

11261
lej
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO DEL POTENCIAL DE RECEPTOR EN
CELULAS RETINULARES DE ACOCIL DURANTE
EL NICTAMERO

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)

P r e s e n t a

Jesús Gerardo Hernández Falcón

FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1984



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 está 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.

INDICE

RESUMEN	1
Introducción	1
Características de los ritmos circádicos	1
Ritmos circádicos en crustáceos, en especial en el acocil	7
El sistema visual de los artrópodos	9
a) Aparato dióptrico	9
b) Pigmentos oculares	9
La glándula sinusal	11
El ojo del acocil	14
a) Aparato dióptrico y pigmentos retinianos accesorios	14
b) El fotorreceptor	16
Resumen	24
Hipótesis	26
Material y Método	28
i) Análisis de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados (potencial de receptor) durante el ciclo de veinticuatro horas	28
ii) Estudio de la potencia del extracto de tallo ocular sobre la pseudopupila en el animal íntegro durante el ciclo de veinticuatro horas	31

iii) Efecto del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados	33
Resultados	35
i) Análisis de respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados (potencial de recep - tor) durante el ciclo de veinticuatro horas	35
ii) Estudio de la potencia del extracto de tallo ocular sobre la pseudopupila en el animal íntegro durante el ciclo de veinticuatro horas	50
iii) Efecto del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados	55
Discusión	60
Conclusiones	71
Bibliografía	72

RESUMEN

El presente trabajo tiene por objeto contribuir a esclarecer el papel de los fotorreceptores en el origen del ritmo circádico del ERG así como la posible acción moduladora que sobre ellos pudiera ejercer la liberación periódica de HAL por la glándula sinusal.

En tallos oculares aislados, se midió el potencial de receptor -- (PR) de fotorreceptores visuales únicos. Se comprobó que la respuesta que muestran ante destellos de prueba es una despolarización con dos fases: una rápida, dependiente de la intensidad del estímulo, la transitoria, otra lenta que se puede asociar con la duración de la señal luminosa, la estable. La amplitud de estas dos fases se midió durante etapas sucesivas de adaptación a la oscuridad. Con los valores de cada fase obtenidos al aplicar destellos de prueba de características constantes, a intervalos de dos minutos, durante los treinta que seguían a una iluminación sostenida de diez minutos, se construían curvas de adaptación a la oscuridad que, en diferentes preparaciones, se repetían a intervalos de una hora durante el ciclo de veinticuatro.

Se comparó la capacidad de recuperación promedio de la respuesta de los fotorreceptores (CRP), obtenida de las curvas generadas por cada una de las fases. Los resultados mostraron que la CRP cambia a lo largo del día y es diferente en cada fase del PR, lo que puso de manifiesto que los fotorreceptores aislados conservan su capacidad oscilatoria aun cuando esta no presenta carácter circádico.

La liberación periódica de HAL se puso de manifiesto al inyectar ETO obtenido a diferentes horas del nictámero. El ETO se aplicaba siempre a las 6:00 p.m. en animales adaptados a la oscuridad, en los que se medía el tamaño de la pseudopupila; se encontro que la mayor reducción se produce cuando el ETO se preparó en la noche. Los efectos del ETO sobre la amplitud del ERG fueron comparables.

Cuando el ETO se aplicó directamente a los fotorreceptores adaptados previamente a la oscuridad no se encontró modificación alguna -- ni sobre la fase transitoria ni sobre la fase estable, lo que fue interpretado como indice de que las oscilaciones de los fotorreceptores son inherentes a los mismos y pueden contribuir a la oscilación circádica característica del ERG.

INTRODUCCION

Características de los Ritmos Circádicos

Los fenómenos biológicos de carácter circádico han sido observados desde muchos años atrás y desde hace más de dos siglos se han hecho experimentos que tratan de explicarlos. Se sabe que ciertos fenómenos -- diurnos periódicos no se alteran necesariamente por la interrupción experimental de la alternancia de luz y oscuridad o por altas y bajas temperaturas (Bünning, 1960). En 1729 el astrónomo De Mairan describió experimentos en los que colocaba plantas en oscuridad y temperatura relativamente constantes y observaba cambios periódicos en el movimiento de sus hojas. Las observaciones fueron confirmadas por Duhamel en 1758, en estudios realizados en cuevas.

