



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Phase Shifting the ERG Amplitude Circadian  
Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal  
Monochromatic Illumination**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)**

**PRESENTA:  
JOSÉ AQUILES BERNAL MORENO**

**Directora de la Tesis: Dra. María Luisa Fanjul Peña**

**México D.F.**

**Octubre de 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo fue realizado en el  
Laboratorio de Neurofisiología Comparada  
Facultad de Ciencias, UNAM,  
con apoyo del  
PAPIIT IN207008-3

A Brenda, con todas sus letras, tiempos y acentos

A José Andrés, y a todos los que vengan

A mis padres, José y María de las Nieves

A mis hermanas, Nievitás y Celita

A mis sobrinos, Melissa y José Julio

A la memoria de mis abuelos, tíos y seres queridos  
que se marcharon antes de que este trabajo viera la luz.

## **Agradecimientos:**

Este trabajo no hubiera sido posible sin la paciencia y guía generosa de la Dra. María Luisa Fanjul. Nadie tiene algún mérito mayor en que se haya concluido exitosamente. Mil gracias, por siempre.

A los doctores Raúl Aguilar, Vicky Inclán, Fidel Ramón y Leticia Verdugo, gracias por haber aceptado formar parte del comité tutorial y revisar el manuscrito.

A Julio Prieto, artífice de los sistemas de captura y registro, y muchas cosas más en el laboratorio. Para todos los que hemos pasado por tu clase de fisiología, serás siempre el *teacher*.

A Mari Carmen Uribe, con quien empecé a dar clases hace casi 18 años. Creo que -exceptuando a mis padres y familiares más cercanos- a nadie debo más en esta vida en términos de consejos, apoyo y guía constante. Gracias mil por haberme iniciado en la docencia universitaria.

A Francisco Flores Fuentes, en cuyo taller aprendí a desarmar ideas, libros, carburadores, óperas... y aunque algunas cosas no tuvieron compostura, aprendí también que lo podemos platicar largamente por el mero gusto de encontrar otra mente con intereses y gustos similares.

A Rosaura, con cariño y agradecimiento por haberme invitado a colaborar en tu proyecto, y por haberme apoyado para concluir este trabajo.

A todos los cronobiólogos y cronobiólogas surgidos en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias, y muy especialmente a Elsa y Manuel.

A la memoria de los doctores Hugo Aréchiga y León Cintra.

Al Dr. Adrián Martínez, a Bernardo, a Joaquín, a Esther y todos los miembros de aquel gran equipo. A Lichi, Javier, Gustavo, Lupita, Paco y Griselda. A Dení y su equipo. A Minerva.

A mis fraternos amigos Alfredo e Ilya, por su apoyo y estímulo constante para terminar este trabajo.

Al Ingeniero Carlos Cortés Martínez, porque de lo poco que sé, mucho te lo debo.

A mis amigos ajedrecistas, preparatorianos y/o bohemios: Rubén, Ramsés, Chuy, Ricardo, Héctor, Eduardo, Polo, Víctor, Paco...

A los amigos de la carrera, del buceo, de viajes, conciertos, autos y andanzas: a Arturo, Ángel, Javier, Hugo y Gerardo; a Ramón, Manuel, Norma, Rodrigo y Paola; a Julio, Tanya, Mariana, Sofía, Mayela, Alejandra, Ana Elisa.

A aquellos que me recibieron en su casa como un hijo más.

Á los que vienen en la dedicatoria, pero que también merecen todo mi agradecimiento; nuevamente mil gracias a Brenda y José Andrés, a mis padres, hermanas, sobrinos, cuñados, tíos, primos, ahijados y seres queridos que dan alegría y sentido a esta vida.

## ÍNDICE

RESUMEN	_____	6
INTRODUCCIÓN	_____	8
ANTECEDENTES	_____	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVO	_____	23
MATERIALES Y MÉTODOS	_____	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	_____	26
ANÁLISIS PROSPECTIVO	_____	29
APÉNDICE	_____	33
REFERENCIAS	_____	47

## RESUMEN

Se ha propuesto la participación de fotorreceptores retinianos y extrarretinianos en la sincronización del ritmo ERG en el acocil adulto, y tiene relevancia en particular el fotorreceptor del sexto ganglio abdominal (CPR o fotorreceptor caudal). También se ha propuesto la existencia de al menos dos sistemas osciladores independientes involucrados en el desarrollo del ritmo del electroretinograma (ERG) del acocil *Procambarus clarkii*, con sistemas de detección de luz de longitud de onda corta y larga. Las curvas de respuesta de fase (CRF) del ritmo ERG en acociles juveniles, ante la aplicación de luz monocromática azul o roja en el organismo entero, muestran cambios de fase tanto en el día subjetivo como en la noche subjetiva, y las diferencias dependen tanto de la longitud de onda utilizada como de la hora circadiana (CT) en la cual se aplican los estímulos. Con el objetivo de determinar, a través de la construcción de una curva de respuesta de fase, si la aplicación de luz monocromática azul específicamente en el telson de acociles juveniles es capaz de sincronizar el ritmo ERG, se utilizaron 31 acociles con edades de 2 a 6 meses post-eclosión. Se registró en cada uno de ellos la amplitud del ritmo ERG cada 15 minutos, por al menos 8 días en obscuridad y temperatura constante. Tras al menos 3 días de registro se aplicó en el telson de cada organismo, a distintas horas circadianas, un pulso de luz monocromática azul de 30 minutos. Para ello, se diseñó un dispositivo acrílico donde cada organismo fue montado, aislando la parte posterior del mismo hacia una cámara donde una fibra óptica iluminaba a través de un filtro *Kodak* de 450 nm, con un filtro infrarrojo para evitar la transmisión de calor. El efecto de este estímulo luminoso en la fase del ritmo ERG se cuantificó 4 días después del mismo, se calculó el CT normalizando cada ciclo respecto a un período de 24 horas y considerando como referencia de fase el CT 12 o inicio de actividad, donde se alcanza el 50% de la amplitud de cada ciclo. Se calcularon las diferencias entre la hora esperada del inicio de actividad y la hora observada del mismo 4 días después del estímulo, y con ello se obtuvieron los cambios de fase por hora, para construir así la CRF respectiva. Se obtuvo un período circadiano promedio de 23.45 +/- 2.01 horas. Durante la aplicación de la luz azul, la amplitud del ERG disminuyó entre 2% y 30%, dependiendo de la hora, y mostrando un patrón circadiano con disminuciones máximas entre las CT 14 y 17. La curva de respuesta de fase obtenida muestra cierta insensibilidad en el día subjetivo, avances de fase (A) al atardecer y en la noche subjetiva temprana, y retrasos (D) en la noche subjetiva tardía y al amanecer. La relación D/A es casi 1. La forma de esta CRF se asemeja a la obtenida con pulsos de obscuridad en otras especies. La CRF del ERG de acociles jóvenes cuando se estimula con luz blanca el organismo completo muestra zonas de adelantos moderados y retrasos en la noche subjetiva temprana, y retrasos en el día subjetivo tardío. El hecho de que la CFR obtenida al estimular con luz azul únicamente el telson del animal tenga cambios de fase más moderados y principalmente ubicados en la noche subjetiva, sugieren que la magnitud y dirección de los cambios de fase dependen de las características de la luz utilizada y del número de entradas al sistema oscilador de acociles juveniles que son estimuladas.

## **ABSTRACT**

The objective of the present work was to determine the physiological mechanisms underlying the synchronization of the ERG amplitude rhythm. Chronic ERG recordings were obtained from juvenile instars of crayfish. Changes on the ERG amplitude rhythm produced when 30 min blue light illuminated the telson were determined. The PRC obtained with these data showed advances in the early subjective night and delays in the late subjective night. These phase shiftings resemble the features of curves obtained by dark pulses in other species. The relation of this curve with PRCs generated in the crayfish and other animals species are discussed.



## INTRODUCCIÓN

Los relojes biológicos cuentan entre sus características primordiales la capacidad de recibir estímulos (principalmente luminosos) provenientes del exterior y de sincronizarse a partir de ellos. Los diversos sistemas circadianos encontrados en animales pueden tener uno o más osciladores y también una o más vías de entrada de señales luminosas y de diversas índoles que funcionen como *zeitgeber* (del alemán, "dador de tiempo").

En el caso de crustáceos, se han descrito sistemas multiosciladores y también diversos tipos de fotorreceptores involucrados en su sincronización. La hipótesis clásica de los *Articulata* plantea que los artrópodos provienen evolutivamente de organismos metaméricos, en los que cada segmento contaría con una porción de cadena ganglionar y un par de fotorreceptores. De este modo, el proceso evolutivo que habría determinado la cefalización a través de la integración de varios ganglios anteriores, también habría involucrado la integración de los fotorreceptores de la región anterior en estructuras más complejas y eventualmente en ojos, con sus respectivos fotorreceptores retinianos, que permitirían la ubicación espacial del organismo. Los fotorreceptores extrarretinianos que se habrían mantenido funcionales en los segmentos posteriores de algunos crustáceos podrían ser una vía de entrada al sistema circadiano, mediando en la ubicación temporal del organismo y en respuestas automáticas como el reflejo de huida.

Varios trabajos han propuesto la participación de fotorreceptores retinianos y extrarretinianos en la sincronización del ritmo ERG en el acocil adulto (Page and Larimer, 1976; Fuentes-Pardo and Inclán-Rubio, 1987; Sandeman *et al.*, 1990), y tienen relevancia en particular los fotorreceptores del sexto ganglio abdominal (CPR o fotorreceptor caudal).

También se ha propuesto la existencia de al menos dos sistemas osciladores independientes involucrados en el desarrollo del ritmo del electroretinograma (ERG) del acocil *Procambarus clarkii*, con sistemas de detección de luz de longitud de onda corta y larga (Fanjul-Moles *et al.*, 1992). A lo largo del desarrollo del acocil se observa que la sensibilidad a las distintas longitudes de onda y su participación en el programa temporal del organismo se va modificando, y en este proceso está implícita la maduración y el acoplamiento de las diversas estructuras involucradas.

Una herramienta definitiva para determinar si cierto estímulo es capaz de sincronizar el reloj biológico de un organismo es la construcción de *una Curva de Respuesta de Fase* (CRF), en la cual se grafican los cambios de fase (adelantos o retrasos) que sufre el sistema temporal, respecto a la hora circadiana (CT) en la que se administra el estímulo.

La curva de respuesta de fase del ritmo ERG en acociles juveniles, ante la aplicación de luz monocromática en el organismo entero, muestra una forma bimodal, en la que los cambios de fase dependen de la longitud de onda utilizada y de la hora circadiana en la cual se aplican los estímulos (Fuentes-Pardo *et al.*, 1992). Sin embargo, la aplicación de luz al organismo entero no permite averiguar las vías a través de las cuales está llegando la información al sistema circadiano.

Este trabajo aborda experimentalmente las temáticas anteriores, pues estudia, a través de la construcción de una curva de respuesta de fase, si la aplicación de luz monocromática específicamente en el telson de acociles juveniles es capaz de sincronizar el ritmo ERG.

## ANTECEDENTES

### Generalidades de los Ritmos Circadianos.

La persistencia de oscilaciones periódicas en organismos mantenidos bajo condiciones ambientales constantes ha sido demostrada en numerosas especies eucariontes (Reinberg y Smolensky, 1983). Este mecanismo temporal llamado "Reloj Biológico", ha sido definido como "*Un sistema fisiológico innato capaz de medir el transcurso del tiempo en un organismo viviente*" (Coleman, 1986); esta definición describe un simple "medidor de intervalos", que se limita a marcar lapsos constantes; sin embargo, actualmente la idea central de un reloj biológico ha sido principalmente desarrollada alrededor del concepto de los Ritmos Circadianos (del latín *circa*, cercano a y *diem*, día), es decir, eventos cíclicos cuyo período se aproxima al de 24 horas. Este concepto de reloj biológico también supone para muchas especies la existencia de un sistema multioscilandor, cuya integración permite imponer un orden temporal al organismo. Aunque hay antecedentes del estudio de los ritmos desde siglos atrás, fue en el siglo pasado cuando se sentaron las bases de esta nueva disciplina, la Cronobiología. Por ejemplo, Erwin Bünning inició en la primera mitad del siglo XX el estudio sistemático de los ritmos circadianos en plantas e insectos; Jürgen Aschoff describió algunas de las relaciones de los factores externos al organismo (como la luz) respecto a la expresión de los ritmos circadianos; Colin Pittendrigh impulsó el uso de enfoques y modelos matemáticos al análisis de los ritmos (Lara, 2002). Fue en 1960, con el encuentro de Cold Spring Harbor cuando se establecen las bases de la Cronobiología, y el texto "*Proceedings from the Meeting (Symposia on Quantitative Biology, Vol.XXV)*" se ha considerado como el acta fundacional de esta disciplina.

