

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DEL CALCIO SOBRE EL RITMO CIRCADICO DE LA RESPUESTA A LA LUZ  
DE LOS FOTORRECEPTORES VISUALES DEL ACOCIL"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA

SYLVIA LETICIA VERDUGO DIAZ

México, D.F. diciembre de 1982.



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

	<u>Página</u>
Introducción . . . . .	1
Material y Métodos . . . . .	16
Resultados . . . . .	21
Discusión . . . . .	24
Conclusiones . . . . .	30
Figuras . . . . .	31
Referencias Bibliográficas . . . . .	49

## INTRODUCCION

### 1).- ORGANIZACION ANATOMO-FUNCIONAL DEL OJO COMPUESTO DEL ACOCIL.

La organización del ojo compuesto del acocil es similar en sus aspectos fundamentales a la que se encuentra en todos los crustáceos decápodos (Prosser y Brown, 1961; Horridge y Bullock, 1965). Desde finales del siglo pasado, Parker realizó estudios que hasta ahora no han sido superados en sus aspectos esenciales y que lo llevaron a proponer cuál es la organización anatomofuncional de los ojos de estos organismos (1891, 1895, 1897). Desde esa época, se puso de manifiesto que la unidad funcional del ojo compuesto, la omatidia, está formada por un sistema conductor de la luz, un sistema transductor de la señal luminosa en señal eléctrica y un sistema regulador de la cantidad de luz que llega hasta los fotorreceptores.

El aspecto externo de cada tallo ocular del acocil, es el de un pequeño cilindro móvil, que se encuentra unido por su parte proximal al cuerpo del organismo.

En un corte longitudinal del tallo ocular (figura 1), se observa en su parte externa una gruesa cutícula incrustada de sales de calcio que le dan una dura consistencia; esta cutícula se adelgaza bruscamente haciéndose translúcida en la región distal del tallo donde forma la córnea del ojo, que cubre la retina. Bajo esta cutícula se encuentra la hipodermis, que se engruesa para formar la retina (Parker, 1895).

El sistema conductor está integrado por la córnea, estructura que forma una faceta visible desde el exterior y que es secretada por dos células corneágenas de origen epidérmico las que se localizan en su parte inferior; más abajo se encuentran cuatro células que forman el cono cristalino el cual es una lente cuyo vértice termina en las células fotorreceptoras mediante un largo filamento llamado tallo del cono cristalino. Esta organización permite que la luz que incide sobre la superficie de la córnea llegue hasta los fotorreceptores sin que haya un grado de dispersión excesivo. De hecho, es la longitud del tallo del cono cristalino la que determina la capacidad de que la luz excite a los fotorreceptores, por lo que no es de extrañar que sea precisamente esta característica la que cambie en las especies (diurnas o nocturnas) dependiendo de que el ojo compuesto funcione como un -

ojo en el que se forman las imágenes "por aposición" o "por superposición".

El sistema transductor del ojo compuesto del acocil, está formado por 7 células fotorreceptoras que se arreglan alrededor del eje longitudinal de la omatidia, seis de estas células se han asociado con la captación de la luz y la séptima con la visión de colores y la detección de la luz polarizada (Waterman y Horch, 1966). Junto a estas células receptoras, se encuentra una octava célula de menor tamaño, llamada "célula basal excéntrica" (Waterman, 1961). Las 6 + 1 células fotorreceptoras forman la retina, en cuyo centro se encuentra el rabdomo, estructura fotosensible formada a partir de las prolongaciones tubulares o rabdomeros de dichas células. El rabdomo contiene el pigmento visual del ojo, la rodopsina, y es por lo tanto el sitio donde se lleva a cabo la reacción fotoquímica primaria (Eguchi, E., 1965). En el acocil y otros decápodos con ojos por superposición, se ha observado que cada rabdomo está formado por capas periódicas perpendiculares al eje óptico. Estas capas están integradas por 3 ó 4 sectores, cada uno formado por una de las siete células retinulares. Una de estas células es más grande que las otras y ocupa todo un lado de los cuatro que componen el rabdomo; un par de células más pequeñas ocupa cada uno de los otros tres lados. Como se observa en la figura 2, las capas alternadas del rabdomo provienen de células localizadas en los lados opuestos del mismo. Así, una capa la forman los rabdomeros de las células 1, 4 y 5, mientras que la siguiente estará formada por las células 2, 3, 6 y 7 y así sucesivamente. La microscopía electrónica ha mostrado que las fibras que forman al rabdomo están formadas por microvellosidades de diámetro entre 500 y 1000 Å.

El sistema regulador de la cantidad de luz que llega al rabdomo, lo forman diferentes clases de células, las que en conjunto forman el sistema de células pigmentarias accesorias. Estas son: las del pigmento distal (P.D.), las del pigmento proximal (P.P.) y las del pigmento reflector (P.R.). Las células del pigmento distal se encuentran rodeando a los conos cristalinos y contienen gránulos de color oscuro, cuya composición química aún no ha sido bien establecida. La posición de dichos gránulos depende del grado de iluminación al que se exponga el ojo (Sandeem y Brown, 1952) según detallaremos un poco más adelante. Las células del pigmento proximal se encuentran en la base de las células retinulares y tienen gránulos oscuros cuya posición, al igual que la de los gránulos del pigmento distal, depende también de la cantidad de luz a la que se someta al sistema. Por último, hay

células con un pigmento ocre y que se encuentran en la base de la omatidia, las que se conocen con el nombre de células del pigmento de reflexión, ya que contienen pigmentos a base de purinas y pteridinas que se caracterizan por reflejar la luz que incide sobre ellos (Kleinholz, 1961).

La membrana basal está atravesada por las fibras nerviosas provenientes de cada una de las células retinulares, las que continúan su camino hacia el sistema nervioso central y establecen su primer contacto con las neuronas de la capa ganglionar.

Además de las fibras sensitivas visuales, el nervio óptico contiene axones eferentes que se dirigen hacia los músculos que mueven el tallo ocular (Parker, 1895). También se ha encontrado un tercer tipo de fibras en el nervio óptico, las que tienen carácter secretor y que son fibras que terminan en los diferentes ganglios, en especial en la glándula sinusal. Esta estructura se conecta con un órgano glandular, el llamado órgano X, mediante axones que forman un nervio, llamado nervio óptico de la glándula sinusal. Esta glándula se considera el más importante de los receptáculos de neurosecreciones de estos organismos y se ha relacionado con la liberación de neurohormonas de muy diversos tipos. Entre las distintas hormonas que se han encontrado están la que regula la migración de los pigmentos retinianos y de los cromatóforos tegumentarios (Smith, 1948; Kleinholz, 1961), la responsable de la muda (Kleinholz y Bourquin, 1941; Brown, 1961), la que regula los niveles de la glucosa en la hemolinfa (Kleinholz, 1973) y probablemente muchas otras cuyas funciones aún se desconocen.

Las fibras nerviosas retinulares pasan desde la parte proximal de la retina hasta la masa ganglionar que se encuentra en la parte central del tallo ocular y que consiste de cuatro capas neuronales (figura 1). El primer ganglio o "lámina ganglionar", es el más pequeño, tiene aspecto de cúpula y sigue la forma de la retina. Los axones provenientes de esta capa se decusan formando el primer quiasma óptico, antes de entrar en contacto con la "médula" o segundo ganglio óptico, el cual es más grueso que la lámina ganglionar y tiene forma convexa en la región distal y cóncava en la región proximal. Los axones que emergen de esta capa ganglionar, vuelven a cruzarse formando así el segundo quiasma, antes de llegar al tercer ganglio. Es en este tercer neuropilo, llamado "complejo lobular" donde termina la mayoría de las neuronas, aunque algunas fibras pasan directamente hasta el nervio óptico. El cuarto y último neuropilo es un conjunto de masas ganglionares que -

forman los llamados focos ópticos. De los cuatro neuropilos, es éste el de mayor tamaño y del que sale el nervio óptico para ingresar a través del protocerebro lateral y llegar al lóbulo óptico del ganglio supraesofágico o cerebroide.

#### Funcionamiento del ojo compuesto del acocil.

Optica de la omatidia.- Desde 1897, Exner describió el sistema óptico del ojo compuesto de algunos artrópodos y desde entonces no se ha avanzado mucho más en éste campo, debido a la dificultad que presenta la composición gelatinosa de las estructuras que forman el sistema dióptico de estos organismos.

En el acocil, el ojo compuesto corresponde a un ojo con superposición óptica de las imágenes, lo que significa que la capa rabdomérica queda en un sitio relativamente profundo con una zona de material claro entre ella y las facetas de la córnea. Exner demostró que la luz que entra desde un punto distante llega a un gran número de facetas aunque debido a la longitud del tallo del cristalino, el que es particularmente grande en estos ojos, todos los rayos llegan a un punto en la capa receptora. En el sistema óptico del acocil se encuentra un arreglo cuadrado de espejos que se acomodan en forma radial y que hacen que la formación de imágenes sea erecta y afocal. Algo que resulta ventajoso de la organización de los ojos por superposición es que tienen una gran "pupila" (o sea el sistema de entrada de luz), ya que muchas facetas contribuyen a que llegue luz de las distintas regiones del espacio hasta la retina, por lo que la incidencia de luz en esta región es considerablemente mayor que en los ojos por aposición.

Funcionamiento de los fotorreceptores.- El funcionamiento de los fotorreceptores visuales del acocil se pone de manifiesto cuando se genera una serie de cambios eléctricos característicos de estas células ante la llegada de un estímulo luminoso.

La respuesta inicial de estas células, como en todos los fotorreceptores estudiados corresponde al llamado "potencial temprano", el que se caracteriza por las siguientes propiedades: no tiene latencia o si la tiene no se ha detectado hasta ahora; la forma de la onda depende de la temperatura ya que si ésta es elevada la onda es sólo negativa presentándose un componente positivo conforme la temperatura disminuye; se mantiene aún después de los procesos de fijación química; mantiene, hasta llegar a la saturación, una relación lineal con respecto a la intensidad de la luz; es insensible a

los cambios iónicos del medio y por último tiene el mismo espectro de absorción que caracteriza al potencial de receptor. Se considera que este potencial coincide con las primeras etapas de degradación de los pigmentos fotosensibles así como con los primeros procesos de resíntesis de los mismos; - también se ha propuesto que no se relaciona con los cambios de permeabilidad de la membrana, sino más bien con corrientes capacitivas que resultan del - cambio de cargas de las moléculas del pigmento orientadas en forma semejante que han capturado los cuantos de luz,

Potencial de receptor.- El potencial de receptor es un voltaje lento que se presenta en los fotorreceptores retinianos como respuesta a la aplicación de un estímulo luminoso. Esta respuesta es graduada y depende de la intensidad y la duración del estímulo,

En el acocll, el potencial de membrana tiene valores entre -30 a -70 mV en ausencia de la luz. Al incidir un destello luminoso hasta el rabdomo, que ya hemos dicho que es el sitio donde se encuentran las microvellosidades que contienen al pigmento fotosensible, se lleva a cabo una despolarización, en la que buen número de autores (Burkhardt y Autrum, 1961; Naka, 1961; Lasansky y Fourtes, 1969; Hamdorf, 1979) ha encontrado dos componentes; una fase rápida dependiente de la intensidad del estímulo y que se conoce como la respuesta "transitoria" y otra lenta que depende de la duración del estímulo y que recibe el nombre de "estacionaria". La dependencia entre estímulo y respuesta es lineal a bajas intensidades y no lineal (logarítmica) a intensidades elevadas cercanas a la saturación. El origen del potencial de receptor no se conoce aún cuando se han propuesto dos explicaciones: una de ellas (Benolken, 1961) dice que durante la iluminación hay un aumento en la conductancia de la membrana del fotorreceptor, lo que causaría un régimen de cambio de los iones en la membrana que provocaría que se generara el potencial de receptor. Por su parte, Smith en 1968, propuso que durante la iluminación se presenta un cambio en la actividad de una bomba electrogénica, lo que provocaría que transitoriamente se suspendiera la expulsión activa de sodio y la retención activa de potasio con la consiguiente despolarización característica del potencial de receptor. Hasta ahora, sin embargo, la controversia se mantiene ya que se han aportado datos que apoyan una y otra posibilidad.

Electrorretinograma.- Otra forma de registrar la actividad eléctrica de los fotorreceptores cuando responden a la luz, es mediante el "electrorretinograma" (ERG). Esta es la respuesta de grupos de fotorreceptores que se excitan por la llegada de un estímulo luminoso y tiene características bien establecidas (Naka y Kuwabara, 1959) que dependen del estímulo y del sitio donde se coloque el electrodo (extracelular, por supuesto). En un ERG de acocil, se encuentran dos componentes; una de ellas, la llamada H I, responde al encendido de la iluminación y la otra que se conoce como H II, se mantiene todo el tiempo que dure la aplicación del estímulo. Los mismos autores propusieron que, por lo menos en el acocil, la componente H I se origina en el rabadomo y la H II en la célula retinular.

Al estudiarse la dinámica de la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales se ha observado no sólo modificaciones en los registros eléctricos sino también cambios estructurales detectables con microscopía óptica o electrónica, como consecuencia de haber sometido al organismo a condiciones de obscuridad durante tiempos prolongados del orden de semanas (Eguchi y Waterman, 1968; Fuentes-Pardo y García, 1979). Se pudo así comprobar que en estas condiciones hay un gran aumento en la sensibilidad a la luz de los fotorreceptores, además de modificaciones estructurales notables sobre todo en lo que se refiere a la organización de los rabadomos. Por el contrario, si los fotorreceptores se han visto sometidos a una iluminación prolongada, se provoca una reducción de la sensibilidad a la luz, que se manifiesta en hechos tales como que los receptores se aparten en su comportamiento de lo esperado según la ley de Weber.

Si los registros se hacen en la vía aferente, se pueden registrar potenciales de acción cuya frecuencia depende de la intensidad del estímulo y de la zona del ojo que se ilumine, ya que se ha encontrado que hay interacciones de tipo excitatorio e inhibitorio entre los diferentes campos sensoriales (Wiersma y Yamaguchi, 1967). No se conoce, sin embargo, el lugar donde están las somas de las neuronas que originarían estas respuestas y mucho menos todas las interacciones posibles entre ellas. (Hay que recordar que cuatro neuropilos y por lo menos dos quiasmas, suponen un grado de complejidad en la organización de estos elementos que hasta ahora no estamos en condiciones de aclarar).

## II).- ORGANIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADICOS.

El término circádico o circadiano (del latín circa - "alrededor" y diem - "día"), fué asignado a la propiedad de las estructuras vivas - de "manifestar períodos diarios que no difieren mucho de las 24 horas" (Halberg y cols., 1959).

La ritmicidad circádica es un fenómeno que se encuentra en - un gran número de sistemas vivos tanto vegetales como animales, lo que ha hecho que muchos autores acepten que la capacidad de oscilar es una característica inherente a la organización de la materia viva. Esta propiedad tiene - consecuencias muy importantes para las células, sobre todo si pensamos que - en ellas predomina en ciertos momentos el catabolismo y en otros el anabolismo, y añadimos la ventaja que les significaría la posibilidad de sincronizarse con el período de rotación de la tierra. Hay que aclarar, sin embargo, que no se sabe cuándo se generó en la materia viva la actividad periódica y menos aún, cómo y cuándo pudo entrar en fase con la rotación terrestre.

En esta sección se hará un breve resumen del desarrollo que - se ha presentado en el estudio de los ritmos circádicos, haciéndose énfasis - en los principales trabajos que permitieron que emergiera el concepto de "circádico", presentaremos después las principales características de los ritmos circádicos y las ideas que ha habido sobre la posible ubicación de los relojes biológicos y más tarde ubicaremos nuestro trabajo en un contexto amplio: el estudio de los ritmos circádicos en el acocil y estructuras aisladas del mismo.