Más tarde otros autores, entre los que se puede citar a De Candolle, Dutrochet, Sachs y Hofmeister, pusieron en claro que los movimientos de las hojas eran causados por un ritmo diurno inherente controlado por la alternancia de luz y oscuridad. Aunque en un principio dudara de estos resultados, Pfeffer, en 1873 y en 1875 los confirmó con sus propias observaciones aun cuando siempre consideró a los ritmos como un efecto secundario (residual o posterior) a la alternancia previa de luz y oscuridad. Estudios posteriores del mismo autor en 1915 hechos en Phaseolus sp. y Calendula sp. pusieron de manifiesto la importancia que tienen los cambios ambientales sobre la actividad cíclica de estas estructuras.

A pesar de éstos y otros experimentos que apuntaban ya hacia un posible origen endógeno de los ritmos, durante las dos primeras décadas -

de este siglo, hubo varios intentos por localizar un "factor X" que se suponía causante de la periodicidad diurna en procesos fisiológicos bajo condiciones constantes de luz y temperatura. Sin embargo sólo se pudieron encontrar reguladores externos de la periodicidad.

Una observación constante en los fenómenos periódicos fue que estos se presentaban cada veinticuatro horas siempre y cuando estuvieran regulados por la alternancia luz - oscuridad (Bünning, 1960; Aschoff, 1960); en condiciones constantes de luz u oscuridad, el ritmo se desvía del período de veinticuatro horas. Debido a esta circunstancia se habla de ritmos "circádicos", es decir ritmos que tienen un período cercano a veinticuatro horas y que puede variar en algunas horas en uno o en otro sentido (Halberg, 1954).

Es evidente que el estudio de los ritmos circádicos hubo de abarcar no sólo a los vegetales; desde 1894, Kiesel describió la persistencia de los ciclos de pigmentación de algunos artrópodos en ausencia de la alternancia de luz y oscuridad. Al mismo tiempo que Kleinhoonte encontraba que podía adelantar o atrasar la fase del ritmo de movimiento de las hojas con un pulso de luz, Forsgren, Beling, Kalmus y Welsh, describían diversos ritmos en animales; tan variados como el del glucógeno en el hígado, el "sentido del tiempo" en las abejas o el de la migración de pigmentos en los crustáceos.

Cabe señalar en este momento que son dos los problemas más grandes a resolver en el estudio de los ritmos circádicos: su origen y sus mecanismos de operación. Ambos aspectos han sido abordados desde muchos puntos de vista y en gran variedad de organismos vivos. A principios de este siglo los estudios de la ritmicidad circádica se hicieron sobre todo

en vegetales; es a partir de los años treinta que los animales empiezan a ser estudiados y entre ellos los insectos y los crustáceos resultan ser buena fuente del conocimiento sobre tal fenómeno. En lo que respecta al origen de los ritmos han prevalecido dos corrientes de pensamiento; por un lado el ritmo circádico ha sido considerado como el resultado de la acción de distintos factores externos sobre el organismo que lo presenta (Stoppel, 1910). La idea central de esta corriente se puede resumir diciendo que los ritmos son exógenos, ya que, como resulta imposible aislar totalmente al organismo de todas las influencias externas, resulta también imposible demostrar su endogenicidad. Sin embargo buen número de estudios ha apuntado hacia el carácter inherente de los organismos a presentar cambios periódicos endógenos. Así, larvas de insectos que han permanecido en la oscuridad durante largos períodos, --- muestran capacidad oscilatoria desencadenada por un estímulo luminoso; más aún, la capacidad de oscilación persiste en larvas que se mantienen en oscuridad constante durante quince generaciones sucesivas (Bünning, 1960). Sin embargo aun aceptando un posible carácter endógeno en los ritmos quedan muchas dudas referentes a la forma como se genera la actividad circádica, que sólo la experimentación podrá aclarar en algún futuro no se sabe qué tan próximo.

Los mecanismos de operación de los ritmos sólo son abordables en forma indirecta. Sin embargo, resulta más simple proponer un posible mecanismo de operación que un modelo que explique el origen de la ritmicidad, lo que ha llevado a que gran número de autores hayan dirigido su esfuerzo a caracterizar en forma sistemática los ritmos para, con esta base, proponer los posibles mecanismos de operación. En 1960 y en 1965,

aparecieron dos volúmenes en los que se reunió buena cantidad de información referente al aspecto de los ritmos que ahora analizamos. En ---- ellos Aschoff (1960) y Pittendrigh (1965) señalaron los requisitos que habría que pedirle aun ritmo para que se pueda catalogar como circádico.