En la segunda mitad del siglo pasado se describe que los ritmos circadianos poseen 4 características fundamentales:

- a) Persistencia en oscilación espontánea: Su condición endógena, que permite al organismo generar ciclos recurrentes con periodo cercano a 24 horas independientemente de que se le aisle de estímulos periódicos externos.
  
- b) Compensación de la temperatura: Un reloj biológico debe ser prácticamente independiente de la temperatura, o al menos debe ser capaz de compensar los efectos de la variación térmica en el metabolismo; dado que la mayoría de las condiciones vitales involucran reacciones químicas, cuya velocidad generalmente depende de la temperatura a que se realicen, y que los procesos biológicos son acelerados al doble o triple con un incremento de apenas 10 grados Celsius, un ritmo requiere ser capaz de compensar la duración de su periodo mas allá de las variaciones de temperatura, dada la mermada utilidad que representaría un reloj cuya marcha es alterada por las cambiantes condiciones ambientales.
  
- c) Se ha llegado a considerar al "*reloj biológico*" como un "*cronómetro continuamente consultado*"; es decir, se postula que los organismos pueden utilizarlo para ubicarse temporalmente del mismo modo en que los humanos consultamos continuamente el reloj.
  
- d) Un reloj biológico debe ser capaz de sufrir una puesta a tiempo que lo sincronice con la fase de los eventos periódicos ambientales. (Binkley, 1959)

El origen evolutivo de los relojes biológicos radica en la rotación terrestre, que cada 24 horas determina la variación cíclica de numerosas condiciones ambientales como luz, obscuridad, temperatura, concentración de oxígeno, salinidad, etcétera. Dado que estas condiciones necesariamente afectan a los organismos, los organismos vivientes organizan su fisiología sobre las bases temporales (diarias, estacionales) que correspondan a los ciclos ambientales; de aquí la importancia adaptativa que significaría para un organismo el poder predecir

la recurrencia en la variación de condiciones y tomar ventaja de una selección natural que actuaría en favor de aquellos individuos capaces de prepararse a tales variaciones e inclusive, beneficiarse de las mismas (Binkley, 1959).

### **Capacidad de los ritmos de ser sincronizados.**

El concepto de reloj biológico como un sistema orgánico que puede generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la posibilidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna. Dicho sistema permite la adecuada interacción en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente.

Una de las funciones más importantes de los sistemas circadianos es asegurar el ajuste temporal apropiado entre los procesos cíclicos del organismo y los fenómenos cíclicos ambientales; dicho ajuste es referido como puesta a tiempo o sincronización; se utiliza el término **zeitgeber** si nos referimos al estímulo que produce dicha sincronización (como podría ser la luz o la temperatura); es importante recalcar que dicho estímulo no crea el ritmo, solamente tiene efectos sobre su expresión alterando la longitud del periodo y/o relacionando la fase del ritmo con la hora externa (establecimiento de relación de fase).

a) Sincronización interna. Si un organismo es mantenido en condiciones constantes de luz y temperatura, lejos de cualquier otro estímulo que pudiera representar un sincronizador externo, sus ritmos circadianos tenderán a mantener una relación de fase estable entre ellos, ya sea porque coinciden sus máximos y mínimos o porque exista cierta constante de tiempo transcurrido entre ellos.

b) Sincronización externa. Cuando el ritmo de un organismo al que se le aplican estímulos periódicos cambia su periodo de oscilación libre y lo hace igual al de la señal externa, estableciendo con ella una relación de fase, se considera que dicho

estímulo es un sincronizador externo. Generalmente existen periodos llamados transitorios a través de los cuales el ritmo se acopla al estímulo externo, sufriendo una perturbación temporal antes de mostrar una relación de fase estable.

### **Curva de Respuesta de Fase.**

Dependiendo de la fase que presente un ritmo circadiano, un pulso sencillo de luz, a veces tan breve como de 0.5 milisegundos (Joshi y Chandrashekar, 1985), puede adelantar la fase, retrasarla o puede no alterar el ritmo. La relación entre la fase de exposición a la luz y la magnitud y dirección del cambio de fase se representa gráficamente en forma de una *Curva de Respuesta de Fase* (Hastings, 1958). En general, los pulsos de luz practicados en oscuridad continua, alrededor del inicio de la noche subjetiva (cerca del arranque de la fase de actividad diaria en un organismo nocturno, o del reposo en uno diurno), ocasionan retrasos de fase, mientras que los pulsos presentados cerca del final de la noche subjetiva originan adelantos. Los pulsos de luz presentados en la mayor parte del día subjetivo tienen efectos reducidos o nulos (Boulos, 1991).

En algunas especies, después de exponer al organismo a un pulso de luz, el ritmo se establece gradualmente, a través de uno o más ciclos transitorios (Pittendrigh, 1958). Se han observado transitorios adelantándose o retrasándose, según en la fase del ritmo en que haya recibido la luz. Tanto en *Drosophila* como en hámster los avances de fase requieren más transitorios (3-4 ciclos en *Drosophila*, y hasta 10 en hámsters) de los que necesitan los retrasos, que son completados en 1 o 2 ciclos. La existencia de ciclos transitorios puede revelar el acompañamiento de un oscilador esclavo para alcanzar a un marcapasos que fue sincronizado inmediatamente con el pulso (Pittendrigh, 1981).

## **Tipos de Curva de Respuesta de Fase**

Existen dos tipos diferentes de Curvas de Respuesta de Fase (CRF); las tenues o tipo I, en las que los máximos cambios de fase son típicamente del orden de unas pocas horas, y existe una transición más o menos gradual entre las regiones de avance o adelanto en la curva. Además, cuando la fase del ritmo cambiado (la nueva fase) es graficada como función de la fase en la que ocurrió la exposición a la luz (fase original), la derivada promedio de la curva de transición de fase resultante es igual a 1. Sin embargo, en algunas especies, el aumento en la fuerza del pulso de luz (incrementando su intensidad o duración), puede producir cambios de fase de más de 12 horas, y hay una aparente discontinuidad en la CRF, con un salto súbito entre máximos retrasos y máximos adelantos de fase. La dirección de estos amplios cambios es a menudo ambigua, puesto que un cambio de fase de alrededor de 12 horas puede interpretarse tanto como un retraso o como un avance. Estas CRF's son conocidas como fuertes o de tipo 0, dado que la pendiente promedio de la curva de transición de fase es igual a 0 (Boulos, 1991).

Los cambios de fase dependientes de la fase en que se administre el pulso ocurren tanto en respuesta a pulsos de obscuridad aplicados en LL (luz continua), y en etapas de transición de LL a DD (obscuridad continua) y viceversa. Las CRF's con pulso de obscuridad tienden a ser imágenes especulares de las CRF's con pulso de luz, aunque a menudo existe un desplazamiento medible entre la regiones de avance de una y las de atraso de otra. La duración efectiva mínima puede tanto ser mayor para pulsos de obscuridad que de luz. Los cambios de fase ocasionados en etapas de transición son generalmente más variables (intra o interespecíficamente) que aquellos causados por pulsos únicos, y la dependencia de fase de la respuesta no queda siempre clara, aunque existe cierta tendencia a una relación de imagen especular entre las CRF's para transiciones LL-DD y DD-LL. (Boulos, 1991).

## **Efectos de la luz monocromática en los ritmos circadianos.**

Mientras que la importancia de la luz blanca como agente sincronizador de los ritmos circadianos está perfectamente establecida en organismos desde unicelulares hasta vertebrados superiores, el papel de la luz monocromática está todavía explorándose, relacionando su efecto con la modulación y sincronización de las actividades rítmicas: En 1971, Gordon y Brown lograron alterar la fase del ritmo circadiano de temperatura corporal en el ratón *Perognathus*, estimulando con luz verde-azul. Mote y Black (1981) encontraron que el mecanismo sincronizador del ritmo circadiano de actividad locomotora en la cucaracha *Periplaneta americana* está controlado por un grupo de fotorreceptores sensibles a longitudes de onda mayores de 590 nm. Finalmente, mientras que Joshi y Chandrashekarán (1985) reportan que el ritmo circadiano de vuelo del murciélago *Hipposideros speoris* acelera su velocidad de oscilación al ser estimulado por luz de 520 nm y la disminuye con luz de 430 nm, algunos autores mencionan que la luz monocromática tiene efectos en los sistemas reproductivos del ratón y el hámster, modificando tanto el ritmo circadiano de melatonina o los niveles plasmáticos de testosterona, como directamente los órganos reproductivos (Brainard *et al*, 1986; Benschhoff, 1987).

## **El sistema circadiano en el acocil.**

El acocil *Procambarus clarkii* presenta un sistema visual típico dentro del grupo de los crustáceos. Está formado por un par de tallos oculares situados a ambos lados del *rostrum*, en la parte anterior del cefalotórax; en la porción distal de cada tallo se encuentra un ojo compuesto, constituido por 2,000 a 3,000 unidades repetitivas u omatidias; cada una puede dividirse en tres subsistemas, a saber, dióptrico, fotorreceptor y parareceptor. El sistema dióptrico está formado por la córnea (una cutícula de 60 micrómetros de grosor), las células corneágenas y el cono cristalino, formado por 4 células cuyos extremos proximales se adelgazan



originando una raíz que es rodeada por las células retinulares; la agregación de las córneas contiguas dan a la superficie del ojo el típico aspecto facetado de los ojos artrópodos. Al sistema fotorreceptor lo constituyen 8 células retinulares, de las cuales 7 (denominadas R1 a R7) son alargadas y se distribuyen verticalmente; las caras internas de dichas células poseen microvellosidades en cuyas membranas se localiza el pigmento visual; a esta región central se le conoce como rabdomo. En su porción distal, las células retinulares poseen una unión hermética con desmosomas en banda. La octava célula retinular o R8 es más pequeña, redonda y se encuentra más diferenciada que las otras (Cummins y Goldsmith, 1981), formando un pequeño rabdomo separado, por encima (es decir, distalmente) del otro rabdomo. Los axones de las 8 células retinulares atraviesan la membrana basal y se unen para formar el nervio óptico. El sistema parareceptor está integrado por los pigmentos anexos a los fotorreceptores, que regulan la llegada de luz a estos; primeramente, el pigmento distal, localizado en las células del cono cristalino; en obscuridad se repliega distalmente (hacia la córnea) dejando libre paso a la luz, mientras que con iluminación intensa se distribuye a lo largo de la célula, blindándola; en segundo término, el pigmento proximal, que dentro de las células retinulares puede replegarse proximalmente (por debajo de la membrana basal) permitiendo el paso de la luz, o distribuirse en ellas, cerrándolo. Por último, tenemos el pigmento reflector, que a diferencia de los otros pigmentos no migra, y se le encuentra todo el tiempo a nivel de la membrana basal. Los efectos sumados de los tres pigmentos pueden blindar casi totalmente a la omatidia o bien permitir el paso de luz no solamente por el eje principal, sino también por los lados.

Por debajo de las células retinulares se encuentra la lámina ganglionar, seguida de la médula externa (en cuya región dorsal está la glándula sinusal) la médula interna y la médula terminal (donde se encuentra el órgano X). El flujo de información visual hacia zonas centrales de integración se lleva a cabo por axones que, habiendo atravesado la lámina ganglionar, la unen con la médula externa, con la interna y se decusan, formando dos quiasmas; habiendo ya cruzado la médula terminal forman el nervio óptico, que se une con las neuronas y

prolongaciones neuronales propias de la región para llegar al ganglio cerebroide o supraesofágico.

