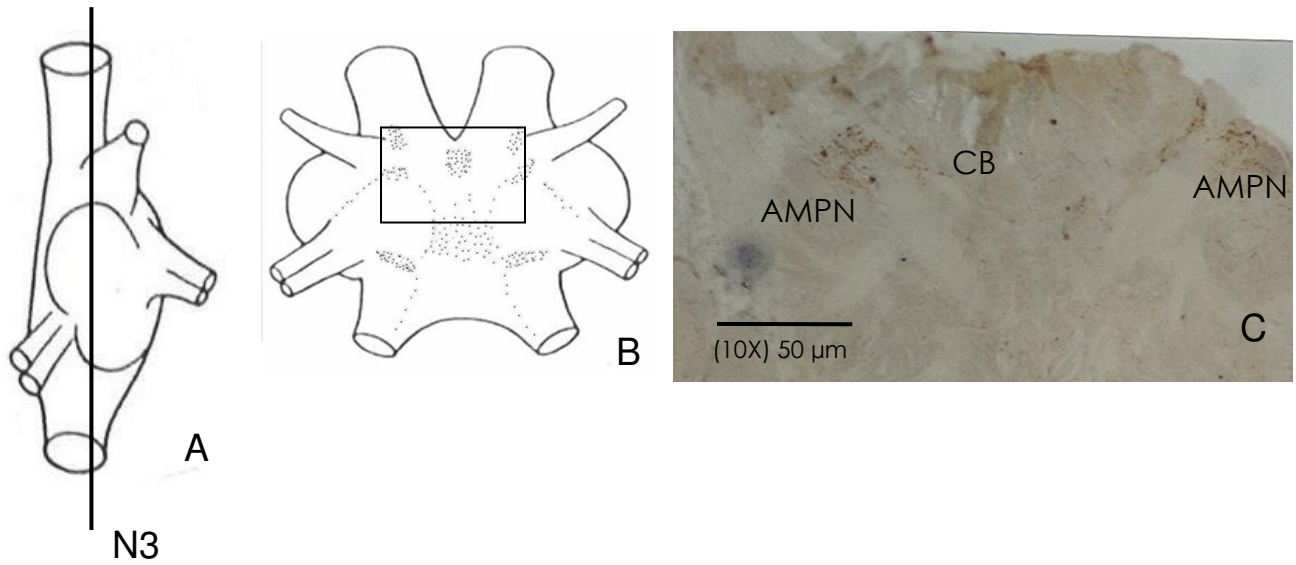


Figura 24: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 3) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que las fibras ahora forman grupos concentrados en el neuropilo medial anterior (AMPN) y el cuerpo central (CB).

RESULTADOS FIGURA 25

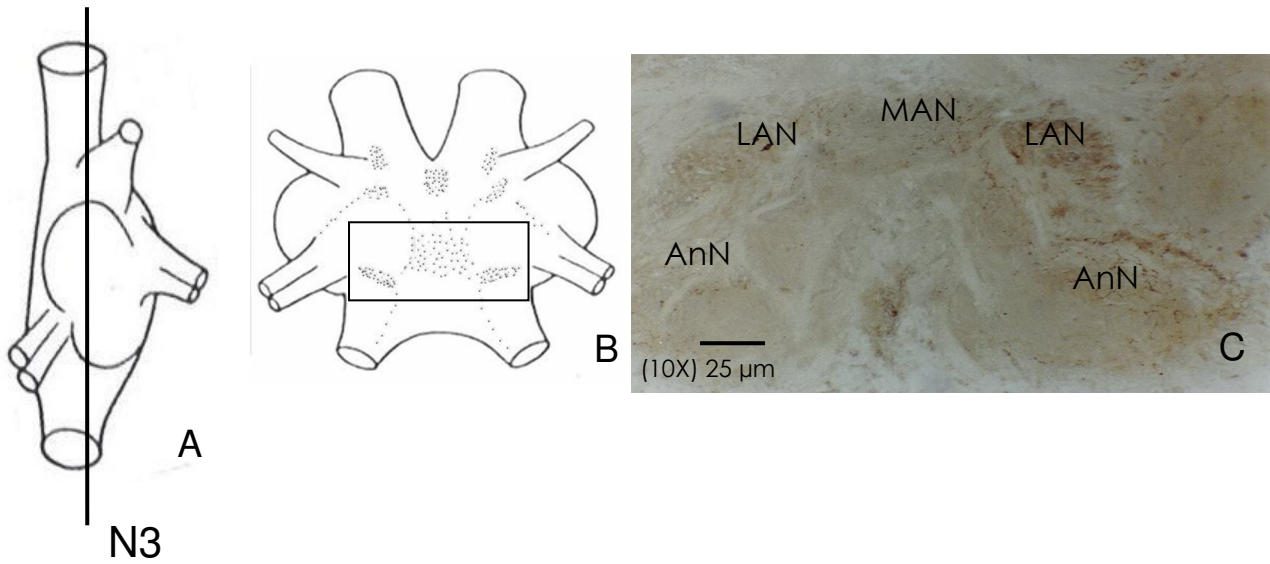


Figura 25: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 3) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de tritocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que se forman grupos más concentrados en el neuropilo medial antenular (MAN), lateral antenular (LAN) y antenular II (AnN).

Sin embargo las marcas más sobresalientes corresponden a las secciones más ventrales del ganglio cerebroide (nivel 4), en las cuales cambia la disposición de los somas y las fibras del tritocerebro; el *neuropilo de antenas II* (AnN) muestra sus somas en la parte superior con células intensamente marcadas de tamaños entre 5 hasta 35 μm de largo (10 μm de largo en promedio) y cuyas fibras se proyectan en dos sentidos uno hacia la parte inferior del neuropilo (figs. 26-c, 27-b) y otras que corren lateralmente hacia salidas del nervio antenular (fig. 27-c). Además de esta organización se puede observar el neuropilo correspondiente al *neuropilo antenular lateral* (LAN), donde las neuronas tienen tamaños entre 12 μm hasta 66 μm de largo (32 μm de largo en promedio) y muestran inmunoreactividad en el citoplasma, incluso se observa una gran concentración de gránulos en el interior de las mismas. Nótese que a pesar de que las células están muy marcadas los núcleos no presentaron inmunoreactividad (fig. 26-c y 27-a).

RESULTADOS FIGURA 26

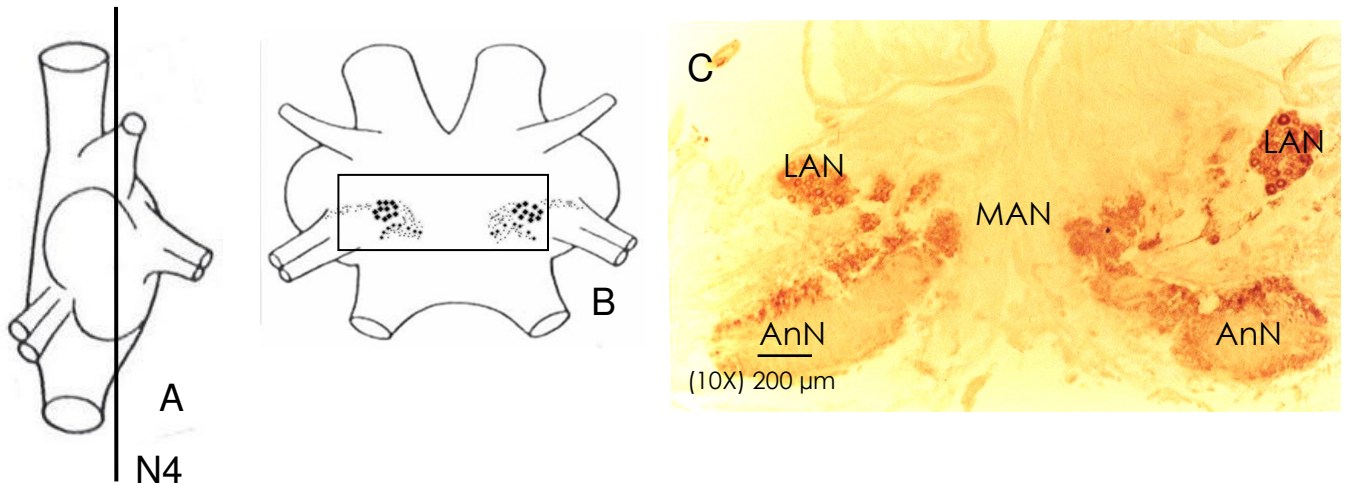


Figura 26: Esquema del ganglio cerebroide (Vista lateral; nivel 4) (A). Esquema del ganglio cerebroide (Vista frontal) (B). Microfotografía de sección de protocerebro marcado con la inmunoreacción con peroxidasa vs. HDP (C). Nótese que aparecen grupos de células de gran tamaño en lo que correspondería a neuropilos lateral antenular (LAN) y fibras en el neuropio antenular (AnN), las regiones del neuropilo antenular medial (MAN) ahora están ausentes de células inmunomarcadas.

RESULTADOS FIGURA 27

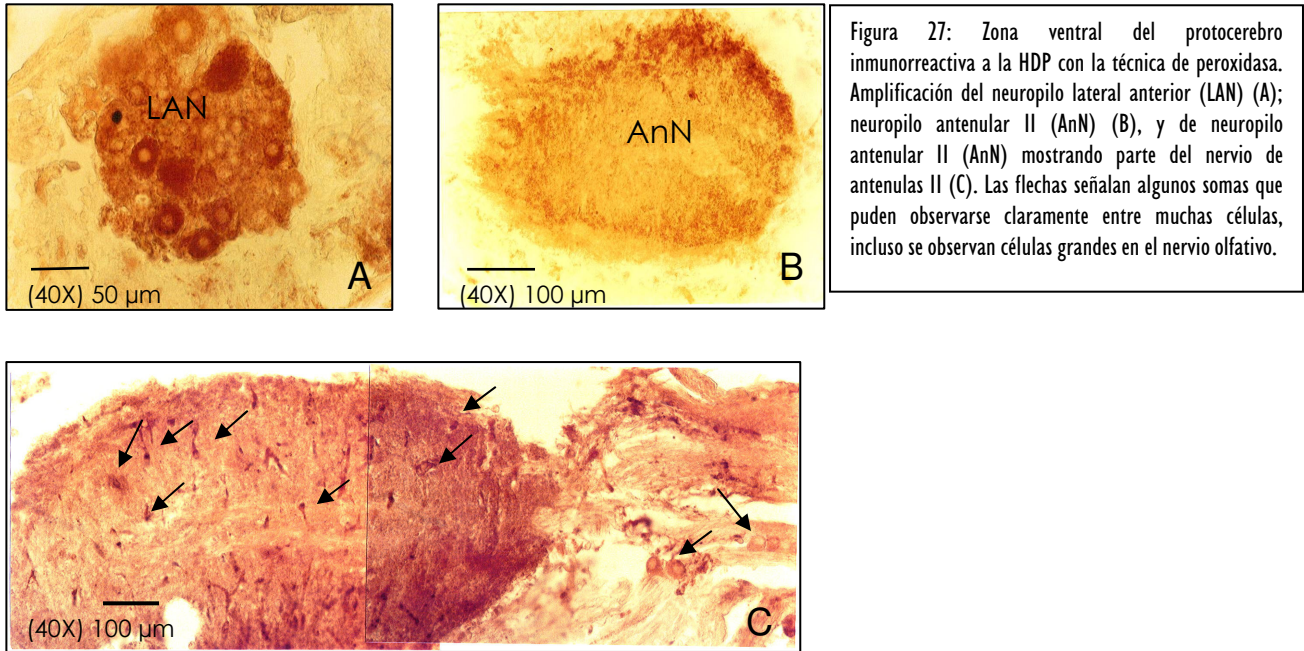


Figura 27: Zona ventral del protocerebro inmunorreactiva a la HDP con la técnica de peroxidasa. Amplificación del neuropilo lateral anterior (LAN) (A); neuropilo antenular II (AnN) (B), y de neuropilo antenular II (AnN) mostrando parte del nervio de antenulas II (C). Las flechas señalan algunos somas que pueden observarse claramente entre muchas células, incluso se observan células grandes en el nervio olfatorio.

En deutocerebro aparecen algunas marcas más intensas con la reacción fluorescente que con la reacción a peroxidasa revelando algunos detalles en los lóbulos olfatorios (ON) y el neuropilo accesorios (AcN). En las cercanías de los lóbulos se observan células y fibras inmunorreactivas rodeando los neuropilos, pocas fibras se proyectan a la parte central pero la superposición de las mismas produce marcas de fondo (fig. 28-b y 28-c).

RESULTADOS FIGURA 28

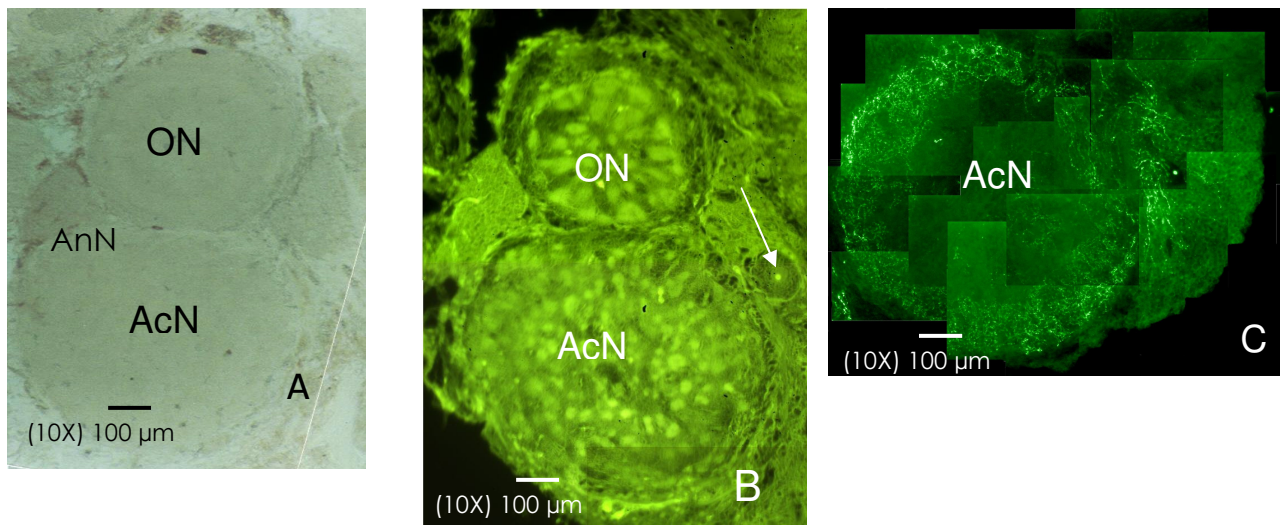


Figura 28: Zona de deutocerebro inmunorreactiva a la HDP con tinción con peroxidasa (A) y con tinción fluorescente (B) Las flechas indican células inmunorreactivas a la HDP en la fluorescencia, que no aparecen en la reacción con peroxidasa por lo menos claramente. Las fibras reactivas aparecen alrededor de los lóbulos olfatorios (C).nervio olfatorio (ON); Nervio accesorio (AcN).

SOBRE LA GENERACIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

LESIÓN DEL GANGLIO CEREBROIDE

En la figura 29-a se muestra el registro de cinco días, de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) obtenido para un acocil control mantenido en condiciones constantes de temperatura (17° C) y oscuridad (OO), en la cual se observa una actividad regular normal durante los cinco días de registro, con máximos a las 12 de la noche, como corresponde a un animal nocturno y un periodo de 24.8 horas (figs. 29-b y 29-c).

RESULTADOS FIGURA 29

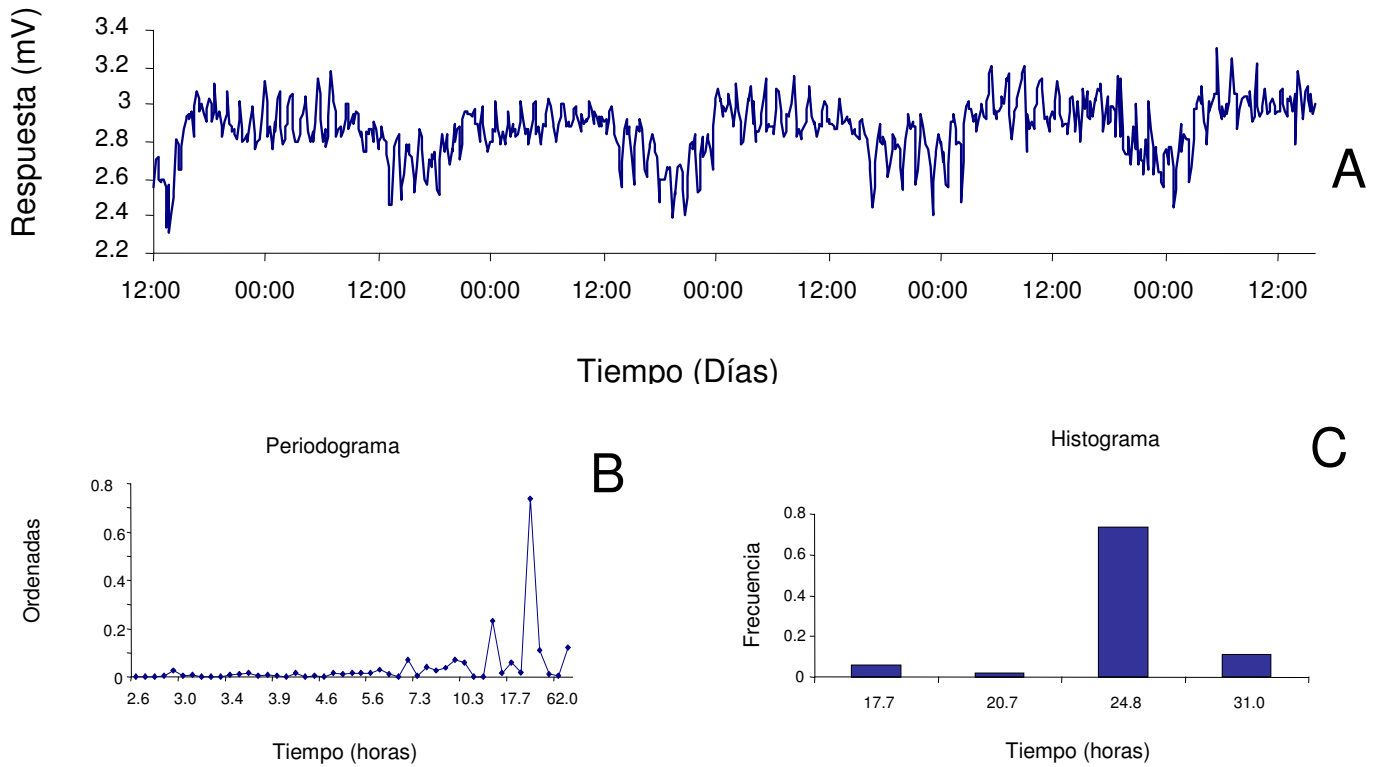


Figura 29: Registro del ERG de un acocil en condiciones de temperatura (16 °C) y oscuridad constante (A). El periodograma representativo de la conducta circadiana es de $\tau = 24.8$ horas (B). También se muestra el histogramas de frecuencia representativo de la conducta circadiana (C).