### 1.- Breve historia del estudio de los ritmos circádicos.

Ya desde 1729, el astrónomo De Mairán, describió el cambio - que presenta el movimiento de las hojas en plantas mantenidas en condiciones constantes de luz y de temperatura. Durante todo ese siglo, algunos investigadores realizaron observaciones similares, pero siempre en vegetales. La siguiente etapa en el estudio sobre los ritmos circádicos, se presentó en el - siglo XIX, cuando en Europa, algunos investigadores como De Candolle en 1835, Dutrochet en 1837 y Hofmeister en 1867 concluyeron cada uno por su cuenta - que las plantas tienen una "tendencia inherente" a presentar movimientos periódicos. Años después, en ese mismo siglo (1880), Darwin describió la característica hereditaria de estos ritmos y Kiesel, por primera vez en 1894, des

cribió un ritmo circádico en animales, como es el que presentan los artrópodos en la coloración de su exoesqueleto al mantenerlos en condiciones constantes de iluminación. A partir de este momento, empiezan a florecer trabajos que describen oscilaciones de este tipo, y entre los investigadores de la época que más aportaron en este sentido, no sólo por describir la presencia de actividad periódica en algunos organismos, sino sobre todo por poner de manifiesto ya algunas de las principales características que los distinguen, se encuentra Pfeffer con sus trabajos en Caléndula y Phaseolus (1873, 1915).

En 1910, Stroppel sugirió que estos ritmos no se debían, como Pfeffer lo había propuesto, a cambios intrínsecos de los organismos, sino más bien a cambios periódicos en la atmósfera que los afectaba. Estos antecedentes ponen de manifiesto que fue Pfeffer el primer exponente de lo que ahora se llama corriente endógena de los ritmos, en contraposición con la exógena. Esta considera que el "reloj" de los organismos vivos funciona según los factores ambientales, los que son capaces de traspasar todas las barreras - que se pongan entre ellos y los organismos aún cuando se trate de mantener a éstos en condiciones constantes; la corriente endógena, en cambio, considera que el sentido del tiempo se genera en los organismos independientemente del medio ambiente y que es capaz de transmitirse y mantenerse a lo largo de muchas generaciones.

Apoyando esta última idea, la de la permanencia de los ritmos a través de generaciones sucesivas, están los estudios de Bübbing en 1935, de Pittendrigh en 1954 y de Pittendrigh y Bruce en 1957, quienes mostraron la posibilidad de que la periodicidad circádica de la eclosión de larvas de insectos, se herede durante 14 generaciones mantenidas en obscuridad constante.

## 2.- Características de los ritmos circádicos.

Muchas otras características de los ritmos se pusieron de manifiesto en la primera mitad del siglo XX mediante experimentos muy variados entre los que destacan los realizados por Aschoff, Pittendrigh y Bübbing y que fueron compilados por Aschoff en 1960. La importancia de estos experimentos radica en el hecho de que llevaron a la concepción de la llamada "regla circádica de Aschoff" cuyo enunciado se puede resumir de la siguiente manera: "las características básicas de los ritmos circádicos como son la frecuencia,

la amplitud de la oscilación y la relación entre los tiempos de actividad y de reposo (relación  $\alpha / \rho$ ), aumentan en los animales diurnos cuando aumenta la intensidad luminosa, y disminuyen en los animales nocturnos ante la misma situación ambiental".

Además de seguir la regla de Aschoff se puede afirmar que los ritmos circádicos tienen las siguientes características:

a).- Tienen una frecuencia natural de oscilación, cuyo período es cercano a las veinticuatro horas, y el que se pone de manifiesto al colocar la estructura en condiciones ambientales constantes (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960, 1965; Bünning, 1960),

b).- Tienen la tendencia a contrarrestar los cambios de temperatura ambiental, por lo que se considera que poseen "mecanismos de compensación de la temperatura". El término de compensación no debe confundirse con el de "independiente" de la temperatura, ya que si esto sucediera se podría suponer que ningún parámetro de los ritmos circádicos se ve afectado por cambios térmicos lo que es evidentemente erróneo, ya que en particular la amplitud se afecta ante cambios de esta naturaleza. Los mecanismos de compensación de la temperatura se han puesto de manifiesto al aplicar a los sistemas circádicos cambios de temperatura de tipo "escalón", y comprobarse que el período circádico no se modifica. Sin embargo, si los cambios térmicos se presentan en forma periódica o como una función "impulso", se puede provocar cambios de fase (atrasos o adelantos) que dependen de la forma de aplicación del estímulo térmico.

c).- Los ritmos circádicos son susceptibles de ser sincronizados por señales externas. Esta propiedad tiene implicaciones adaptativas de gran importancia para el organismo, ya que ante los cambios externos periódicos como la luz o la temperatura, el organismo sufre un ajuste en su frecuencia natural de oscilación que le permite seguir la frecuencia de tales cambios por lo que su relación con el medio y con otros organismos, no se perturba. Cabe sin embargo aclarar que estos cambios de frecuencia sólo se presentan dentro de un margen de variabilidad relativamente estrecho. Cuando los cambios externos son señales únicas, la sincronización se manifiesta por cambios de fase, sean atrasos o adelantos, del ritmo; se ha podido comprobar que estos atrasos o adelantos dependen del momento en que se aplique la señal externa, lo que se ha interpretado como el resultado de que los elementos responsables de las oscilaciones cambian su reactividad a los

estímulos externos a lo largo del ciclo de veinticuatro horas.

d). Los sistemas circádicos mantienen su estabilidad ante una gran variedad de inhibidores químicos, narcóticos, estimulantes del crecimiento, antimetabolitos y en general, ante cualquier cambio químico que actúe sobre ellos. Son pocas las sustancias con las que se ha logrado afectar al período o a la fase de los ritmos y entre ellas están el óxido de deuterio (Bruce y Pittendrigh, 1960; Enright, 1971; Dowse y Palmer, 1972) y el alcohol etílico (Enright, 1971).

e).- Los ritmos circádicos son innatos y hereditarios, lo que se ha probado en diversas estructuras (Barnett, 1966, 1969; Stadler, -- 1959; Bruce, 1952; Blinzing, 1935) observando los ritmos circádicos en algunos casos durante 14 generaciones sucesivas. También se ha logrado establecer en algunas especies el lugar genético donde radica la capacidad de presentar un período circádico (Barnett, 1966) habiéndose provocado modificaciones en el mismo gracias a las manipulaciones sobre los genes correspondientes.

Otras propiedades son: autosostenimiento, amortiguamiento -- después de cierto tiempo de permanecer en condiciones ambientales constantes ubicuidad, presencia de "transitorios" (etapas de ajuste) después de un estímulo externo que altera el ritmo.

### 3.- Posible ubicación de los relojes biológicos.

Son muchos los experimentos con los que se ha tratado de dilucidar dónde radica la capacidad de medir el tiempo de los organismos; con base en ellos, algunos autores han llegado a la conclusión de que el reloj - (o posiblemente más de uno) reside en cada célula de los organismos multicelulares o en cada individuo de las poblaciones formadas por organismos unicelulares.

Entre los trabajos que apoyan esta proposición están los desarrollados por Sweeney en 1960 en los que al trabajar con el dinoflagelado Gonyaulax, la autora logró separar un individuo de la colonia y comprobó que continuaba oscilando. En 1964, Tharp y Folk registraron actividad circádica en corazones aislados y células del miocardio de mamíferos. Strumwasser en 1965 y Jacklet en 1969 trabajaron con neuronas del ganglio visceral y con fibras del nervio óptico del molusco Aplysia, respectivamente y en ambos casos se encontraron patrones circádicos en la actividad eléctrica espontánea o -

provocada. Sweeney y Harro en 1961 comprobaron que el ritmo de la respuesta fotosintética de las células de Acetabularia se mantiene aún después de la enucleación. Resultados similares se han obtenido en las respuestas de segmentos multicelulares aislados de organismos complejos como los que presentó Enderle en 1951 al trabajar con fragmentos de zanahoria; Binning en 1958 con el intestino aislado del criceto; Andrews y Folk en 1964 con glándulas suprarrenales aisladas del criceto; Wilkins en 1959 con mesófilos aislados; Sánchez y Fuentes-Pardo en 1976 con tallos oculares aislados de acocil.

Por otra parte, también se ha propuesto que en ciertos organismos multicelulares hay grupos celulares con propiedades oscilatorias que ejercen control temporal sobre determinados procesos que se originan en otras porciones del organismo imprimiéndoles su propio ritmo de actividad. Este control se puede ejercer por vía humoral (Harker, 1954; Truman, 1971) o mediante impulsos nerviosos (Brady, 1969 y 1971; Page y Larimer, 1975a y 1975b).

#### 4.- Ritmos circádicos en el acocil.

Los ritmos circádicos más estudiados del acocil son los de actividad motora (Roberts, 1941, 1944; etc.) y los de respuestas espontáneas o provocadas del sistema visual. Así por ejemplo, Bennit registró en 1932, la persistencia de un ritmo diurno en el movimiento del pigmento retiniano proximal del acocil Cambarus virilis; Welsh detectó en 1939 y en 1941 un ritmo en el diámetro de la pseudopupila, el que se usa como índice de la posición de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal. Aréchiga y Wiersma demostraron en 1969 la existencia de cambios circádicos en la amplitud del electroretinograma (ERG) y de la frecuencia de descarga de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa. Aréchiga, Fuentes y Barrera observaron en 1973 los cambios de amplitud del ERG y comprobaron que son dependientes de la cantidad de luz y que se relacionan con la hora del día. Aréchiga y Fuentes demostraron en 1970 que existe una correlación entre la posición de los pigmentos retinianos accesorios y la amplitud del ERG en la que también se puede comprobar un carácter circádico. En 1981, Fuentes-Pardo e Inclán mostraron el grado de correlación que existe entre el ritmo del ERG y el ritmo motor del acocil, etc.

Pero a pesar de estos y muchos otros estudios realizados en el acocil, quedan todavía por demostrar muchos aspectos fundamentales sobre

la organización de los sistemas circádicos en este animal como son, por ejemplo, el papel del sistema nervioso en dichos ritmos, si el resultado de un ritmo es el resultado de uno o muchos "relojes", y en este último caso si están o no acoplados y suponiendo que lo estuvieran, la forma como se generó el acoplamiento, etc.

### III).- PAPEL DEL CALCIO EN LAS OSCILACIONES BIOLÓGICAS.

En muchos trabajos se ha demostrado que el calcio desempeña un papel importante en el origen y el mantenimiento de las oscilaciones infradianas que se presentan en las células, tanto de origen citoplásmico como de origen membranal. En 1979, Tsien encontró que el mecanismo oscilatorio de las células del marcapaso cardíaco se relaciona con oscilaciones del calcio mioplásmico, probablemente debido a la salida y la entrada de calcio del retículo sarcoplásmico. Resultados similares han sido observados en una gran variedad de preparaciones neurofisiológicas entre las que se incluye axones de cangrejo (Connor, 1978), nodos de Ranvier de rana (Bergman, Nonner y Stämpfli, 1968) y somas de neuronas de moluscos (Connor y Stevens, 1971; Gorman y Thomas, 1978). En esta misma línea, Rapp y Berridge (1977) han propuesto que el calcio y el AMP cíclico (AMPc) pueden ser los mensajeros que afectan la permeabilidad a los iones de la membrana por lo que el potencial de membrana cambiaría en forma oscilatoria originando de esta manera las ondas cíclicas del potencial del marcapaso.

Experimentos hechos en muy diversos tipos celulares han puesto de manifiesto la participación del calcio en la generación de oscilaciones de tipo infradiano. Así, Meech observó en 1979 que se pueden inducir oscilaciones en el potencial de membrana de neuronas aisladas de diversas especies de moluscos y encontró también que la frecuencia de los trenes de respuesta depende del régimen de retorno del calcio intracelular a sus receptáculos. Por otro lado Matthews y O'Connor en 1979 observaron que la glucosa y otros azúcares del metabolismo, inducen la aparición de oscilaciones en el potencial de membrana de las células  $\beta$  del páncreas, lo que los autores explicaron con un modelo en el que incluían en la ecuación de Goldman la acción de iones divalentes, en especial de los iones de calcio.

Por último es particularmente interesante el trabajo de Nelson y Henkart (1979), quienes estudiaron las células-L (fibroblastos) y comprobaron que al afectarlas con diversas clases de estímulos les provocaban -

respuestas hiperpolarizantes de carácter oscilatorio. Los autores explicaron estas respuestas con base en el aumento de la permeabilidad de la membrana al potasio, aumento que a su vez dependería del incremento de la concentración del calcio libre citoplasmático. Con estos datos, propusieron un modelo en el que se reproducen las oscilaciones del potencial de membrana cuando se cambian los niveles de calcio.

En apoyo a este modelo, están los trabajos de Romero y Whittam en 1971 quienes encontraron que un aumento en la concentración del calcio libre intracelular produce un aumento en la permeabilidad de la membrana al potasio. De ahí que al inyectar calcio a la célula se produjeran hiperpolarizaciones las que eran acompañadas de un incremento en la conductancia de la membrana. Por otro lado, la aplicación de 1.5 mM de EGTA en el medio extracelular de macrófagos suprime tanto la respuesta espontánea como la hiperpolarizante (Gallin et al, 1975) y por el contrario, si se aplica un ionóforo del calcio, el A23187 por ejemplo, se producen hiperpolarizaciones prolongadas de la membrana. Okada y colaboradores observaron en 1978 que al quitar el calcio externo se suprime la respuesta hiperpolarizante oscilatoria de las células- L.

Diversos estudios morfológicos han servido de apoyo al modelo propuesto, ya que se ha observado en las células- L que el retículo endoplásmico forma aposiciones con la superficie de la membrana de manera semejante a las que se observan entre el retículo sarcoplásmico y el sistema de túbulos transversos o entre la superficie de la membrana y las tríadas en el músculo estriado. Una aposición semejante entre el retículo endoplásmico y la superficie de la membrana ha sido descrita en neuronas (Rosenbleuth, 1962; Henkart, Landis y Reese, 1976).

Estos resultados funcionales y morfológicos sugirieron el modelo de Nelson y Henkart con el que los autores pretendieron explicar las oscilaciones hiperpolarizantes de las células- L, y según el cual la estimulación se acoplaría con algún mecanismo que liberaría calcio desde sus cisternas u otras regiones del retículo endoplásmico, lo que afectaría directamente la superficie de la membrana incrementando su permeabilidad al potasio. Este cambio de permeabilidad induciría a su vez la captura del calcio por la mitocondria o el retículo endoplásmico o provocaría su salida al exterior, generándose así las oscilaciones de la respuesta hiperpolarizante. Con base en este modelo los autores propusieron que esta clase de cambios pudiera tam

bién provocar oscilaciones de larga duración.

#### IV).- HIPOTESIS DE TRABAJO.

Regresando al problema de las oscilaciones de frecuencia circádica que presentan muchos de los organismos, órganos, tejidos o células estudiados, hay que hacer énfasis en el vacío de conocimiento que significa hasta el momento la falta de información sobre los mecanismos involucrados en la génesis de estas oscilaciones. Ha habido, sin embargo, intentos por explicar este origen los que en términos generales, podemos incluir en dos grandes grupos. En uno de ellos, el más tradicionalista, quizá, se ha querido encontrar el origen de la ritmicidad circádica en la acción directriz de estructuras cuya capacidad intrínseca de "medir" el tiempo les conferiría la posibilidad de imponer esa misma medida a otras estructuras. Dadas sus relaciones con estructuras diversas, los elementos más abocados para cumplir con esta función serían los de tipo nervioso o humoral.

En el otro grupo, se incluyen trabajos que intentan explicar las oscilaciones circádicas en la capacidad bien establecida de las células de presentar, en prácticamente todas sus funciones, oscilaciones de frecuencia muy variada sobre todo en la gama de valores infradianos, según los defensores de esta teoría, de la interacción de esas oscilaciones podrían generarse oscilaciones diferentes, de menor frecuencia, hasta que emergiera la oscilación circadiana como tal. Este acoplamiento de osciladores requeriría de algún (os) sistema (s) especializado (s) en comunicar unos elementos con otros haciéndoles "entrar en fase". Volverían a ser los sistemas nervioso o endócrino los candidatos más fuertes para desempeñar el, hasta ahora, hipotético papel de "sincronizadores" de las oscilaciones infradianas.