Al igual que numerosos invertebrados, los crustáceos exhiben ritmos circadianos muy conspicuos. Los acociles adultos son organismos transicionales, en los cuales pueden observarse varios ritmos: locomotor, ERG, de migración de pigmentos retinianos, etcétera. Las observaciones realizadas en animales intactos sugieren la existencia de más de un marcapasos circadiano en el sistema nervioso, pero los experimentos de ablación no han sido conclusivos en señalar su ubicación. Sin embargo, varias estructuras (particularmente el pedúnculo ocular) han mostrado mantener actividad circadiana rítmica *in vitro*; tanto la sensibilidad retiniana como la actividad neurosecretoria despliegan ritmos circadianos en el pedúnculo ocular aislado, pero también son responsivas a las influencias sincronizadoras de otras regiones del sistema nervioso, particularmente del ganglio supraesofágico. De tal manera, el modelo que mejor respalda las observaciones experimentales hasta la fecha es el basado en varios marcapasos distribuidos en el sistema nervioso, cuyo acoplamiento parece ocurrir, dentro de un nivel neuroendócrino de integración (Aréchiga, 1992). A tal respecto, consideremos el ritmo circadiano de sensibilidad retiniana: Contando con que el ritmo en la amplitud de la respuesta del receptor a la luz depende de tres variables (la ganancia de los propios fotorreceptores, la migración de los pigmentos proximales en las células retinulares y en las del cono cristalino para los pigmentos distales), se observó que el umbral de los pigmentos proximales es mucho menor que el de los distales al comparar la oscilación bajo luz tenue (4 luxes) e intensa (270 luxes); la oscilación en la sensibilidad del receptor encontrada a 4 luxes era debida al desplazamiento rítmico de los pigmentos proximales, mientras que la encontrada a 270 luxes se debía al desplazamiento de los pigmentos distales. Podría pensarse que el marcapasos que dictaminaba ambas oscilaciones se encontraba en el ojo si extirpándolo se mantenían ambos ritmos, pero los resultados del experimento indicaron que, mientras la migración de los pigmentos proximales depende del marcapasos del pedúnculo ocular, la

migración de los pigmentos distales requiere de neurosecreciones provenientes del tallo ocular (Aréchiga, 1992).

El ritmo locomotor en acociles se conserva a pesar de la ablación del tallo ocular, pero al aislar los centros motores torácicos del ganglio supraesofágico mediante el corte de la conexión circumesofágica se obtiene conducta arrítmica. (Page y Larimer, 1975) .

### **El ritmo circadiano de amplitud electrorretinográfica.**

Se denomina Electrorretinograma (ERG) al registro extracelular de los cambios de voltaje que se llevan a cabo en el ojo como respuesta a un estímulo luminoso, midiendo la diferencia de potencial que se desarrolla a través de la resistencia del fluido extracelular que separa al electrodo activo (que se coloca dentro o en la cercanía del ojo) del electrodo indiferente (colocado en alguna región inactiva cercana), reflejando la suma de actividad que se produce en el sistema visual (reveladas por la magnitud y polaridad del ERG) dependiendo de la intensidad y duración del estímulo (Shaw and Stowe, 1982). El ERG posee dos componentes principales, HI y HII, correspondiendo el primero al encendido del estímulo luminoso, mientras que el segundo se mantiene todo el tiempo que dure la estimulación luminosa (Naka y Kuwabara, 1959).

Implantando microelectrodos en diferentes elementos de la vía visual del acocil *Procambarus clarkii*, Aréchiga y Wiersma (1969) demostraron la existencia de cambios periódicos en la amplitud del electrorretinograma y en la frecuencia de disparo de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa, revelando mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día; caracterizando las propiedades del ERG en *Procambarus bouvieri*, Aréchiga *et al* (1973) comprobaron que los cambios de amplitud del ERG correspondían a

un ritmo circádico típico de un animal nocturno, donde la longitud del periodo dependía de la cantidad de luz recibida por el acocil.

El ritmo de amplitud del ERG es el resultado de las variaciones día-noche en la amplitud de la respuesta del fotorreceptor a un estímulo luminoso de igual intensidad.

Aréchiga (1993) propuso que estas variaciones dependen de:

- 1- cambios en la sensibilidad del fotorreceptor
- 2- cambios en la posición de los pigmentos proximales o retinulares
- 3- cambios en la posición de los pigmentos distales

En la obscuridad, los pigmentos proximales se retraen, permitiendo el paso de luz, mientras que con luz se dispersan para obstaculizar el paso de la misma. En crustáceos, estos movimientos pueden ser controlados por los potenciales de membrana de las células retinulares o por modulación serotoninérgica (Frixione y Hernández, 1989), y si se mantiene el organismo en obscuridad constante, se mantiene el ritmo de migración de los pigmentos.

Los pigmentos distales se encuentran en las células pigmentadas distales, localizadas en el cono cristalino. También se retraen en la obscuridad y se dispersan en presencia de luz, y este ritmo se mantiene en condiciones de iluminación u obscuridad constantes.

Diversos estudios sugieren que el ritmo ERG es controlado por mecanismos neurales y neuroendócrinos que dependen del cerebro y de estructuras neurosecretoras del lóbulo óptico, en particular la glándula sinusal (SG) y el órgano X (XO), además de la oscilación intrínseca que proporciona la variación en la sensibilidad retinular (Fanjul y Prieto, 2003). Experimentos de trasplante de ojo (Aréchiga, 1977) muestran que el ojo donado adquiere el ritmo de migración de los pigmentos retinianos del receptor. Barrera-Mera y Block (1990) aislaron el

complejo formado por protocerebro y tallo ocular, y registraron un ritmo ERG que se mantenía hasta que se biseccionaba el protocerebro. Esta desincronización muestra la existencia de señales provenientes del cerebro, las cuales controlan los diferentes efectores del ritmo circadiano del ERG. El acoplamiento de los posibles marcapasos neurales con el lóbulo óptico puede darse por axones que van de un lado a otro del ganglio supraesofágico (SOG) o por fibras del lóbulo óptico, con participación de serotonina, Hormona dispersora de los pigmentos distales (DPH) y Hormona concentradora del pigmento rojo (RPCH). De este modo, el ritmo circadiano de sensibilidad retiniana que subyace al ritmo ERG es controlado por tres pares de osciladores, que son las células retinulares, el sistema neurosecretor de ambos lóbulos ópticos y los marcapasos cerebrales, además de los fotorreceptores extrarretinianos que se han caracterizado (Fanjul y Prieto, 2003).

### **Sensibilidad espectral del ritmo ERG del acocil durante la ontogenia.**

Ontogenia es la historia de vida del organismo individual, incluyendo su construcción física desde el huevo fertilizado, la maduración funcional de sus sistemas conductual, homeostático y reproductivo, hasta el declinamiento de los mismos con la edad (Davis, 1984). Dado que muchas funciones conductuales, fisiológicas y bioquímicas presentan ritmicidad circadiana, la ontogenia de cualquier función particular podría incluir la aparición y modificación de controles rítmicos. Ritmos circadianos diferentes son a fin de cuentas dependientes entre sí; tanto si son controlados por un marcapasos circadiano único o por varios, los ritmos que llegan a manifestarse estarán organizados temporalmente entre sí y con el ambiente, puesto que los marcapasos, las vías de expresión de los ritmos y los mecanismos de sincronización son todos parte del sistema circadiano. Así, la ontogenia de los sistemas circadianos debe incluir los intermediarios constitutivos y fisiológicos requeridos para que las partes del sistema aparezcan y se organicen, modificando la forma del ritmo, su fase y su amplitud.

Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo (1989), encontraron cambios a lo largo de la ontogenia del acocil, de tal manera que los más jóvenes (formas postembrionarias) poseían mayor sensibilidad a las longitudes de onda cortas (uv, azul), la cual va disminuyendo (sobre todo para el uv) hasta un mínimo en estado adulto; la respuesta a las longitudes de onda mayores (verde y rojo) aparece en las etapas posteriores del desarrollo, incrementándose progresivamente (particularmente en el caso del verde) hasta alcanzar un máximo en el adulto. Aunque se maneja la hipótesis de que durante el desarrollo pueda existir un cambio en la capacidad de los pigmentos retinulares para responder diferencialmente a distintas longitudes de onda, estos resultados parecen indicar un desarrollo asimétrico de las poblaciones de fotorreceptores sensibles a longitudes de onda cortas y largas (Fanjul-Moles *et al*, 1991); dicho desarrollo asimétrico parece depender del sistema neuroendócrino. Para probarlo, Fanjul-Moles *et al* (1992) estudiaron los parámetros del ritmo ERG de *Procambarus clarkii* de 2 a 12 semanas y adultos, en oscilación espontánea, bajo pulsos de prueba azules, rojos o blancos, encontrando una sensibilidad máxima del sistema circadiano a luz monocromática en organismos de 8 a 12 semanas de edad, la cual se desvía a través del desarrollo del azul al rojo entre las 8 y 16 semanas, estabilizándose en el adulto

### **El fotorreceptor caudal del acocil.**

El sistema ganglionar del acocil es un cordón ventral recubierto por conectivo (referido como vaina), formado por una serie de ganglios pareados que están unidos transversalmente por comisuras y longitudinalmente por conectivos. En dirección antero-posterior, encontramos primero el ganglio cerebroide, que conjunta protocerebro, deutocerebro y tritocerebro. Posteriormente se ubica el ganglio subesofágico, y luego 5 ganglios torácicos, para terminar con 6 ganglios abdominales.

El acicil tiene varios ritmos circadianos cuyos osciladores se han propuesto en el ganglio cerebroide y el tallo ocular. Una de las posibles vías de entrada al sistema circadiano es el fotorreceptor caudal ubicado en el sexto ganglio abdominal. Diversos autores han analizado la respuesta eléctrica del sexto ganglio ante la luz, entre las que se encuentran el aumento en la frecuencia de disparo, la cual, al igual que la actividad espontánea, muestran un patrón circadiano (Prieto-Sagredo y Fanjul, 2001). El pico de sensibilidad del fotorreceptor caudal se encuentra alrededor de los 500 nanómetros de longitud de onda.

## **HIPÓTESIS**

Si el fotorreceptor caudal del acocil *Procambarus clarkii*, situado en la porción ventral del telson, es una de las vías de entrada al sistema circadiano durante el desarrollo, se podrán obtener cambios de fase (adelantos o retrasos) en el ritmo ERG mediante la estimulación con luz monocromática del sexto ganglio abdominal.

## **OBJETIVO**

Determinar, a través de la construcción de una curva de respuesta de fase, si la aplicación de luz monocromática en el telson de acociles juveniles es capaz de sincronizar el ritmo ERG.



## METODOLOGÍA

Se utilizaron 31 acociles con edades de 2 a 6 meses post-eclosión. Se registró en cada uno de ellos la amplitud del ritmo ERG cada 15 minutos, por al menos 8 días.

Para el registro de ERG, se inmovilizaba al organismo en una cámara húmeda de acrílico negro, mantenida en obscuridad y temperatura (16 grados Celsius) constantes, de tal manera que el agua de la misma pudiera llegar hasta las branquias, pero sin mojar los ojos. Habiendo inmovilizado los pedúnculos oculares con una pequeña pieza de algodón, se implantaba en la zona de la córnea un electrodo de acero con punta de 5 a 10 micrómetros de diámetro, el cual se conectaba al polígrafo (*Grass mod. 79E*) a través de un preamplificador (*Grass mod. 7P122E*); el electrodo indiferente se sumergía en el agua de la cámara. Cada 15 minutos se aplicaba un destello luminoso de 15 microsegundos a 5.1 microEinsteins/M<sup>2</sup>/s<sup>2</sup> (lo cual equivale a 372 luxes) con un *fotoestimulador Grass PS22*, y se registraba la amplitud electrorretinográfica tanto en papel como a través de una tarjeta *PC-LabCard* modelo PC-812, que permitía la captura de la señal en una PC a través del programa *CapERG*. Los datos obtenidos en diskette se vaciaban directamente a hoja de cálculo, graficándose las variaciones de la amplitud ERG con respecto al tiempo, de tal manera que pudieran determinarse los parámetros del ritmo.

Tras al menos 3 días de registro se aplicó en el telson de cada organismo, a distintas horas circadianas, un pulso de luz monocromática azul de 30 minutos. Para que la luz de este estímulo no llegara al resto del cuerpo, se diseñó un dispositivo acrílico donde cada organismo fue montado, aislando la parte posterior del mismo hacia una cámara donde una fibra óptica iluminaba a través de un filtro *Kodak* de 450 nm., con un filtro infrarrojo para evitar la transmisión de calor.

El efecto de este estímulo luminoso en la fase del ritmo ERG se cuantificó 4 días después del mismo, para lo cual se calculó el CT normalizando cada ciclo respecto a un período de 24 horas y considerando como referencia de fase el CT 12 o inicio de actividad, donde se alcanza el 50% de la amplitud de cada ciclo. Se calcularon las diferencias entre la hora esperada del inicio de actividad y la hora observada del mismo 4 días después del estímulo, y con ello se obtuvieron los cambios de fase por hora, para construir así la CRF respectiva.