El primer aspecto a considerar es el carácter endógeno del ritmo, el cual se pone de manifiesto cuando un sistema sigue oscilando a pesar de haber sido colocado en condiciones relativamente constantes de, por lo menos, luz y temperatura. En esas condiciones los ritmos suelen presentar un período diferente al que muestran cuando actúan sobre ellos los factores externos mencionados y se dice que manifiestan su "frecuencia libre de oscilación" la que sólo se puede hacer evidente en registro ininterrumpidos durante siete o más días (Aschoff, 1960). Si el ritmo se detuvo o presentó un período totalmente alejado o exactamente --- igual a veinticuatro horas, se puede descartar el carácter circádico -- del mismo.

La segunda característica de los ritmos circádicos se relaciona -- con el efecto que ejerce la cantidad de luz que se aplique al sistema -- sobre la frecuencia de oscilación, la relación entre los tiempos de actividad y reposo (relación α/ρ) y el nivel de actividad de la estructura u organismo, según lo que se conoce como la regla circádica de Aschoff (Aschoff, 1960). Esta puede resumirse de la siguiente manera: --- "...puede afirmarse que la frecuencia de oscilación, la relación α/ρ y el nivel de excitación de una estructura viviente, se encuentran correlacionados de tal suerte que el cambio en uno de ellos altera en cierta medida los otros dos; los cambios, a su vez, dependen de la cantidad de

luz que recibe el sistema, de tal manera que los organismos diurnos aumentan la frecuencia, la relación α/λ y el nivel de excitación al recibir más luz, en tanto que los nocturnos reducen estos tres parámetros - ante la misma situación ambiental..." (Fuentes-Pardo, 1977).

Un tercer aspecto característico de los ritmos se refiere a su poca sensibilidad a los cambios térmicos, aun cuando no existe acuerdo entre los autores respecto a los mecanismos implícitos en esa baja sensibilidad a un factor tan importante en un elevado número de procesos biológicos. De hecho, lo que se ha encontrado es que el período, que es el parámetro básico a considerar en un proceso circádico, no parece verse afectado cuando los registros se hacen a distintas temperaturas. Sin embargo, esto no significa que los ritmos sean independientes de la temperatura sino más bien que presentan "mecanismos de compensación de los cambios térmicos" los cuales no han sido aclarados hasta ahora. También hay que hacer notar que si los cambios de temperatura se aplican en forma de "impulsos" o en forma periódica, pueden atrasar, adelantar e inclusive cambiar la frecuencia libre de oscilación de un ritmo, es decir son capaces de actuar como "sincronizadores".

Precisamente el ser "sincronizables" es otra característica importante de los ritmos circádicos. Esta propiedad se define como la capacidad de atrasarse o adelantarse debido a la aplicación de un cambio externo y puede llevar a un ritmo a modificar su frecuencia básica cuando se le aplica algún factor externo periódico. De todos los potenciales sincronizadores la luz y la temperatura han sido los más ampliamente estudiados y hay que hacer notar que el grado de sincronización que producen es muy variable.

Otra característica de los ritmos circádicos es la referente a la estabilidad que presentan ante una gran variedad de sustancias químicas, -- como narcóticos, estimulantes del crecimiento, antimetabolitos y en general ante cualquier clase de sustancia que actúe sobre ellos con excepción de algunas pocas entre las que se encuentran el óxido de deuterio y el alcohol etílico cuyos efectos se traducen en disminución de la frecuencia de oscilación en relación directa con la dosis aplicada.