En la parte inferior se muestra un registro de 3.5 días, de la actividad motora espontánea (Ritmo motor) obtenido de un acocil control en condiciones de temperatura (17°C) y oscuridad continua (OO), en el cual se observa una actividad regular normal con máximos a las 12 de la noche, como corresponde a un animal nocturno (fig. 30-a), aunque el periodo endógeno cambia la fase hacia el final del registro, con un periodo de 21 horas (fig. 30-b y 30-c).

RESULTADOS FIGURA 30

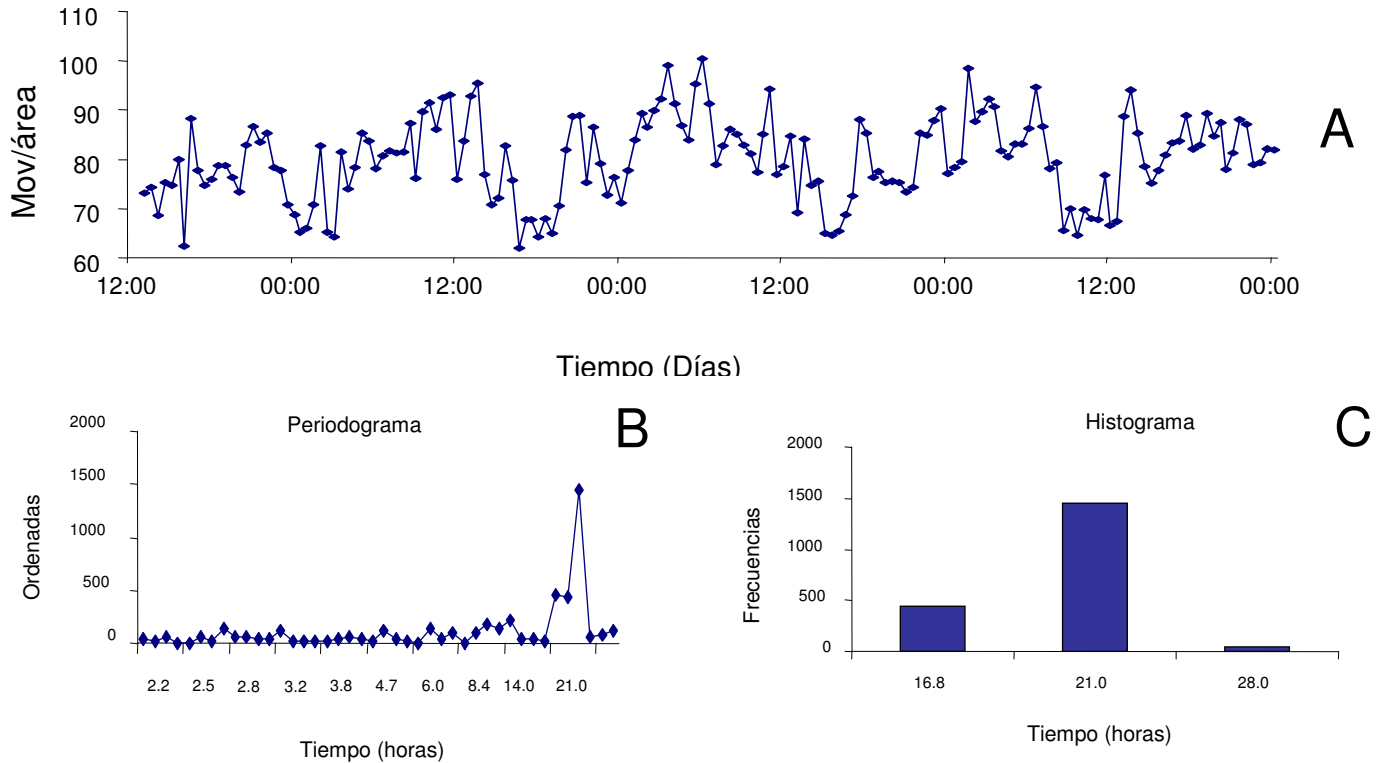


Figura 30: Registro del ritmo motor de un acocil en condiciones de temperatura (16°C) y oscuridad constante (A). El periodograma representativo de la conducta circadiana es de $\tau = 21$ horas (B). También se muestra el histograma de frecuencia representativo de la conducta circadiana (C).

En la figura 31-b se muestra un registro de tres días de la actividad locomotora obtenido de un acocil con el ganglio cerebroide lesionado. Se observa una actividad irregular y donde no aparece ningún patrón circadiano, esto debido a una lesión en el ganglio cerebroide, ocasionada por la punción de una aguja metálica en el protocerebro (fig. 31-a). En la parte superior se muestran el periodograma y el histograma de frecuencia (figs. 31-c y 31-d) que muestra una gran dispersión en los valores de frecuencia.

RESULTADOS FIGURA 31

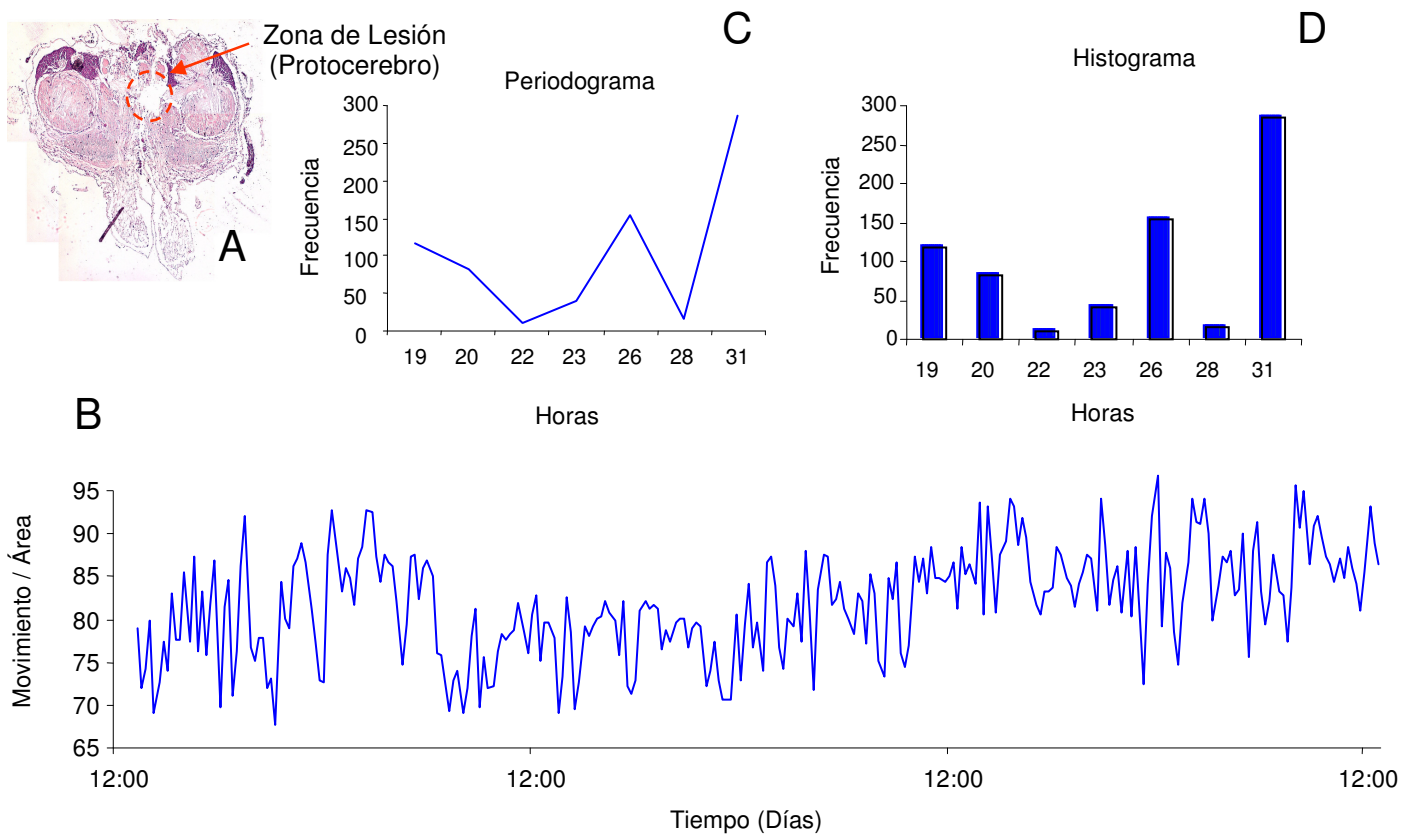


Figura 31: Ganglio cerebroide del acocil al cual se le registró el ritmo locomotor. La zona marcada muestra la punción de una punta metálica en el protocerebro (A). Registro del ritmo motor de un acocil lesionado y colocado en condiciones de temperatura (16 °C) y oscuridad constante (B). Periodograma $\tau = 31.9$ horas (C). Histograma de frecuencia (D).

En la figura 32-b se muestra un registro de cuatro días obtenido de un acocil lesionado en el ganglio cerebroide (protocerebro). Se pueden observar características similares a la figura anterior, excepto que es un ritmo de amplitud del ERG, donde a pesar de que no se pueden identificar oscilaciones de tipo circadiano, sí se pueden observar oscilaciones de alta frecuencia. En la parte superior se muestra la microfotografía del ganglio lesionado por la punción de una aguja metálica en el protocerebro (fig. 32-a). El periodograma y el histograma de frecuencia se representan en las figuras 32-c y 32-d respectivamente. Nótese la dispersión en los valores de frecuencia.

RESULTADOS FIGURA 32

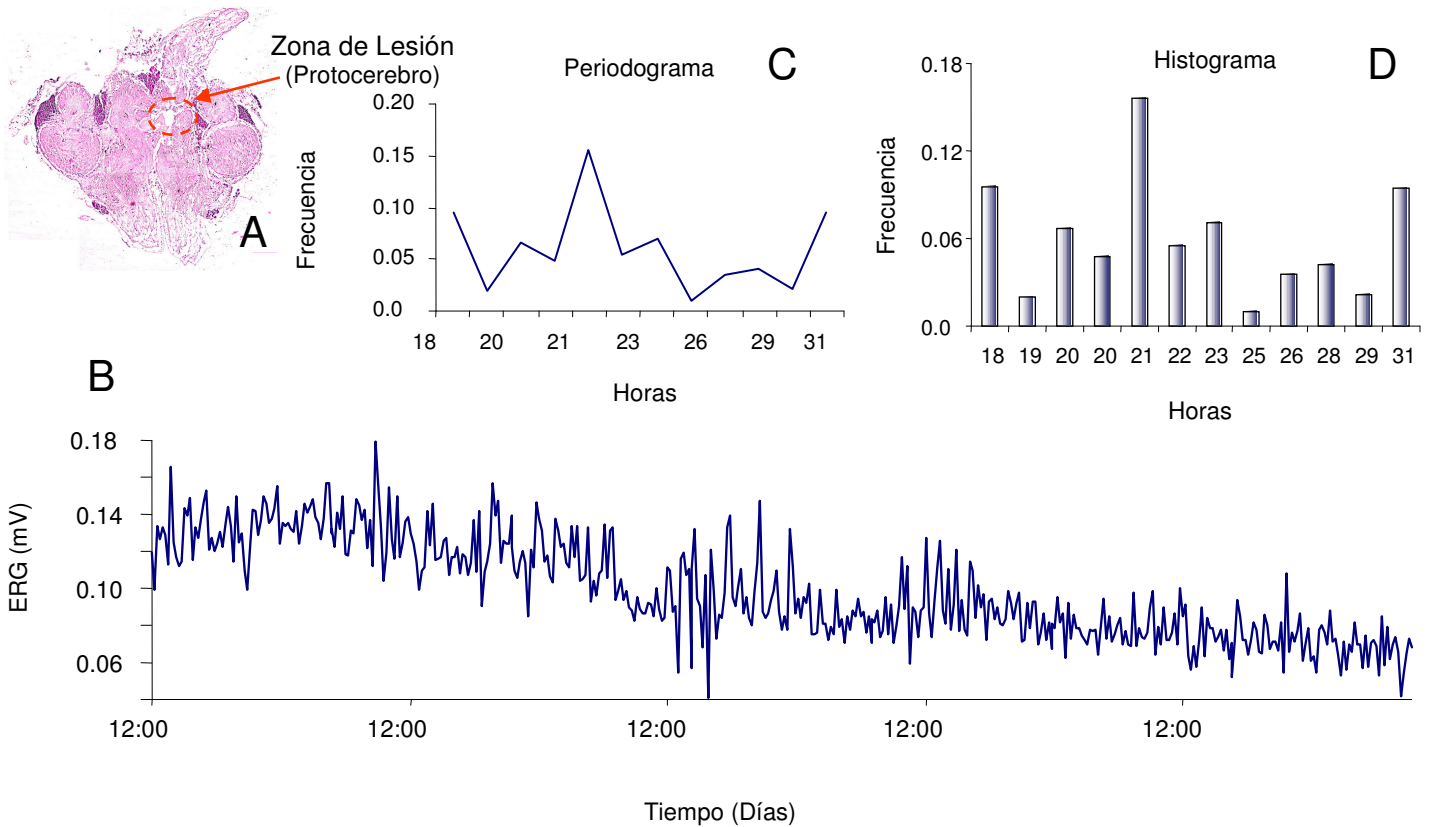


Figura 32: Ganglio cerebroide del acocil al cual se le registró el ritmo de amplitud del ERG. La zona marcada muestra la punción de una punta metálica en el protocerebro (A). Registro del ritmo del ERG de un acocil lesionado y colocado en condiciones de temperatura (16°C) y oscuridad constante (B). Periodograma $\tau = 21.3$ horas (C). Histograma de frecuencia (D).

En la figura 33-a podemos observar un ejemplo de un acicil registrado durante cuatro días de actividad motriz espontánea, el cual, ante la lesión del ganglio cerebroide pierde la capacidad de movimiento rítmico circadiano. En la parte inferior (fig. 33-b) tenemos al mismo animal tres meses después de la lesión, registrado durante 7 días y ahora se puede observar una débil oscilación de características ultradianas. El periodograma y el histograma de frecuencia (figs. 34-b y 34-c), muestran una dispersión de los valores muy alta con un máximo de periodo hacia las 19 hrs. Tres meses después el periodo es muy disperso moviéndose entre las 18 y las 25.4 horas (figs. 34-e y 34-f). También se presenta la fotografía del ganglio cerebroide y el lugar donde se punzó con la aguja en azul (fig.34-a), y la la fotografía de la posible reconexión de fibras. Aunque aún no hay nuevas conexiones parecen ser suficientes para que emerja un ritmo ultracircadiano (fig. 34-d).