(ver apéndice)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

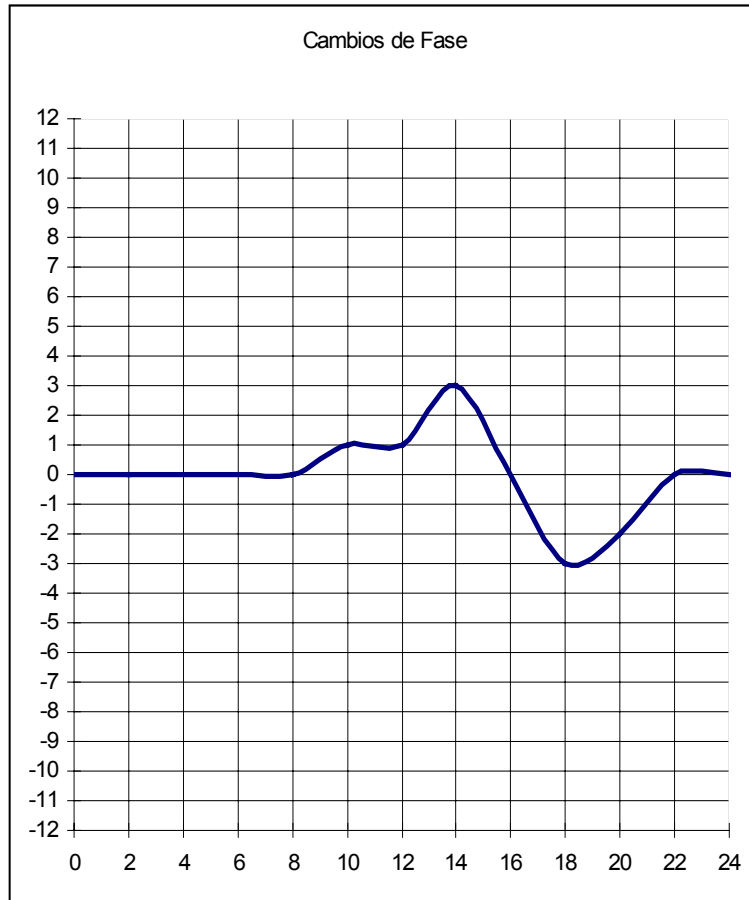
Se obtuvo un período circadiano promedio de 23.45 +/- 2.01 horas. Durante la aplicación de la luz azul, la amplitud del ERG disminuyó entre 2% y 30%, dependiendo de la hora, y mostrando un patrón circadiano con disminuciones máximas entre las CT 14 y 17.

### Tabla de datos

CT	promedio	exp1	exp2	exp3
0	0	0	0	0
2	0	0	0	
4	0	0	0	
6	0	0	0	
8	0	0	0	
10	1	1	1	1
12	1	1	1	1
14	3	4	2	3
16	0	0	0	0
18	-3	-3	-2	-4
20	-2	-2	-2	-2
22	0	0	0	
24	0	0	0	0

Estos resultados corresponden a los 31 organismos utilizados, descartando aquellos registros que se malograron antes del pulso azul o de los períodos transitorios.

La curva de respuesta de fase obtenida muestra falta de respuesta en el día subjetivo, avances de fase (A) al atardecer y en la noche subjetiva temprana, y retrasos (D) en la noche subjetiva tardía y al amanecer. La relación D/A es casi 1.



La forma de esta CRF se asemeja a la obtenida con pulsos de oscuridad en otras especies (Klein *et al.*, 1985). La CRF del ERG de acociles jóvenes, cuando se estimula con luz blanca el organismo completo, muestra zonas de adelantos moderados y retrasos en la noche subjetiva temprana, y retrasos en el día subjetivo tardío.

El hecho de que la CFR obtenida al estimular con luz azul únicamente el telson del animal sea unimodal, y que los cambios de fase sean más moderados y principalmente ubicados en la noche subjetiva, sugieren que la magnitud y dirección de los cambios de fase dependen de las características de la luz utilizada y del número de entradas al sistema oscilador de acociles juveniles que son estimuladas.

La disminución de la amplitud del ERG durante la aplicación del estímulo luminoso en el fotorreceptor caudal parece indicar efectos tónicos y fásicos, y al correlacionar las máximas disminuciones obtenidas en el ERG con respecto a la curva de respuesta de fase, se observa que coincide con las horas de mayores cambios de fase de la curva (CT 14 y CT 17). Este comportamiento sugiere la existencia de relaciones funcionales entre el fotorreceptor caudal y el sistema visual, de manera similar a lo reportado por Inclán-Rubio y Fuentes Pardo (1987).

## ANÁLISIS PROSPECTIVO

Este trabajo ha recibido hasta el momento 10 citas, 9 de ellas corresponden a artículos de investigación en revistas indexadas y otra más corresponde a un libro que se titula "*Rhythms of Life, An introduction using selected topics and examples*". El autor del libro es el Dr. Wolfgang Engelmann, de la Universität Tübingen, en Alemania, y se hace referencia a este trabajo en el capítulo titulado *Photoreceptors for synchronization of circadian rhythms*.

En orden cronológico, las citas de artículos que aparecen en *Scopus*, son las siguientes:

1. Nonparametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. Miranda-Anaya, M., Fajul-Moles, M.L. *Chronobiology International*. Volume 14, Issue 1, 1997, Pages 25-34
2. The crustacean eye: Dark/ light adaptation, polarization sensitivity, flicker fusion frequency, and photoreceptor damage. Meyer-Rochow, V.B. *Zoological Science*. Volume 18, Issue 9, December 2001, Pages 1175-1197
3. Spontaneous and light-evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations. Prieto-Sagredo, J., Fajul-Moles, M.L. *Chronobiology International*. Volume 18, Issue 5, 2001, Pages 759-765
4. The circadian system of crayfish: A developmental approach. Fajul-Moles, M.L. *Microscopy Research and Technique*. Volume 60, Issue 3, 15 February 2003, Pages 291-301
5. Nonvisual photoreceptors in arthropods with emphasis on their putative role as receptors of natural Zeitgeber stimuli. Fleissner, G. *Chronobiology International*. Volume 20, Issue 4, 2003, Pages 593-616
6. The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. Fajul-Moles, M.L., Escamilla-Chimal, E.G. and Gloria-Soria, A. *Journal of Experimental Biology*. Volume 207, Issue 9, April 2004, Pages 1453-1460
7. Photic regulation of c-Fos expression in the protocerebrum of crayfish. Granados-Dominguez, M., Escamilla-Chimal, E.G. *Biological Rhythm Research*. Volume 36, Issue 1-2, February 2005, Pages 15-22
8. Serotonin-caused phase shift of circadian rhythmicity in a photosensitive neuron. Rodríguez-Sosa, L., Calderon-Rosete, G., Flores, G., Porras, M.G. *Synapse*. Volume 61, Issue 10, October 2007, Pages 801-808

9. Circadian and ultradian rhythms in the crayfish caudal photoreceptor. Rodríguez-Sosa, L., Calderón-Rosete, G. Synapse Volume 62, Issue 9, September 2008, Pages 643-652

Las citas que ha recibido este artículo pueden clasificarse en los siguientes rubros:

- Revisiones
- Fotorreceptores extrarretinianos
- Fotorreceptor caudal

## **Revisiones**

En 2001 Meyer hace una revisión de la estructura y función de ojos y otros fotorreceptores de crustáceos, y de las variables involucradas en el daño que puedan recibir por distintos procesos. En esta referencia se menciona que, en contraste con los numerosos estudios acerca del ojo compuesto de los crustáceos, se sabe poco de los procesos adaptativos relativos a los otros fotorreceptores que se han caracterizado, como el caudal del acocil.

En 2003, Fanjul y Prieto desarrollan un estudio del sistema circadiano del acocil desde la perspectiva de la biología del desarrollo, y plantean que aunque los acociles adultos exhiben varios ritmos evidentes, entre ellos el locomotor y el de sensibilidad retinal, los mecanismos que subyacen a estos ritmos son controvertidos. Se detalla cómo se han realizado estudios para localizar los marcapasos y los mecanismos de sincronización, y con aproximaciones ontogenéticas, utilizando experimentos de conducta, electrofisiología o neuroquímica, se confirma el modelo basado en varios marcapasos distribuidos en el sistema nervioso central. Sin embargo, el acoplamiento de la ritmicidad entre estos distintos osciladores puede ser complejo y depender de la interacción entre Serotonina, luz, y la Hormona Hiperglicemiante de crustáceos (CHH). La CHH no se había considerado previamente como un agente en la génesis y sincronización del ritmo de sensibilidad retiniana.

## **Fotorreceptores extrarretinianos**

Miranda y Fanjul (1997) probaron el efecto de luz monocromática azul o roja aplicada extrarretinariamente para sincronizar el ritmo de actividad locomotora de acociles juveniles. Para ello se registró la actividad locomotora de 46 acociles por 30 días; en los primeros 10 días se mantuvo en obscuridad constante, luego se extirpó la retina y la lamina ganglionaris de los organismos experimentales (se mantuvieron intactos a los organismos control) y se aplicaron fotoperiodos esqueleto con pulsos de 30 minutos de luz azul o roja por otros 10 días. Después se dejó en obscuridad por otros 10 días, se analizó cuantitativa y cualitativamente la actividad locomotora, y se observaron cambios de fase (adelantos y retrasos) en los animales intactos, lo cual indica la participación de fotorreceptores extrarretinianos en las respuestas circadianas a luz monocromática.

Flessner (2003) plantea que en varios insectos y arácnidos se han encontrado tres clases de fotorreceptores que no son utilizados en el procesamiento de imágenes:

- a) En los lóbulos ópticos de insectos holo y hemimetábolos
- b) Dentro del último ganglio de alacranes y dípteros
- c) Como fotorreceptores visuales modificados en alacranes (ojos laterales)

En relación con el tema de sincronización, se postula que estos fotorreceptores extrarretinianos pueden ser vías de entrada al reloj circadiano.

En 2004, Fanjul y Escamilla utilizan técnicas inmunocitoquímicas para detectar CRY, encontrando variaciones circádicas de CRY en cerebro pero no en tallo ocular. Se plantea que los ritmos circadianos del acocil son sincronizados por luz azul cuya señal ingresa al sistema circadiano a través de fotorreceptores extrarretinianos. El criptocromo es un fotopigmento proteico existente en plantas y animales.

Un año después (2005) Granados y Escamilla utilizan inmunocitoquímica para identificar variaciones circadianas de c-fos en protocerebro de acocil. La



señalización intracelular del núcleo supraquiasmático de roedores implica el proto-oncogen c-fos, y su producto, la fosfoproteína Fos. En acociles, la luz induce c-fos en protocerebro medio del ganglio supraesofágico, y esta presencia presenta patrones circadianos, especialmente en neuronas de la región dorsal anterior del puente protocerebral

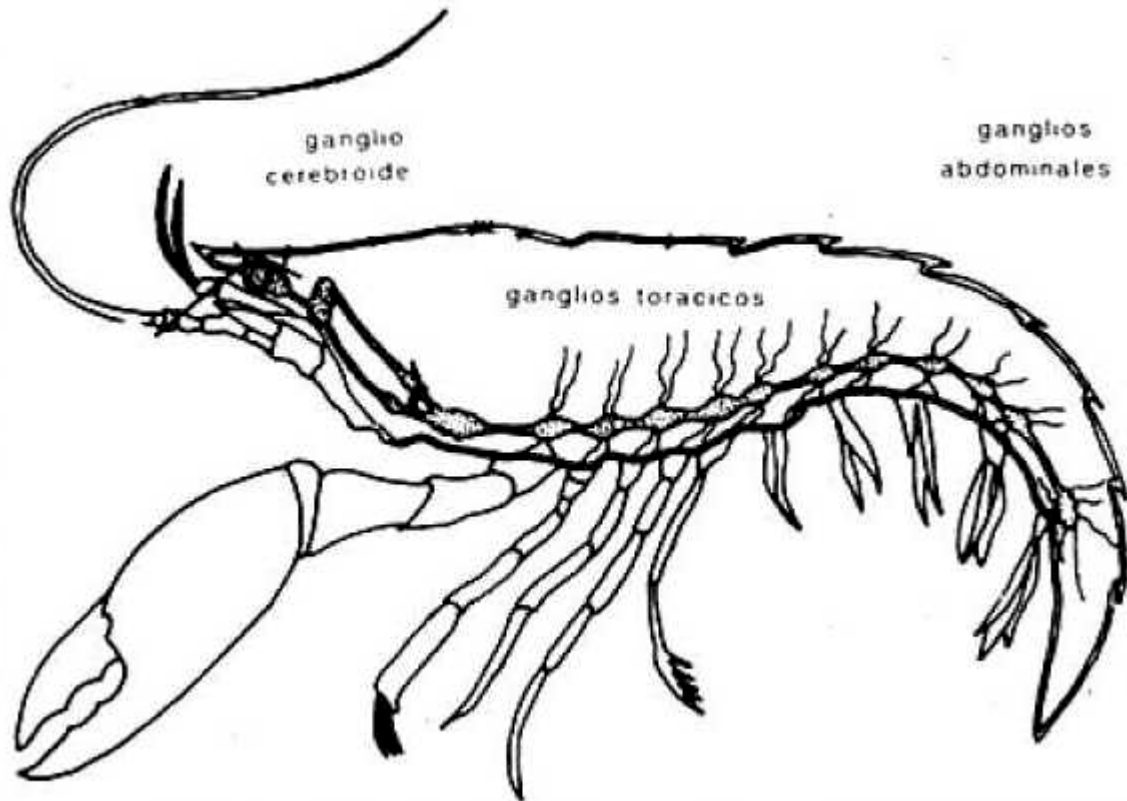
### **Fotorreceptor caudal**

Prieto y Fanjul (2001) describen que al examinar los patrones de descarga espontáneos y evocados por luz del fotorreceptor caudal del acocil, registrando la cadena ganglionar abdominal aislada y mantenida *in vitro*, se observan ritmos circadianos con período de 24.4 horas para las descargas espontáneas y de 24.2 horas para las descargas provocadas por luz. Se postula un significado adaptativo de esta respuesta involucrada en la reacción de huida .