El análisis objetivo de estos dos grupos de teorías nos llevó a considerar la posibilidad de que, efectivamente, la oscilación circádica dependa del acoplamiento de osciladores infradianos, y es en este sentido que ideamos el presente trabajo en el que planteamos como hipótesis principal que los osciladores infradianos presentes en un sistema relativamente simple (el sistema visual del acocil) son susceptibles de modificar su sincronización cuando se les quita algún (os) factor (es) que los mantiene acoplados (el sistema nervioso central, por ejemplo), por lo que algún ritmo circádico propio del sistema visual como es el de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG), debería de presentar modificaciones al regis-

trarse de un animal íntegro o de un tallo ocular aislado. Mas aún, entre los factores de acoplamiento deben encontrarse elementos cuya ubicuidad en las células aseguran su participación en muchas de sus funciones, en particular las que nos interesa analizar desde el punto de vista de las oscilaciones que presentan. Dicho de otra manera: elementos como el calcio, del que se conoce su importancia en el mantenimiento de la permeabilidad de la membrana, en el origen de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores, etc., es posible que sean elementos que jueguen un papel determinante en los cambios periódicos que sufren esas mismas funciones. De ser así, tendríamos derecho a esperar que al cambiar el calcio disponible de las células del sistema a estudiar (el tallo ocular aislado) mediante cambios en la concentración del calcio externo, cambiara la oscilación circadiana por cambios provocados por el calcio en las oscilaciones infradianas en las que ésta se sustenta.

## MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se hizo con acociles de la especie Procambarus bouvieri (Ortmann), sin distinción de sexo, provenientes de Uruapan, Michoacán. Una vez en el laboratorio, los animales se colocaban en piletas con agua corriente y aireada y se les alimentaba una vez por semana con trozos de ancas de rana y zanahorias. La iluminación ambiental era normal.

Los registros de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) se hicieron en animales íntegros y en tallos oculares aislados. Poco antes de empezar el experimento con los tallos oculares aislados, el animal se colocaba en la oscuridad y en estas condiciones se extirpaban los tallos oculares. Para ello se introducían las tijeras desde la parte anterior del rostro hasta la base del ojo cortando y colocando los tallos de inmediato a temperatura constante de 12° C. y en la solución salina de Van Harreveld (Van Harreveld, 1936). La solución podía ser normal o modificada, aunque en todos los casos se mantenían constantes la osmolaridad (420 miliosmoles) y el pH (7.2 a 7.4). La composición de los diferentes tipos de solución empleados fué la siguiente:

a).- Solución normal de Van Harreveld:

<u>Compuesto</u>	<u>gr/l</u>
NaCl	12.0
KCl	0.4
Ca Cl <sub>2</sub>	1.5
Mg Cl <sub>2</sub>	0.25
Na H CO <sub>3</sub>	0.2

b).- Solución de Van Harreveld rica en calcio sin magnesio. - Para aumentar la concentración de calcio sin variar la osmolaridad se sustituía la cantidad equivalente de Mg Cl<sub>2</sub> por la de Ca Cl<sub>2</sub> (ver tabla 1).

c).- Solución de Van Harreveld rica en calcio. Se preparaba aumentando al doble la concentración del Ca Cl<sub>2</sub> y conservando todos los demás compuestos en las mismas proporciones (ver tabla 1). Fué el único caso en el que la osmolaridad total se incrementó ligeramente debido a la presencia del exceso de calcio.

d).- Solución de Van Harreveld sin calcio, el que era sustituido por magnesio. Esta solución se preparaba conservando las proporciones

originales de todos los iones pero sustituyendo el  $\text{CaCl}_2$  por el  $\text{MgCl}_2$  - (ver tabla 1),

e).- Solución de Van Harreveld sin calcio, Esta solución se hacía al sustituir el  $\text{CaCl}_2$  por la correspondiente cantidad de sacarosa y agregando ácido etilenediamina  $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^1$  - tetra-acético (EDTA).

TABLA 1.

Tipo de solución	gr/l.						
	NaCl	KCl	$\text{CaCl}_2$	$\text{MgCl}_2$	$\text{NaHCO}_3$	EDTA	Sacarosa
a).- Normal	12.0	0.4	1.5	0.25	0.2	--	---
b).- Rico en $\text{Ca}^{++}$ sin $\text{Mg}^{++}$	12.0	0.4	1.78	---	0.2	--	---
c).- Rico en $\text{Ca}^{++}$	12.0	0.4	3.0	0.25	0.2	--	---
d).- Sin $\text{Ca}^{++}$ sust. $\text{Mg}^{++}$	12.0	0.4	---	1.47	0.2	--	---
e).- Sin $\text{Ca}^{++}$	12.0	0.4	---	0.25	0.2	1.48	4.44

Además de los registros eléctricos cuya duración dependía en buena medida de la sobrevivencia de los animales o de los tallos oculares aislados, se hizo también el análisis histológico, para determinar la posición de los pigmentos retinianos accesorios (distal y proximal), durante 5 días consecutivos.

#### 1).- REGISTROS DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA,

##### a).- En el animal íntegro.

Un primer tipo de experimentos se hizo con animales íntegros los que se colocaban para su registro, durante no menos de cuatro días, en una cámara de temperatura y oscuridad constantes, aquélla de  $19^\circ\text{C}$ . y ésta sólo modificada por los destellos luminosos de prueba. El animal se sujetaba a una pinza mediante un corcho que se le pegaba en el dorso con cemento acrílico y se le mantenía sumergido en agua aireada todo el tiempo que durara el experimento. Los ojos se le inmovilizaban y se le colocaba sobre la córnea un electrodo de acero inoxidable con punta de 5 a 10  $\mu$  con el cual se recogía la respuesta eléctrica a la luz (ERG) que generaban los fotorreceptores en respuesta a los destellos de prueba que se les hacían llegar periódicamente. Los destellos luminosos procedían de un fotoestimulador marca Grass modelo PS 22, el que era accionado por un quimógrafo Palmer con una frecuencia de un estímulo cada tres minutos. La intensidad y la duración del estímulo -

luminoso fueron constantes, El electrodo se conectaba a un preamplificador - marca Tektronix modelo 122, desde el que se enviaba la señal para su registro a un polígrafo marca Grass modelo 7.

El análisis de la respuesta se hacía midiéndola la amplitud del ERG a intervalos regulares (cada 20 minutos) y graficándola con respecto al tiempo, lo que permitía obtener curvas semejantes a la que se muestra en la figura 5, en las que se ponía de manifiesto el carácter periódico de la amplitud del ERG, su periodicidad cercana a las veinticuatro horas y la duración de sus períodos de actividad y de reposo.

b).- En tallos oculares aislados.

Para observar las posibles variaciones en la amplitud de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores del tallo ocular aislado del acorcil a los estímulos luminosos, a distintas horas del día y en las diversas soluciones salinas, se utilizaron cerca de 50 organismos, los que se preparaban de la siguiente manera:

Al inicio del experimento, se separaba un tallo ocular del animal, introduciendo las tijeras y cortando desde la parte anterior del rostro hasta la base del tallo, Ya separado el tallo ocular se colocaba sobre una caja de Petri con parafina solidificada, la cual contenía 150 ml. de la solución de Van Harreveld correspondiente (rica en calcio, normal o libre de calcio con las modalidades ya descritas). Esta caja se introducía en una cámara oscura con control de temperatura (12°C.), condiciones que se mantenían durante todo el experimento; sólo la oscuridad se interrumpía por los estímulos luminosos de prueba. Los estímulos eran de las mismas características que hemos descrito para el animal íntegro (intensidad 20 lux y duración 1 mseg.). El dispositivo que se empleaba para el registro del ERG de los tallos oculares se muestra en la figura 3, y se puede observar que también es igual al que se utilizaba para el animal íntegro.

La duración del experimento la determinaba la sobrevivencia de la preparación la que, por promedio, era de cerca de 4 días. Con intervalos de 20 minutos se medía la amplitud de la respuesta, la que posteriormente se graficaba con respecto al tiempo, construyéndose de esta manera gráficas que pusieron de manifiesto que también en este caso el ERG presentaba fluctuaciones periódicas en la amplitud. Con las gráficas se calculaba el tiempo transcurrido de valle a valle o de cresta a cresta, el período de actividad  $\alpha$  (tiempo -

en el que la amplitud tiene un 50 % o más de su valor máximo), el período de reposo  $\rho$  (tiempo en el que la amplitud de la respuesta tiene menos del 50 % del valor máximo). Con estos datos se calculaba finalmente la relación  $\alpha/\rho$  de cada registro. Todas las determinaciones se hacían para cada experimento.

## II).- ANALISIS HISTOLOGICO.

Para hacer el análisis histológico de la posición de los pigmentos retinianos accesorios, se aislaron 720 tallos oculares y se colocaron en los tres tipos de solución salina (rica en calcio, normal y libre de calcio) durante 5 días consecutivos. Los primeros dos días en obscuridad y temperatura constantes (esta última de 12°C.). A partir del tercer día se aplicaba un estímulo luminoso de las mismas características y al mismo intervalo que se utilizaba en los registros eléctricos. Cada hora se hacían las determinaciones de la posición de los pigmentos proximal y distal para lo cual se seguían los siguientes pasos:

1.- Fijación.- Para la fijación de los pigmentos proximal y distal se utilizó el método de fijación por ebullición seguido por Bennit desde 1932, colocando los tallos inmediatamente después de la extracción en agua a temperatura de 80°C. durante dos minutos, tiempo suficiente para lograr una fijación completa del pigmento.

2.- Corte.- Con una navaja afilada, se hacían los cortes en sentido longitudinal desde la córnea del ojo hasta la región mas proximal del tallo ocular aislado. Más tarde se colocaban bajo el microscopio estereoscópico (Zeiss modelo f 125) y se procedía a medir la posición que ocupaban los pigmentos a las diferentes horas del día. El método que se siguió fué el propuesto por De Bruin y Crisp (1957) con algunas modificaciones. Las fórmulas utilizadas para calcular los índices de pigmento distal (IPD) y proximal (IPP) son las siguientes:

$$IPD = \frac{a_1 + a_2}{2r}$$

$$IPP = \frac{b_1}{r}$$

Donde:

$r$  es la distancia comprendida entre la capa corneágena de la parte distal del ojo y la membrana basal (m. b.) en la posición proximal de la retina.

$a_1$  es la distancia entre la capa corneágena y la parte del -

pigmento distal más cercana a ella.

$a_2$  es la distancia entre la capa corneágena y la parte del pigmento distal más alejada de ella.

$b_1$  es la distancia entre la membrana basal y la parte más distal del ojo a la que haya llegado el pigmento proximal.

$b_2$  es la distancia entre la membrana basal y por debajo de ésta, hasta donde llegue el pigmento proximal. (figura 4).

Los valores de los respectivos promedios de diez determinaciones del IPP y del IPD, obtenidos cada hora a lo largo del nictámero, permitían calcular cada punto de las gráficas, en las que se muestran los cambios de estos índices con respecto al tiempo.

El procedimiento se repetía para cada una de las soluciones salinas estudiadas (figuras 13, 14 y 15).

Finalmente, se debe hacer notar que para cada valor promedio se calculaba su correspondiente error estándar.

## RESULTADOS

### 1).- REGISTROS DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA.

#### a).- Del animal íntegro.

Un registro típico del ritmo circádico del ERG obtenido de un animal íntegro se muestra en la figura 5. En estos experimentos se puede comprobar que inmediatamente después de que se inicia el registro hay una etapa "transitoria" (que no aparece en la figura) en la que los cambios de amplitud del ERG no siguen un patrón predecible. Posteriormente el patrón de respuesta se estabiliza y se puede comprobar que hay un incremento en la amplitud del ERG que se inicia a las 17.00 horas y que alcanza su máximo a las 24.00 horas. La reducción en la amplitud del ERG se inicia a las 6.00 horas y llega a su mínimo a las 10.00 horas, para que se reinicie el ascenso 22 horas después de que empezó el primer ciclo. El valor del período fue de 23.2 y la relación  $\alpha / \rho$  de 1.03.

#### b).- De tallos oculares aislados.

Los cambios de amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los tallos oculares del acocil puestos en solución salina normal y obtenidos durante cuatro días de registro ininterrumpido, se muestran en la figura 6. Al observar esta figura con mayor detenimiento, se puede comprobar que la amplitud del ERG presenta, como era de esperarse del trabajo de Sánchez y Fuentes-Pardo en 1976, cambios periódicos que permiten proponer un ritmo circádico bien establecido. El período de este ritmo fue de 23.5 horas como promedio y la relación entre los tiempos de actividad y de reposo (relación  $\alpha / \rho$ ) fue de 0.9. Al analizar el ERG de los tallos oculares colocados en las soluciones salinas ricas en calcio (estuvieran desprovistas de magnesio o bien habiéndoles duplicado la cantidad de  $\text{Ca Cl}_2$ ) se encontró que, igual que en el caso de la solución salina normal la amplitud de la respuesta mostraba fluctuaciones periódicas circádicas sólo que había cambios sistemáticos en el período y en la relación  $\alpha / \rho$  siendo aquél de 21 horas y ésta de 1.25, como promedio (figura 7).

La figura 8 muestra un registro típico de la amplitud del ERG durante tres días, obtenido de un tallo ocular sumergido en solución salina desprovista de calcio. Se puede comprobar que hay también actividad periódica

de tipo circádico y que el período es de 25,3 horas (el promedio de la población fué de 25 horas). Por lo que se refiere a la relación  $\alpha / \rho$  fué de 0,76. Otro hecho que se manifiesta en este registro es que el voltaje del ERG es particularmente grande (del orden de los 4 mV en la fase nocturna) sobre todo si lo comparamos con la amplitud que se registró en las otras soluciones salinas (cerca de 2 mV en la misma fase). Estos hechos fueron semejantes en los registros obtenidos de la solución carente de calcio sustituido por magnesio que es el que se ilustra en la figura 9, o de la solución carente de calcio sustituido por sacarosa y con EDTA.

Otro aspecto que cabe destacar, de los registros eléctricos a largo plazo de tallos oculares puestos en solución salina normal es la aparición de ciclos de frecuencia cercana a 1/3 horas, superpuestos en las fases de ascenso o de descenso del ciclo circádico. Estos ciclos ya habían sido encontrados por Sánchez y Fuentes-Pardo en 1976 y aún cuando su significado se desconoce con certeza no es improbable que se relacionen con la pérdida de sincronía entre los diferentes osciladores involucrados en la generación de la oscilación circádica.

Llama la atención que la amplitud y la duración de esos ciclos muestren diferencias que parecen depender del tipo de solución salina del que provengan. Así, en la solución salina normal se presentan con toda regularidad (sobre todo en la fase de ascenso) cada tres horas (figura 10); mientras que en las soluciones ricas en calcio se tornan muy irregulares y su período es cercano a los 40 minutos (figura 11). Al analizar estos ciclos en las respuestas de los ojos sumergidos en solución salina desprovista de calcio, se comprueba que por promedio la frecuencia se eleva al doble con respecto al caso anterior (1/20 minutos) (figura 12).

#### 11).- ANALISIS HISTOLOGICO.

Por lo que respecta a la posición de los pigmentos retinianos accesorios, los resultados que se muestran en la figura 13 corresponden a las medidas que se obtuvieron del IPD (curva superior) y del IPP (curva inferior) durante un ciclo de veinticuatro horas, de tallos oculares colocados en solución salina normal. Las medidas se hicieron cada hora y cada punto corresponde a diez determinaciones. También se incluye en la figura el error estándar. Es claro que no se observa ninguna modificación periódica ni en el IPD ni en el IPP y sí en cambio ascensos y descensos que ponen de mani-

fiesto la gran variabilidad de valores que se presenta entre los diferentes tallos oculares empleados,

Algo semejante ocurre con el IPD y el IPP cuando los tallos oculares habían sido sometidos a las soluciones rica en calcio (figura 14) o carente de calcio (figura 15). Si bien es cierto que en estos casos se observaron modificaciones en la amplitud del IPD y del IPP que sugieren la posibilidad de que haya ciclos de frecuencia relativamente elevada (figura 14) o de tipo circádico (figura 15), no es posible descartar la posibilidad de que los cambios de amplitud que se observan correspondan, de nuevo, a variaciones propias de los diferentes tallos oculares empleados mas que a oscilaciones establecidas como tales. Con el objeto de analizar la relación que pudiera haber entre los cambios en la posición del pigmento distal y los cambios en el ERG, se utilizaron las mediciones de uno y otro fenómeno y se correlacionaron en el tiempo.