RESULTADOS FIGURA 33

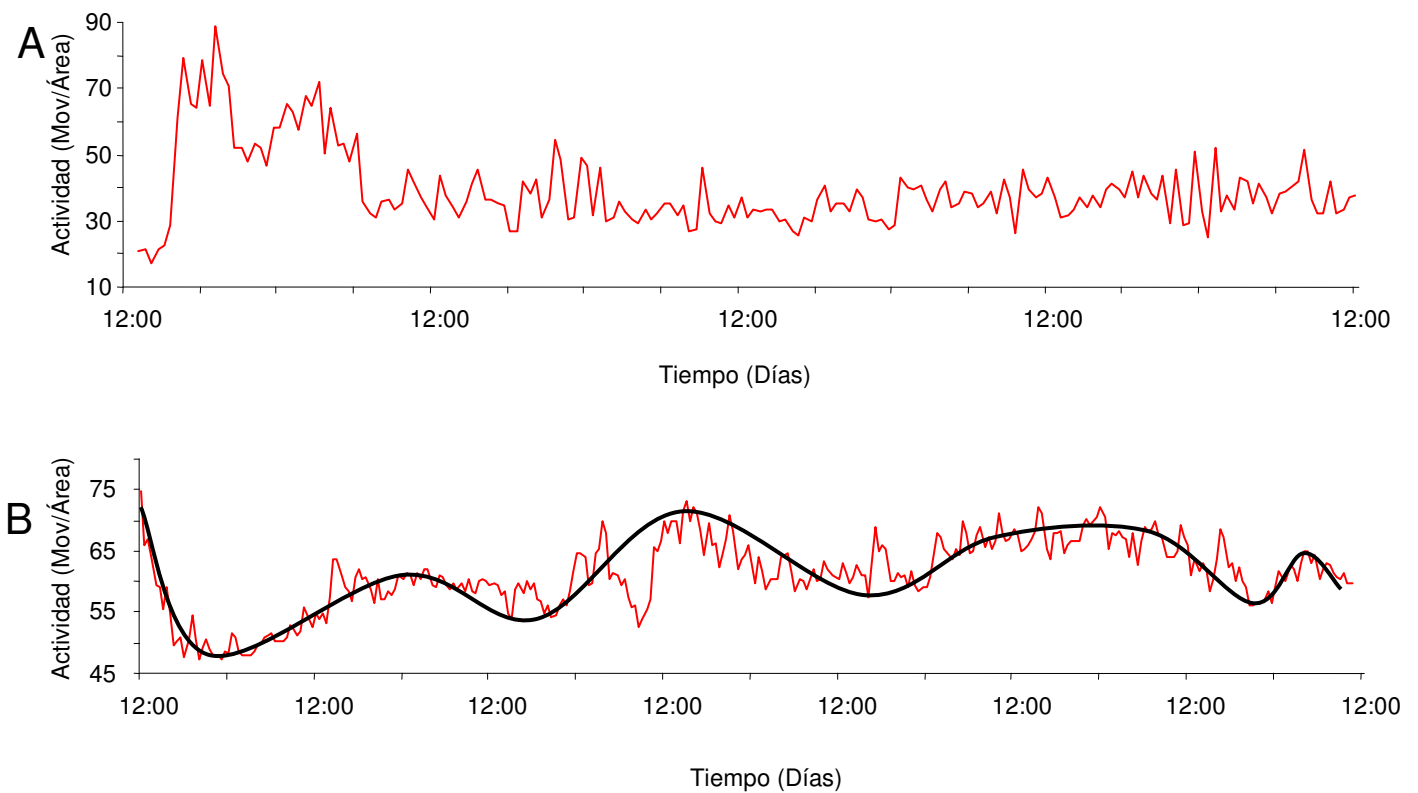
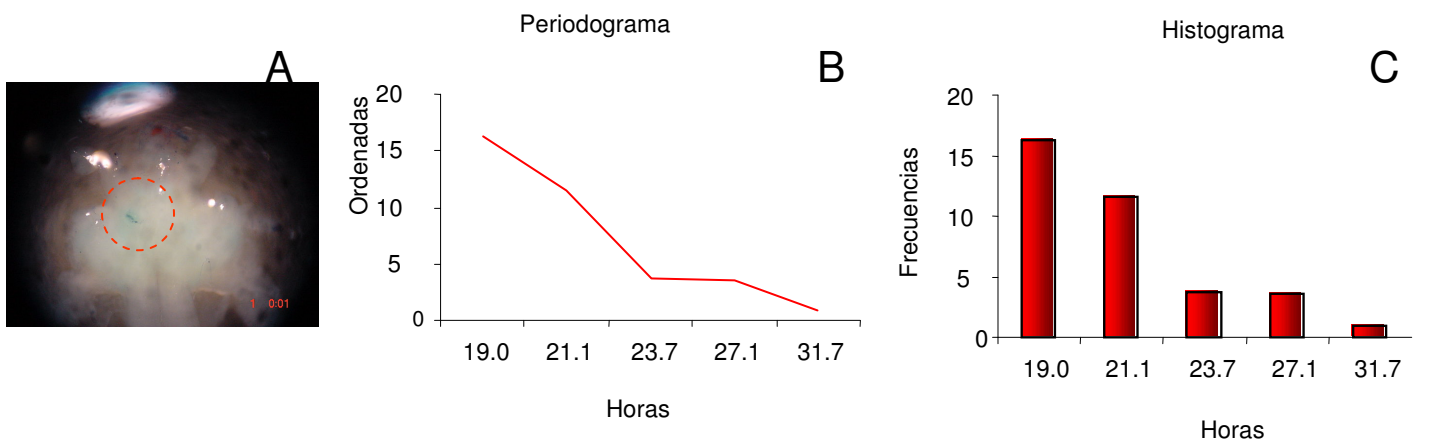


Figura 33: Registro del ritmo motor. Animal recién lesionado (A), y recuperado después de 3 meses (B).

En todos los casos en que se realizó la lesión del ganglio cerebroide se observó una pérdida de la actividad circadiana, es evidente que la punción fue suficiente para hacer perder la actividad periódica; sin embargo, fue sumamente difícil mantener vivos a los animales de experimentación una vez que estuvieron lesionados, lo agresivo de la maniobra experimental sólo permitió que algunos animales (n=5) sobrevivieran hasta dos meses después de la lesión, tiempo en el que fueron registrados nuevamente y se pudo observar una leve oscilación. En algunos casos las oscilaciones eran de alta frecuencia (ultradianas) y en otros de frecuencias amplias (infradianas) sin que pudiera verse un patrón claro en el periodograma; solamente un acocil (n=1) sobrevivió 3 meses después de la lesión sin que se viera mayor ajuste circadiano.

RESULTADOS FIGURA 34

REGISTROS DESPUÉS DE LA LESIÓN



REGISTROS 3 MESES DESPUÉS DE LA LESIÓN

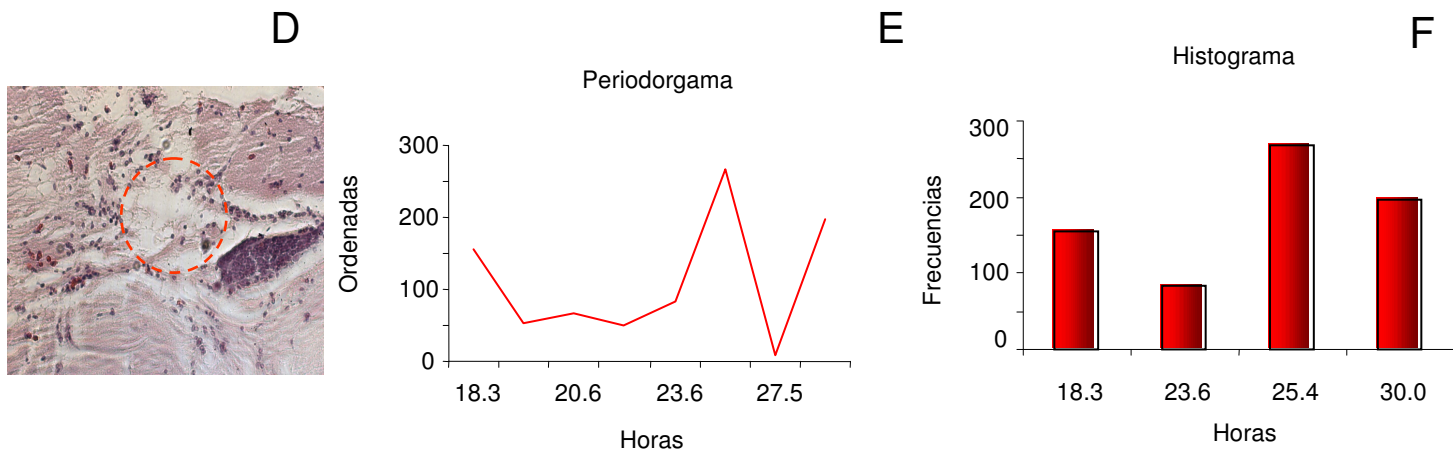


Figura 34: Fotografía del ganglio cerebroide de un acocil recién lesionado (A). Periodograma $\tau = 19$ horas (B) y $\tau = 25.4$ horas (E) e Histogramas (C y F) de los registros mostrado en la figura anterior. Después de la lesión (arriba) y tres meses después de la lesión (abajo). Fotografía de la zona de lesión del protocerebro de un segundo acocil donde se muestran algunas reconexiones en el tejido.

En la figura 35 se muestra un esquema resumen de la actividad realizada antes, después de la lesión y después de 12 semanas de recuperación del ganglio cerebroide. La actividad locomotora se presenta con regularidad al igual que la actividad del ERG antes de la punción (fig. 35-a); al realizarse una punción en el ganglio cerebroide con una aguja en la zona marcada en el esquema, la actividad rítmica motora y de amplitud del ERG desaparece (fig. 35-b), y al cabo de tres meses aparece nuevamente una actividad organizada de manera cíclica (aunque no circadiana) (fig.35-c).

RESULTADOS FIGURA 35

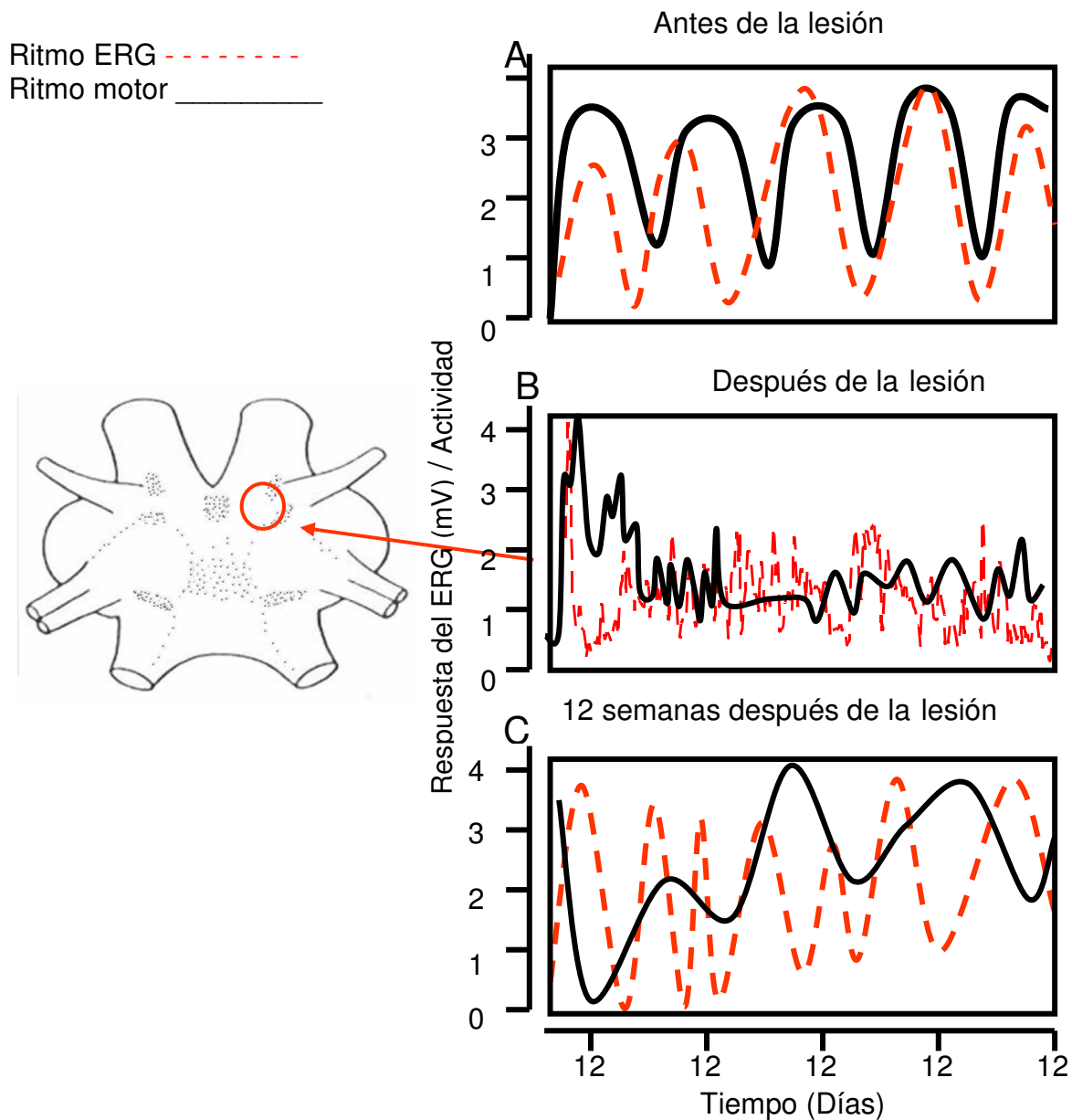


Figura 35: Resumen del efecto de una lesión en el ganglio cerebroide (protocerebrum) sobre el ritmo circadiano de amplitud del ERG (línea continua) y del ritmo motor (línea discontinua). Antes de la lesión (A); al lesionar la zona marcada en el esquema, los ritmos desaparecen (B); después de algunas semanas la actividad rítmica comienza a emerger aunque no con características circadianas.

SINCRONIZACIÓN DE LA RITMICIDAD BIOLÓGICA

CURVAS DE RESPUESTA DEL RITMO DEL ERG

En la gráfica de la figura 36-a se muestra el ritmo circadiano de amplitud de ERG de un acocil adulto colocado en condiciones constantes de oscuridad (OO) y temperatura (16°C). El eje de las ordenadas muestra el voltaje producido por las células fotorreceptoras ante un destello de prueba de 1.8 lux de intensidad y 10 μs de duración, en el eje de las abscisas se muestra el tiempo externo. Los picos de máxima actividad se presentan en este caso hacia las 24 horas. En este caso el animal registra un periodo circadiano de 25.7 horas (fig. 37-b). El quinto día del experimento se aplicó una dosis de 1 μl de HDP (1 nM) (indicado por la flecha), en este caso a las 18 horas circadianas. Puede observarse un pequeño transitorio y la consecuente recuperación del ritmo. Las barras de arriba indican la posición en que la fase se hubiera esperado el punto más alto si la hormona no se hubiera aplicado. Note que la aplicación de la HDP produce un cambio de fase correspondiente a un adelanto (con respecto a lo esperado), de 11.2 horas, (indicado por la línea punteada). En la parte superior derecha se presenta el periodograma de los ciclos después de la aplicación de la señal química. En este casos el periodo es similar al presentado antes de la inyección de HDP (26.6 horas) (fig. 36-b y fig 36-c).

RESULTADOS FIGURA 36

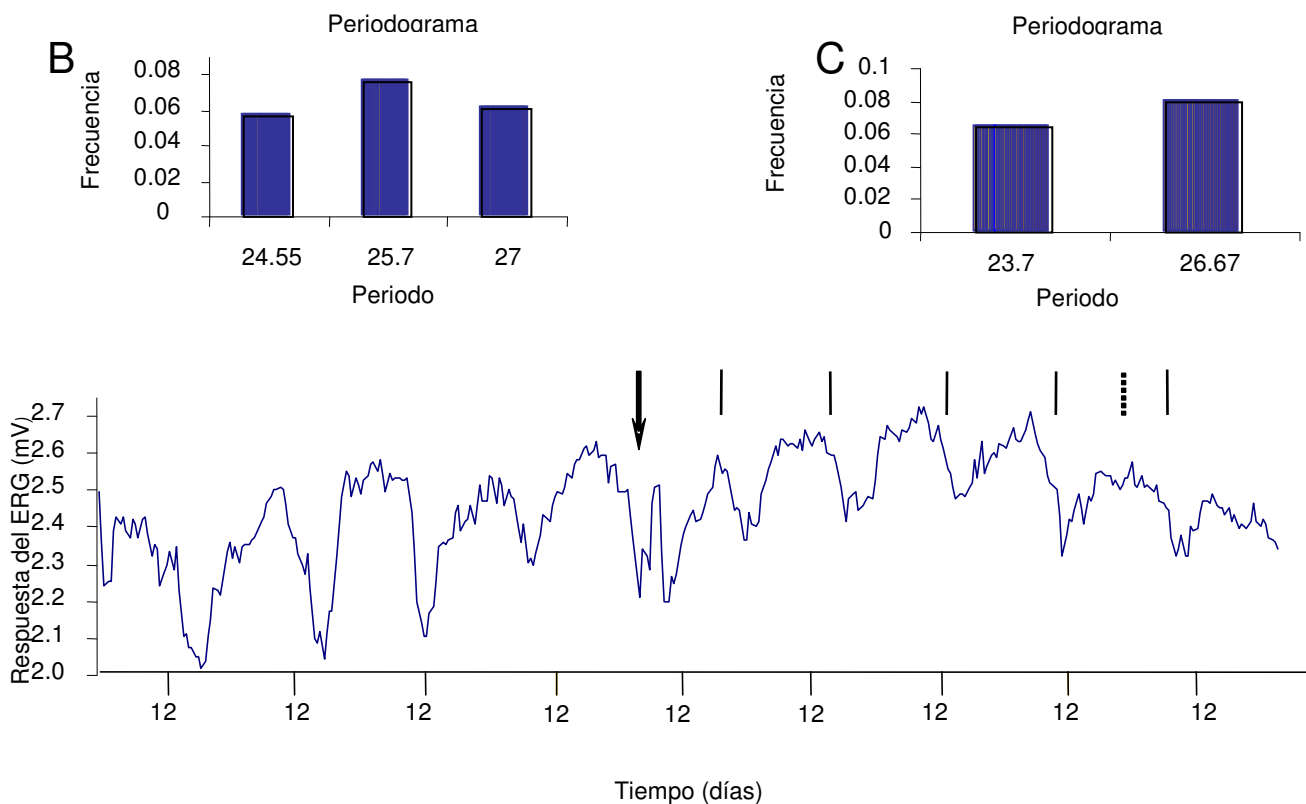


Figura 36: Ritmo Circadiano del ERG con HDP; con adelantos de fase ($\Phi = 9$ horas). En la parte superior se muestran los periodogramas antes y después de la aplicación de la hormona.

La figura 37-a muestra un ritmo circadiano de amplitud del ERG de un segundo acocil colocado en condiciones idénticas al ejemplo anterior. Como en el primer ejemplo, el quinto día del experimento se inyectó una dosis de 1µl de HDP (1nM) (indicado por la flecha), pero en este caso hacia las 12 horas circadianas. También se observó un pequeño transitorio y la recuperación del ritmo. Las barras de arriba indican la posición en que la fase se hubiera esperado durante su punto máximo si la hormona no se hubiera aplicado. Note que la aplicación de la HDP produce un cambio de fase, (ahora se trata de un atraso de fase con respecto a lo esperado), de 12 horas, (indicado por la línea punteada). En la parte superior izquierda y derecha se presentan los periodogramas de los ciclos antes y después de la aplicación de la señal química. En ambos casos los periodos predominantes son de 24 y 22.8 horas respectivamente (fig 37-b y 37-c).