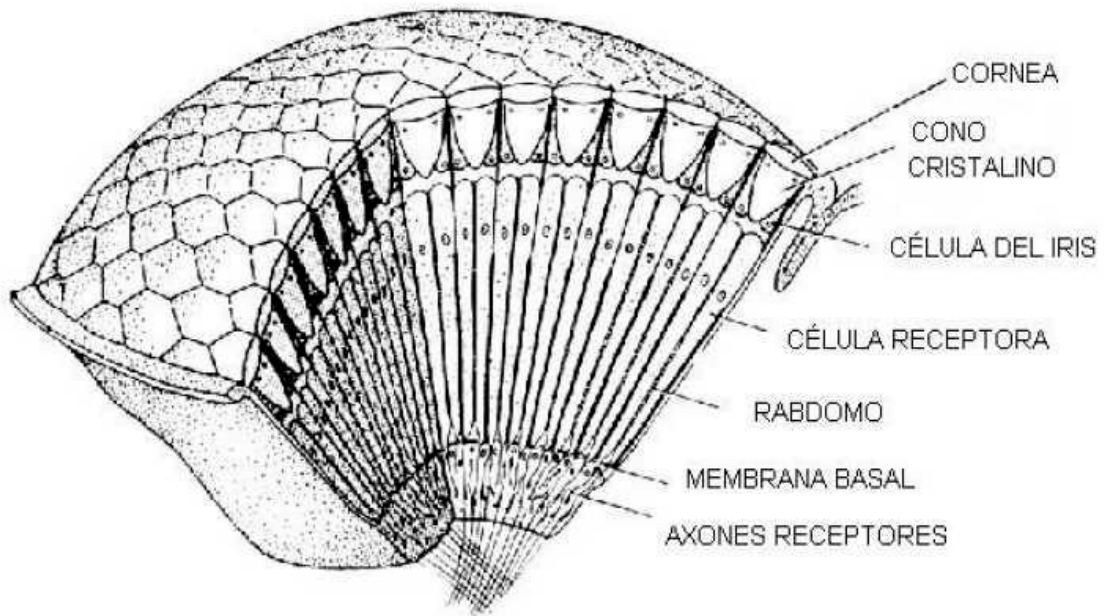
En 2007, Rodríguez-Sosa cuantifica que la aplicación de 5-HT u 8-OH-DPAT (agonista de 5-HT) ocasionan cambios de fase en el patrón de disparo del fotorreceptor caudal del sexto ganglio abdominal. Esto sugiere la participación del receptor 5-HT 1A en esta modulación. Un año después, el mismo autor describe cómo el fotorreceptor caudal del acocil muestra patrones rítmicos en su actividad espontánea y en la actividad inducida por luz. La modulación se da por 5-HT y el nivel de los receptores 5-HT 1A tiene un ritmo en el sexto ganglio, con acrofase al atardecer. Finalmente, plantea la hipótesis de la existencia de dos osciladores circadianos en una neurona única del fotorreceptor caudal.

**APÉNDICE:**

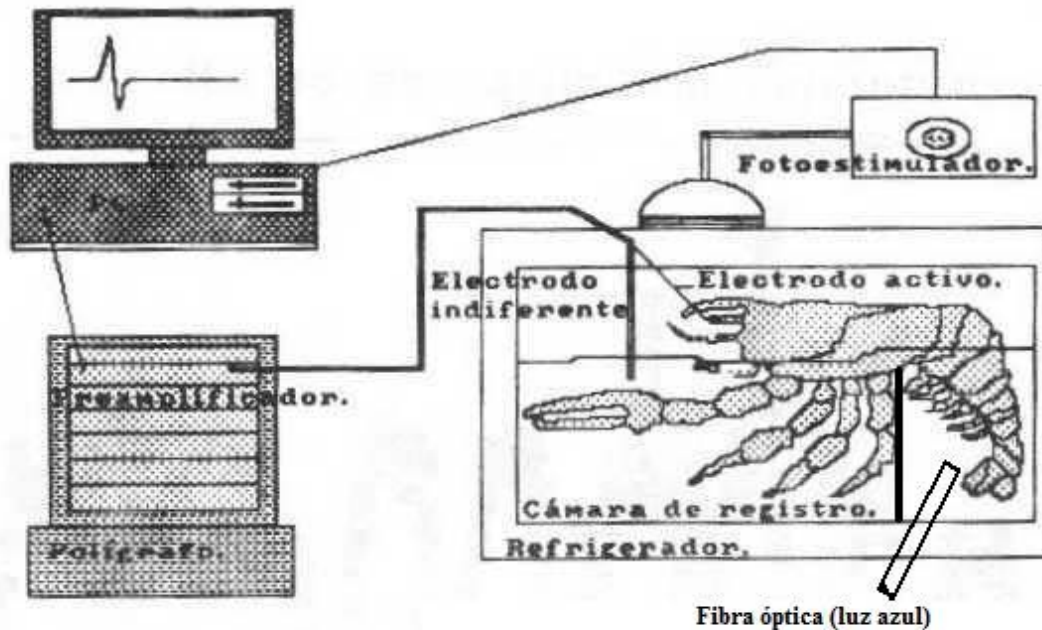
Imágenes relativas al texto y artículo original.



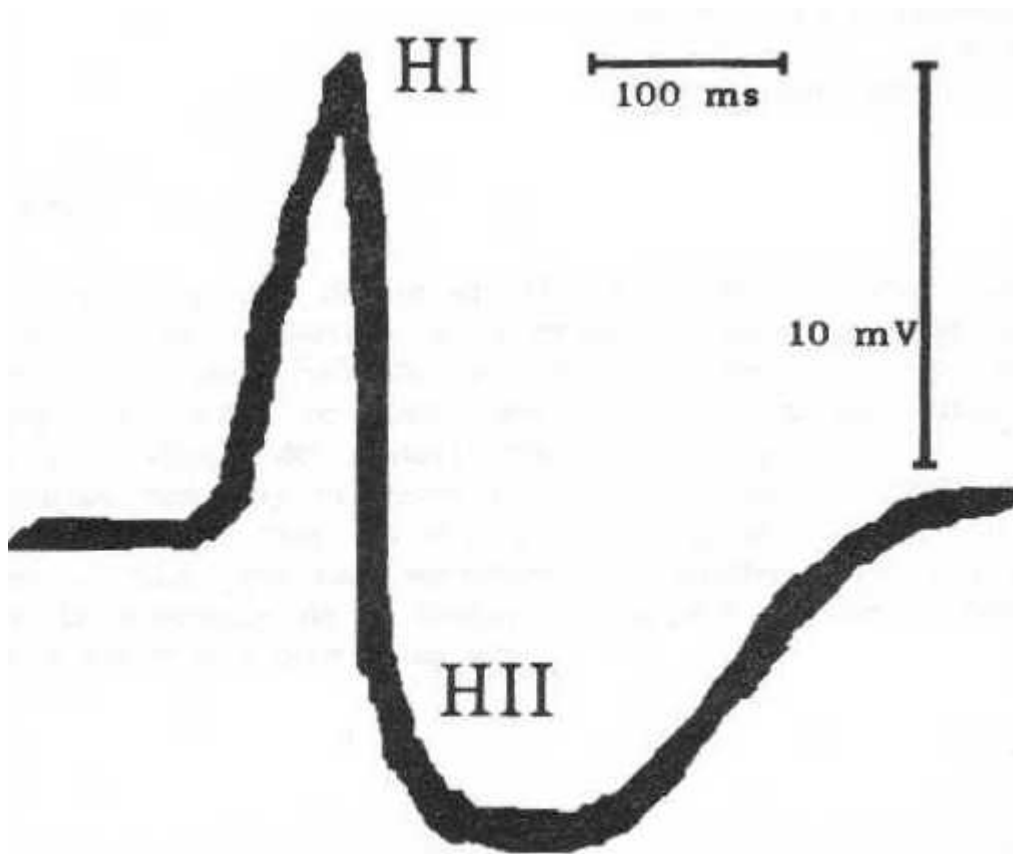
Esquema lateral de un acocil, mostrando la distribución anatómica de los ganglios que constituyen el sistema nervioso.



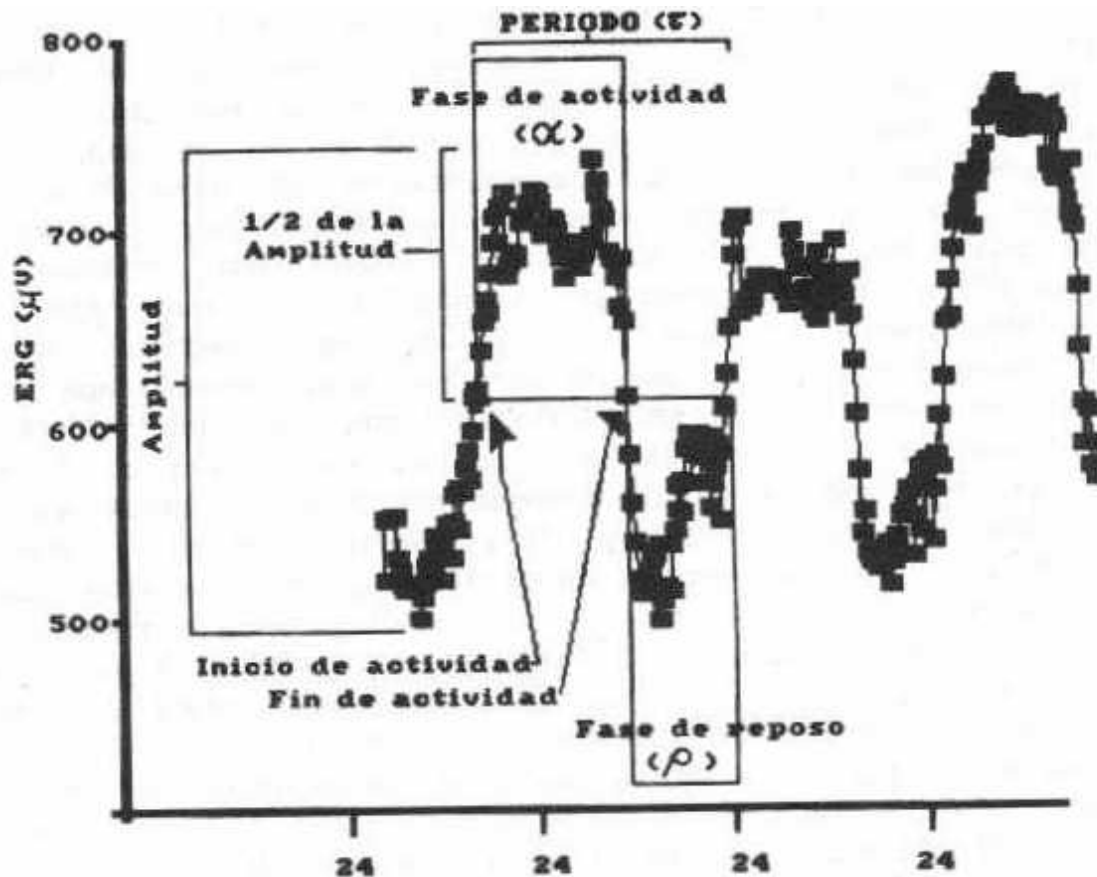
Corte del ojo compuesto de acocil, mostrando las estructuras principales.