En las figuras 16, 17 y 18, se muestran los resultados de estas correlaciones obtenidas de tallos oculares inmersos en soluciones salinas normal, rica en calcio y carente de calcio, respectivamente. Se escogió un lapso de ocho horas (de las 14 a las 22 horas) por haber utilizado previamente ese tiempo en el análisis de los ciclos de alta frecuencia (figuras 10, 11 y 12). Puede comprobarse que en ninguno de los tres medios se puede encontrar un cambio paralelo entre los dos fenómenos.

## DISCUSION

El que el tallo ocular aislado muestre fluctuaciones circádicas en la amplitud de su respuesta eléctrica a la luz (ERG) es un hecho que pone de manifiesto la relativa autonomía de los osciladores presentes en el tallo ocular con respecto a estructuras centrales del sistema nervioso, en particular del ganglio cerebroide. Este hecho resulta interesante a la luz de las proposiciones hechas por diferentes autores (Harker, 1954; Brady, 1969; Brown, Hastings y Palmer, 1970; Page y Larimer, 1972) sobre la posibilidad de que el sentido del tiempo de un organismo sea dado por la actividad de estructuras centrales específicas, las que le conferirían a las estructuras periféricas su capacidad de presentar cambios a lo largo del ciclo de veinticuatro horas.

El tallo ocular es una estructura compleja en la que se encuentra buena parte de los elementos involucrados en la integración de las señales que se proyectarán finalmente al sistema nervioso central. Así, una primera etapa de esta organización la representan los fotorreceptores que forman la retina, sitio desde el cual salen las fibras aferentes para establecer conexión con el grupo de células y fibras que forman un primer neuropilo que es la lámina ganglionar. A la salida de la lámina ganglionar las fibras se decusan formando el primero de los dos quiasmas ópticos que se han encontrado en la vía visual de los decápodos, ya que el segundo se forma a la salida de las fibras del segundo neuropilo que comprende a la médula. Incidentalmente diremos que entre estos dos neuropilos se encuentra la glándula sinusal, estructura que se caracteriza por ser el principal sitio de almacenamiento de las neurosecreciones provenientes del sistema nervioso del acicil. De la médula, las fibras se proyectarán hasta un complejo lobular primero y a los focos ópticos en la última etapa antes de salir de la región del tallo ocular para ingresar, a través del protocerebro lateral y llegar al ganglio cerebroide.

Si tomamos en cuenta esta organización y recordamos que la estructura con la que trabajamos se obtiene por el corte del tallo justo antes de la entrada del nervio óptico al ganglio cerebroide, resulta claro que el número de elementos que después del corte pueden todavía interactuar es considerable. Así, no es posible descartar la idea de un sistema de osciladores

acoplados (al menos cada una de las estructuras relacionadas con la vía visual podría, en teoría, oscilar con un ritmo particular) que al interactuar aún generen una salida con carácter circadiano, pero que han perdido parte de la sincronía original debido a la ausencia de algunas de las influencias que se ejercían desde el sistema nervioso, sea porque las fibras eferentes de éste que llegan hasta los distintos niveles de la vía aferente tienen en sí mismos la capacidad de oscilar o de "sincronizar" a otros osciladores, o bien porque la ausencia misma del sistema nervioso central cambia en forma importante la calidad, la cantidad o ambas características de las neurosecreciones que se acumulan en la glándula sinusal, las que en condiciones normales (animal íntegro) también contribuyen a la sincronización de los osciladores del tallo ocular.

El esquema que presentamos y la explicación tentativa que proponemos corresponden a una interpretación de los hechos que se observan en el registro a largo plazo del ERG de los tallos oculares aislados: cuando se mantienen en solución salina normal, presentan un ritmo circádico en la amplitud del ERG, pero este ritmo se ve modificado con respecto al que se obtiene de animales íntegros en lo que se refiere sobre todo, a la aparición, en el ritmo de los tallos oculares aislados, de ciclos de relativamente alta frecuencia (1/3 horas) superpuestos en las fases de ascenso y de descenso del ritmo (figuras 5 y 6).

Por otra parte, se encuentra en la literatura gran número de trabajos en los que se muestra, sin lugar a dudas, que la capacidad de oscilar es una propiedad inherente a la materia viva (Pittendrigh, 1954; Pittendrigh y Bruce, 1957). A muy diferentes velocidades, la conducta de los sistemas biológicos presenta actividad recurrente a intervalos regulares por lo que se podría esperar fenómenos especiales de la interacción de las poblaciones de procesos periódicos.

Es en la generación de estos procesos periódicos así como en la interacción entre ellos, que el calcio podría jugar un papel importante dada su ubicuidad en los sistemas biológicos y la participación que le ha sido atribuida en la generación de procesos recurrentes relativamente rápidos, tales como las descargas que presentan algunas neuronas aisladas de diversas especies de moluscos que mandan "trenes" de disparos oscilatorios que dependen del régimen de retorno del calcio intracelular a sus receptáculos (Meech, 1979); los cambios oscilatorios en el potencial de membrana de células marca

paso cardíacas donde se ha propuesto a el calcio y al AMP cíclico como los posibles mensajeros que afectan la permeabilidad de la membrana creando así las oscilaciones del potencial de marcapaso (Rapp y Berridge, 1977); las respuestas hiperpolarizantes oscilatorias de las células-L (fibroblastos) que dependen de un aumento de la permeabilidad del potasio que a su vez depende de un incremento en la concentración de calcio citoplasmal (Nelson y Henkart, 1979), etc.

De ser válida la interpretación de estos dos hechos (la presencia de ciclos de alta frecuencia como manifestación de osciladores infradianos desacoplados y la participación del calcio en la generación de los fenómenos recurrentes) tendríamos una explicación aproximada de los resultados más conspicuos de este trabajo según los cuales las características esenciales del ritmo circádico, como son el período circádico y la relación entre los períodos de actividad y de reposo (relación  $\alpha / \rho$ ) se correlacionan con la cantidad de calcio externo disponible por el sistema (figuras 6, 7 y 8) ya que este elemento afecta las oscilaciones infradianas (figuras 10, 11 y 12) que son la base en la que se sustenta la oscilación circadiana. En el mismo sentido estarían los resultados observados en nuestras preparaciones sobre el efecto de la concentración externa de calcio sobre la relación de las duraciones de los períodos de actividad y de reposo (relación  $\alpha / \rho$ ) según los cuales cuando hay un aumento en la concentración externa de calcio no sólo hay un aumento en la frecuencia de oscilación sino además se presenta un incremento en la relación  $\alpha / \rho$  confirmando con esto que las oscilaciones se ven afectadas por la concentración externa de calcio ya que el efecto contrario se observa cuando se usan soluciones libres de calcio, y en la solución salina normal los valores de la relación  $\alpha / \rho$  son intermedios (0.9) entre los valores obtenidos en la solución rica en calcio (1.25) y la solución carente de calcio (0.76).

Por otra parte es bien conocido el hecho de que el calcio afecta la liberación de neurosecreciones. Se ha medido la cantidad de neurohormonas liberadas en forma espontánea y por estimulación eléctrica de los órganos pericárdicos aislados de cangrejo en soluciones salinas con diferentes concentraciones de calcio (Berlind y Cooke, 1971) y se encontró que al bajar éstos, había una reducción en la cantidad de hormona liberada, poniendo así de manifiesto la necesidad de que haya calcio en cantidades suficientes para favorecer (por un mecanismo que todavía no se determina) la libera-

ción de las neurosecreciones,

Este hecho se relaciona con nuestros resultados en la medida en que las neurosecreciones provenientes del sistema nervioso y liberadas hacia la glándula sinusal, sitio desde el cual salen al torrente circulatorio, provocan modificaciones importantes en la posición de los pigmentos retinianos accesorios, en particular en la del pigmento distal. En otras palabras, es posible que el calcio ejerza una acción importante dentro del tallo relacionada con la liberación de la hormona responsable de llevar al pigmento retiniano distal a la posición de adaptación a la luz (HAL), lo que a su vez significa modificaciones en la entrada de luz a los fotorreceptores retinianos con los consiguientes cambios en el ERG. Según esto, el exceso de calcio de la solución puede provocar aumento en la liberación de la HAL lo que influiría en que el ERG tuviera un tamaño relativamente pequeño, mientras que la ausencia de este ion reduciría la posibilidad de liberación de la HAL por lo que cabría esperar que los pigmentos accesorios tendieran hacia la posición de adaptación a la obscuridad con el consiguiente aumento en el ERG. Estos hechos, efectivamente se comprueban en nuestros registros donde se puede apreciar que la magnitud del ERG es sistemáticamente mayor en los registros de las preparaciones puestas en las soluciones libres de calcio que en cualquiera de las otras soluciones empleadas (compare los valores del ERG de las figuras 6, 7 y 8).

Sin embargo, no se ve de manera obvia el papel que desempeña el calcio sobre la oscilación de los pigmentos accesorios ya que en ninguno de los tipos de soluciones probadas se encuentra alguna modificación en las oscilaciones que tienen estos pigmentos (las que por otra parte son bastante irregulares y no de carácter circádico) que se pudiera atribuir a la concentración externa de calcio (figuras 13, 14 y 15).

Más aún, cuando se compara la fase de ascenso de un ciclo circádico del ERG con la posición de los pigmentos retinianos accesorios durante el mismo período, no se puede establecer ninguna correlación evidente entre los dos fenómenos (figuras 16, 17 y 18).

Estos hechos nos llevan a sugerir la posibilidad de que el calcio esté influyendo directamente a nivel de los fotorreceptores de tal manera que por una parte afectaría al mecanismo por medio del cual se genera la respuesta eléctrica a la luz, y por otra, influiría en los mecanismos subyacentes en la oscilación circádica del ERG dependientes de los fotorre-

ceptores. Evidencias de que el calcio influye en la generación de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores existen en la literatura (trabajos de Fulpui y Baumann, 1969; Brown y Blinks, 1974; Lisman y Brown, 1975; Bader y cols., 1976) quienes han demostrado que los cambios en la concentración de calcio tienen notables efectos sobre la forma y la amplitud de la respuesta a la luz, habiéndose propuesto que el aumento intracelular del calcio es un paso en la cadena de eventos excitatorios que llevan a la generación del potencial de receptor (Lisman y Brown, 1971; Bader y cols., 1976).

Por nuestra parte, no podemos afirmar que esto esté sucediendo en nuestras preparaciones, ya que nuestros registros son extracelulares, pero sí podemos insistir en el hecho de que la magnitud del ERG (que no hay que olvidar que tiene su origen sólo en la respuesta de los fotorreceptores) es mucho mayor en las preparaciones colocadas en los medios libres de calcio que en los otros medios utilizados, lo que pudiera explicarse con base en un menor ingreso de calcio al fotorreceptor, hecho que favorecería el ingreso del sodio - que se sabe que es el elemento fundamental en la generación del potencial de receptor y que está en competencia por los canales que ocupa el calcio en esta estructura. (Este hecho, no excluye, por supuesto, la posible participación de los pigmentos accesorios llevados al estado de adaptación a la obscuridad, en el incremento de la respuesta que se observa en los tallos puestos en las soluciones libres de calcio, hecho al que ya aludíamos en párrafos anteriores).

Como datos que apoyen la participación directa del calcio en los mecanismos de oscilación del ERG que observamos, sólo disponemos de las modificaciones del período circádico que se presentan en las distintas soluciones y que, al no poderlas atribuir a oscilaciones del pigmento accesorio, las tenemos que proponer como el resultado de la acción del calcio sobre los fotorreceptores o sobre eventos que afectan directamente la capacidad de oscilar de los mismos. Así, es posible que la acción del calcio sobre la liberación de hormonas modifique (además de la acción ya descrita sobre los pigmentos accesorios) la capacidad de oscilación de los fotorreceptores, lo que no sería sorprendente que sucediera si tomamos en cuenta que los extractos de tallo ocular (donde están contenidas las principales hormonas del acocil) son capaces de modificar la respuesta a la luz de los fotorreceptores según se desprende de los resultados de Vera Mendoza en 1978. Si por último, aplicamos las ideas básicas de la teoría de los osciladores múltiples a nuestros resultados, el calcio po-

dría estar afectando la capacidad de interactuar de unos osciladores (los fotoreceptores) con otros (cualesquiera ótras de las estructuras presentes en nuestra preparación), hasta un punto en que la frecuencia resultante de las interacciones se viera aumentada (medio rico en calcio) o disminuida (medio pobre o carente de calcio), tal y como se pudo observar en nuestras preparaciones.

## CONCLUSIONES

- 1.- El acócil presenta oscilaciones circádicas en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de sus fotorreceptores visuales, las que se ponen de manifiesto cuando se coloca al animal en condiciones ambientales constantes.
- 2.- Al seccionar los tallos oculares del acócil, colocarlos en solución salina y mantenerlos en un medio ambiente constante, se comprueba que el ritmo circádico de la amplitud del ERG persiste aun cuando presenta algunas diferencias con respecto al que se observa en el animal íntegro. Una de esas diferencias se refiere a la aparición de ciclos de alta frecuencia superpuestos al ciclo circádico.
- 3.- Cuando los tallos oculares son colocados en soluciones salinas carentes o ricas en calcio, algunas características del ritmo circádico se modifican. Así, el período y la relación  $\alpha / \rho$  dependen del tipo de solución salina empleada. También la frecuencia de las oscilaciones superpuestas a la oscilación circádica se ve afectada por la concentración externa de calcio.
- 4.- El análisis de la posición de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal no permite proponer oscilaciones periódicas en la posición de los pigmentos paralelas a las que se observan en el ERG ni durante el ciclo circádico ni durante los ciclos de alta frecuencia.
- 5.- Se discute la posible acción del calcio sobre la liberación de neurohormonas y la acción de estas sobre la posición de los pigmentos accesorios.
- 6.- La amplitud del ERG es mayor en los medios pobres o carentes de calcio que en el normal o el enriquecido con este ion. Este hecho se explica con base en el punto anterior y con una posible acción del calcio directamente sobre el fotorreceptor.
- 7.- Se propone una acción del calcio sobre el fotorreceptor tanto en lo que respecta al origen de la respuesta eléctrica a la luz como en los mecanismos relacionados con la capacidad de oscilación de esta estructura.
- 8.- Se propone una acción del calcio sobre los mecanismos de acoplamiento de los osciladores presentes en el tallo ocular seccionado.