RESULTADOS FIGURA 37

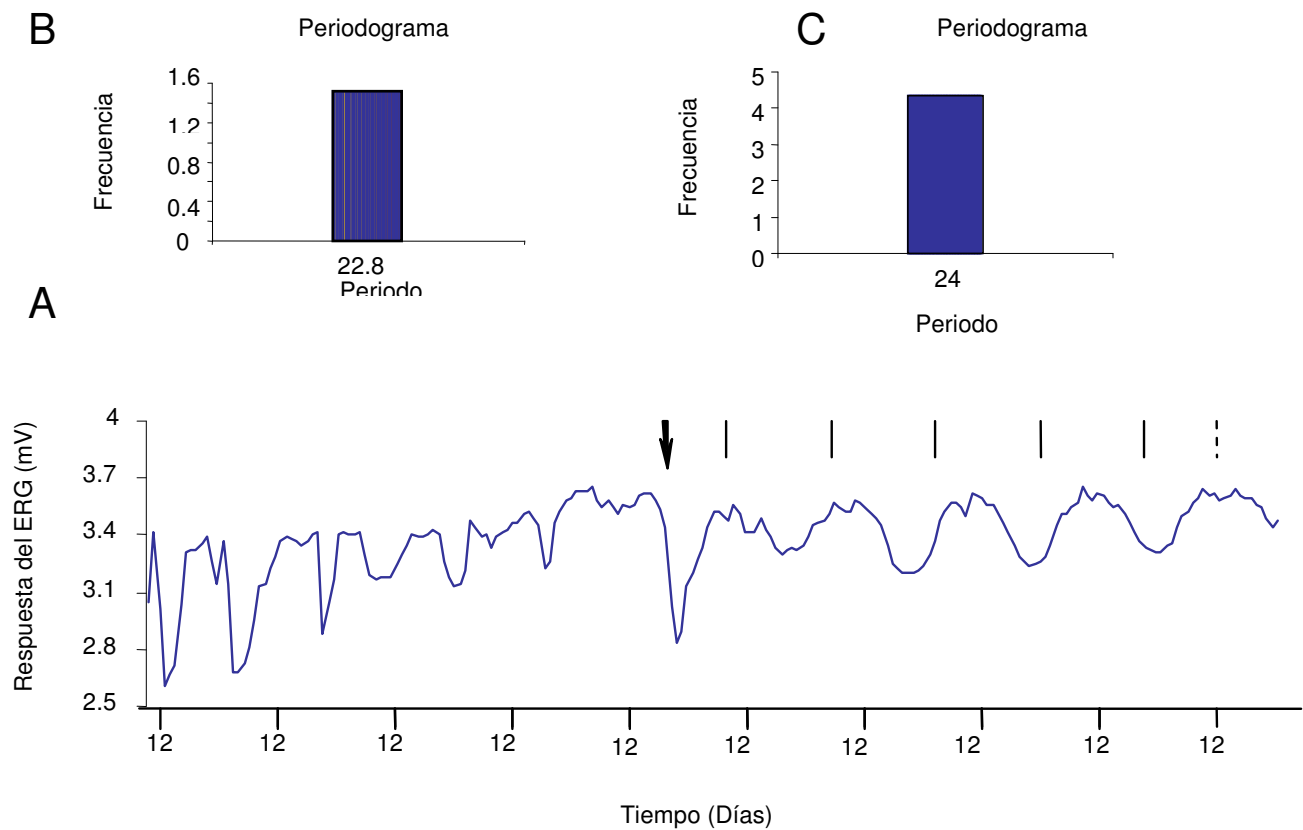


Figura 37: Ritmo Circadiano del ERG con HDP; con atrasos de fase ($\Phi = -12$ horas). En la parte superior se muestran los periodogramas antes y después de la aplicación de la hormona.

Estos experimentos se hicieron en diferentes tiempos (todas las horas circadianas) hasta cubrir el ciclo completo de 24 horas, esta maniobra tuvo por objeto conocer si la sensibilidad del sistema ante el estímulo (una dosis única de HDP) cambia de acuerdo con la hora del día, lo que de presentarse sugiere la acción de un estímulo químico sobre los osciladores responsables del ritmo del ERG. Así los osciladores mostrarían cambios en su velocidad expresados como adelantos o atrasos de la fase del ritmo una vez que éste hubiera recuperado su estado estable, alterado inicialmente a consecuencia de la estimulación aplicada.

Los resultados de los 24 experimentos del ritmo del ERG que cubrieron el ciclo de 24 horas, se reunieron en una curva de respuesta de fase mostradas en la figura 38. Aquí se observan diferentes zonas de atrasos y de adelantos de acuerdo con la hora del día. Entre las CT 14 y la CT 7 circadianas hay un claro periodo de adelantos de fase, mientras que de las CT 8 a las CT 12 circadianas lo que se manifiestan son atrasos de fase.

RESULTADOS FIGURA 38

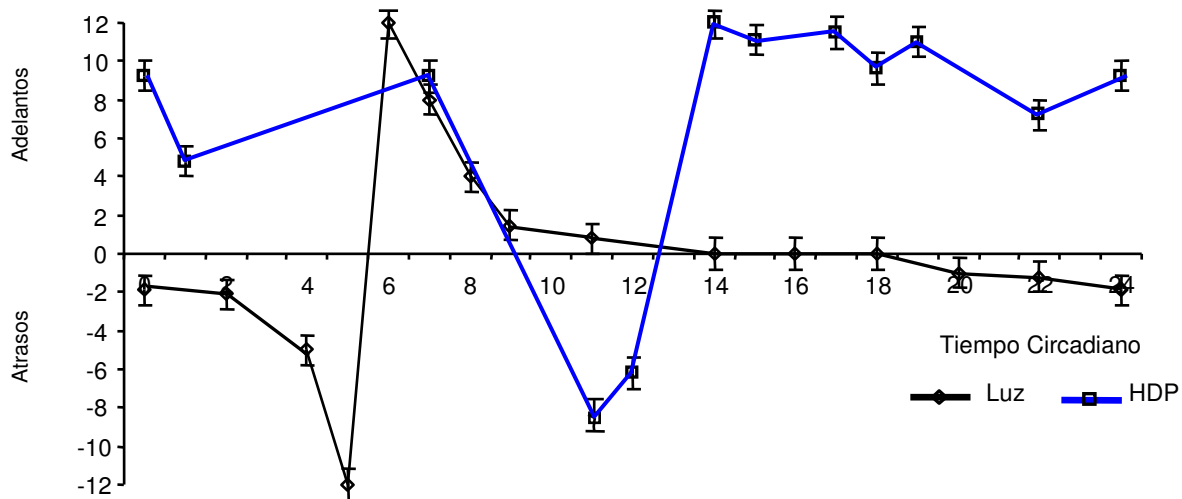


Figura 38: Curva de respuesta de fase del ritmo circadiano del ERG con HDP; en el eje de las abscisas se muestran las horas circadianas y en el eje de las ordenadas se observan los adelantos y atrasos de fase. Además se compara la curva de respuesta de fase del mismo ritmo con estímulos luminosos presentada por Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1995).

CURVAS DE RESPUESTA DEL RITMO MOTOR

En la gráfica de la figura 39-a se muestran los cambios en la actividad locomotora espontánea de un acocil adulto grabado durante 10 días en oscuridad (OO) y temperatura constante (16°C). El eje de las ordenadas muestra la cantidad de movimiento por área recorrida; el eje de las abscisas muestra el tiempo externo.

Los máximos de actividad se presentan durante la noche, lo que expresa la actividad circadiana propia de un organismo nocturno, aunque pueden observarse ligeros desplazamientos debido al periodo endógeno del acocil.

El quinto día del experimento se inyectó entre el quinto pleópodo y el primer pereiópodo una dosis de 1 µl de HDP (1 nM) (indicado por la flecha), hacia las 18 horas circadianas. En este caso no es evidente una onda transitoria más bien puede observarse una disminución en la cantidad de movimiento general del acocil sin que se viera modificado sustancialmente el periodo aunque si la fase. La fase habría permanecido en su punto máximo en ausencia de HDP donde indican las barras superiores (fase esperado) pero se observa un retraso de 9 horas marcado por la línea punteada (fase observada).

Los periodogramas correspondientes a los ciclos antes y después de la aplicación de la señal química se muestran en la parte superior indicando un cambio mínimo en el periodo; 22.2 horas como máximo antes de la señal química (fig. 39-b) y de 20.6 horas después de la señal química (fig. 39-c).

RESULTADOS FIGURA 39

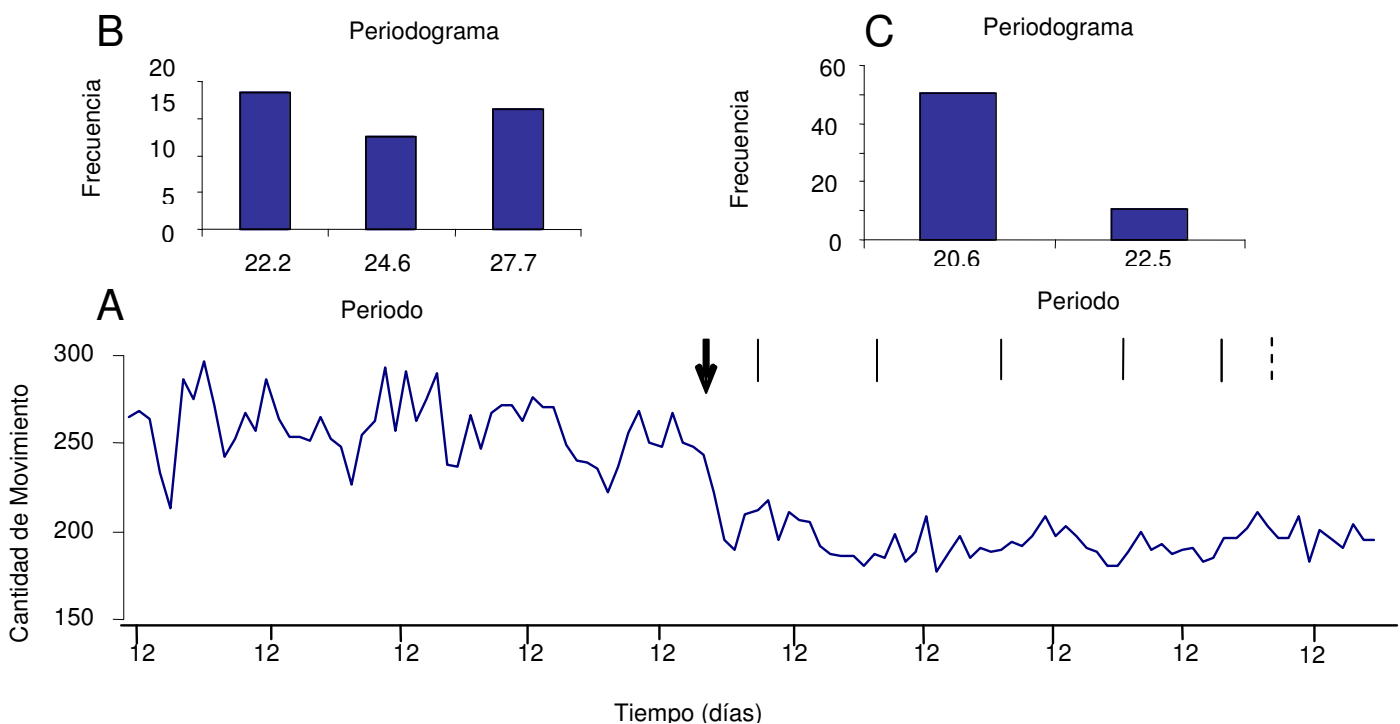


Figura 39: Ritmo circadiano del ritmo motor con HDP; con atrasos de fase ($\Phi = -3$ horas). En la parte superior del grafico se muestran los periodogramas antes y después de la aplicación de la hormona.

En la parte inferior se muestra un segundo ejemplo del ritmo de la actividad locomotora espontánea (fig. 40-a) de un acocil grabado en idénticas condiciones durante 10 días. El quinto día del experimento se inyectó una dosis de 1µl de HDP (1nM) (indicado por la flecha), hacia las 21 horas circadianas. En este caso es evidente una onda transitoria breve y de nuevo una disminución en la cantidad de movimiento general del acocil y un cambio en la regularidad de las ondas, sin embargo el cambio de fase es evidente manifestándose un adelanto de 2 horas en su punto máximo (barras superiores continuas y punteadas; fase esperada y fase observada respectivamente). El periodo se mantiene estable como lo muestran los periodogramas en la parte superior de la gráfica, 23 horas antes (fig. 40-b) y después de la aplicación de HDP (fig. 40-c).

RESULTADOS FIGURA 40

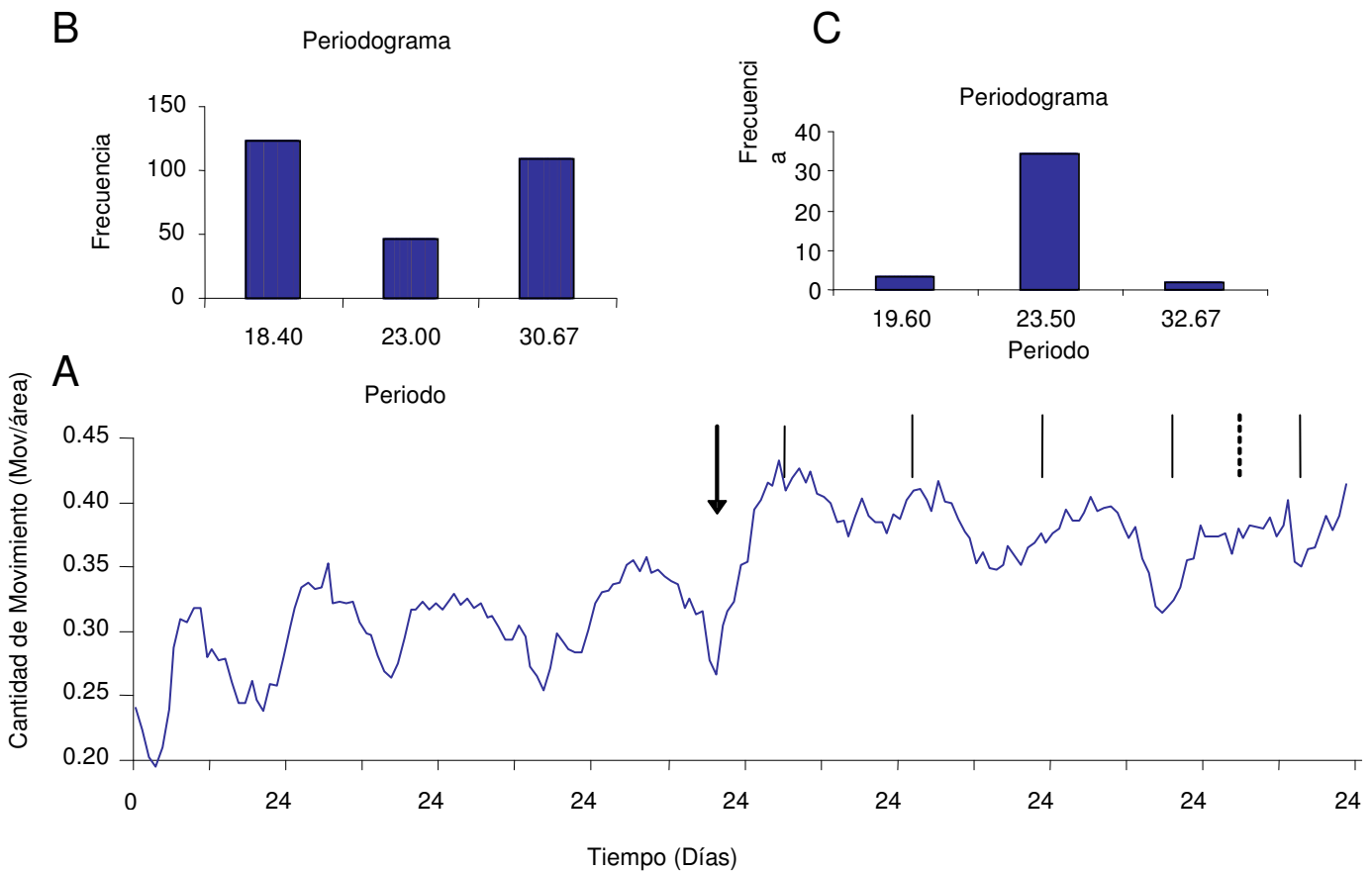


Figura 40: Ritmo circadiano del ritmo motor con HDP; con adelantos de fase ($\Phi = 12$ horas). En la parte superior se muestran los periodogramas antes y después de la aplicación de la hormona.

Los resultados de los 18 experimentos de ritmo motor que cubrieron el ciclo de 24 horas, se reunieron en una curva de respuesta de fase mostrada en la figura 40 para actividad locomotriz.

La figura 40 muestra diferentes zonas de atrasos y de adelantos de acuerdo con la hora del día. Entre las CT 3 y la CT 8, así como entre las CT 19 y las CT 22 horas circadianas hay un claro periodo de adelantos de fase, mientras que entre las CT 10 a las CT 18 y de las CT 23 a la CT 3 se manifiestan atrasos de fase.

Este tipo de curva es conocida como de tipo bimodal, es decir, se observan dos claras zonas de adelantos y otras dos zonas de atrasos. Una comparación entre esta curva y la que fue obtenida con la aplicación de estímulos luminosos únicos (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994) refuerza la idea de que la hormona dispersora del pigmento modifica la organización de los osciladores que subyacen a la generación y expresión del ritmo circadiano motor. Es de especial interés que ambas curvas son bimodales y más aún parecen coincidir los tiempos de adelantos y atrasos de fase.