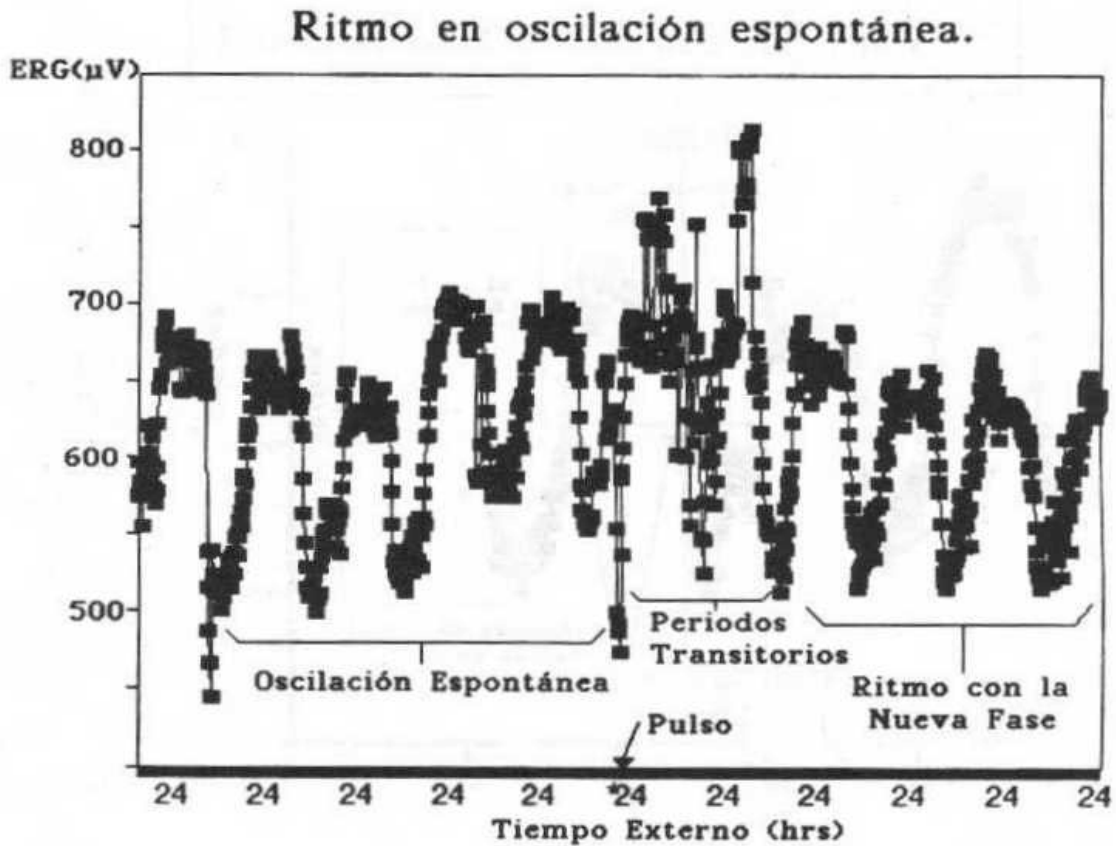
Dispositivo de registro, que consta de una cámara húmeda donde se registra el ERG, una PC que envía cada 15 minutos al fotoestimulador las señales de disparo, preamplificador y polígrafo donde se reciben y registran las amplitudes del ERG y en la misma PC se almacenan los datos del registro. La parte posterior de la cámara húmeda está separada de la anterior para aislar de cualquier fuente de luz ambas regiones; el pulso de luz monocromática se aplica al telson a través de una fibra óptica.



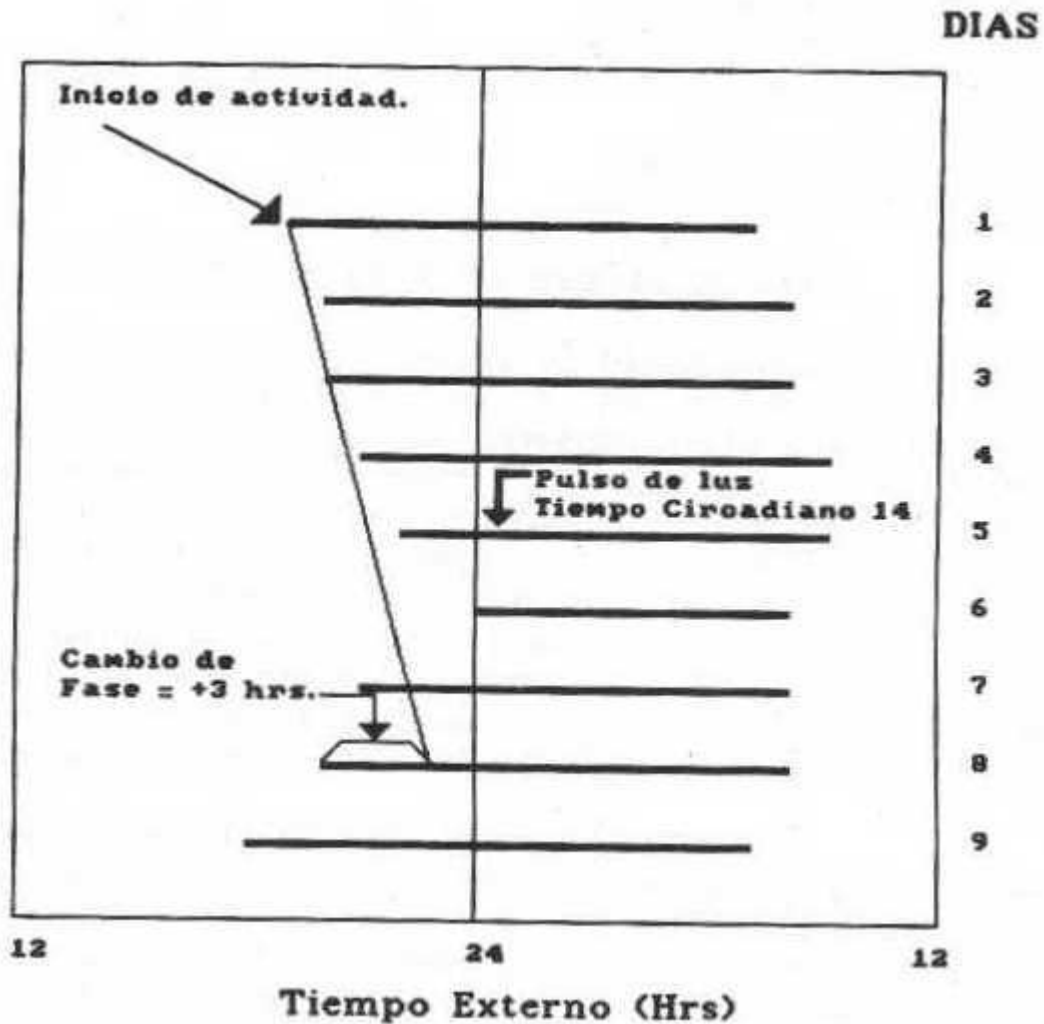
Electrorretinograma: Se aprecian los componentes HI y HII del ERG, que corresponden al encendido del estímulo luminoso y al tiempo que dure la estimulación, respectivamente. Modificado de Naka y Kuwabara, 1959.



Parámetros circadianos del ERG: Se puede observar la duración del periodo (Tau) que se mide desde el inicio de actividad de un ciclo hasta el inicio de actividad del siguiente; la fase de actividad (alfa) considerada desde el momento del ciclo en el cual la amplitud equivale al 50% del máximo y hasta que regresa a tal magnitud; la fase de reposo (ro) que considera desde que la amplitud cae al 50% de la total, y hasta que recupera esa misma magnitud: y el tiempo circadiano (CT), que se calcula normalizando cada ciclo respecto a 24 horas.

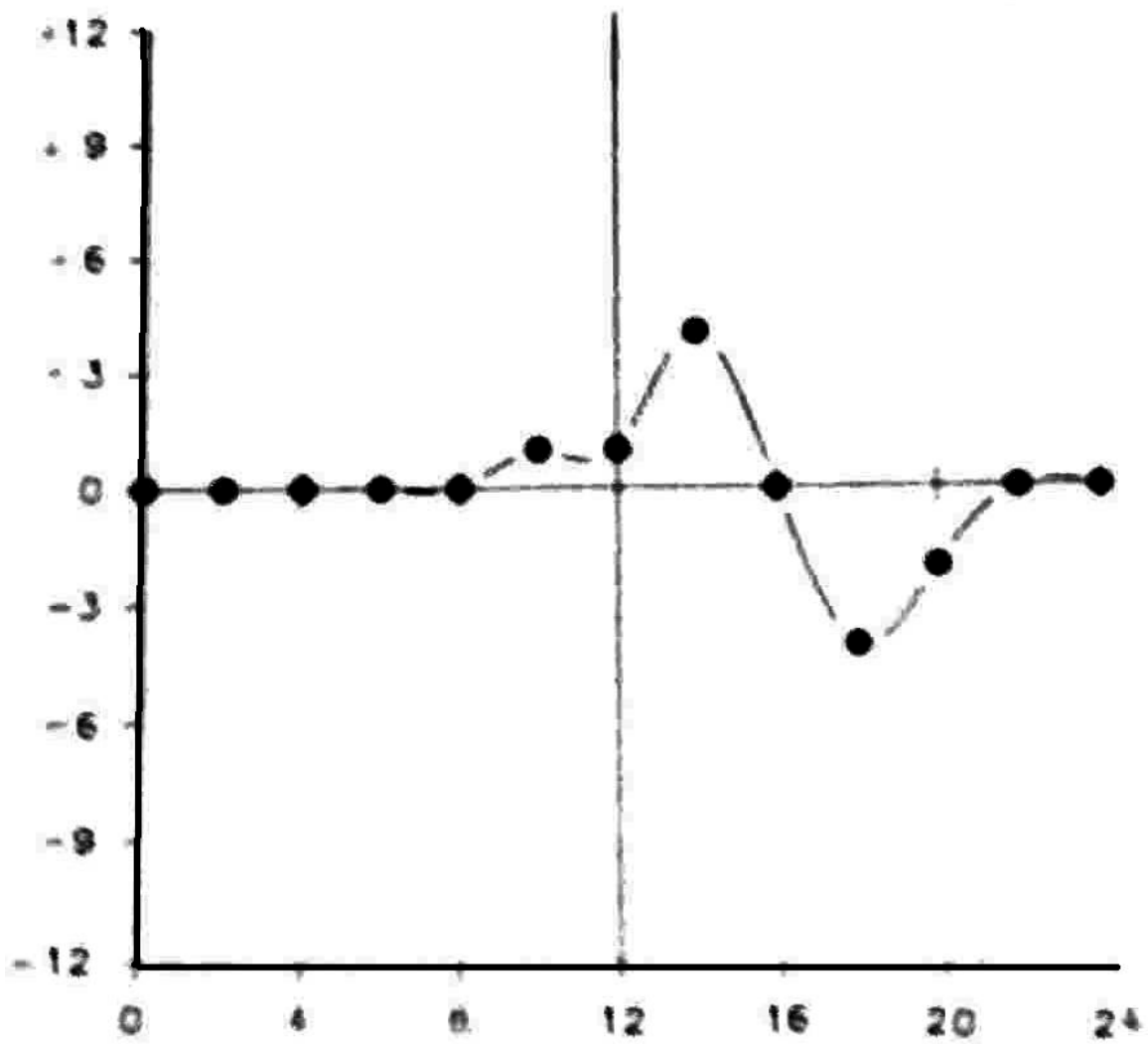


Datos crudos de un registro típico de ERG en obscuridad y temperatura constantes, al quinto día se aplica un pulso de luz monocromática azul en la región abdominal, y tras un par de periodos transitorios, se restablece la oscilación, eventualmente con una nueva fase.