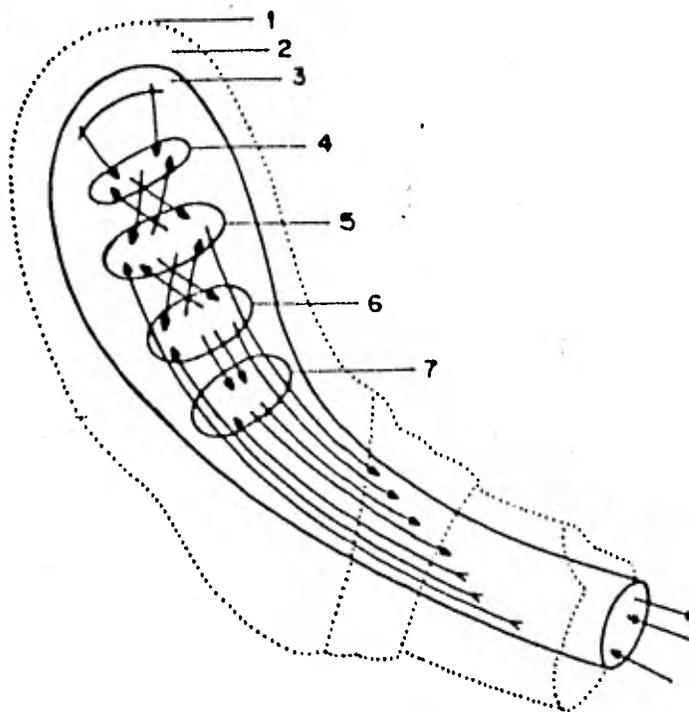


Figura 1 - Esquema de un corte longitudinal del ojo de un decápodo (Tomado de Wateman et al, 1964) donde se muestran; 1.- Córnea, 2.- Capa dióptrica, 3.- Capa de células retinulares, 4.- Lámina ganglionar, 5.- Médula, 6.- Complejo lobular y 7.- Focos ópticos. Note el entrecruzamiento de fibras entre la lámina y la médula y entre ésta y el complejo lobular. La glándula sinusal se localiza entre la lámina ganglionar y la médula.

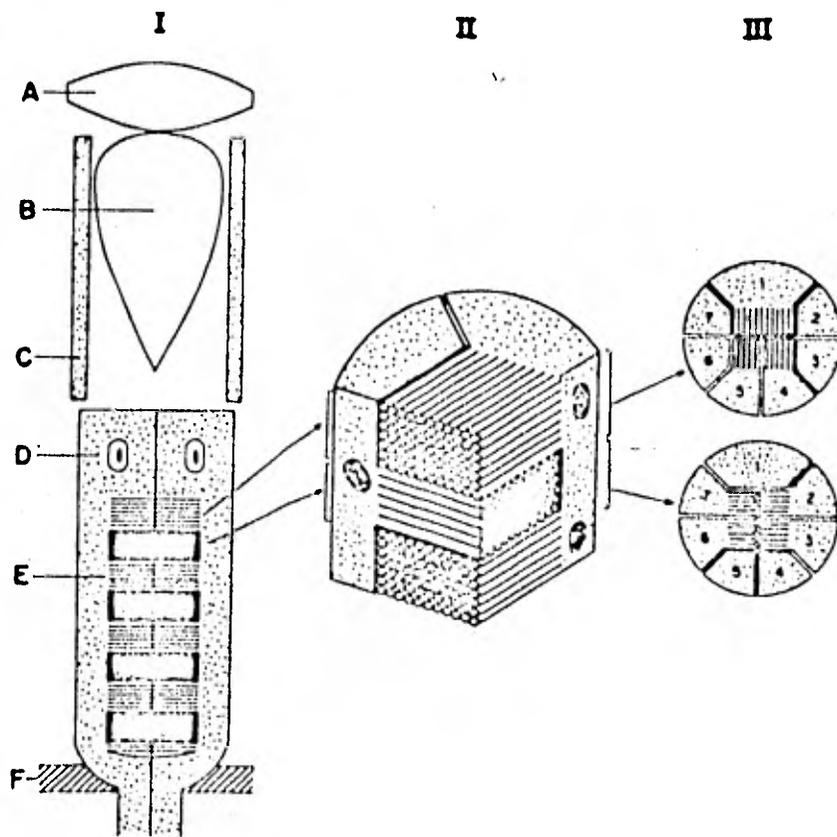


Figura 2 - Estructura de un ojo compuesto del acocil (Tomado de Eguchi, 1965) donde se observan diferentes aspectos de su organización estructural: I. Arreglo longitudinal de sus componentes: córnea (A), cono cristalino (B), células de pigmento accesorio (C), célula retinular (D), microvellosidades (E) y membrana basal (F). II. Disposición de las microvellosidades en capas transversales perpendiculares entre sí. III, Arreglo de las siete células retinulares dentro de las microvellosidades (Ver detalles en el texto).

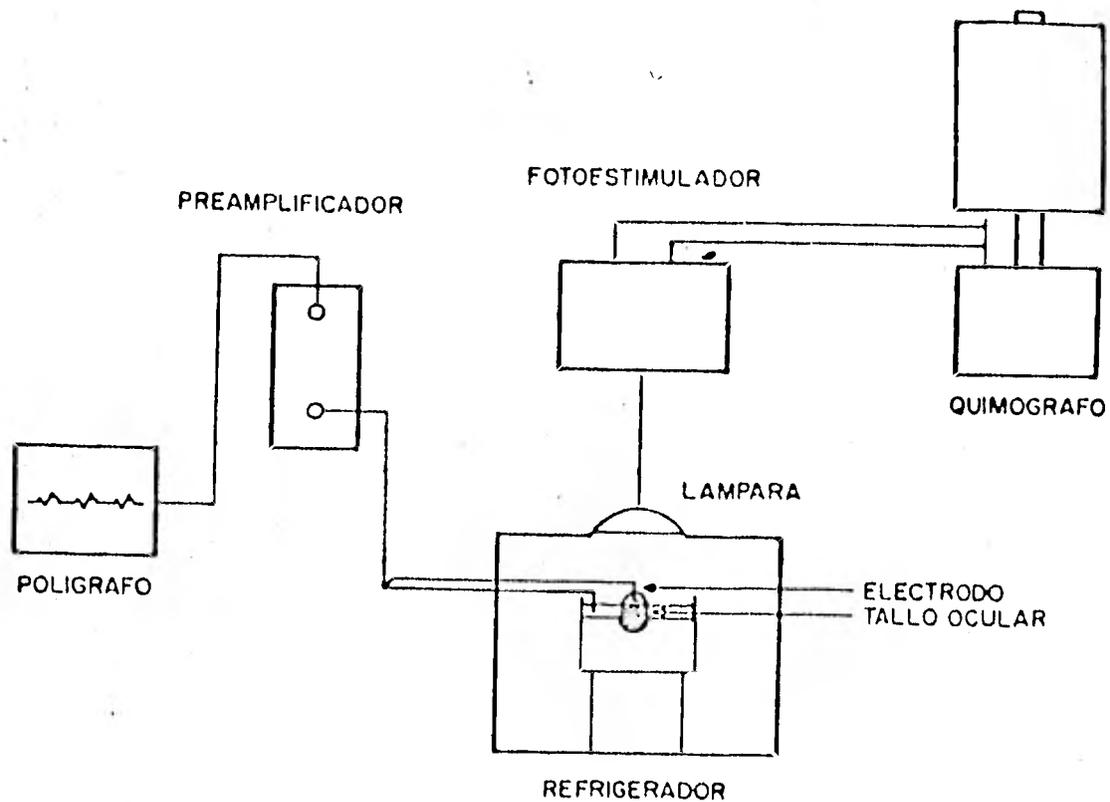


Figura 3 - Esquema del dispositivo para la estimulación luminosa, el registro de la actividad eléctrica generada por los fotorreceptores y la inscripción gráfica de la misma, utilizado en nuestros experimentos (Ver detalles en el texto).

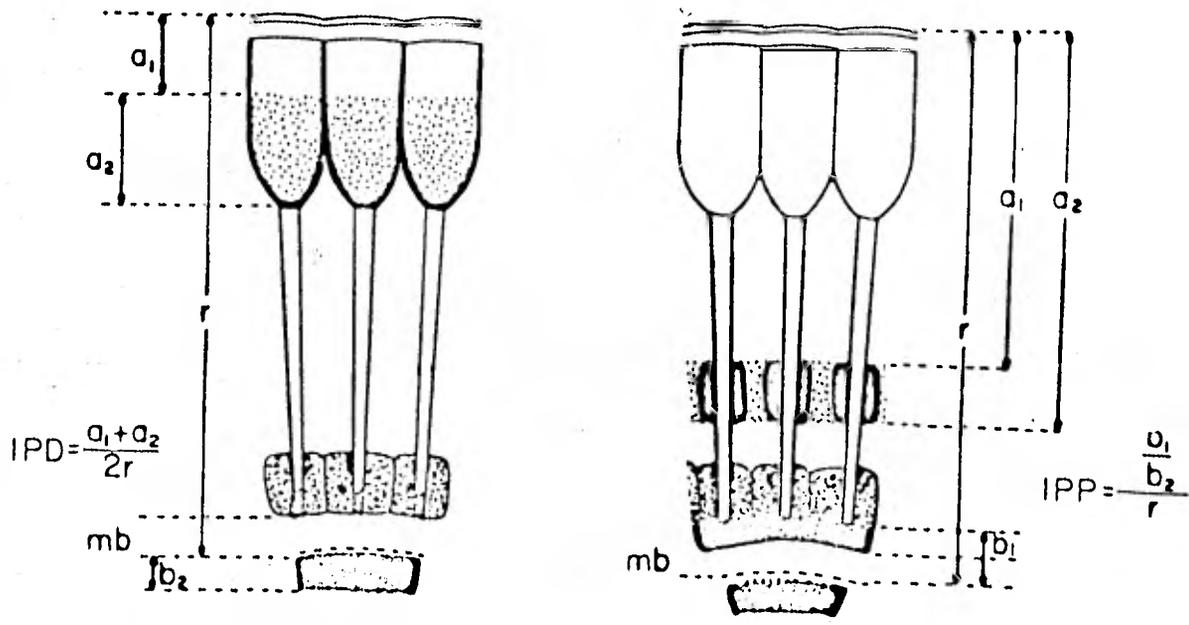


Figura 4 - Diagrama tomado de De Bruin y Crisp, 1957 que muestra la distribución de los pigmentos retinianos (distal y proximal) en las ommatidias de un ojo adaptado a la oscuridad (izquierda) ó adaptado a la luz (derecha). (Detalles en el texto).

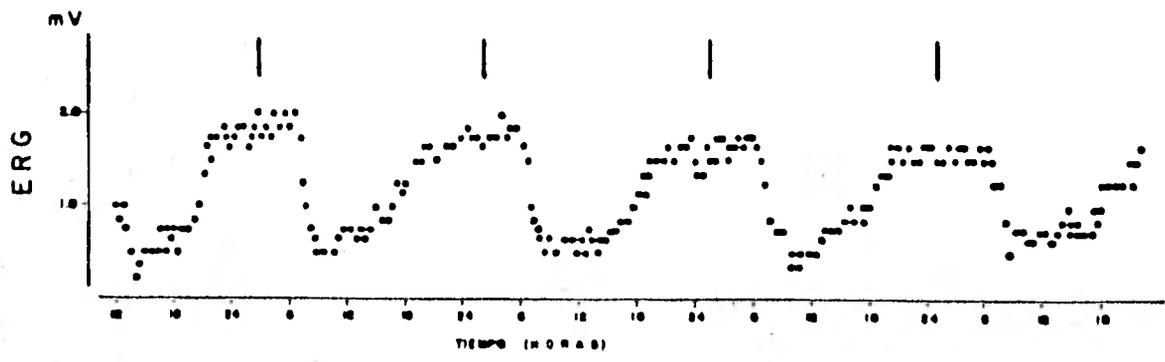


Figura 5 - Registro típico de los cambios de voltaje de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales obtenido de un organismo íntegro. Las fases de ascenso y de descenso de la respuesta ponen de manifiesto un ritmo circádico característico de un animal nocturno con un período de 23.2 horas y una relación  $\alpha / \rho$  de 1.03.

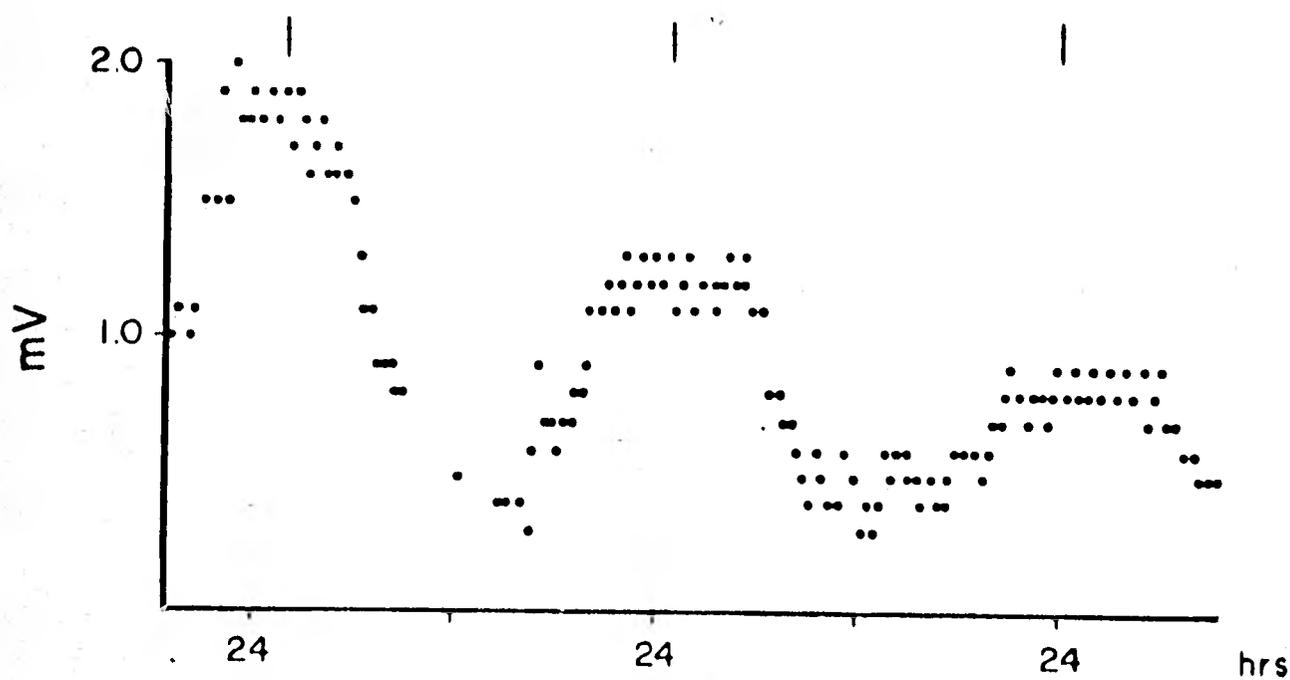


Figura 6 - Registro de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de un tallo ocular aislado inmerso en solución normal de Van Harreveld. El período fué de 23.5 horas y la relación  $\alpha / \rho$  de 0.9, Abscisa: tiempo externo.

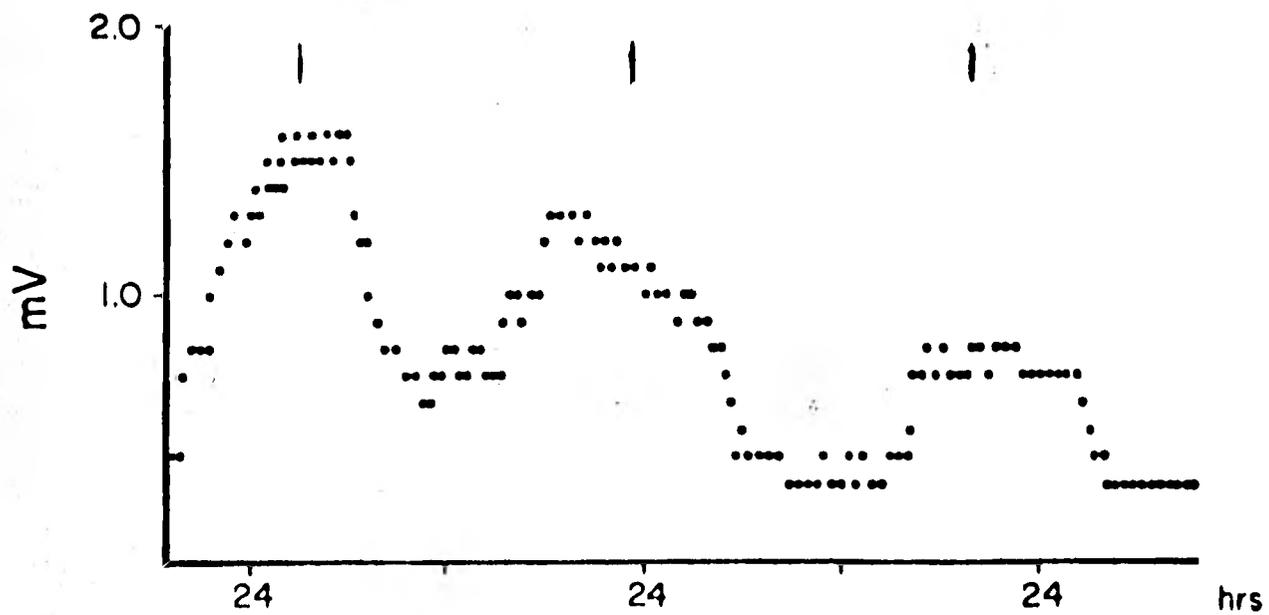


Figura 7 - Registro de la amplitud en la respuesta eléctrica - a la luz (ERG) de un tallo ocular aislado inmerso en solución de Van Harreveld rica en calcio. El período fué de 21 horas y la relación  $\alpha / \rho$  de 1.25. Abscisa : tiempo externo.