Cuando un fenómeno periódico cumple con los criterios expuestos en los párrafos anteriores, puede ser considerado circádico lo que, sin embargo, no aclara un aspecto inherente a los mecanismos de acción de los ritmos que durante muchos años ha sido motivo de controversia entre los estudiosos del tema: la oscilación circádica, ¿es la expresión de la actividad periódica de una estructura "maestra" capaz de darle un sentido del tiempo a todo el sistema? Si la respuesta fuera afirmativa ello significaría que sólo los organismos íntegros poseerían la capacidad de oscilar, lo que parece no ser el caso si nos atenemos a la gran cantidad de información que hay acerca de porciones aisladas de organismos, tejidos, células e inclusive elementos subcelulares en los que se ha comprobado capacidad oscilatoria de carácter circádico. Estos hechos han llevado a plantear como alternativa el que los ritmos circádicos sean el resultado del acoplamiento de osciladores de frecuencia no necesariamente circádica, -- proposición que también presenta problemas importantes, como por ejemplo, el que la capacidad de oscilar se pueda, efectivamente, generalizar a todos los niveles de organización de la materia viva; el que los osciladores que se acoplan sólo lo hagan si tienen frecuencias relativamente próximas o si lo pueden hacer a pesar de poseer frecuencias muy distintas, y

sobre todo, el hipotético mecanismo de acoplamiento entre los hipotéticos osciladores del sistema.

Como se puede ver son muchos los problemas sin resolver en el campo de los ritmos circádicos. Sin embargo se tiene la confianza de que el uso de técnicas de estimulación y de registro cada vez más finas, el avance en los métodos de análisis de datos, el uso de modelos matemáticos, etcétera, contribuirán a un adelanto sustancial en un campo tan atractivo y difícil como es el del estudio de los mecanismos de acción de los ritmos circádicos.

Ritmos Circádicos en Crustáceos, en Especial en el Acocil.

El estudio de los ritmos circádicos en animales se ha profundizado en invertebrados y de éstos los insectos y los crustáceos han sido los más ampliamente utilizados. Así, Kalmus en 1934 observó un ritmo circádico en la actividad locomotora de Potamobius astacus, el que desaparece poco después de la remoción de los tallos oculares. En 1941, Roberts estudió también el ritmo locomotor de acociles del género Cambarus, observó que después de la sección de los tallos oculares, se presentaba una hiperactividad que se reducía notablemente después de la inyección de extractos de tallo ocular, por lo que postuló un control neuroendocrino sobre el ritmo circádico locomotor. Schalleck, un año después, puso de manifiesto la hiperactividad arrítmica que sigue a la sección de los tallos oculares o del tracto óptico del acocil; sus resultados le llevaron a postular un control neural sobre el ritmo circádico locomotor generado en los ganglios de los lóbulos ópticos. Cambios en el ritmo circádico locomotor del acocil asociados con las mareas, fueron descritos en 1957 por Guyselman. Un control hormonal sobre el mismo ritmo-

fue propuesto por Powell en 1965. En 1981 Fuentes-Pardo e Inclán describieron la relación que hay entre los ritmos locomotor y electroretinográfico del acocil Procambarus bouvieri, habiendo encontrado que entre ambos hay una relación de fase constante.

Además del ritmo locomotor se han estudiado otros cambios circádicos en el acocil. Bennit en 1932, describió un ritmo diurno en el movimiento del pigmento retiniano proximal; entre 1939 y 1941, Welsh detectó un ritmo en el diámetro de la pseudopupila y sugirió que se podría deber a la variación de la actividad de centros nerviosos, lo que provocaría, a su vez, una variación en la cantidad de hormona de adaptación a la luz (HAL) liberada de la glándula sinusal. Aréchiga y Wiersma (1969) describieron los cambios en la amplitud del electroretinograma y en la frecuencia de descarga de interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa. Aréchiga y Fuentes-Pardo (1970) demostraron la estrecha correlación que existe entre la posición de los pigmentos retinianos accesorios y la amplitud del electroretinograma a lo largo del nictámero. Aréchiga, Fuentes-Pardo y Barrera (1973) observaron que los cambios de amplitud del electroretinograma correspondían a un verdadero ritmo circádico con cambios en la periodicidad dependientes de la cantidad de luz que el animal recibiera. En 1976 Barrera-Mera describió cambios en los ritmos circádicos electroretinográfico y de los pigmentos accesorios, consecutivos a lesiones efectuadas en diferentes regiones del ganglio cerebroide. Al año siguiente Sánchez y Fuentes-Pardo describieron un ritmo circádico en la respuesta eléctrica a la luz del tallo aislado de E. acocil Procambarus bouvieri diferente, en algunos aspectos, al que se encuentra en el animal íntegro. Los autores propusieron la po-

sibilidad de que el ritmo circádico electroretinográfico sea el resultado de la acción de factores extrínsecos e intrínsecos a los fotorreceptores, los que, al oscilar e interactuar entre sí generarían la oscilación de la amplitud del electroretinograma. Parte del desarrollo experimental de esta tesis está orientada hacia la obtención de pruebas que permitan rechazar o aceptar esta idea.