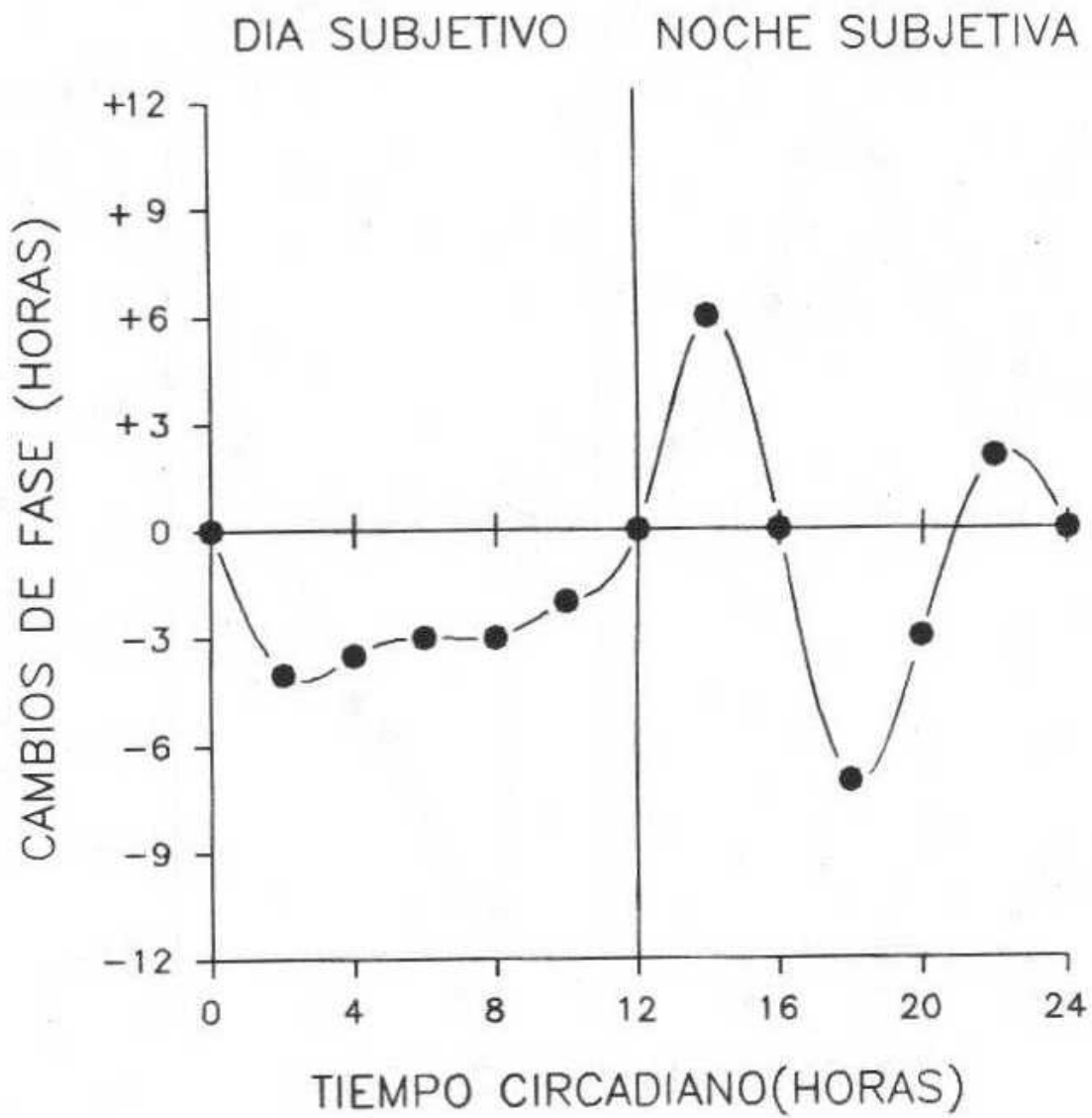


Método de Enright para determinar los cambios de fase: Se grafican como barras horizontales las fases de actividad de cada período, la longitud de cada barra representa la duración de dicha fase, respecto al tiempo externo. Como el ciclo observado es mayor a 24 horas, cada barra se va desplazando hacia la derecha en días consecutivos. Al quinto día se aplica un pulso de luz azul en la región abdominal y la perturbación que sufre el ritmo se aprecia por el cambio en la longitud de las barras subsecuentes, que corresponden a los períodos transitorios. El cambio de fase se cuantifica al tercer día después del pulso, estimando mediante una regresión lineal la hora esperada del inicio de actividad respecto a la hora real en que se presenta.

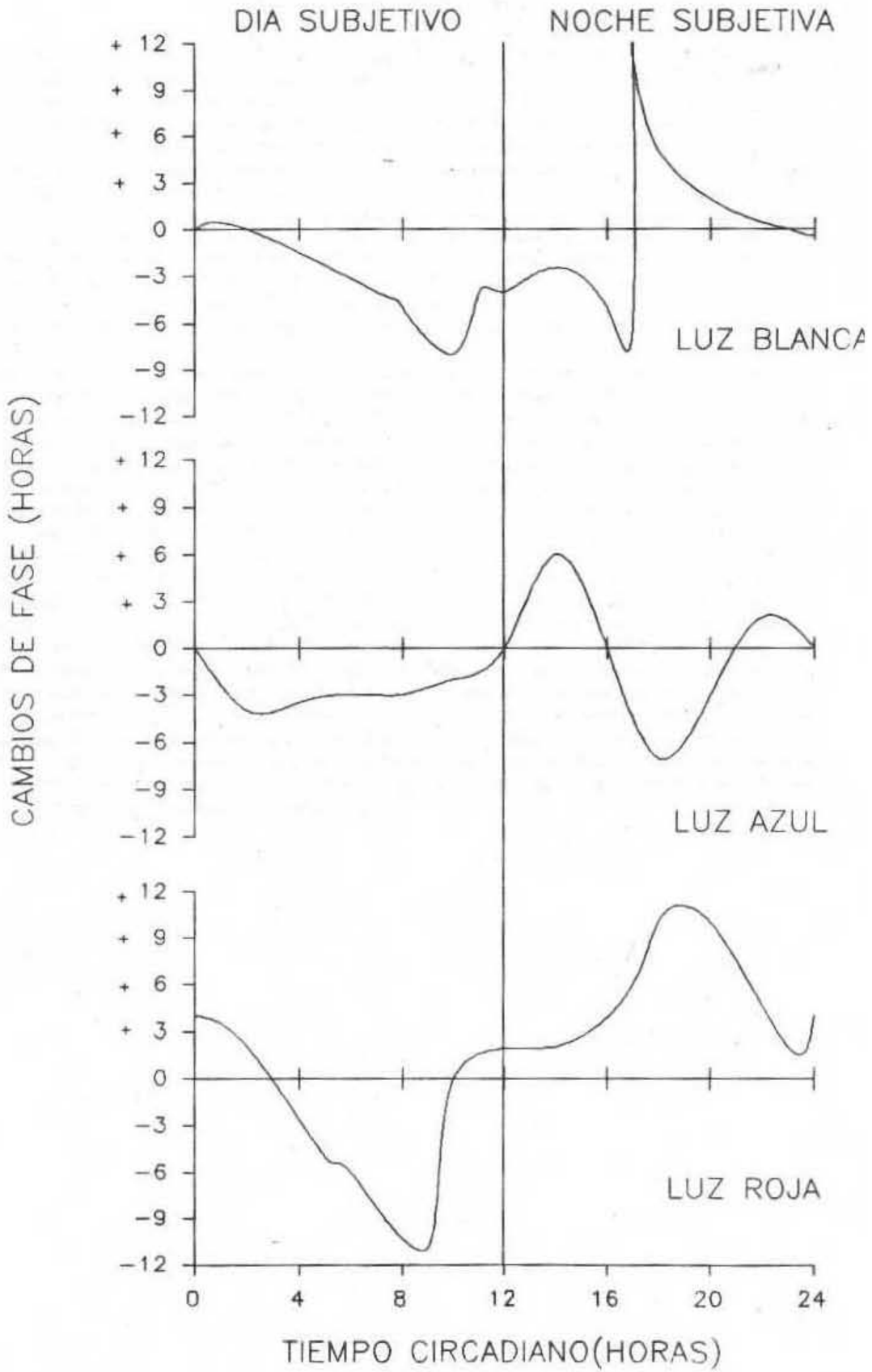




Curva de Respuesta de Fase cuando se aplica luz monocromática azul al fotorreceptor caudal.



Curva de Respuesta de Fase cuando se aplica luz monocromática azul al organismo completo.



Comparativa de las Curvas de Respuesta de Fase a Luz Blanca, Azul y Roja.

This article was downloaded by: [UNAM Direccion General de Bibliotecas]  
On: 7 November 2008  
Access details: Access Details: [subscription number 788840779]  
Publisher Taylor & Francis  
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House,  
37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



### Biological Rhythm Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:  
<http://www.informaworld.com/ajpp/tae-context=0210734219>

### Phase Shifting the ERG Amplitude Circadian Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal Monochromatic Illumination

J. A. Bernal-Moreno, M. Miranda-Araya, M. L. Farjot-Moles

Online Publication Date: 01 August 2008

To cite this Article Bernal-Moreno, J. A., Miranda-Araya, M. and Farjot-Moles, M. L. (2008) Phase Shifting the ERG Amplitude Circadian Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal Monochromatic Illumination, *Biological Rhythm Research*, 27:3, 299 — 301

To link to this Article: DOI: 10.1078/brhm.27.3.299.12955

URL: <http://dx.doi.org/10.1078/brhm.27.3.299.12955>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

## Phase Shifting the ERG Amplitude Circadian Rhythm of Juvenile Crayfish by Caudal Monochromatic Illumination

J.A. Bernal-Moreno, M. Miranda-Anaya and M.L. Fanjul-Moles\*

### ABSTRACT

The objective of the present work was to determine the physiological mechanisms underlying the synchronization of the ERG amplitude rhythm. Chronic ERG recordings were obtained from juvenile instars of crayfish. Changes on the ERG amplitude rhythm produced when 30 min blue light illuminated the telson were determined. The PRC obtained with these data showed advances in the early subjective night and delays in the late subjective night. These phase shiftings resemble the features of curves obtained by dark pulses in other species. The relation of this curve with PRCs generated in the crayfish and other animals species are discussed.

**Abstracting keywords:** Circadian rhythm, extraretinal photoreceptor, blue light, phase-response curve, juvenile crayfish.

### INTRODUCTION

In a previous work on the development of crayfish rhythmicity (Fanjul-Moles et al., 1992) it was proposed the existence of two independent systems involved in the synchronization of the electroretinogram (ERG) circadian system, i.e. a short and a long wavelength detection systems. Both, retinal and extraretinal photoreceptors seem to be involved in the entrainment of the ERG rhythm of adult crayfish (Page and Larimer, 1976; Fuentes-Pardo and Inclán-Rubio, 1987; Sandeman et al., 1990). Hence neural integration from different circadian photic inputs might occur in the central circadian phase shifting system, as has been proposed for other animal species (Horne and Renninger, 1988; Brad Hanna et al., 1988.) The present work was undertaken to test synchronization of the ERG amplitude rhythm in juvenile instars of crayfish *Procambarus clarkii* when blue monochromatic light, by illuminating the telson, stimulates the caudal photoreceptor system (CPS), one of the structures proposed as a photoreceptor for entrainment of the pacemaker in the adult crayfish.

Correspondence: M.L. Fanjul-Moles, Laboratorio de Neurofisiología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-371, 04510, México D.F., México.

## METHODS

Thirty-one crayfish aged between two and six months after eclosion were used. The retina's electrical response (electroretinogram-ERG) to a fixed white light was recorded individually in animals maintained in darkness and constant temperature (Fanjul-Moles et al., 1992) for at least 8 days. Each animal was maintained under free running conditions during 3 days. On the fourth day, and at different circadian times (CT), a 30 min. and  $5.1 \text{ microeinstein sec}^{-1}\text{m}^{-2}$  blue light pulse was applied on the transparent ventral region of telson. To confine illumination to the sixth abdominal segment, the telson was inserted in a special device made of black acrylic plastic, allowing only the entrance of an optic fiber light provided with a Kodak wratten interference filter (transmittance wavelength of 450 nm.). To avoid the heat an infrared cut-off filter was placed between the light source and the interference filter. The effect of the luminous stimulus on the phase of the ERG oscillation was determined on the fourth day after stimulation. CT was calculated by normalizing each cycle with respect to the 24-hour period. The phase reference point was the onset of activity, CT 12 (CT 12 corresponds to the moment at which 50% of the maximum amplitude of the cycle is reached). The difference between the observed and expected times of the onset of activity i.e. when the ERG rhythm attained its steady state (4th day), was the criterion used to measure a phase shift, which was used to construct a phase-response curve.