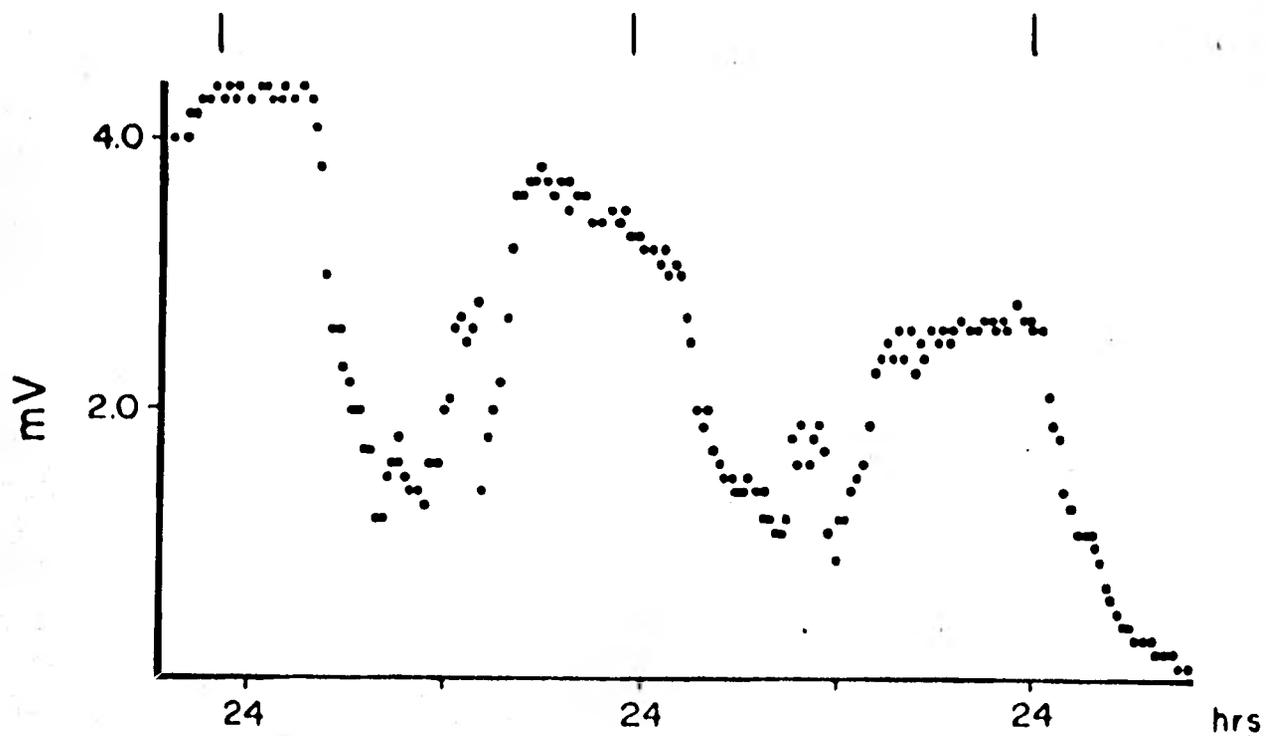


Figura 8 - Registro de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de un tallo ocular aislado colocado en solución de Van Harrevelt carente de calcio. El período de la oscilación fué de 25,3 horas y la relación  $\alpha / \rho$  de 0.76. Notese la magnitud de la respuesta en comparación con la de las figuras 6 y 7. Abscisa: tiempo externo.

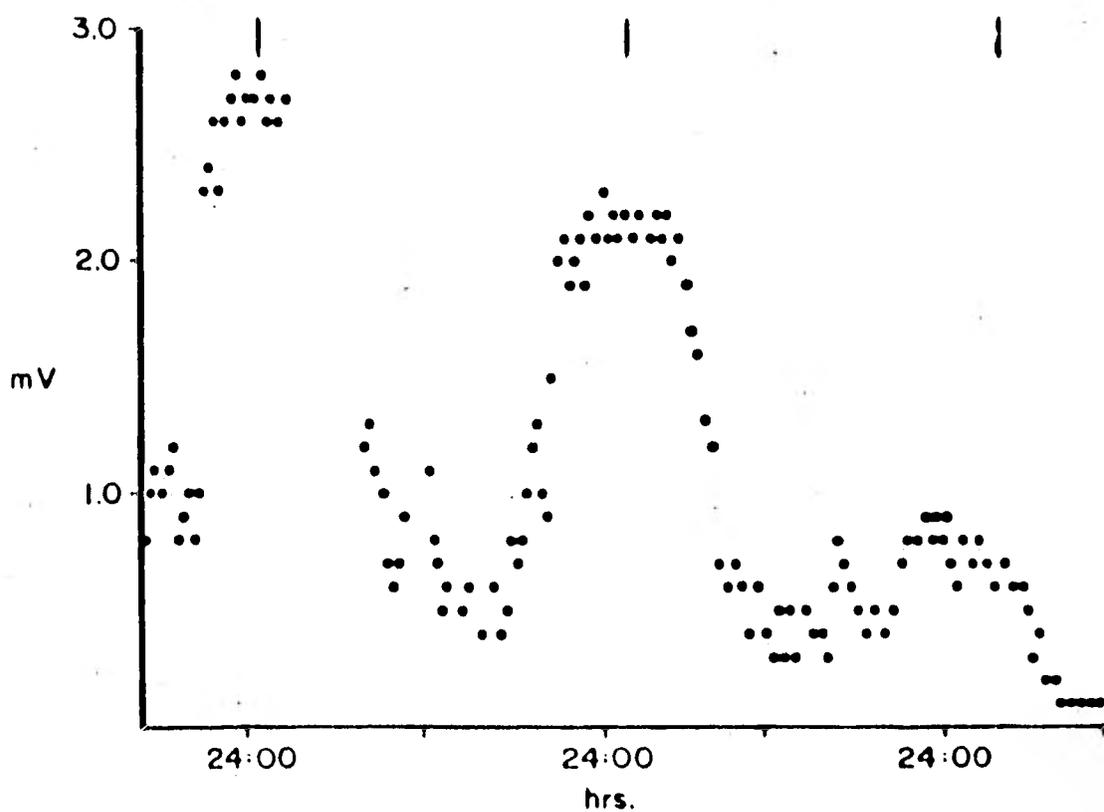


Figura 9 - Registro de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de un tallo ocular aislado colocado en solución de Van Harreveld sin calcio, sustituido por magnesio. El período y la relación  $\alpha / \rho$  son muy similares a los obtenidos en las preparaciones colocadas en la solución carente de calcio (ver figura 8). Abscisa: tiempo externo.

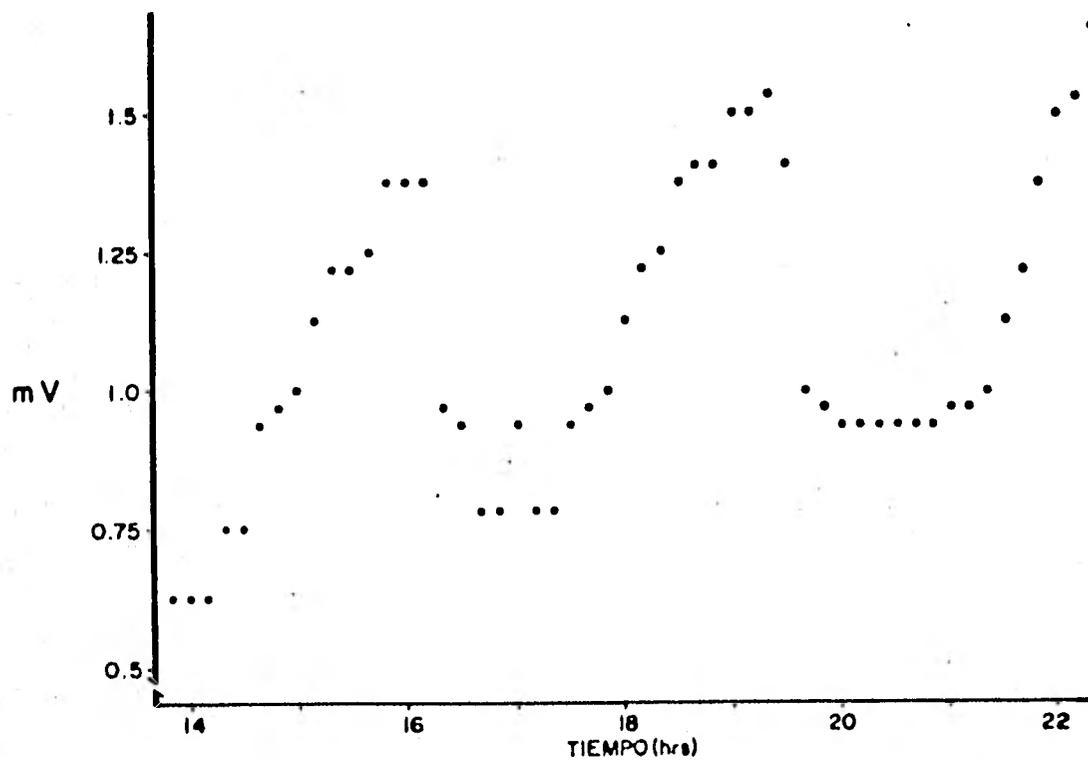


Figura 10 - Registro de la amplitud del ERG medida desde las 14 hasta las 22 horas. Note la regularidad de las oscilaciones de alta frecuencia (1/3 horas) que se superponen a la fase de ascenso del ciclo circádico. El registro se obtuvo de un tallo ocular aislado inmerso en solución normal de Van Harreveld.



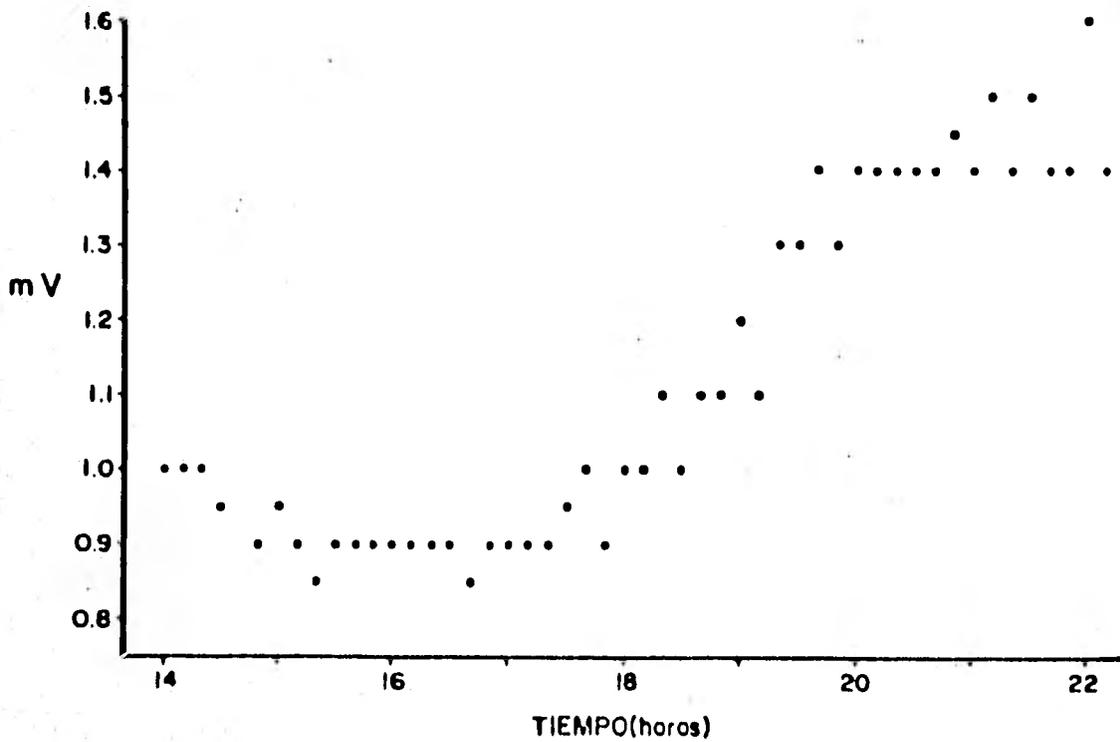


Figura 12 - Oscilaciones de alta frecuencia en la amplitud del ERG registradas durante la fase de ascenso de un ciclo circádico. El ERG se obtuvo de un tallo ocular aislado colocado en solución de Van Harrevelde carente de calcio. Al igual que las de la figura 11, estas oscilaciones son muy irregulares.

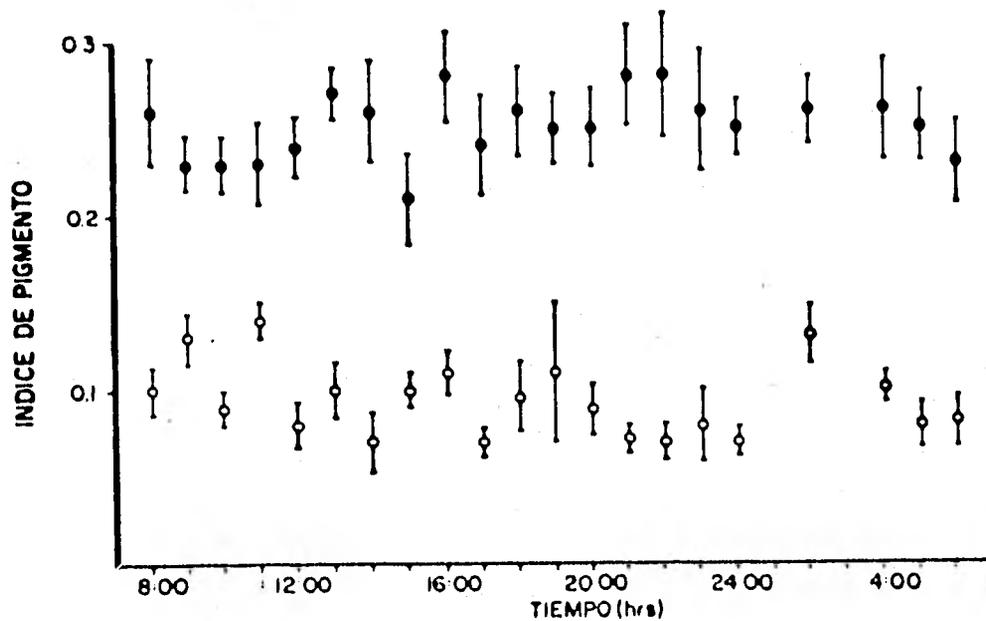


Figura 13 - Cambios en la posición de los pigmentos retinianos accesorios durante el ciclo de veinticuatro horas. Cada punto de la curva superior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice del pigmento distal (IPD) con sus correspondientes valores de error estándar. Cada punto de la curva inferior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice de pigmento proximal (IPP) con sus correspondientes valores de error estándar. Los tallos oculares de los que se hicieron las determinaciones estaban inmersos en solución salina normal. Note la ausencia de oscilaciones periódicas por lo menos de carácter circádico.