El Sistema Visual de los Artrópodos.

a) Aparato Dióptrico

En 1889, Exner estudió el aparato dióptrico y los pigmentos visuales de los insectos. De estos estudios se originó la clasificación de los ojos de los insectos, que luego se extendería a los crustáceos, en dos grandes grupos: ojos por superposición y ojos por aposición. En los primeros el aparato dióptrico lo forman múltiples omatidias con rabdómeros cortos, lo que permite que se formen en la retínula muchas imágenes que se superponen. En los ojos por aposición las omatidias tienen rabdómeros largos y la imagen se forma en sólo un punto de la retínula. Es necesario señalar que hay ojos compuestos que pueden funcionar tanto por superposición como por aposición. El ojo del acocil pertenece a este grupo aunque funciona principalmente por superposición y sólo cuando está totalmente adaptado a la luz lo hace por aposición.

b) Pigmentos Oculares

En 1890, Stefanowska estudió los pigmentos oculares de los insectos y sus modificaciones por la luz. Lo mismo hizo Szczawinska en crustáceos. Entre 1891 y 1897, Parker realizó estudios sobre los ojos compuestos de los crustáceos, la migración de los pigmentos con los ciclos de luz oscuridad y la participación del sistema nervioso en esta migración. Por

su parte Exner y Stefanowska, hablan de un área de reflexión de la luz en la córnea, lo que más tarde (Parker, 1897) recibió el nombre de pseudopupila.

En 1930, Welsh describió un ritmo diario en los movimientos del pigmento retiniano accesorio de Macrobrachium. Estas observaciones fueron seguidas por las de Bennit (1932) quien encontró que el pigmento proximal del acocil Cambarus presenta también cambios periódicos aun en oscuridad constante. El ritmo diario de movimiento de los pigmentos se interpretó como consecuencia de los ciclos previos de luz y oscuridad así como de la participación de otros agentes estimulantes (Welsh, 1930). El mismo autor demostró que cuando se liga la base de los tallos oculares de Macrobrachium se detiene la migración del pigmento distal, lo que lo llevó a postular la participación de alguna hormona sobre la actividad de los pigmentos; sin embargo esta hipótesis fue cuestionada por Parker en 1932 al decir: "Como el latido cardíaco del vertebrado, la migración del pigmento retiniano parece ser un proceso esencialmente inherente a la célula pigmentaria, y estar bajo un cierto grado de control humoral o nervioso que a veces da la apariencia de ser originado solamente por este tipo de acción" (Parker, 1932).

Estos trabajos en Macrobrachium sugirieron que las células del pigmento distal del ojo son controladas por una sustancia que se encuentra en la sangre. También sugirieron que el sistema nervioso está involucrado de alguna manera en la persistencia de los movimientos diurnos de estas células pigmentarias. Estudios posteriores (Kleinholz, 1936; Welsh, 1939) mostraron sin lugar a dudas que por lo menos una hormona presente en los tallos oculares está relacionada con la activación de los pigmen

tos accesorios del ojo. Dos de las posibles fuentes de esta sustancia - activadora de pigmento son la glándula sinusal y el llamado órgano X. - Este parece ser el órgano que sintetiza y envía sus productos a aquella la cual actúa como un verdadero sitio de almacenamiento lo que la hace la principal fuente de activación (Welsh, 1941). Brown y colaboradores en 1952 reforzaron estos resultados y sugirieron la existencia de una - hormona de adaptación a la luz que participa en la regulación de la posición del pigmento retiniano distal. Inyectando extractos de tallos -- oculares, recientemente cortados, en animales adaptados a la oscuridad- se producía un cambio en la posición de los pigmentos distales hacia la posición de adaptación a la luz.

La Glándula Sinusal.