## RESULTS AND DISCUSSION

The ERG amplitude rhythm of juvenile crayfish kept in constant darkness was recorded at 15 min intervals. It was plotted against the external time and analyzed over the eight days of the experiment. The average circadian period of all the animals studied was  $23.45 \pm 2.01$  hrs. A significant reduction of the ERG amplitude was elicited when the blue light reached the telson. The ERG reduction was obtained from the first ERG measure after stimulation until 30 min after light suppression. The effect of the stimulus on the ERG amplitude appeared to be both phasic and tonic. The average reduction of ERG varied between 2 and 30 % depending on the external time. This change seems to follow circadian pattern (maximal decrement between 14 and 17 CT). Although this pattern was not analyzed in the present work, it appears to indicate an important functional relationship between the eyes and CPS, as has been reported by other authors (Inclán-Rubio and Fuentes-Pardo, 1987). Figure 1 shows the phase response curve (PRC) obtained by applying the blue light on the telson. This PRC shows mostly insensitivity in the subjective day, advances (A) are seen at the time of the expected dusk and in the early subjective night, delays (D) occur around the time

of the expected dawn and in the late subjective night, the D/A ratio is almost 1. The features of this curve resemble the characteristics of the curve obtained by dark pulses in other animal species (Klein et al., 1985). The PRC's of the ERG obtained in juvenile instars of crayfish through the application of a 15 min of white light to the whole animal of the same age (Fuentes-Pardo et al., 1992) indicates a zone of both delays and advances of moderate amplitude in the early subjective night as well as a zone of delays in the late subjective day. The unimodal curve obtained in the present work, resulting from illuminating just the CPS, shows shorter shifts mostly restricted to the subjective night. Although these results are preliminary, the features of both PRCs seem to indicate that the magnitude and direction of the shifts depend on the number as well as the characteristics of the light inputs converging on the juvenile crayfish pacemaker system. This phenomena could be related to similar mechanisms as proposed for antiphase families of PRCs generated in other animals and particularly for *Bulla gouldiana* ocular pacemaker (Block et al., 1995).

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Manna-Barreto for his editorial assistance. This work was supported in part by PAPIIT-IN-2122799 and PADEP, UNAM.

#### REFERENCES

- BLOCK, G., GEUSZ, M., KHALSA, S., MICHEL, S. and WHITMORE, D. (1995): Cellular analysis of a molluscan retinal biological clock. In *Circadian clocks and their adjustment*, Ciba Foundation Symposium 183, pp. 51-60. John Wiley and Sons, Chichester.
- BRAD HANNA, W.J. HORNE, J.A., and RENNINGER, G.H. (1988): Circadian photoreceptor organs in *Limulus*. II. The telson. *J. Comp. Physiol.*, 162A: 133-140.
- FANJUL-MOLES, M.L. MIRANDA-ANAYA, M. and FUENTES-PARDO, B. (1992): Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A, 1: 99-106.
- FUENTES-PARDO, B. and INCLAN RUBIO, V. (1987): Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish I. Synchronization of the ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A, 3: 523-527.
- FUENTES PARD0, B., FANJUL-MOLES, M.L. and MORENO-SAENZ, E. (1992) Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during the ontogeny in crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 23,2: 81-91.
- HORNE, J.A. and RENNINGER, G.H. (1988): Circadian photoreceptors in *Limulus* I. Ventral, median and lateral eyes. *J. Comp. Physiol.* 162A: 127-132.
- INCLAN-RUBIO, V. and FUENTES-PARDO, B. (1987): Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish II. Functional relationships between caudal and visual photoreceptors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A, 3: 529-536.
- KLEIN, S., BINKLEY, S. and MOSHER, K. (1985): Circadian phase of sparrows: Control by light and dark. *Photochem. Photobiol.* 41: 453-457.
- PAGE, T. L. and LARIMER, J.L. (1976) Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.* 23: 245-254.
- SANDEMAN, D.C. SANDEMAN, R.E. and DE COUET, H.G. (1990): Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21,4: 619-629.

## REFERENCIAS

Aréchiga, H. y C. A. G. Wiersma. (1969): Circadian Rhythms of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71.

Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. y B. Barrera-Mera. (1973): Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latin Am.* 24: 601.

Aréchiga H. 1977. Modulation of visual input in the crayfish. In: Hoyle G., editor. *Identified neurons and behavior in arthropods.* New York: Plenum Press. p 387–403.

Aréchiga, H., Fernández-Quiroz, F., Fernández de Miguel, F. and L. Rodríguez-Sosa. (1992): The Circadian System of Crustaceans. *Chronobiology International*, v9, n6.

Aréchiga H, Fernández-Quiroz F., Fernández-de-Miguel F., Rodríguez-Sosa L. (1993): The circadian system of crustaceans. *Chronobiol Int.* 10:1–9.

Barrera-Mera B., Block G. D. (1990): Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* 522:241–245.

Benshoff, H. M., Brainard, G.C., Rollag, M.D. and G. R. Lynch (1987): Suppression of pineal melatonin in *Peromyscus leucopus* by different monochromatic wavelengths of visible and near ultraviolet light (UV-A) *Brain Res.* 420, 397-402.

Brainard, G.C., Vaughan, M.K. and J.R. Russel (1986): Effect of light irradiance and wavelength on the Syrian Hamster reproductive system. *Endocrinol.* 119, 648-654.

Binkley, S. (1990): *The Clockwork Sparrow.* Prentice Hall, New Jersey.

Block, G., Geusz, M., Khalsa, S., Michel, S. and Whitmore, D. (1995): Cellular analysis of a molluscan retinal biological clock. In *Circadian clocks and their adjustment.* Ciba Foundation Symposium 183. pp. 51-60. John Wiley and Sons, Chichester.

Boulos, Z. (1991) *Circadian Rhythms: The Physiology of Biological Timing.* In *Neural and integrative animal physiology*, 4<sup>th</sup> edition, C. L. Prosser, editor. Wiley-Liss.

Brad Hanna, W.J. Horne, J.A., and Renninger, G.H. (1988): Circadian photoreceptor organs in *Limulus*. II. The telson. *J. Comp. Physiol*, 162A: 133-140.

Coleman, R. (1986): *Wide Awake at 3:00 a.m.* W. H. Freeman. N.Y.



Cummins, D. and T. H. Goldsmith (1981): Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. *J. comp. Physiol.* 142, 199-202.

Davis, Fred C. (1984): Ontogeny of Circadian Rhythms. In "Handbook of Behavioral Neurobiology; Volume 4, Biological Rhythms" ed. Jürgen Aschoff, Plenum Press. New York-London.

Fanjul-Moles M. L. and B. Fuentes-Pardo (1989): Spectral sensitivity in the course of ontogeny of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A, 61-66.

Fanjul-Moles M. L., Prieto-Sagredo, J. and B. Fuentes-Pardo (1991): Sinus Gland regulates the spectral sensitivity in the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 98a (2) 317-322.

Fanjul-Moles, M.L. Miranda-Anaya, M. and Fuentes-Pardo, B. (1992): Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A, 1: 99-106.

Fanjul-Moles, M.L. and J. Prieto-Sagredo (2003): The circadian system of crayfish: A developmental approach. *Microscopy Research and Technique*, Volume 60, Issue 3, 15, 291-301

Fanjul-Moles, M.L., Escamilla-Chimal, E.G. and Gloria-Soria, A. (2004): The crayfish *Procambarus clarkii* CRY shows daily and circadian variation. *Journal of Experimental Biology*. Volume 207, Issue 9, April 2004, Pages 1453-1460

Fleissner, G. Nonvisual photoreceptors in arthropods with emphasis on their putative role as receptors of natural Zeitgeber stimuli. (2003): *Chronobiology International*. Volume 20, Issue 4, 2003, Pages 593-616

Frixione E., Hernández J. (1989): Modulation of screening-pigment position in crayfish photoreceptors by serotonin: possible involvement of Na/K-ATPase activity. *J. Exp. Biol.* 143:459–473.

Fuentes-Pardo, B. and Inclan Rubio, V. (1987): Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish I. Synchronization of the ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A, 3: 523-527.

Fuentes Pardo, B., Fanjul-Moles, M.L. and Moreno-Saenz, E. (1992): Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during the ontogeny in crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle Res.* 23,2: 81-91.

Gordon, S. A., and Brown, G. A. (1971): Observations on spectral sensitivities of the phasing of circadian temperature rhythms in *Perognatus penicillatus*. In *Biochronometry Natl. Acad. Sci. U.S. M. Menaker ed.*

Granados-Dominguez, M., Escamilla-Chimal, E.G. (2005): Photic regulation of c-Fos expression in the protocerebrum of crayfish. *Biological Rhythm Research*. Volume 36, Issue 1-2, February 2005, Pages 15-22

Hastings, J.W. and B.M.Sweeney. (1958): Light pulse PRC in *Gonyaulax*. *Biol. Bull.* 115:440-458

Horne, J.A. and Renninger, G.H. (1988): Circadian photoreceptors in *Limulus* I. Ventral, median and lateral eyes. *J. Comp.Physiol.* 162A: 127-132.

Inclan-Rubio, V. and Fuentes-Pardo, B. (1987): Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish II. Functional relationships between caudal and visual photoreceptors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A, 3: 529-536.

Joshi, D. and M.K. Chandrashekar. *J. Exp. Zool.* 230:325-328, (1984): Flashes of 0.5 msec reset the circadian clock of a bat.

Klein, S., Binkley, S. and Mosher, K. (1985): Circadian phase of sparrows: Control by light and dark. *Photochem. Photobiol.* 41: 453-457.

Mote, M.L. and Black, K.R. (1981): Action spectrum and threshold sensitivity of entrainment of circadian running activity in the cockroach *Periplaneta americana*. *Photo. Chem. Photobiol.* 34, 257-265.

Lara-Aparicio, Miguel. (2002): Modelos matemáticos de los Ritmos Circadianos. En *Clásicos de la Biología Matemática*. Ed. Siglo XXI-UNAM

Meyer-Rochow, V.B. The crustacean eye: Dark/ light adaptation, polarization sensitivity, flicker fusion frequency, and photoreceptor damage. (2001): *Zoological Science*. Volume 18, Issue 9, December 2001, Pages 1175-1197

Miranda-Anaya, M., Fanjul-Moles, M.L. (1997): Nonparametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiology International*. Volume 14, Issue 1, 25-34

Naka, K. and M. Kuwabara. (1959): Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Physiol.* 36: 51-61.

Page, T. L. and Larimer, J.L. (1976): Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.* 23: 245-254

Pittendrigh, C. S., V. Bruce, and P. Kaus. (1958): *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 44:965-973. Coupled oscillator interpretation of transient cycles in *Drosophila*.

Pittendrigh, C. S. (1981): In *handbook of behavioral neurobiology* (J. Aschoff, ed.) Vol. 4, pp. 57-80. Plenum, New York. *Circadian Systems*.

Prieto-Sagredo, Julio and Fanjul-Moles, María Luisa (2001): Spontaneous and light-evoked discharge of the isolated abdominal nerve cord of crayfish in vitro reveals circadian oscillations', *Chronobiology International*, 18:5, 759 — 765

Prosser, C. L. (1991): *Neural and integrative animal physiology. Comparative Animal Physiology*, Fourth Edition, Wiley-Liss, New York.

Reinberg, A. and M. H. Smolensky. (1983): *Introduction to Chronobiology; in Biological rhythms and medicine.* (Alain Reinberg and Michael Smolensky, Eds.) Springer-Verlag, New York.

Rodríguez-Sosa, L., Calderón-Rosete, G., Flores, G., Porras, M.G. (2007): Serotonin-caused phase shift of circadian rhythmicity in a photosensitive neuron. *Synapse*. Volume 61, Issue 10, October 2007, Pages 801-808

Rodríguez-Sosa, L., Calderón-Rosete, G. (2008): Circadian and ultradian rhythms in the crayfish caudal photoreceptor. *Synapse* Volume 62, Issue 9, September 2008, Pages 643-652

Sandeman, D.C, Sandeman, R.E. and De Couet, H.G. (1990): Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21,4: 619-629.

Shaw, S. and S. Stowe. (1982): Photoreception. In "Biology of Crustacea", V.3., ed. Bliss E. D. and L. H. Mantel Academic Press, New York. pp. 338-339.