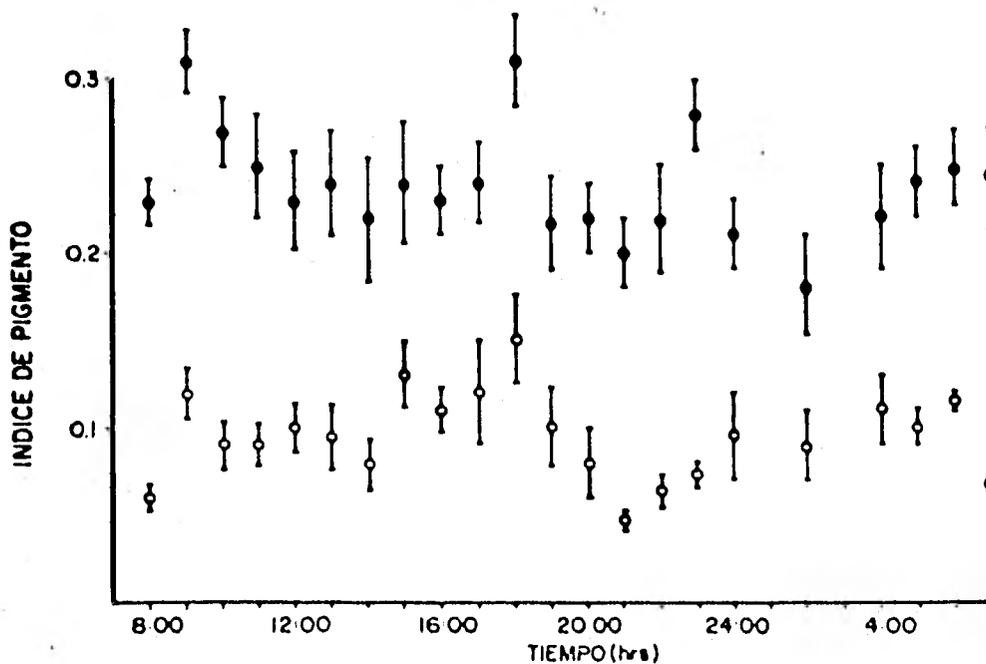


Figura 14 - Cambios en la posición de los pigmentos retinianos accesorios durante el ciclo de veinticuatro horas. Cada punto de la curva superior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice de pigmento distal (IPD) con sus respectivos valores de error estándar. Cada punto de la curva inferior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice de pigmento proximal (IPP) con sus respectivos valores de error estándar. Los tallos oculares de los que se hicieron las determinaciones estaban inmersos en solución de Van Harreveld rica en calcio. Note ciertas variaciones a lo largo del día sobre todo del IPD, en comparación con las de la figura 13.

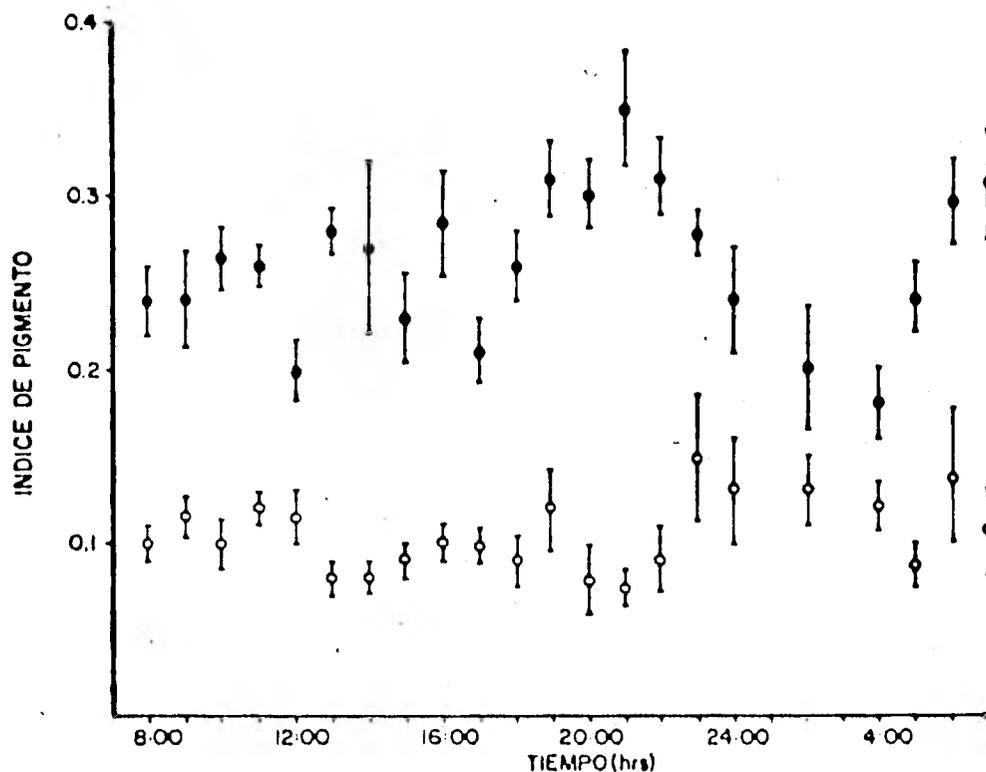


Figura 15 - Cambios en la posición de los pigmentos retinianos accesorios durante el ciclo de veinticuatro horas. Cada punto de la curva superior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice de pigmento distal (IPD) con sus respectivos valores de error estándar. Cada punto de la curva inferior corresponde al promedio de diez determinaciones del índice de pigmento proximal (IPP) con sus respectivos valores de error estándar. Los tallos oculares de los que se hicieron las determinaciones estaban inmersos en solución de Van Harreveld carente de calcio. Note ciertas variaciones a lo largo del día sobre todo del IPD, que no observamos en la figura 13.

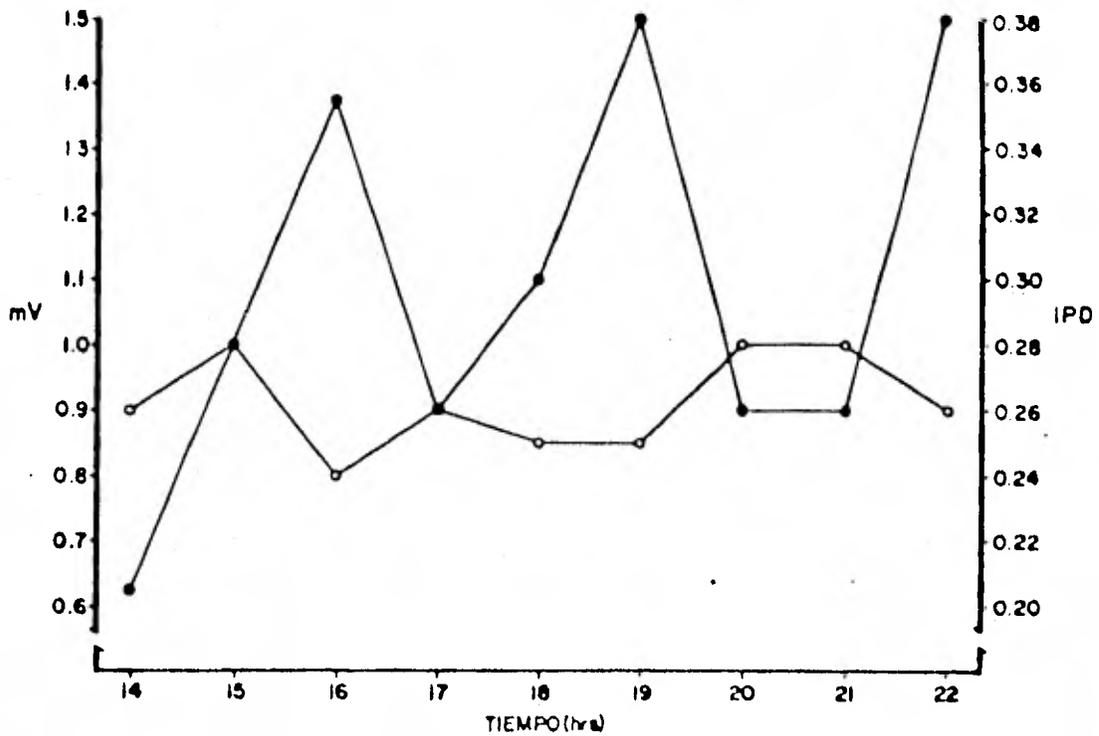


Figura 16 - Medidas de la amplitud del ERG (círculos negros) y del IPD (círculos blancos) durante las ocho horas de la fase de ascenso comprendidas entre las 14 y las 22 horas de un ciclo circádico. Ambas determinaciones corresponden a un tallo ocular inmerso en solución normal de Van Harre veld, Note la falta de correlación entre ambos eventos.

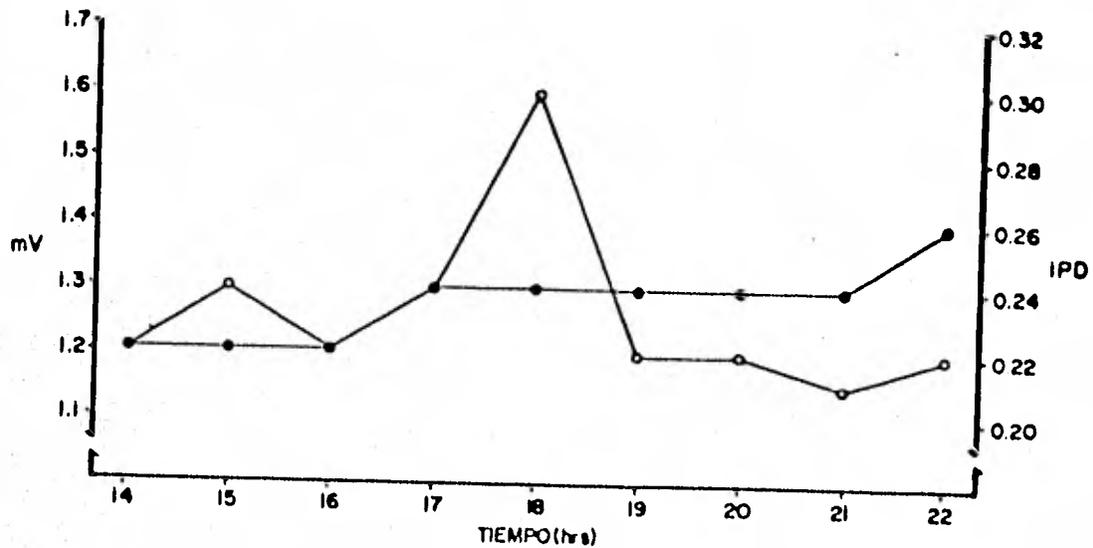


Figura 17 - Medidas de la amplitud del ERG (círculos negros) y del IPD (círculos blancos) durante las ocho horas de la fase de ascenso comprendidas entre las 14 y las 22 horas de un ciclo circádico. Ambas determinaciones corresponden a un tallo ocular inmerso en solución de Van Harreveld - rica en calcio, Note la falta de correlación entre ambos eventos.

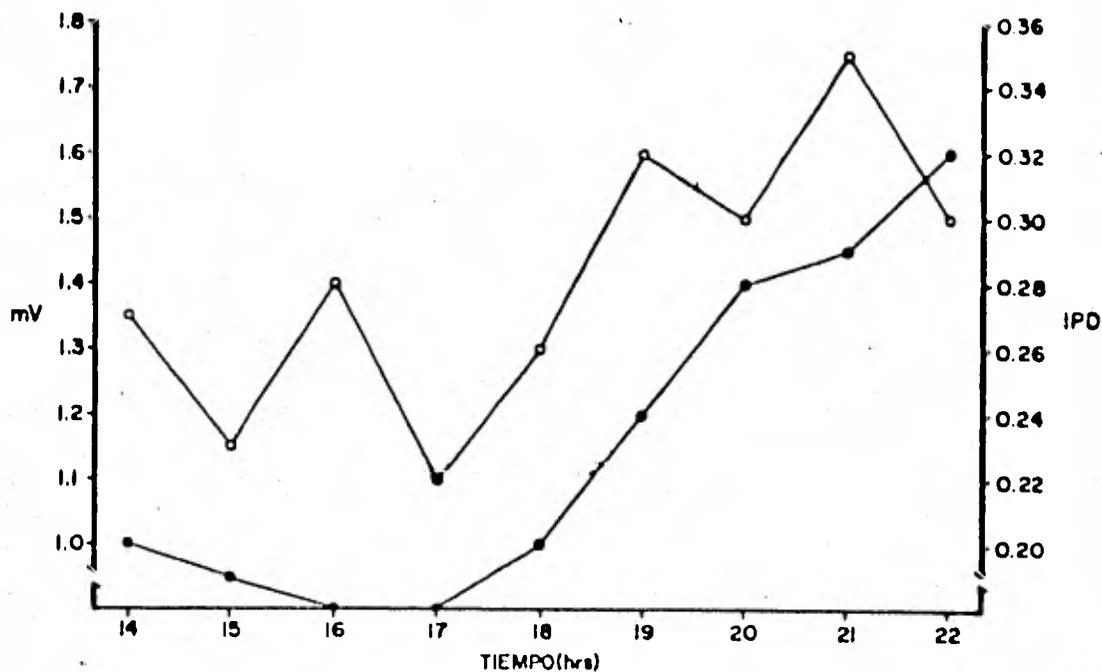


Figura 18 - Medidas de la amplitud del ERG (círculos negros) y del IPD (círculos blancos) durante las ocho horas de la fase de ascenso comprendidas entre las 14 y las 22 horas de un ciclo circádico. Ambas determinaciones corresponden a un tallo ocular inmerso en solución de Van Harreveld - carente de calcio. Note la ausencia de correlación entre ambos eventos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, R. V. and G. E. Folk, Jr. (1964). Circadian metabolic patterns in cultured adrenal glands. *Comp. Biochem. Physiol.*, 11 : 393-409.
- Aréchiga, H. and C. A. G. Wiersma. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.*, 1 : 71-85.
- Aréchiga, H. and B. Fuentes-Pardo. (1970). Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist.*, 13 : 137.
- Aréchiga, H., B. Fuentes-Pardo and B. Barrera. (1973). Circadian - rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: *Neurobiology of Invertebrates*, edited by Salanky, Hungary, 403-421.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological Clocks*, Cold. Spring Harbor. Symposium on Quantitative Biology, 25 : 11-28.
- Aschoff, J. and R. Wever. (1976). Human circadian rhythms: a multi oscillatory system. *Federation Proceedings*. Vol. 35, No. 12.
- Bader, C. R., F. Baumann and D. Bertrand. (1976). Role of intracellular calcium and sodium in light adaptation in the retina of the honey -- drone bee (*Apis mellifera* L.). *J. Gen. Physiol.* 67 : 475-491.
- Barnett, A. (1966). A circadian rhythm of mating type reversals in *Paramecium multimicronucleatum*, syngen 2, and its genetic control. *J. Cell. Physiol.*, 67 : 239-270.
- Barnett, A. (1969). Cell. division: a second circadian clock system in *Paramecium multimicronucleatum*. *Science*, 164 : 1417-1418.
- Bennit, R. and A. Dickson, (1924). The migration of the retinal - pigment in crustaceans. *J. Exper. Zool.* 40 : 381-435.
- Bennit, R. (1932). Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. *Physiol. Zool.*, 5 : 65-72.
- Benolken, R. M. (1961). Reversal of photoreceptor polarity recorded during graded receptor potential response to light in the eye of *Limu-*

lus. Biophys. J., 1 : 551-564.

Bergman, C., W. Nonner and R. Stämpfli. (1968). Sustained spontaneous activity of Ranvier nodes induced by the combined actions of TEA and lack of calcium. Pflügers Arch., 302 : 24-37.

Berlind, A. and M. Cooke. (1971). Role of divalent cations on electrically elicited liberation of neurohormones in pericardial organs in crab. Gen. and Comp. End., 17 : 60-72.