En 1928 Perkins y Köller describieron de manera independiente la - presencia de una sustancia en el extracto de tallo ocular con acción -- muy potente sobre los cromatóforos de Palaemonetes. Entre 1935 y 1938, - Brown y Kleinholz demostraron la participación de varias sustancias hor- monales en este grupo de animales.

En 1935 Hanström, diseñó experimentos con los que demostró que la- porción de tallo ocular con la que lograba activar los cromatóforos --- siempre contenía un tejido que él llamó "glándula sinusal", el que se - localiza entre la médula externa y la médula interna (Fig. 1). Similitu des entre la sustancia cromatofórica contenida en esa fracción y la in- termedia de los vertebrados fueron señaladas por Abramowitz (1936, --- 1938). Köller (1930) fue el primero en demostrar que las hormonas del - tallo ocular tienen otras funciones además del control de los cromatófo ros ya que los animales privados de los tallos oculares eran incapaces-

de depositar calcio en sus exoesqueletos en la misma cantidad que los normales, hecho que fue interpretado como el resultado de haber eliminado la fuente de una hormona reguladora de este proceso.

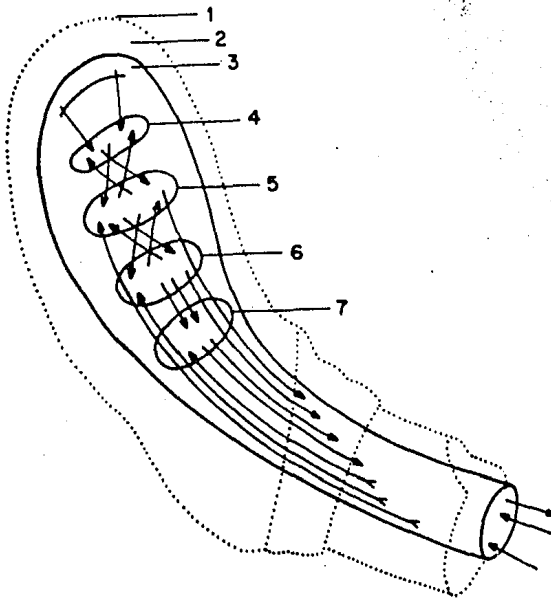


Figura No. 1.- Esquema de un corte longitudinal del ojo de un decápodo donde se muestra: córnea(1), capa dióptrica(2), capa de células retinulares(3), lámina ganglionar(4), médula(5), complejo lobular(6) y lóbulos ópticos(7). La glándula sinusal se localiza entre la lámina ganglionar y la médula. (Modificado de Waterman, T. H., 1979).

Otros estudios sobre la glándula sinusal demostraron cuáles son las funciones que se modifican por la acción de los extractos de tallo ocular. Welsh en 1937 observó que al perfundir un corazón expuesto de accil con extracto de tallo ocular había un pronunciado aumento en la frecuencia del órgano. Brown (1938) demostró que la extirpación de los tallos oculares acortaba en forma apreciable la vida del individuo y que este acortamiento se podía compensar, en parte, por la implantación de tejido del tallo ocular en el abdomen; a este efecto se le llamó de viabilidad. En 1939, Brown describió experimentos en los que demostró que la glándula sinusal elabora una sustancia que se relaciona con el control de la muda, probablemente inhibiéndola al mismo tiempo que confirmó los resultados previos sobre viabilidad. Es interesante hacer notar que el efecto de viabilidad no ha vuelto a ser estudiado después de los trabajos de Brown (1939) y que los estudios derivaron hacia el análisis de otras funciones que controla la glándula como la glucemia, el crecimiento ovárico, la posición de los pigmentos retinianos y el crecimiento de los gastrolitos, (Kleinholz, 1942; 1967).

Análisis histológicos e histoquímicos han puesto de manifiesto que la glándula sinusal no tiene en su seno verdaderas células secretoras, sino que a ella llegan terminaciones neurales que se encuentran cargadas de gránulos de secreción (Bliss, Durand y Welsh, 1954). Las zonas de origen de estas fibras neurosecretoras son los ganglios visuales, el ganglio cerebroide o supraesofágico y la cadena ganglionar, estructuras donde se han ubicado los somas correspondientes.