RESULTADOS FIGURA 41

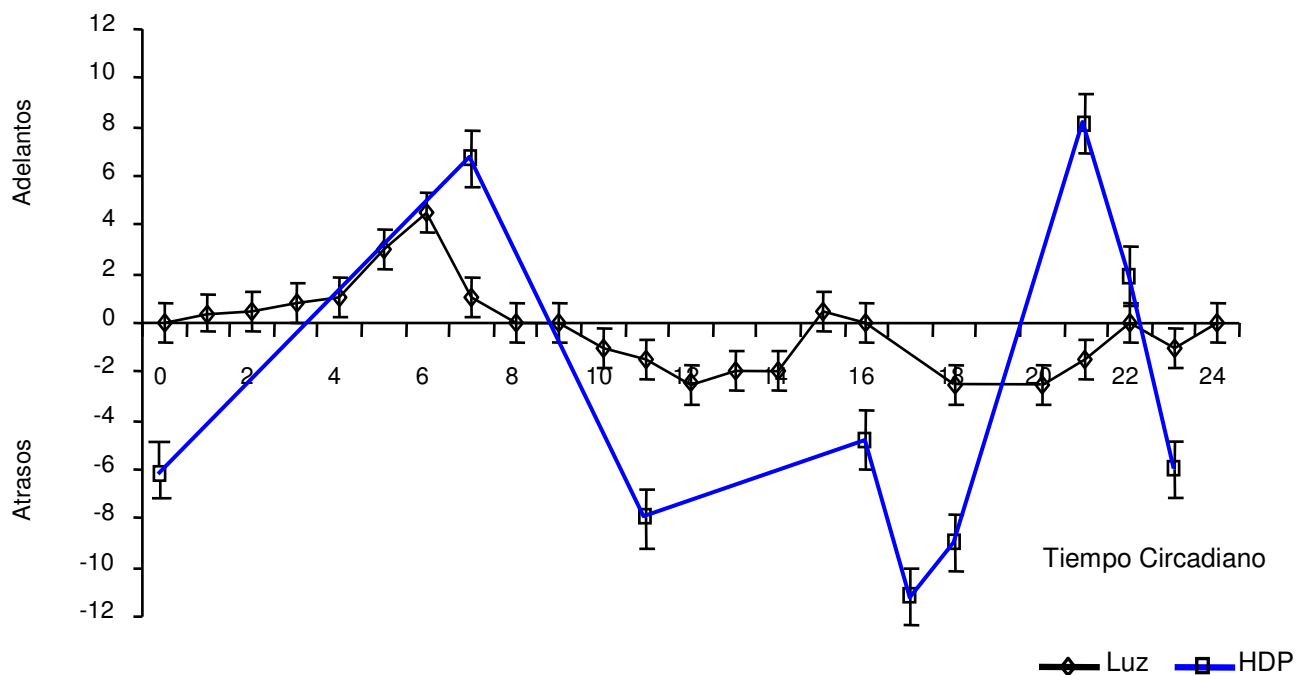


Figura 41: Curva de respuesta de fase del ritmo circadiano locomotor con HDP; en el eje de las abscisas se muestran las horas circadianas y en el eje de las abscisas se presentan los adelantos y atrasos de fase. Además se compara la curva de respuesta de fase del mismo ritmo con estímulos luminosos presentada por Viccon-Pale y Fuentes-Pardo (1998).

DISCUSIÓN**LOCALIZACIÓN DE LA HDP EN EL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL****TALLO OCULAR**

La HDP proporcionada por los laboratorios Genemed Systems resultó adecuada tanto para detectar la presencia de la hormona, como su acción sincronizadora de tipo no luminoso en los ritmos circadianos de respuesta a la luz y motor.

La amplia distribución de la HDP en el sistema nervioso del acocil, en particular en el tallo ocular y el ganglio cerebroide, fue evidenciada por el gran número de marcas inmunorreactivas ante la presencia de suero anti HDP que se localizaron lo mismo mediante reacciones fluorescentes que con peroxidasa, en las preparaciones de estas dos estructuras.

Al ser seccionado el tallo ocular, los pigmentos retinianos accesorios, en particular el pigmento distal, tienden a dispersarse a lo largo del eje mayor de la omatidia, lo que lleva a ésta al estado de adaptación a la luz el cual se alcanza gracias a la acción de la HDP. En consecuencia, uno de los aspectos más característicos de los cortes de ojo es la presencia de HDP delineando con gran precisión a los conos cristalinos de la omatidia (Fig. 7).

En las regiones del tallo ocular es notable la amplia distribución de HDP en el tallo ocular. La presencia de marcas inmunorreactivas a la hormona en la lámina ganglionar, la médula externa y la médula interna nos sugirió, inicialmente, que en esas zonas se establecerían contactos sináptico entre las fibras productoras de HDP, sin embargo, al aplicar tinciones específicas para sinaptofisina se observó que las marcas sinápticas están distribuidas uniformemente en todo el neuropilo (lámina, medula externa, interna terminal), y no coinciden con las fibras HDP-érgicas. (datos no mostrados)

Debido a que la HDP es una sustancia fuertemente implicada en la organización de los sistemas circadianos, las tinciones se hicieron en distintos momentos del ciclo de 24 horas con la finalidad de observar cambios en los niveles de tinción o cambios en los patrones de distribución. No obstante, sin importar la técnica usada o la hora del día, no se encontraron cambios en la intensidad de la marca ni en la distribución de las fibras (datos no mostrados).

El número de fibras y de somas que presentan reacción a la HDP es, en *Procambarus clarkii*, mucho más elevado que en otras especies de crustáceos e insectos (Mangerich y cols., 1987; Nässel y cols., 1991). La HDP dentro de los neuropilos muestra que las fibras que la contienen forman circunferencias y se distribuyen en forma de capas. En la lámina ganglionar, por ejemplo, es notable la presencia de grandes somas y fibras

inmunoreactivas a HDP que proyectan hacia la región superior e inferior (fig. 8), mientras que en las médulas externa e interna la distribución de las marcas inmunorreactivas se presenta en somas pequeños y fibras que van al interior del neuropilo (fig. 9 y fig. 10). Esta distribución es muy similar a la que encuentran otros autores en *Carcinus maenas* y *Orchonectes limosus* quienes inclusive la propusieron como típica de los crustáceos (Keller y cols., 1985 a, b; Mangerich y cols., 1986).

También suponen que las fibras reactivas a HDP están cumpliendo una función neurosecretora, ya que están ampliamente distribuidas, posiblemente la gran cantidad de fibras modifiquen la función sináptica, actuando como un neuromodulador o neurotransmisor local.

OBSERVACIONES EXTRAS

Otro aspecto de la organización estructural del tallo ocular que resulta interesante es la presencia de células de gran tamaño (20- 25 μm de diámetro) que se ubican entre las fibras de la retina (fig. 7-b). Sus cuerpos circulares no parecen tener proyecciones o axones hacia ninguna otra fibra y tampoco fueron reactivas a la HDP. Sólo podemos afirmar que son neuronas debido a su reacción positiva con la sinaptofisina y que son muy similares a las neuronas reactivas a corazonina que fueron reportadas por Porras y cols., en 2003 en los corpora cardiaca de algunos insectos.

GANGLIO CEREBROIDE

La amplia distribución de HDP que encontramos en el ganglio cerebroide sugiere al menos dos posibilidades que no se excluyen entre sí:

1. La distribución de HDP por circulación general impregna al sistema nervioso.
2. La HDP actúa en esta región como neurotransmisor y como neuromodulador.

Debe, sin embargo, hacerse notar que en un acercamiento más cuidadoso a los resultados obtenidos, se comprueba que las marcas inmunorreactivas a HDP son más intensas en protocerebro y tritocerebro que en deutocerebro (fig. 15).

En la zona del protocerebro conocida como *cúmulo protocerebral* se encontraron células que mostraron una intensa reacción anti-HDP (fig 17, 19 y 20-c). En su interior, se observaron gránulos reactivos a la marca de peroxidasa, así como algunos núcleos con la marca fluorescente. Dados los reportes de otros autores acerca de la existencia de células que en forma rítmica producen HDP (la cual ha sido reconocida como la expresión de un reloj circadiano), se sugiere fuertemente la posibilidad de que estas células, que en el acocil sintetizan HDP, sean la región del sistema nervioso del acocil en la que se ubicaría el marcapaso circadiano.

Un poco más arriba del puente protocerebral se encuentra una región de tejido laxo que muestra gran reactividad ante la HDP (fig. 18). En esta región se demostró la presencia no sólo de células gliales y vasos sanguíneos como era de esperarse de acuerdo con su aspecto general, sino también, y de manera importante, de células reactivas a la sinaptofisina y en las que se tiñeron gránulos de Nissl; es decir, de neuronas.

En algunos cortes de estas regiones se comprobó la presencia de fibras provenientes de los tractos oculares que proyectan a los centros integradores visuales del protocerebro (fig. 18) los que a su vez conectan con células del cúmulo protocerebral (figs. 17 y 20-d). Estos hechos apoyan la posibilidad de que el oscilador propuesto en el tallo ocular, responsable en buena medida del ritmo circadiano de respuesta a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977), interactúe con un oscilador en protocerebro según ha sido sugerido por algunos autores (Moreno-Sáenz y cols., 1992; Hernández y Fuentes-Pardo, 2001).

Se puede también observar como algunas fibras proyectan a la región contralateral del protocerebro, lo que apoya la posibilidad de interdependencia entre las regiones derecha e izquierda de las estructuras del protocerebro responsables de la generación de los ritmos circadianos. Vale la pena enfatizar que esta interdependencia daría sustento a la regulación de la actividad circadiana en el acocil (Moreno-Sáenz y cols. 1992, Barrera-Mera y Block, 1990).

El deutocerebro mostró poca reactividad al anticuerpo contra-HDP. Las marcas obtenidas son más notorias con la fluorescencia que con la peroxidasa, presentandose principalmente en los somas de los lóbulos

olfatorio y accesorio. Aunque hay fibras que proyectan hacia las regiones centrales del ganglio cerebroide se desconoce si hay o no entrecruzamiento con la región contralateral o si proyectan hacia proto o tritocerebro. En cualquier caso, lo que se puede afirmar es que la HDP de esta región no desempeña ningún papel en la organización de los sistemas circadianos, ya que en experimentos de ablación del deutocerebro no se observa efecto sobre la actividad circadiana (Verde y Fuentes-Pardo. en preparación).

Por lo que se refiere al tritocerebro, se encontró inmunorreactividad a la HDP en el neuropilo medial anterior (MAN) y en el neuropilo lateral anterior (LAN) (fig. 21, 23 y 25). Es de notarse la ausencia de fibras de interconexión así como la presencia en ambas regiones de gránulos reactivos a la HDP dentro del citoplasma y no dentro del núcleo de las células (fig. 22), lo que sugiere que en tritocerebro las células acumulan HDP.

Debido a la gran cantidad de cortes, tinciones y de experimentos realizados, se pudieron hacer inferencias tridimensionales en algunas regiones del ganglio cerebroide, aún de modo parcial, podemos proponer que la organización de las fibras y neuropilos con inmunorreactividad a la HDP, tienen interconexiones entre las regiones izquierda y derecha, además hay fibras que se desplazan entre las regiones dorsal y ventral (figs. 16, 17 y 24).

Podemos inferir que las fibras primero comunican los lados derecho e izquierdo del ganglio y que al ir profundizando, la comunicación lateral cambia a grupos de células estables, que incluso rodean los tractos ópticos pero no los penetran, luego muchas de esas fibras descienden teniendo contacto con deutocerebro y con tritocerebro para continuar a través de las comisuras circunesofágicas hacia otros ganglios, posiblemente el estomatogástrico (donde la hormona controlaría o modificaría los ritmos masticadores) y luego a otros ganglios torácicos (donde modificaría los ritmos locomotores). Tritocerebro también tiene una organización similar mostrada en grupos aislados que luego se conectan (figs. 21, 23 y 25) interconectando centros de LAN y MAN para luego proyectarse hacia la parte posterior (figs. 26 y 27).

Podemos describir y suponer conexiones aferentes o eferentes entre los diversos órganos como son el tallo ocular y el protocerebro, podemos sugerir modificaciones químicas o eléctricas entre los diversos neuropilos del ganglio cerebroide, podemos observar la compleja interacción celular entre los diferentes planos inferior y superior ventral y dorsal así como el izquierdo y el derecho; pero es evidente que falta aún mucho por conocer en lo que respecta a la organización del sistema responsable de la producción, acumulación, liberación y transporte aferente y eferente de la hormona dispersora del pigmento en el ganglio cerebroide de *Procambarus clarkii*.

LESIÓN DEL GANGLIO CEREBROIDE

Tomando como base, la organización estructural descrita anteriormente que muestran las células y fibras con actividad inmunorreactiva a la HDP, y por otro lado, tomando los antecedentes que se refieren a la participación del protocerebro en la generación de la actividad circadiana en el acocil (Hernández y Fuentes-Pardo, 2001), procedimos a realizar experimentos de lesión en regiones específicas del protocerebro. Sometimos a los animales en registros de largo plazo del ERG y de la actividad locomotriz, una vez que se hubieran recuperado de los efectos de la manipulación quirúrgica. Los registros iniciaron el segundo día posterior a la lesión, a los 30 días después de la lesión y a los 90 días después de la lesión y las diferencias que se observaron en cada condición sólo expresan el diferente grado de recuperación del correspondiente ritmo de acuerdo con el tiempo transcurrido después del daño en el protocerebro (figs. 31, 32, y 33).

Entre los síntomas que mostraron los animales durante la operación, destaca la pérdida del equilibrio que sigue inmediatamente a la lesión y que desaparece paulatinamente en los siguientes días hasta que los acociles recuperan nuevamente la verticalidad y el movimiento ambulatorio normal (datos no mostrados).

Se podría argumentar que la pérdida de la actividad circadiana se debe a lo agresivo de la lesión o a la pérdida del equilibrio y no a la destrucción de grupos neuronales específicos relacionados con la generación de tal actividad. Sin embargo, la destrucción masiva de otras regiones del ganglio cerebroide como el deutocerebro, donde se ha extirpado por completo el ganglio olfatorio (datos no mostrados), no afecta el equilibrio de los animales más allá de unas cuantas horas y no se modifican las características esenciales del ritmo circadiano de respuesta a la luz (Verde y Fuentes Pardo, en preparación). En éste caso la punción aunque es agresiva no es de las mismas dimensiones que las realizadas en deutocerebro, recuperando la verticalidad y perdiendo el ritmo del ERG y el motor.

Un aspecto que vale la pena mencionar acerca de los registros de los ritmos del ERG y motor obtenidos a distintos tiempos posteriores a la lesión del protocerebro se refiere a la presencia de oscilaciones muy irregulares y de alta frecuencia. Conforme transcurre el tiempo, hay una clara y progresiva reducción de estas dos características hasta obtener, pasadas 9 ó 12 semanas, registros mucho más parecidos a los de los animales intactos (fig. 33).

Las oscilaciones irregulares y de alta frecuencia se han interpretado como la expresión de la falta de acoplamiento entre algunas de las estructuras que forman parte de un determinado sistema circadiano. Así, por ejemplo, se ha encontrado que durante la ontogenia de los ritmos del ERG y motor, aparecen muy pronto estas oscilaciones y, poco a poco, van cediendo el paso a otras de frecuencia más baja y con forma más regular hasta llegar a las de tipo circadiano (Fanjul-Moles y cols., 1992; Lara-Aparicio y cols., 1993; Fuentes-Pardo y cols.,

2001). Algo similar sucede en experimentos en los que se registran estos mismo ritmos pero de animales que han sido lesionados en alguna estructura determinada así como en registros de largo plazo de estructuras aisladas, (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Hernández-Falcón y cols., 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1992). Es posible que en estos casos, los sistemas que operan en etapas tempranas del desarrollo, esten actuando solamente los sistemas nerviosos (ya que no se han desarrollado aún los complejos hormonales) (Hafner y Tokarski, 1998). En sistemas en los que se han producido cierto tipo de lesiones o en estructuras aisladas, las oscilaciones de alta e irregular frecuencia sean la manifestación de la falta de integridad entre el sistema nervioso y los sistemas hormonales, e incluso con neuronas neurosecretoras o productoras de algún neurotransmisor, neuromodulador o alguna neurohormona (HDP), inclusive de una proteína generadoras de ritmos (Per). Cabe también la posibilidad de que la aparición del ritmo circadiano sea el efecto orquestado de la aparición de diferentes ritmos que al estar en un cierto ciclo puedan acoplarse y sumar sus diferentes frecuencias para generar una oscilación de características circadianas. En los experimentos de lesión y de estructuras aisladas se esperaría que se mantuviera este tipo de oscilaciones de alta frecuencia por algún tiempo si es que se tuviera un oscilador secundario, esclavo o independiente.

En otras especies se han llevado a cabo experimentos de lesión de células inmunorreactivas a HDP y su efecto sobre la generación de ritmos circadianos; algunos autores han propuesto la existencia de un generador circadiano relacionado con la HDP en la mosca *Drosophila melanogaster*, el cual estaría organizado en pequeños grupos de células del cerebro denominadas “*neuronas laterales*” responsables de la síntesis de la proteína PER. La desaparición de estas células conlleva a la desaparición de un comportamiento rítmico. (Dushay y cols., 1989; Zerr y cols., 1990; Hardin y cols., 1992b; Helfrich-Förster y Homberg en 1993). Helfrich-Förster y Homberg (1991) estudiaron esta región del cerebro en *Drosophila* y encontraron que la inervación de las neuronas inmunorreactivas a la HDP, conforma todo un neuropilo denominado “*médula accesoria*”. Los autores modifican genéticamente a las moscas cuyas fibras inmunorreactivas a la HDP se distribuyen principalmente en la médula accesoria del ganglio cerebroide y el protocerebro y que desaparecen casi en su totalidad produciendo animales arrítmicos, hecho que ha sido interpretado en el sentido de que estas fibras tienen un papel importante en la generación de ritmos (Helfrich-Förster y Homberg, 1993). En otra serie de experimentos, algunos autores han obtenido diversas mutaciones en insectos, en los que las manipulaciones a células inmunorreactivas a HDP han modificado y anulado ritmos motores o de eclosión (Helfrich-Förster, 1998; Park y Hall, 1998; Renn y cols., 1999).