Brady, J. (1969). How are insect circadian rhythms controlled? Nature, Lond., 223 : 781-784.

Brady, J. (1971). The search for an insect clock. In: Biochronometry (ed. M. Menaker), National Academy of Sciences, Washington, D. C., 517-526.

Brown, F. A. (1961). Retinal pigment rhythms in Crustacea. En: "The Physiology of Crustacea", dirigido por T. H. Waterman. New York Academic -- Press. 11, 401-430.

Brown, F. A., Jr., J. W. Hastings and J. D. Palmer. (1970). The -- Biological Clock: Two Views, 2nd. ed. Academic, New York.

Brown, J. E. and J. R. Blinks. (1974). Changes in intracellular -- free calcium concentration during illumination in invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin. J. Gen. Physiol., 64 : 643-665.

Bruce, V. G. and C. S. Pittendrigh. (1960). An effect of heavy water on the phase and period of the circadian rhythm in Euglena. J. Cell. -- Comp. Physiol., 56 : 25-31.

Bruce, V. G. (1972). Mutants of the biological clock in Chlamydomonas reinhardtii. Genetics, 70 : 537-548.

Bünning, E. (1935). Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmik bei Insekten und bei Pflanzen. Ber. deutsch. bot. ges., 53 : 594-623. Citado -- por Fuentes-Pardo (1977).

Bünning, E. (1958). Das Weiterlaufen der "Physiologischen Uhr" -- im Stüngerdarm ohne Zentrale Steuerung. Nature wiss., 45 : 68-77. Citado -- por Fuentes-Pardo, (1977).

Bünning, E. (1960). Opening address: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. Biological Clocks, 25 : 1-9.

Burkhardt, D. and H. Autrum. (1960). Die Belichtungspotentiale einzelner Sehzellen von Calliphora erythrocephala. Meig. A. Naturforsch., 156 : 612-616. Citado por Hamdorf, (1979).

Connor, J. A. (1978). Slow repetitive activity from fast conductance changes in neurones. Fedn. Proc., 37 : 2139-2145. Citado por Tsien et al, (1979).

Connor, J. A. and C. F. Stevens. (1971). Prediction of repetitive firing behavior from voltage clamp data on an isolated neurone soma. J. Physiol., Lond., 213 : 31-53.

Darwin, Ch. and F. (1880). The Power of Movement in Plants, pp. - 407-408.

De Bruin, G. H. P. and D. J. Crisp. (1957). The influence of pigment migration on vision of "higher crustacea". J. Exp. Biol., 34 : 447-463.

De Candolle, A. P. (1835). Pflanzenphysiologie, Oder Darstellung - der Lebenskräfte and Lebensvenichtungen der Gewächse, Stuttgart a Ulbingen, pp 639-640. Citado por Bünning. (1960).

De Mairan. (1729). Observation botanique. Histoire de L'Académie - Royale des Sciences. Paris, pp 35. Citado por Bünning, (1960).

Dowse, H. B. and J. D. Palmer. (1972). The chronomutogenic effect of deuterium oxide on the period and entrainment of a biological rhythm. - Biol. Bull., 143 : 513-524.

Dutrochet, H. (1837). Mémoires pour servir a l'histoire des végétaux et des animaux. Brussel, pp 287. Citado por Bünning, (1960).

Eguchi, E. (1965). Rhodom structure and receptor potentials in -- single crayfish retinular cells. J. cell. comp. Physiol., 66 : 411-430.

Eguchi, E. and T. H. Waterman. (1968). Cellular basis of polarized light perception in the spider crab Libinia. Zeitschrift fur Zell forschung 84 : 87-101.

Enderle, W. (1951). Tagesperiodische Wachstums und Turgorschwankungen an Gewebekulturen. Planta, 39 : 570-588. Citado por Bünning, (1960).

Enright, J. T. (1971). Deavy water slows biological timing processes  
Z. vergl. Physiol., 72 : 1-16.

Exner, S. (1891). Die Physiologie der facettierten Augen von Krebsen  
und Insekten. Leipzig : Deuticke. Citado por Horridge and Bullock, (1965).

Fuentes-Pardo, B. (1977). Correlación entre los ritmos circádicos e-  
lectrorretinográfico y motor en el acocil Procambarus bouvieri (Ortmann). Te-  
sis doctoral. México, D. F.

Fuentes-Pardo, B. and M. C. García. (1979). Effect of the light-de-  
privation on the neurohumoral activity of the visual system of the crayfish.  
Comp. Biochem. Physiol., 66 : 549-555.

Fuentes-Pardo, B. and V. Inclán. (1981). Analysis of the correlation  
between two circadian rhythms in the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 68A :  
477-485.

Fulpius, B. and F. Baumann. (1969). Effects of sodium, potassium and  
calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptor cells. J. -  
Gen. Physiol., 53 : 541-561.

Gallin, E. K., M. L. Wiederhold, P. E. Lipsky and A. S. Rosenthal. -  
(1975). Spontaneous and induced membrane hyperpolarizations in macrophages. J.  
Cell. Physiol., 86 : 653-662. Citado por Nelson and Henkart, (1979).

Gorman, A. L. F. and M. V. Thomas. (1978). Changes in the intracellu-  
lar concentration of free calcium ions in a pace-maker neurone, measured with  
the metallochromic indicator dye arsenazo III. J. Physiol., Lond., 275 : 357-  
376. Citado por Tsien et al, (1979).

Harberg, F., E. Harberg, C. Barnum and J. Bittner. (1959). Physiolo-  
gic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and -  
daily routine. In: Photoperiodism and delated Phenomeno in Plants and Animals  
Ed. R. B. Withrow. AAAS., Washington, D. C., pp. 803-873.

Hamdorf, K. (1979). The physiology of invertebrate visual pigments. -  
In: Comparative Physiology and Evolution of vision in Invertebrates A. Inver-  
tebrate Photoreceptors. Ed. by H. Autrum, New York.

Harker, J. E. (1954). Diurnal rhythms in Periplaneta americana (L).  
Nature, Lond., 173 : 689-690.

Henkart, M., D.M.D. Landis and F.S. Reese. (1976). Similarity of junctions between plasma membranes and endoplasmic reticulum in muscle and neurons. *J. Cell. Biol.*, 70 : 338-347

Hofmeister, W. (1867). *Die Lehre von der Pflanzenzelle*. Leipzig. Cited por Bünning, (1960).

Horridge, G.A. and T. H. Bullock. (1965). *Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates*. Vol. II. W.H. Freeman and Co. San Francisco.

Huxley, A.F. (1959). Ion movements during nerve activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 81 : 221-246.

Jacklet, J.W. (1969). Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of *Aplysia*. *Science, N.Y.*, 164 : 562-563.

Kiesel, A. (1894). Untersuchungen zur Physiologie des facettierten Auges. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien.*, 97-139. Cited por Bünning, (1960).

Kleinholz, L.H. (1934). Eye-stalk hormone and the movement of distal retinal pigment in *Palaeomonetes*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 20 : 659-661.

Kleinholz, L.H. and E. Bourquin. (1941). Effects of eyestalk removal on Decapod Crustaceans. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 27 : 145-149.

Kleinholz, L.H. (1949). Responses of the proximal retinal pigment of the isolated crustacean eyestalk to light and to darkness. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 35 : 215-218.

Kleinholz, L.H. (1961). Pigmentary effectors. En "The Physiology of Crustacea", dirigido por T.H. Waterman. New York Acad. Press. II., 4 : 133-169.

Kleinholz, L.H. (1966). Hormonal regulation of retinal pigment migration in crustaceans. In: "The functional organization of the compound eye". Bernhard C. G. (Ed.). Pergamon, New York., 89-101.

Kleinholz, L.H. and Keller. (1973). Comparative studies in crustacean neurosecretory hyperglycemic hormones. The initial survey. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 21 : 554-564.

Lansky, A. and M.G.F. Fournes. (1969). The site of origin of electrical responses in visual cells of the leech, *Hirudo medicinalis*. *J. Cell.*

Biol., 42 : 241-252.

Lisman, J.E. and J.E. Brown. (1971). Two light-induced processes in the photoreceptor cells of Limulus ventral eye. J. Gen. Physiol., 58 : 544-561.

Lisman, J.E. and J.E. Brown. (1975). Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in Limulus ventral photoreceptors. J. Gen. Physiol., 66 : 489-506.

Matthews, E.K. and M.D.L. O'Connor. (1979). Dynamic oscillations in the membrane potential of pancreatic islet cells. J. Exp. Biol., 81 : 75-91.

Meech, R.W. (1979). Membrane potential oscillations in molluscan "burst" neurones. J. Exp. Biol., 81 : 93-112.

Moreno, S.E. (1981). Ritmo circádico en la respuesta eléctrica a la luz polarizada de los fotorreceptores visuales del acocil. Tesis Biólogo, U.N.A.M., México.

Naka, K. and M. Kuwabara. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. J. Exp. Biol., 35 : 602-610.

Naka, K. (1961). Recording of retinal potentials from single cells of the insect compound eye. J. Gen. Physiol., 44 : 571-584.

Nelson, P.G. and M. P. Henkart. (1979). Oscillatory membrane potential changes in cells of mesenchymal origin: the role of an intracellular calcium regulating system. J. Exp. Biol., 81 : 49-61.

Okada, Y., W. Tsuchiya and A. Inouye. (1978). Role of intracellular  $\text{Ca}^{++}$  in hyperpolarizing excitability of cultured fibroblasts. Sixth Int. Biophys. Cong., Kyoto, Japan, Abstr. V-4 (C<sub>2</sub>). Citado por Nelson and Henkart, (1979).

Page, T.L. and J.L. Larimer. (1972). Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. J. Comp. Physiol., 78 : 107-120.

Page, T.L. and J.L. Larimer. (1975a). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. J. Comp. Physiol., 97 : 59-80.

Page, T.L. and J.L. Larimer. (1975b). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. J. Comp. Physiol.,

97 : 81-96.

Parker, G. H. (1891). The compound eyes in crustaceans. Bull. Mus. - Comp. Zool. (Harvard)., 21 : 45-140.

Parker, G. H. (1895). The retina and optic ganglia in decapods, especially in Astacus. Mitth. Zool. Stat. Neapel., 12 : 1-73.

Parker, G. H. (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment cells in Palaemonetes and their relation to the central nervous system. Bull. Mus. Comp. Zool. (Harvard)., 30.: 275-300.

Pfeffer, W. (1873). Physiologische Untersuchungen. Leipzig. Citado por BUinning, (1960).

Pfeffer, W. (1915). Beiträge zur Kenntnis der Entstehung, der Schlafbewegungen. Abhandl. Math. Phys. Kl. Kön. Sächs. Ges. d. Wiss., 34 : 1-154. Citado por BUinning, (1960).

Pittendrigh, C.S. (1954). On temperature independence in the clock - system controlling emergence time in Drosophila. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 40 : 1018-1029.

Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In: Biological Clock, Cold. Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology., 25 : 159-184.

Pittendrigh, C.S. (1965). On the mechanism of the entrainment of a - circadian rhythm by light cycles. In: Circadian clocks. Worth-Roland Publishing Co., Amsterdam, 277-297.

Pittendrigh, C.S. and V.G. Bruce. (1957). An oscillator model for biological clocks. In: Rhythmic and Synthetic Processes in Growth, Ed. D. Rudnick Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, pp. 75-109.

Prosser, C. L. y C. L. Brown, (1961). Cromatóforos y cambios de color En: Fisiología Comparada. Segunda edición, Ed. Interamericana, S.A. México. pp 539-574.

Rapp, P.E. and M.J. Berridge. (1977). Oscillations in calcium-cyclic AMP control loops form the basis of pacemaker activity and other high frequency biological rhythms. J. Theor. Biol., 66 : 497-525.

Roberts, T.W. (1941). Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish Cambarus virilis (Hagen). Anat. Rec. (Suppl.), 181 : 46-47.

Roberts, T.W. (1944). Light, eyestalk, chemical and certain other factors as regulators of community activity for the crayfish Cambarus virilis. Ecol. Monogr., 14 : 359-365.

Romero, P.J. and R. Whittam. (1971). The control by internal calcium of membrane permeability to sodium and potassium. J. Physiol., Lond., 214 : 481-507.

Rosenbleuth, J. (1962). Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. J. Cell. Biol., 13 : 405-422.

Sánchez, J.A. and B. Fuentes-Pardo. (1976). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 56 : 601-605.

Sandeen, M.I. and F. A. Brown, Jr. (1952). Responses of the distal pigment of Palaemonetes to illumination. Physiol. Zool., 25 : 222-230.

Smith, R.I. (1948). The role of the sinus glands in retinal pigment migration in grapsoids crabs. Biol. Bull., 95 : 169-185.

Smith, T.G., W.K. Stell, J.E. Brown, J.C. Freeman, G.C. Murray. (1968). A role for the sodium pump in photoreception. Science., 162 : 456-458.

Stadler, D.R. (1959). Genetic control of a cyclic growth pattern in Neurospore. Nature, 184 : 170-171.

Stroppel, R. (1910). Über den Einfluss des Lichtes auf das Oeffnen und Schliessen einiger Blueten, Z. f. Bot., 2 : 369-453. Citado por Aschoff, (1960).

Strumwasser, F. (1965). The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron. In: Circadian Clocks. Ed. J. Aschoff, Amsterdam, North Holland, pp. 442-462.

Sweeney, B.M. (1960). The photosynthetic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra. Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol., 25 : 145-148.

Sweeney, B.M. and F.T. Harro. (1961). Persistence of a photosynthetic

tic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra, Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol., 25 : 145-148.

Sweeney, B.M. and F.T. Harro. (1961). Persistence of a photosynthetic rhythm in enucleated Acetabularia. Science, 134 : 1361-1363.

Tharp, G.D. and G.E. Folk. (1964). Rhythmic changes in rate of the mammalian heart and heart cells during prolonged isolation. Comp. Biochem. - Physiol., 14 : 255-273.

Truman, J.W. (1971). Hour-glass behaviour of the circadian clock controlling eclosion of the silkworm Antheraea pernyi. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.A., 68 : 595-599.

Tsien, R.W., R.S. Kass and R. Weingart. (1979). Cellular and subcellular mechanisms of cardiac pacemaker oscillations. J. Exp. Biol., 81 : 205-215.

Vera Mendoza, K.E. (1978). Acción del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acócil - Procambarus bouvieri (Ortmann). Tesis Biólogo, U.N.A.M. México.

Wald, G. (1968). Single and multiple visual systems in Arthropods. - J. Gen. Physiol., 51 (2) : 125.

Washizu, Y. (1964). Electrical activity of single retinula cells in the compound eye of the blowfly Calliphora erythrocephala. Meig. Comp. Biochem. Physiol., 12 : 369-387.

Waterman, T.H. (1961). The Physiology of Crustacea Sense organs, integration, and behaviour. Academic Press., New York, London, 11.

Waterman, T.H., and K.W. Horch. (1966). Mechanism of polarized light perception. Science, 154 (3748) : 467-475.

Welsh, J. H. (1934). The caudal photoreceptor and responses in the crayfish to light. J. Cell. Comp. Physiol., 4 : 379-388.

Welsh, J. H. (1939). The action of eyestalk extracts of retinal pigment migration in the crayfish Cambarus bartoni. Biol. Bull., 77 : 119-128.

Welsh, J. H. (1941). The sinus glands and 24 hours cycles of retinal pigment migration in the crayfish. J. Exp. Zool., 86 : 35-49.

Wiersma, C.A.G. and T.Yamaguchi, (1966). The neuronal components of the optic nerve of the crayfish, as studied by single unit analysis. J. Comp. Neurol., 128 : 333-358.

Wilkins, M.B. (1959). An endogenous rhythm in the rate of CO<sub>2</sub> output of Bryophyllum l. Some preliminary experiments, J. Exp. Bot., 10 : 377-390.

Winfrey, A.T. (1967). Biological theory and the behaviour of populations of coupled oscillators. J. Teor. Biol., 16 : 15-42.