Hay otro tipo de lesiones que ha arrojado valiosa información sobre las fibras inmunorreactivas a la HDP. Al cortar fibras inmunorreactivas a HDP y sus comunicaciones con los lóbulos ópticos y los centros nerviosos en la cucaracha *Leucophaea maderae*; Stengel y Homberg (1994) demostraron que los grupos celulares que se encuentran entre la región de la médula y la lámina óptica son los responsables de la actividad rítmica

locomotora de la cucaracha; después de la lesión, muchas de las fibras generan nuevas conexiones y aunque el reacomodo de las fibras se vuelve prácticamente caótico, hay ciertos patrones que se conservan y una nueva y marcada inervación aparece en el protocerebro. A esta reconexión sigue la recuperación de la ritmicidad perdida. En el caso de la cucaracha, las fibras lesionadas aumentan el número de dendritas cubriendo mayor superficie de forma un tanto caótica, pero la aparición de fibras supernumerarias en uno de los extremos del protocerebro puede generar periodos mayores a 24 horas. (Stengel y Homberg; 1994)

Trabajos de Reisching y Stengl (2003) han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la organización del marcapaso de la cucaracha *Leucophaea maderae*. Al trasplantar la médula accesoria (la cual contiene neuronas y fibras inmunorreactivas a la HDP), de una cucaracha, a otra que mostraba un periodo circadiano diferente a la del donador, se logró la restitución de la actividad con el periodo del donador. Se sabe también que las fibras que provienen de la médula accesoria donadora tienen proyecciones importantes al protocerebro lo que indica que se requiere forzosamente de una comunicación entre el lóbulo óptico y el centro integrador del protocerebro para la generación de la actividad circadiana.

Un criterio poderoso en la determinación de un marcapaso circadiano es la posibilidad de mantener a la(s) estructura(s) propuesta(s) como generadora(s) del ritmo considerado, en registros *in vitro*. Durante mucho tiempo se han llevado acabo intentos de obtener registros *in vitro* de células nerviosas de acocil, sin que a la fecha se haya tenido algún éxito. Una aproximación al estudio del ganglio cerebroide *in vitro* fue realizada por Hernández y Fuentes-Pardo (2001). Los autores propusieron un sistema semi-aislado del ganglio cerebroide, registrando diferentes zonas del ganglio cerebroide en condiciones casi incomunicadas. Los autores concluyeron que el sistema semi-aislado proporciona evidencia de que el ganglio cerebroide tiene presentes generadores circadianos y que están relacionados con los ritmos de potenciales espontáneos y potenciales provocados.

Petri y Stengel (1999) intentaron obtener cultivos primarios de células reactivas a la HDP aisladas del protocerebro de la cucaracha. Aún cuando no lograron detectar una producción oscilante de HDP en el baño de cultivo, los autores encontraron diferencias anatómicas en el grosor de axones así como en el número es espinas dendríticas entre los distintos tipos de neuronas que forman el complejo y entre el número y consistencia de los gránulos contenidos en las células.

SINCRONIZACIÓN DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS

La sincronización de los sistemas circadianos es la propiedad de éstos de ajustar el periodo natural de su oscilación al periodo de alguna señal externa bien establecida. La señal a la que se ajustan con mayor facilidad los sistemas circadianos es, con mucho, la de la alternancia día noche o su homólogo experimental, la relación luz oscuridad con periodos de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de oscuridad (L:O 12:12). Es evidente que la base de los mecanismos que hacen posible el ajuste de un periodo en oscilación libre (de valor cercano a pero diferente de 24 horas) a un periodo de exactamente 24 horas, radica en una sensibilidad a la luz, de parte del marcapaso, que cambia poco a poco a lo largo de las veinticuatro horas del día.

Inicialmente, se pensó que los ritmos circadianos sólo eran capaces de ser sincronizados por la luz. Tiempo después, sin embargo, se estableció el concepto de “sincronización por estímulos no luminosos” en alusión a la posibilidad de los ritmos circadianos de responder en forma diferencial a la presencia de muchas otras formas de estimulación como las de tipo químico, alimenticio, social o de temperatura.

Los ajustes de un periodo circadiano de un sistema en oscilación libre, al periodo de una señal externa de 24 horas, se logran por medio de cambios sucesivos de la fase del ritmo circadiano en oscilación libre cuando es estimulado con señales únicas aplicadas en distintos momentos de la oscilación. Los primeros trabajos sobre el particular los llevó a cabo Pittendrigh quien estudió los cambios de fase que muestran los ritmos en oscilación libre ante estímulos luminosos de intensidad conocida y de corta duración (15 minutos). Al establecer una relación gráfica en la que se muestren los atrasos o adelantos de la fase del ritmo (ordenadas), generados como consecuencia de la aplicación de un estímulo único, con respecto a la hora del ciclo circadiano (abscisas) en la que fue aplicado, se obtiene lo que se conoce con el nombre de “curva de respuesta de fase” (CRF) (Pittendrigh, 1960). La construcción e interpretación de las curvas de respuesta de fase se ha convertido en una herramienta valiosa que ha ayudado a predecir algunas propiedades fundamentales de los osciladores que subyacen a los sistemas circadianos.

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

Diferentes estudios han comenzado a utilizar diferentes sustancias químicas como señales no fóticas para comprender el funcionamiento de los osciladores endógenos, principalmente neurotransmisores como la serotonina (Page, 1987; Tomioka, 1991) e incluso la misma HDP (Petri y Stengel, 1997; Okamoto y cols., 2001; Singaravel y cols., 2003).

En un esfuerzo por conocer los mecanismos de los sistemas circadianos y en particular el efecto de la HDP como un sincronizador de tipo no luminoso en el acocil aplicamos la HDP esperando que actuara como un sincronizador de tipo no luminoso, en todos nuestros experimentos obtuvimos cambios de fase tanto para el ritmo del ERG como el motor.

Construimos las curvas de respuesta de fase del ritmo de amplitud del ERG y el ritmo locomotor. Para el caso del ERG la aplicación de una dosis única de HDP basta para generar en el acocil cambios de fase (fig. 36 y 37) el máximo de atrasos se presenta hacia las 11 y 12 horas circadianas (noche subjetiva), los máximos adelantos se mantienen en el resto del ciclo, es decir entre las 14 a las 4 horas circadianas (día subjetivo) (fig. 38).

La CRF obtenida de la estimulación de HDP fue comparada con la CRF obtenida de la estimulación luminosa del acocil, (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983). Este tipo de curva es conocida como de tipo unimodal, es decir, se observa una clara zona de adelantos y otra de atrasos. La comparación entre ambas curvas refuerza la idea de que la hormona dispersora del pigmento modifica la organización de los osciladores que subyacen a la generación y expresión del ritmo circadiano del ERG.

Es de especial interés que ambas curvas son unimodales aunque no en los mismos horarios. Ambas curvas son diferentes entre sí ya que a pesar de ser unimodal en ambas, los cambios de fase no se dan en los mismos tiempos circadianos (fig. 38), la CRF del acocil es mucho más parecida a la obtenida por otros autores para la aplicación de HDP en la cucaracha, incluso en casi las mismas horas circadianas, (Petri y Stengel, 1997). En el caso de la cucaracha, la HDP también actúa como un sincronizador no luminoso, puesto que la CRF para este insecto presenta el máximo atraso hacia las 18:50 horas circadianas (día subjetivo) y el máximo adelanto de fase hacia las 1.8 y 18:30 horas circadianas (día subjetivo temprano y noche subjetiva tardía respectivamente). Comparada esta curva contra otras curvas de respuesta de fase de estímulos no luminosos (temperatura Wiedenmann, 1977; y serotonina Page, 1987) son todas ellas muy similares en el sentido que los cambios de fase son los mismos a casi las mismas horas circadianas y de tipo unimodal; difiriendo a la CRF obtenida con luz (Page y Barret, 1989).

Otro insectos, el grillo *Gryllus bimaculatus* ha sido estudiado en este sentido, mostrando una CRF construida con estímulos únicos de HDP para el ritmo locomotor. Este insecto también presentó cambios de fase, lo que indica que la HDP es capaz de actuar como un sincronizador de tipo no luminoso en varias especies.

La CRF del grillo igualmente es unimodal, sin embargo, presenta serias diferencias contra el estudio en acocil y en cucaracha; primeramente no son las mismas horas entre los cambios de fase, es decir, para el caso del grillo el máximo de adelantos se presenta hacia las 18 horas circadianas (medio día subjetivo), mientras que los atrasos máximos se muestran entre las 24 horas circadianas, (media noche subjetiva); cuando los autores compara otras CRF para estímulos luminosos y de serotonina ninguna de las curvas tiene similitud entre si, a excepción de ser unimodales todas ellas. Los autores de este trabajo discuten las diferencias entre el grillo y la cucaracha argumentando diferencias entre las técnicas usadas (lesión de uno o ambos lóbulos ópticos) lo que impondría la acción de un marcapaso sobre otro o él desacople de los mismos; la diferencia entre los tipos de HDP usada (los autores del trabajo de cucaracha usaron una hormona dispersora propia del grillo *Acheta domesticus*) lo que acarrearía diferencias entre las especies usadas, ya que la HDP usada entre uno y otro insecto difiere en el 4º aminoácido (Singaravel y cols., 2003).

Aunque las CRF del acocil y de los insectos son diferentes, principalmente en las horas circadianas en que ocurre el efecto de la HDP, la forma en que responden los osciladores es parecida, incluso se puede decir que en el caso del grillo la forma parece invertida con respecto al acocil posiblemente sea debido al comportamiento diurno del primero y nocturno del segundo.

Además hay otra correspondencia entre las CRF, tanto en el acocil como en los insectos la CRF obtenidas para HDP difieren fuertemente a las obtenidas con estímulos luminosos. Esto sugiere que los mecanismos que subyacen a los sistemas no luminosos, en particular para la HDP, son diferentes a los manifestados para estímulos luminosos, posiblemente rutas alternas (aférentes nerviosas o bioquímicas hormonales) hacia el marcapaso.

Para el caso del ritmo motor la aplicación de una dosis única de HDP bastó para generar en el acocil cambios de fase (fig. 39 y 40) el máximo de atrasos se presenta entre las 11 y 18 horas circadianas (medio día subjetivo) sin embargo una nueva serie de atrasos se observa hacia las 24 horas circadianas (media noche subjetiva), los máximos adelantos se mantienen en el resto del ciclo, es decir, un máximo de adelantos se observa a las 7 horas circadianas y nuevamente otro a las 21 horas circadianas (noche subjetiva temprana y noche subjetiva temprana respectivamente). A este tipo de curvas donde los cambios de fase se repiten en más de un momento se les denomina bimodales, los cuales son muy raros, ya que indican la presencia de por lo

menos dos osciladores actuando en diferentes tiempos, en este caso la HDP parece ser un sincronizador no luminoso del ritmo motor.

La CRF obtenida de la estimulación de HDP fue comparada con la CRF obtenida de la estimulación luminosa del acocil, (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994). Para nuestra sorpresa, la correspondencia entre ambas curvas fue mucho mayor, ya que la obtenida con estímulos luminosos resultó también de tipo bimodal, inclusive la primera serie de adelantos se manifiesta en las mismas horas circadianas (fig. 41). En ningún otro grupo de insectos o crustáceos se han reportado CRF de este tipo bimodal, pero el hecho de que en el acocil ambas curvas sean muy similares habla de un sistema propio del ritmo motor, el cual es controlado por dos osciladores circadianos independientes de los mostrados para el ritmo del ERG.

El sistema motor podría estar manifestando la acción de osciladores que muy probablemente estén en otros centros nerviosos como el ganglio estomatogástrico y los propios ganglios torácicos; en estos centros se han encontrado neuronas y ramificaciones reactivas a HDP, el ganglio estomatogástrico participa activamente en los movimientos rítmicos (aunque no de tipo circadiano) involucrados con la masticación (Mortir y Marder, 1991) muy posiblemente la acción propia de la HDP sea generar actividad rítmica de alta frecuencia a este nivel o modular mediante HDP la respuesta nerviosa. Posiblemente otros centros nerviosos en donde también se han encontrado células y fibras inmunorreactivas a HDP modifiquen la acción local (Mangerich and Keller, 1988), actuando como un oscilador específico de regiones particulares involucradas con el movimiento, la suma de señales neuroendocrinas de múltiples centros torácicos o abdominales resulta en la acción de un ritmo locomotor circadiano claro que se ve afectado por la HDP, por lo menos en dos momentos del día (fig. 41).

Parece ser que el sistema circadiano del acocil es sumamente complejo, ya que es posible que se presente una serie de osciladores nerviosos, controlados por fibras productoras de HDP (entre otras fibras que puedan producir otras sustancias, posiblemente PER o melatonina) en los diferentes centros integradores del ganglio cerebroide (principalmente protocerebro), así como en otros ganglios de la cadena abdominal (cuya acción puede estar controlada o modulada por HDP, en dirección céfalo-torácica o viceversa) (Mortin y Marder, 1991), y el sistema endocrino controlado básicamente por el complejo órgano-X glándula sinusal (en ambos tallos oculares), provee de una complejidad enorme al sistema. Múltiples osciladores actuando por etapas, desde el desarrollo embrionario hasta el estado adulto, de tipo nervioso y neuroendocrino son necesarios para que el sistema circadiano actúe de forma que se manifieste un comportamiento coherente y predecible del organismo en diferentes tiempos y circunstancias en un ambiente cambiante.

CONCLUSIÓN**PRESENCIA DE HDP EN TALLO OCULAR Y GANGLIO CEREBROIDE (MARCAS HISTOLÓGICAS)**

La HDP proporcionada por los laboratorios Genemed Systems resultó la apropiada para los diferentes experimentos realizados en esta tesis. La HDP se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso del acocil, tanto el tallo ocular como el ganglio cerebroide. Se localizó en el tallo ocular, particularmente en los fotorreceptores, en la lámina ganglionaris y algunos somas de médula externa, interna y terminal.

La disposición en los diferentes neuropilos es en bandas que corren transversalmente en cada neuropilo, los somas y fibras conectan las bandas entre si, y entre los neuropilos. La mayor tinción se obtiene en el sistema órgano X-glandula sinusal, confirmándose así la producción de HDP por parte de este sistema.

La HDP se localizó en el ganglio cerebroide, la marca inmunológica de peroxidasa y de fluorescencia marcaron zonas de protocerebro y tritocerebro con mayor intensidad que otras de deutocerebro. En protocerebro se encontraron células de gran tamaño que se tiñeron intensamente, ya que contenían una gran cantidad de gránulos indicando que estas células son productoras de HDP por si mismas. Se identificaron neuronas en la parte superior del protocerebro y fibras laxas que también fueron reactivas a la marca de HDP, se descartó que fueran glía o tejido conectivo, mediante tinciones de violeta de cresilo e inmunohistoquímica con sinaptofisina.

Se tiñeron los núcleos de las células del ganglio cerebroide confirmando la presencia de HDP en estas zonas. Las fibras del ganglio cerebroide se encontraron en los tractos ópticos, en protocerebro y decusan entre la parte izquierda y derecha del ganglio.

Las células en deutocerebro se tiñeron de modo importante (especialmente los somas alrededor de los lóbulos olfatorios y accesorios, y algunas fibras) pero parece ser que la HDP no cumple funciones circadianas en este caso.

Las marcas más importantes se encuentran en la región ventral del ganglio cerebroide. Las inmunoreacciones de la parte ventral del ganglio marcaron importantes zonas de protocerebro y tritocerebro en neuropilos antenulares (LAN) y neuropilos mediales (MAN), estas regiones parecen proyectar hacia la parte dorsal con disminución importante en el número de somas y de fibras. Los cúmulos de protocerebro en la parte dorsal son claros y definidos rodeando el quiasma óptico. Las marcas de tritocerebro posiblemente estén proyectándose hacia partes inferiores del sistema nervioso, como las comisuras circumesofágicas y el ganglio subesofágico.

LESIÓN DEL GANGLIO CEREBROIDE

Es suficiente una punción de un objeto metálico para generar una lesión en el ganglio cerebroide. La lesión de una parte de protocerebro destruye la actividad circadiana del ERG, y también la actividad circadiana motriz. Mientras que la extirpación de otras estructuras del ganglio cerebroide como el deutocerebro (lóbulo olfatorio) no destruye la actividad circadiana del ERG (Verde y Fuentes Pardo en preparación).

La lesión produce en algunos casos oscilaciones de alta frecuencia, aunque no se determinaron ritmos ultradianos regulares. Los resultados sugieren la recuperación de algunas fibras nerviosas con la consecuente recuperación de un tímido ritmo de características no determinadas. Se requiere de más de dos meses para que la actividad rítmica regrese aunque con características no circadianas e irregulares.

Un mayor número de experimentos más específicos de lesión en estos centros nerviosos arrojarán luz sobre la generación de los ritmos circadianos del acocil.

SINCRONIZACIÓN DEL RITMO DEL ERG Y MOTOR

Se confirma la existencia de un ritmo circadiano de amplitud del ERG y de un ritmo circadiano de actividad locomotriz espontánea con características típicas nocturnas. La aplicación exógena de HDP produce atrasos o adelantos de fase de acuerdo a una hora del día actuando como un sincronizador de tipo no luminoso para ambos ritmos. Es de especial interés que en el caso del ritmo del ERG, ambas curvas sean unimodales aunque no en los mismos horarios. Ambas curvas son diferentes entre sí ya que a pesar de ser unimodal en ambas, los cambios de fase no se dan en los mismos tiempos circadianos (fig. 38), la CRF del acocil es mucho más parecida a la obtenida por otros autores para la aplicación de HDP.

Comparada esta curva contra otras curvas de respuesta de fase de estímulos no luminosos (temperatura Wiedenmann, 1977; y serotonina Page, 1987) todas ellas son muy similares en el sentido que los cambios de fase son los mismos a casi las mismas horas circadianas y de tipo unimodal; difiriendo a la CRF obtenida con luz (Page y Barret, 1989; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1995).

Se pudieron genera CRF ante los cambios de fase generados por la acción de la HDP, siendo de tipo unimodal para el caso del ERG y una CRF de tipo bimodal para el caso de ritmo motor.

(Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). El protocerebro como marcapaso del ritmo y su participación en la regulación de la HDP (7) (Hernández and Fuentes-Pardo, 2001) son un poco más recientes.

El modelo también incluye algunas ideas hipotéticas: la directa relación entre la HDP con el marcapasos (8), y la llegada al marcapaso de señales sincronizadoras no luminosas (9).

Finalmente el diagrama incluye información obtenida recientemente del laboratorio de cronobiología y que se publicó un artículo en “Comparative Biochemistry and Physiology” (Verde, y cols., 2007), incluyendo parte de estos resultados: la acción directa de la HDP en las propiedades eléctricas del potencial de receptor de los fotorreceptores visuales (10), la acción de la HDP en el ritmo circadiano de la pseudopupila (11) y la acción de la HDP como un sincronizador no luminoso del ritmo circadiano del ERG (12) como lo proponemos con las curvas de respuesta de fase de éste trabajo.

En esencia, el diagrama explica la participación de la HDP en el sistema circadiano del ERG. Sin embargo, es necesario explorar más profundamente el papel de esta hormona con respecto a las estructuras involucradas en la generación y expresión de los ritmos circadianos en los crustáceos.

APÉNDICE

SOLUCIONES

SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATOS 0.1M PH 7.6 (TBS):

Trizma HCl 3.030g.

Trizma Base 0.695g.

NaCl 0.945g.

Disolver en 230 ml, ajustar el pH a 7.5 – 7.6 y aforar a 250ml.

Solución buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 (PBS):

Fosfato sódico monobásico 0.510g.

Fosfato sódico dibasico 2.945g.

NaCl 0.714g.

Disolver en 230 ml, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 250ml.

Solución STOCK de Violeta de Cresilo

2 gotas de violeta de cresilo, aforar con 100 ml de agua bidestilada

Buffer

2g de acetato de sodio, a 1000ml con agua bidestilada, agregar 3ml de ácido acético glacial.

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA INCLUSIÓN EN PARAFINA

Fijador de formaldehído al 10% durante 24horas.

Deshidratación en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Aclaración por xilol 15 minutos.

Inclusión en parafina líquida a 56°C.

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA INCLUSIÓN EN CONGELACIÓN

Fijador de formaldehído al 10% durante 24 horas.

Crioprotección en sacarosa a 30% durante 1 hora y en sacarosa al 15% durante 15 minutos.

Inclusión en medio de congelación tissue freezing medium.

Inmersión en nitrógeno líquido durante 5 minutos.

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA

Desparafinar en horno a 56°C 30 minutos en seco y en horno húmedo (xilol caliente) 15 minutos.

Rehidratar en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Hidratar en agua destilada 10 minutos

Teñir con hematoxilina alcohólica al 3%, de 3 a 5 minutos

Virar con agua de la llave unos segundos

Lavar con agua destilada unos segundos

Deshidratar en alcoholes graduales desde el 30% al 70%, 3 minutos

Teñir con eosina de I a 3 minutos

Deshidratar con alcoholes graduales al 96% en dos cambios y alcohol absoluto, 5 minutos

Aclarar con xilol, 5 minutos

Aplicar el medio de montaje

TRATAMIENTO DEL TEJIDO CON VIOLETA DE CRESILO (VOGT)

Desparafinar en horno a 56°C 30 minutos en seco y en horno húmedo (xilol caliente) 15 minutos.

Rehidratar en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Hidratar en agua destilada 10 minutos

Teñir con violeta de cresilo (1ml de sol STOCK 99 de Buffer), 10 minutos.

Lavar con agua bidestilada unos segundos

Deshidratar con alcoholes graduales 3 minutos

Aclarar con xilol, 2 minutos

Aplicar el medio de montaje

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

Desparafinar en horno a 56°C 30 minutos en seco y en horno húmedo (xilol caliente) 15 minutos.

Rehidratar en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Lavar con solución TBS 0.1M, PH 7.6 y tritón 0.5%.

Activar la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3%, 10 minutos.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Bloquear la peroxidasa endógena con Casblock (Peroxide Block) 20 minutos.

Aplicar anticuerpo primario (En este caso contra HDP a una concentración de 1:5000), 24 horas.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Aplicar anticuerpo secundario biotinado (Biotinado de IgG de conejo), 30 min.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Aplicar anticuerpo terciario reagente Ultratek (anticonejo ABC) 20 min.

Lavar con TBS 10 minutos.

Revelar con diaminobencidina.

Aplicar medio para el montaje.

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA INMUNOFLUORESCENCIA

Desparafinar en horno a 56°C 30 minutos en seco y en horno húmedo (xilol caliente) 15 minutos.

Rehidratar en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Lavar con solución TBS 0.1M, PH 7.6 y tritón 0.5%.

Activar la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3%, 10 minutos.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Bloquear la peroxidasa endógena Casblock (Peroxide Block), 20 minutos.

Aplicar anticuerpo primario (En este caso contra HDP a una concentración de 1:5000), 24 horas.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Aplicar anticuerpo secundario (acoplado a Fluoresceína) 1 hora.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Aplicar medio para el montaje.

TRATAMIENTO DEL TEJIDO PARA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA SINAPTOFISINA

Desparafinar en horno a 56°C durante 30 minutos en seco y en horno húmedo (xilol caliente) durante 15 minutos.

Rehidratar en alcoholes graduales cada 15 minutos.

Lavar con solución TBS 0.1M, PH 7.6 y tritón 0.5%.

Activar la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3%, 10 minutos.

Lavar con TBS, 10 minutos.

Bloquear la peroxidasa endógena Casblock (Peroxide Block) 20 minutos.

Aplicar anticuerpo primario (En este caso contra sinaptofisina a una concentración de 1:250), durante 24 horas.

Lavar con TBS, durante 10 minutos.

Aplicar anticuerpo secundario biotinado (Biotinado de IgG de conejo), durante 30 min.

Lavar con TBS, durante 10 minutos.

Aplicar anticuerpo terciario reagente Ultratek (anticonejo ABC) durante 20 min.

Lavar con TBS durante 10 minutos.

Revelar con diaminobencidina

Medio para el montaje

CURVA DOSIS RESPUESTA PARA HDP

La HDP se mandó sintetizar a los laboratorios Genemedic Systems en Estados Unidos, para conocer si el péptido que nos enviaron es el adecuado, así como para establecer la dosis pertinente, se procedió a probar su acción en estructuras que se sabe que muestran cambios ante la aplicación de la HDP. En particular los pigmentos retinianos accesorios y a los fotorreceptores visuales.

Esto se hizo mediante registros a corto plazo sobre el pigmento accesorio y midiendo el tamaño de área de pseudopupila, todos los experimentos se realizaron a la misma hora del día y se aplicaron diferentes dosis de HDP. Con una cámara de video se grabaron los cambios que se presentaron en la pseudopupila del animal, antes y después de la aplicación, a la circulación general, de dosis conocida de HDP. Como control, algunos animales recibieron una inyección de solución salina VH.

Todos los experimentos se realizaron a la misma hora del día, las dosis eran desde $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ($1 \mu\text{M}$) hasta $1 \times 10^{-12} \text{M}$ (1pM). Se construyó una curva dosis respuesta que nos indicó la dosis aplicada en los registros a largo plazo, siendo la más óptima $1 \times 10^{-10} \text{M}$ (1nM).

Los experimentos a corto plazo de los fotorreceptores visuales se realizaron sujetando a los acociles y colocando un electrodo metálico en la cornea del ojo y aplicando destellos de prueba de 1.8 lux de intensidad y $10 \mu\text{s}$ de duración cada 3 minutos durante 15 minutos. La respuesta eléctrica de los fotorreceptores (ERG) se amplificó y se desplegó en un osciloscopio para medir la amplitud de la componente H1.

Una vez establecido el ERG del animal se aplicaron 10 minutos de luz blanca para llevar a los fotorreceptores a un estado de adaptación a la luz. Al término de ese tiempo se apagó la luz y se midió la amplitud del ERG hasta pasar a una condición de adaptación a la oscuridad. Una vez estabilizada la respuesta se aplicó a la circulación general una inyección de HDP a una dosis conocida entre $1 \mu\text{m}$ y 1pM . Todos los experimentos se realizaron a la misma hora del día. Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la (fig. 43).

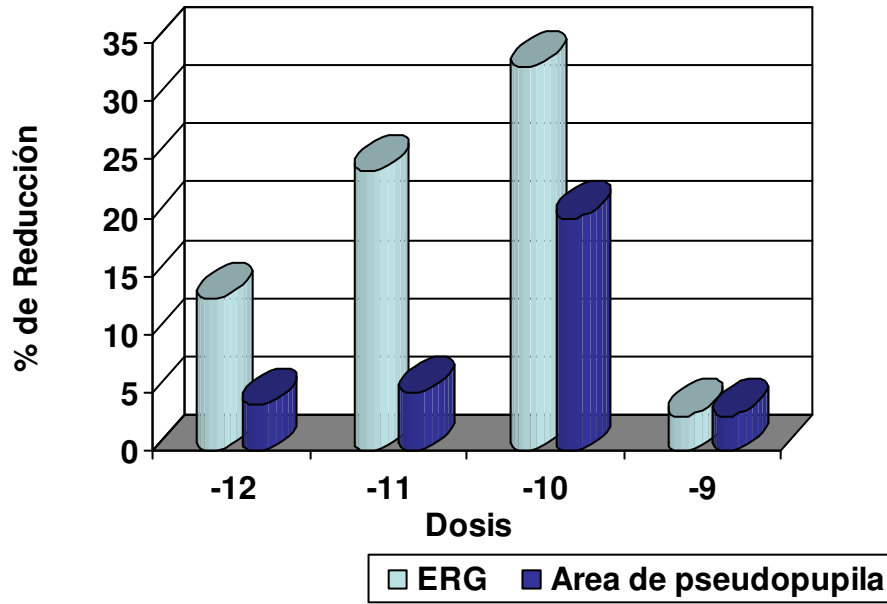


Figura 43: Curva dosis respuesta medida en el área de pseudopupila y en la amplitud del ERG tomadas en la misma hora, cambiando la dosis de 0.1ml de HDP en diferentes concentraciones desde 1pM hasta 1nM. El mayor efecto en la reducción del área de pseudopupila y de la amplitud del ERG se mostró a la concentración $1 \times 10^{-10} \text{M}$

CBA-08178; No of Pages 10



Available online at www.sciencedirect.com



Comparative Biochemistry and Physiology, Part A xx (2007) xxx–xxx

CBP

www.elsevier.com/locate/cbpa

Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*

M.A. Verde, C. Barriga-Montoya, B. Fuentes-Pardo*

Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México

Received 30 May 2006; received in revised form 2 March 2007; accepted 4 March 2007

Abstract

Photoreceptor cells have been identified as important structures in the organization of the circadian system responsible for the generation and expression of the electroretinogram (ERG) circadian rhythm. They are the structures where the circadian periodicity is expressed (effectors) and which transform information from external light signals to be conducted to the pacemaker in order to induce adjustments of the rhythm (synchronizers). After isolation, eyestalks perfused in a pigment dispersing hormone (PDH) solution, show significant changes in receptor potential (RP) amplitude and duration. Exogenous PDH injected into intact crayfish induces a migration of retinal shielding pigments to a light-adapted state. A single dose of PDH produces advances or delays in the circadian rhythm of response to light of visual photoreceptors. All these effects depend on the circadian phase of PDH application. Consequently, the determination of the action of exogenous PDH on photoreceptor cells proved to be very helpful in understanding some mechanisms underlying the circadian organization of crayfish.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Circadian rhythm; Crayfish; Pigment dispersing hormone

1. Introduction

One approach to the study of circadian rhythms involves determination of the main elements that participate in the generation and expression of rhythms, namely the pacemaker, the efferent pathways for the overt rhythm and the synchronization mechanisms. In the crayfish, circadian activity has been extensively studied, particularly with respect to the amplitude of the electrical response of photoreceptors to light (as indicated by an electroretinogram, ERG) (for review, see Fuentes-Pardo and Hernández-Falcón, 1993). However, to-date only little information about the underlying oscillator organization, as well as the role of the main elements involved in the overt rhythm expression is available.

In the crayfish, as in many other invertebrates, the electrical response of photoreceptors to light (receptor potential, RP) is a graded depolarization consisting of two phases, an initial fast transient phase (TP), followed by a sustained one (SP) which

precedes repolarization. The amplitude and duration of these two RP components depend on previous light-adapting conditions, stimulus intensity and the availability and interaction of some intracellular and extracellular ions, particularly Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ (Hernández-Falcón and Fuentes-Pardo, 1991; Miller and Glantz, 2000).

Up to today, the cascade of events involved in the phototransduction process in invertebrates is uncertain. It is possible, however to propose certain similitude between rhabdomic photoreceptor cells of arthropods and ciliar photoreceptor cells of vertebrates. This similitude is clear in the first stage of phototransduction when the absorption of light by a visual pigment – rhodopsin – triggers the biochemical events of phototransduction. Some studies have identified that in rhabdomic photoreceptors, the major G-protein involved in phototransduction is of G_q type (Terakita et al., 1998). This protein is activated by the light-stimulated rhodopsin and stimulates phospholipase C (PLC) (effector enzyme of the phosphoinositide pathway) generating soluble inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P₃) and membrane-bound diacylglycerol (DAG). Whatever be the downstream events (for example,

* Corresponding author. Tel.: +52 15255 56232362.

E-mail address: bfpuado@servidor.unam.mx (B. Fuentes-Pardo).

1095-6433/\$ - see front matter © 2007 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.004

Please cite this article as: Verde, M.A. et al. Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish, *Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. Part A (2007), doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.004

Figura 44. Publicación en el “comparative biochemycal and physiology part A”, 2007,

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Margarita Gonzáles del Pliego, por su gran compromiso, apoyo y colaboración en el trabajo histológico.

A la M en C. Elsa Aguirre Benítez por su valiosa enseñanza y en el trabajo histológico e inmunológico de las diferentes técnicas usadas.

A la Dra. Graciela Porras, por su trabajo histológico y la comprobación de los resultados histológicos fluorescentes del ganglio cerebroide.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson B.D., Jonson K.A., Loros J.L., and Dunlap J.C. (1994). Negative feedback defining a circadian clock: auto regulation of the clock gene frequency. *Science*. 264: 1578-1584.
- Aréchiga H. (2003). Neural substrate for biological rhythms. *Revista de Neurología* 36:49-60.
- Aréchiga H. and Rodríguez Sosa L. (1998). Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc Roy Soc (Lond)*; 265: 1819-23.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 1128.
- Aschoff J. (1965). The phase-angle difference in circadian periodicity. In: *Circadian Clocks*. Amsterdam. North Holland Publishing Co., p.p. 262-276.
- Bargiello T.A., Jackson F.R., and Young M.W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*; 312: 752-4.
- Barrera-Mera B. and Block G.D. (1990). Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res. Jul 9*; 522(2):241-5.
- Bayles M.K., Bargiello T.A., Jackson F.R. and Young M.W. (1987). Changes in abundance or structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature*. 326:390-392.
- Brandes C., Plautz J.D., Stanewsky R., Jamison C.F., Straume M., and Wood K.V., (1996). Novel features of *Drosophila period* transcription revealed by real-time luciferase reporting. *Neuron*; 16: 687-92.
- Brown Jr. F.A. and Edestron H.E. (1940) Dual control of certain black chromatophores of *Crangon*. *J. Exp. Zool.* 85: 53-69
- Brown Jr. F.A. and Wulff V.J. (1941). Chromatophore types in *Crangon* and their endocrine control. *J. Cell Comp. Physiol.* 18: 339-353
- Brown Jr. F.A. and Saigh L.A. (1946). The comparative distribution of two chromatophorotropic hormones (CDH and CBLH) in crustacean nervous systems. *Biol. Bull.* 91: 170-180
- Bruce V.G. (1960). Environmental entrainment of circadian rhythms. *Col. Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25:29-48.
- Bullock T.H. and Horridge G.A. (1965). Structure and function in the nervous systems of invertebrates. Vol. 2 San Francisco: Freeman.
- Bünning E. (1935). Zur Kenntnis der endonomen Tagesrhythmik bei Insekten und bei Plazen. *Berichte d. Deutschen Bot. Ges.*, 53:594623
- Carlson S.P. (1935). The color changes in *Uca pugilator*. *Proc. Nat. Aced. Sci. USA* 21, 549-551.
- Ceriani M.F., Darlington T.K., Staknis D., Mas P., Petti A.A. and Weitz C.J. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*; 285: 553-6.

- Chen Y.B., Dominic B., Mellon M.T. and Zehr J.P. (1998). Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium sp.* strain IMS 101. *J. Bacteriol.* 180:3597-3605.
- De Kleijn D.P. and Van Herp F. (1995). Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. Dec*; 112(4):573-9. Review.
- De Kleijn D.P., Linck B., Klein J.M., Weidemann W.M., Keller R., and van Herp F. (1993). Structure and localization of mRNA encoding a pigment dispersing hormone (PDH) in the eyestalk of the crayfish *Orconectes limosus*. *FEBS Lett.* Apr 26; 321(2-3):251-5.
- Dircksen H., Zahnow C.A., Keller R., Gaus G., Rao K.R. and Riehm J.P. (1987). The ultrastructure of nerve endings containing pigment dispersing hormone (PDH) in crustacean sinus glands identified by an antiserum against a synthetic PDH. *Cell Tissue Res.* 250:377-387.
- Dushay M.S., Rosbash M. and Hall J.C. (1989). The disconnected visual system mutations in *Drosophila melanogaster* drastically disrupt circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 4: 1-27.
- Enright J.T. (1965). Accurate geophysical rhythm and frequency analysis. In Aschoff J: ed. *Circadian clocks*. North-Holland, Amsterdam. p.p. 31-41.
- Ewer J., Frisch B., Hamblen-Coyle M.J., Rosbash M. and May J.C. (1992). Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells' influence on circadian behavioral rhythms. *J. Neurosci.* 12:3321-3349.
- Fanjul-Moles M.L., Moreno-Sáenz E., Villalobos-Hiriart N. and Fuentes-Pardo B. (1992). ERG circadian rhythm on the course of ontogeny in the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A:213-219.
- Fernlund P. (1971). Chromactivating hormones of *Pandalus borealis*: isolation and purification of a light-adapting hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 237,519-29.
- Fernlund P. (1976). Structure of a light-adapting hormone from the shrimp, *Pandalus borealis*. *Ciochim. Biophys. Acta.* 439:17-25.
- 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 Ramos-Carvajal J. (1983). The phase response curve of electroretinogram circadian rhythm of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 3:711-714 p.p.
- Fuentes-Pardo B. and Hernández-Falcón J. (1993). Neurobiology of the circadian clock of crayfish. *Trans. Com. Biochem. Physiol.* 1:635-673.
- Fuentes-Pardo B., Fanjul-Moles M. and Moreno-Sáenz E. (1992). Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish. *J. Interdiscip. Cycle Res.* 23: 81-91.
- Fuentes-Pardo B., Lara-Aparicio M., López de Medrano S. and Viccon-Pale J. A. (1996). Motor circadian rhythm in crayfish. An experimental and theoretical study. *Comp. Biochem. Physiol.* 2:113-127.

- Fuentes-Pardo B., Solórzano-García S. and De la O Martínez A. (1997). Effects of complete and skeleton photoperiods on the circadian rhythm of the electroretinogram of the crayfish. *Biological Rhythm Research*. 28:69-84.
- Fuentes-Pardo B., Lara-Aparicio M. and López de Medrano S. (2001). On the ontogeny of the motor circadian rhythm in crayfish. *Bull. Math. Biol.* 63:353-369.
- Gaus G. and Stieve H. (1992). The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*. *Z. Naturforsch.* 47:300-303.
- Giebultowicz J.M. (2000). Molecular mechanisms and cellular distribution of insect circadian clock. *Ann. Rev. Entomol.* 45:769-794.
- Granato F.C., Tironi T.S., Maciel F.E., Rosa C.E., Vargas M.A. and Nery L.E. (2004). Circadian rhythm of pigment migration induced by chromatophorotropins in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* Jul; 138(3):313-9.
- Hafner G.S. and Tokarski T.R. (1998). Morphogenesis and pattern formation in the retina of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Cell Tissue Res* 293:535-550
- Hafner G.S., Tokarski T.R. and Hammond-Soltis G. (1982). Development of the crayfish retina: a light and electron microscopic study. *J Morphol* 173:101-118.
- Hafner G.S., Martin R.L. and Tokarski T.R. (2003). Photopigment gene expression and rhabdom formation in the crayfish (*Procambarus clarkii*). *Cell Tissue Res* 311:99-105.
- Halberg F. (1959). Physiologic 24 hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*. Ed. Withrow. Washinton: A.A.A.S. p.p. 803-878.
- Hall J.C. and Sassone-Corsi P. (1998). Molecular clocks. *Current Opinion Neurobiol.* 8:633-636.
- Hardin P.E. (1998). Activating inhibitors and inhibiting activators: a day in the life of a fly. *Current Opinion Neurobiol.* 8:642-647.
- Hardin P.E., Hall J.C. and Rosbach M.E. (1992a). Circadian oscillations in period gene mRNA levels are transcriptionally regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:22822-22826.
- Hardin P.E., Hall J.C. and Rosbach M.E. (1992b). Behaviour and molecular analysis suggest that circadian output is disrupted by disconnected mutants in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 11:1-6.
- 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.
- Helfrich-Förster C. (1998). Robust circadian rhythmicity of *Drosophila melanogaster* requires the presence of lateral neurons: a brain-behavioral study of disconnected mutants. *J. Comp. Physiol. A* 182, 435-453.
- Helfrich-Förster C. (2005). PDF has found its receptor. *Neuron*. Vol. 48, oct 20(2)161-169.

- Helfrich-Förster C. and Homberg U. (1993). Pigment dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild type *Drosophila melanogaster* and of several mutants with altered circadian rhythmicity. *J. Comp. Neurol.* 337:177-190.
- Hernández-Falcón J., Moreno-Sáenz E., Farías J.M. and Fuentes-Pardo B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity. Pseudopupil circadian rhythm. *Com. Biochem. Physiol.* Vol. 87A No. 1p.p. 111-118.
- Hernández O. H. and Fuentes-Pardo B. (2001). Cerebroid ganglion is the presumptive pacemaker of the circadian rhythm of electrical response to light in the crayfish. *Biol. Rhythm Res.* Vol. 32 No. 2:125-144.
- Homberg U., Würden S., Dircksen H. and Rao K.R. (1991). Comparative anatomy of pigment dispersing hormone immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects. *Cell Tissue Res.* 266:343-357.
- Hyun S., Lee Y., Hong S.T., Bang S., Paik D., Kang J., Shin J., Lee J., Jeon K., Hwang S., Bae E. and Kim J. (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron.* Vol. 48. oct 20 (2)267-278.
- Josefsson L. (1975). Structure and function of crustacean chromatophorotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* Feb;25(2):199-202.
- Jorenby W.H., Riehm J.P. and Rao K.R. (1987). Position 3 analogues of a crustacean pigment-dispersing hormone: synthesis and biological activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143(2):652-7.
- Keller R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia.* May 15;48(5):439-48. Review.
- Keller R., Jaros P.P. and Kegel G. (1985a). Crustacean hyperglycemic neuropeptides. *Amer. Zool.* 25:207-221.
- Keller R., Dircksen H., Manguerich S. and Jaros P.P. (1985b). Hyperglycemic hormone and other neuropeptides in crustacean neurosecretory structures In: Kobayashi H., Bern H.A., Urano A. (eds) *Neurosecretions and the biology of neuropeptides.* Japan Sci. Soc. Press Tokyo/Springer, Berlin Heidelberg New York 60-69.
- Kleinholz L.H. (1961). Pigmentary effectors. In Waterman T.H. (Ed.) *The physiology of crustacean.* Acad. Press. New York. 2:133-169.
- Kleinholz L.H. (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. In Bernhard CG ed., *The Functional Organization of the Compound Eye.* Pergamon p.p. 89-101.
- Kleinholz L.H.; Carlisle D.B.; Pflueger O. and Burgess P.R. (1962). Neurosecretion and crustacean retinal pigment hormone - distribution of light-adapting hormone. *Biol. Bull.*, 122, (1)73.
- Kleinholz L.H., Rao K.R., Riehm J.P., Tarr G.E., Johnson L. and Norton S. (1986). Isolation and sequence analysis of a pigment-dispersing hormone from the eyestalks of the crab *Cancer magister*. *Biol. Bull.*, 170:135-43.

- Köller G. (1925) Über denfarbwechsel bei *Crangon vulgaris*. Verh Zool Ges Wien 30:128-132.
- Köller G. (1927). Über Chromatophorensystem, Farbensinn and Farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. Z. Vergl. Physiol. 5:191-246.
- Konopka R.J. (1979). Genetic dissection of the *Drosophila* circadian system. Fed. Proc. 38:2602-2605.
- Konopka R.J. and Banzer S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc.Nat.Acad.Sci. 58:2112-2116.
- Lara-Aparicio M., López de Medrano S., Fuentes-Pardo B. and Moreno-Sáez E. (1993). A qualitative mathematical model of the ontogeny of a circadian rhythm in crayfish. Bull. Math. Biol. 55:97-110.
- Lear B.C., Merrill C.E., Lin J.M., Shroeder A., Zhang L. and Allada R. (2005). A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. Neuron. Vol. 48 oct 20(2)221-227.
- Liu X., Zwiebel L.J., Hinton D., Benzer S., Hall J.C., Rosebash M. (1992). The period gene encodes a predominantly nuclear protein in adult *Drosophila*. J. Neurosci. 12:2735-2744.
- Mangerich S. and Keller R. (1988). Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) immunoreactivity in the central nervous system of *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* (Crustacea), with reference to FMRFamide immunoreactivity in *O. limosus*. Cell and Tissue research. 253: 199-208.
- Mangerich S., Kelle R. and Dircksen H. (1986). Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentration hormone in two species of decapods crustaceans. Cell Tissue Res. 245:377-386.
- Mangerich S., Sélér R., Dircksen H., Rao K.R. and Riehm J.P. (1987). Immunocytochemical localization of pigment dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide immunoreactive material in the eyestalk of decapods crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*. Cell Tissue Res. 250:365-375.
- Mertens I., Vendingenen A., Johnson E. C., Shafer O. T., Li W., Trigg J.S., DeLoof A., Schoofs L. and Taghert P.H. (2005). PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. Neuron. Vol. 48 oct 20 (2)213-219.
- Moreno-Sáenz E., Hernández Flacón J. and Fuentes-Pardo B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity. II ERG circadian rhythm. Comp. Biochem. Physiol. 87A Vol. 1:119-125.
- Moreno-Sáenz, E., Fuentes-Pardo, B. and Hernández-Falcón, J. (1992). Photoentrainment of the circadian rhythm in the electroretinogram of the crayfish and its dependence of the sinus gland. J. Exp. Zool., 264: 144-162.
- Mortir L. and Marder E. (1991). Differential distribution of B-pigment dispersing hormone like immunoreactivity in the stomatogastric nervous system of five species of decapods crustaceans. Cell and tissue research. 265:19-33.

- Nässel D.R., Shiga S., Wikstrand E.M. and Rao K.R. (1991). Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons and their relation to serotonergic neurons in the blowfly and cockroach visual system. *Cell Tissue Res.* 266:511-523.
- Okamoto A., Mori H., Tomioka K. (2001). The role of photic lobe in circadian locomotor rhythm generation in the cricket *Gryllus bimaculatus*, with special referente to PDH-immunoreactive neurons. *J. Insect Physiol.* 47:889-895.
- Page T.L. (1987). Serotonin phase-shift the circadian rhythm of locomotor activity in the cockroach. *J. Biol. Rhythms* 2:23-34.
- Page T.L. and Barret K.R. (1989). Effects of light on circadian pacemaker development II. Responses to light. *J. Comp. Fisiol [A]* 165:51-59.
- Park J.H. and Hall J.C. (1998). Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms.* 13, 219-228.
- Perkins E.B. (1928). Color changes in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J. Exp. Zool.* 50:71-105.
- Petri B. and Stengel M. (1997). Pigment dispersing hormone shifts the phase of the circadian pacemaker of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. Neuroscience.* 17:4087-4093.
- Petri B. and Stengel M. (1999). Presumtive insect circadian pacemaker in vitro: immunocytochemical characterization of cultured pigment dispersing hormone immunoreactive neurons of *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res.* 296:635-643.
- Phillips J.M., Rao K.R., Riehm J.P. and Morgan W.T. (1988). Isolation and characterization of a pigment-dispersing hormone from the shrimp, *Penaeus aztecus*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 14:534.
- Pittendrigh C.S. (1960). Circadian rhythms and the organization of living systems. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* 25:159-182.
- Pittendrigh C.S. (1965). Biological clocks: The functions, ancient and moder, of circadian oscillations. *Science in the sixties. Proceedings of the 1965 Cloudcroft symposium. Air Force Office of Scientific Research* p.p. 96-123.
- Pittendrigh C.S. (1965a). One the mechanism of entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: *Circadian Clocks* (J. Aschoff, ed.) pp 277-297. Norht-Holland Publish. Co. Amsterdam.
- Pittendrigh C.S. (1981). Circadian systems: Entrainment. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology. 4 Biological Rhythms.* (J. Aschoff, ed.) pp. 95-124. Plenum. New York.
- Plautz J.D., Kaneko M., Hall J.C., Kay S.A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*; 278: 1632-5.
- Porras M.G., De Loof A., Breuer M. and Aréchiga H. (2003). Corazonina promotes tegumentary pigment migration in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Peptides* 24: 1581-1589.
- Ramsdale M. and Lakin-Thomas P.L. (2000). sn-1,2-Diacylglycerol levels in the fungus *Neurospora crassa* display circadian rhythmicity. *J. Biol. Chem.* 275:27541-27550.

- Rao K.R. (1992). Crustacean pigment-dispersing hormones: chemistry, distribution and actions. *Pigment Cell Res.* 1992; Suppl 2:266-70. Review.
- Rao K.R. (1985). Pigmentary effectors. In D. E. Bliss and L. H. Mantel (eds.). *The biology of Crustacean*, Vol. 9, pp. 395-462. Academic Press, New York.
- Rao K.R. and Riehm J.P. (1988). Pigment-dispersing hormones: a novel family of neuropeptides from arthropods. *Peptides*. 9 Suppl 1:153-9. Review.
- Rao K.R. and Riehm J.P. (1989). The pigment dispersing hormone family; chemistry, structure-activity relations and distribution. *Biol. Bull.* 177:225-229.
- Rao K.R., Riehm J.P., Zahnow C.A., Kleinholz L.H., Tarr G.E., Jonson L., Norton S., Landau M., Semmes O.J., Sattelberg R.M., Jorenby W.H. and Hintz (1985). Characterization of a pigment-dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5319-5322.
- Rao K.R., Mohrherr C.J., Riehm J.P., Zahnow C.A., Norton S., Johnson L., and Tarr G. (1987). Primary structure of an analog of crustacean pigment-dispersing hormone from the lubber grasshopper *Romalea microptera*. *J. Biol. Chem.* 262(6):2672-5.
- Reisching T. and Stengl M. (2003). Ectopic transplantation of the accessory medulla restores circadian locomotor rhythms in arrhythmic cockroaches (*Leucophaea maderae*). *J. Exper. Biol.* 206:1877-1886.
- Renn C.P., Park J.H., Rosbash M., Hall J.C. and Taghert P.H. (1999). A PDF neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell.* 99: 791-802.
- Rodríguez-Sosa, L., Calderón, J., Hernández, J. and Aréchiga H. (1990). The isolated eyestalk of the crayfish maintains a circadian rhythm of neurosecretion content in the crayfish eyestalk. *Soc. Neurosci. Abstr.*, v.16, p. 909.
- Sánchez J. and Fuentes-Pardo B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretiogram in isolated eyestalk of the crayfish. *Com. Biochem. Physiol.* 56A: 601-605.
- Sandeman D.C., Sandeman R.E., Derby C. and Schmidt M. (1992). Morphology of the brain of crayfish, crab and spin lobster: A common nomenclature for homologous structures. *Biol. Bull.* 183:304-326.
- Semmes O.J., Riehm J.P. and Rao K.R. (1985). Substitution of norleucine for methionine residues in a crustacean pigment-dispersing hormone, *Peptides*, 6(3):491-4.
- Shaw S.R. and Stowe S. (1982). Photoreception. Review chapter for: "The Biology of Crustacea" Vol III. Series editor, D.Bliss, volume editors, HL Atwood and DC Sandeman. Academic Press, New York. pp. 292-363
- Singaravel M., Fujisawa Y., Hisada M., Saifullah A.S.M. and Tomioka K. (2003). Phase shifts of the circadian locomotor rhythm induced by pigment dispersing factor in the cricket *Grillus bimaculatus*. *Zool.Sci.* 20:1347-1354.

- Siwicki K.K., Strack S., Rosbask M., Hall J.C. and Jacklet J.W. (1989). An antibody to the *Drosophyla* period protein recognized circadian pacemaker neurons in *Aplysia* and *Bulla*, *Neuron*. 3 (1):51-58.
- Stanewsky R., Kaneko M, Emory P, Beretta B, Wager-Smith K, (1998). The cry b mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*; 95: 681-92.
- Stangel 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.
- Tomioka K. (1991). Light and serotonin phase-shift the circadian clock in the cricket optic lobe in vitro. *J. Comp. Physiol. A* 185:437-444.
- Verde M.A., Barriga-Montoya C. and Fuentes-Pardo B. (2007). Pigment dispersing hormone generates a circadian response to light in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* (in press) doi:10.1016/j.cbpa.2007.03.004. www.sciencedirect.com
- Vosshall L.B., Young M.W. (1995). Circadian rhythms in *Drosophila* can be driven by period expression in a restricted group of central brain cells. *Neuron*; 15: 345-60.
- Viccon-Pale J.A. and Fuentes-Pardo B. (1994). Synchronization by light of the circadian rhythm of motor activity in the crayfish. *Biological Rhythm Research*. 25:267-276.
- Viccon-Pale J.A., Ortega P. and Fuentes-Pardo B. (1997). Effects of illumination on the circadian motor rhythm of the chelipeds of crayfish. *Biol. Rhythm. Res*. 28:230-243.
- Wald G. (1968). Single and multiple visual systems in arthropods. *J. Gen. Physiol*. 51:125-156.
- Waterman T.H., Wiersma C.A. and Bush B.M.H. (1964). Afferent visual responses in the optic nerve of the crab *Podophthalmus*. *J. Cell.Comp.Physiol*. 63:135-55.
- Welsh J. (1930). Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA*. 16:386-395.
- Welsh J.H. (1939). The action of eyes-stalk extract on retinal pigment migration in the crayfish *Cambarus bartoni*. *Biol. Bull*. 77:117-125.
- Welsh J.H. (1941). The sinus gland and 24 hours cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool*. 186, 35-49.
- Wiedenmann G. (1977). Two activity peaks in the circadian rhythm of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. interdiscip. Cycle Res*. 8:378-383.
- Wiersa C.A.G. and Yamaguchi T. (1967). The integration of visual stimuli in the rock lobster. *Vision Res*. 7:197-204.
- Xu Y., Mory T. and Johnson C.H. (2000). Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythm and phase setting. *EMBO Journal* 19:3349-3357.
- Yang W.J., Aida K. and Nagasawa H. (1999). Characterization of chromatophoretropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*, *Gen. Comp. Endocrinol*. 114(3):415-24.

BIBLIOGRAFÍA

- Yu Q., Jaquier A.C., Citri Y., Hamblen M., May J.C. and Rosbash M. (1987). Molecular mapping of point mutations in the period gene that stop or stopped up biological clock in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sca. USA. 84:784-788.
- Zerr D.M., Hall J.C., Rosbash M. and Siwicki K.K. (1990). Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. J. Neurosci. 10:2749-2762.