Si bien Welsh (1941) había propuesto que la hormona que participa en el fenómeno de adaptación a la luz tenía como fuente principal a la

glándula sinusal, otros trabajos (Kleinholz y cols, 1962; Kleinholz, 1966 a), mostraron que es todo el sistema nervioso el productor de la misma. Por su parte Heffington y Ashby (1967, 1968) realizaron estudios de microscopía electrónica de la glándula sinusal del acocil Procamburus clarkii y en las terminaciones nerviosas que llegan a la glándula identificó cuando menos cinco tipos de gránulos de tamaño, forma y densidad diferentes. Esto va de acuerdo con la hipótesis de Kleinholz (1966 a) sobre la existencia de seis o más hormonas diferentes almacenadas en la glándula sinusal.

Cuando la glándula sinusal se estimula eléctricamente se observa una reducción en el número de granulaciones de las terminaciones nerviosas (Heffington y Ashby, 1968), lo que indica que la estimulación produce la liberación de secreciones (hormonas) acumuladas. La aplicación de extractos de tallo ocular en animales íntegros y en tallos oculares aislados previamente adaptados a la oscuridad, provoca la disminución en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales (Vera, K., 1978). Fuentes Pardo y García en 1979 demostraron los efectos que, sobre la glándula sinusal, tiene la privación prolongada de luz sobre la posición de los pigmentos y la respuesta eléctrica a la luz del acocil; sus resultados muestran que la capacidad de liberación de productos almacenados en la glándula se afecta cuando al animal ha sido sometido a largos períodos de oscuridad lo que sugiere que el mecanismo responsable de la liberación es un reflejo en el que están implicados los fotorreceptores visuales.

El Ojo del Acocil.

a) Aparato Dióptrico y Pigmentos Retinianos Accesorios.

El ojo compuesto del acocil está formado por un conjunto de unidades, las omatidias, que se encuentran dispuestas en forma paralela al eje mayor del tallo ocular. Cada omatidia esta compuesta por las células retinulares de las que forman parte los rabdomeros los que al fusionarse forman el rabdomo o elemento fotosensible, el cono cristalino y la córnea. Las células retinulares descansan sobre la membrana basal.

Alrededor de los rabdomos y de los conos cristalinos, se encuentran las células pigmentarias accesorias (Eakin, 1971; Eguchi, 1965); estas células son de tres tipos: distales, proximales y de reflexión; en las dos primeras se encuentra un pigmento químicamente similar a la melánina y en las últimas el pigmento es del tipo de las guaninas y pteridinas (Kleinholz, 1966 b). La iluminación del ojo provoca que los pigmentos proximal y distal se aproximen entre sí cubriendo al rabdomo; en la oscuridad el pigmento distal se desplaza hacia la córnea y el proximal lo hace en sentido contrario quedando el rabdomo descubierto por lo que le llega la luz con más facilidad. En consecuencia, estos pigmentos influyen sobre la sensibilidad del ojo a la luz. Es esta migración de los pigmentos lo que permite los cambios de tamaño de la pseudopupila al incidir y reflejarse la luz sobre el pigmento de reflexión (Staven-ga, 1979). Una técnica que permite conocer con precisión la posición de los pigmentos y que es alternativa a la medición de la pseudopupila, es la mencionada por De Bruin y Crisp en 1957 y que consiste en la medición de los índices pigmentarios que, para cada pigmento, se derivan de la distancia que separa un nivel definido de la capa de pigmento de un nivel fijo en el ojo y se expresa como una fracción de la distancia desde la membrana basal hasta la superficie externa de los conos cristali-

nos. Los extractos de tallo ocular son capaces de inducir la migración de ambos pigmentos hacia la posición de adaptación a la luz siendo más sensible a la acción hormonal el pigmento distal que el proximal (Welsh, 1939). El pigmento de reflexión no presenta migración alguna.

b) El Fotorreceptor.

El rabdomo es el elemento fotosensible del ojo lo que ha sido confirmado por la presencia en él de un pigmento análogo a la rodopsina. Wald y Hubbard encontraron en 1967 que una fracción membranosa de las células retinulares de la langosta contenía una sustancia análoga a la rodopsina; Goldsmith en 1958 descubrió el retinal y Goldsmith y Warner en 1964 encontraron en la abeja la presencia de retinol. Las diversas investigaciones en artrópodos mayores (langostas y cangrejos cacerola) y en cefalópodos han llevado a la ubicación del fotopigmento en los rabdomómeros (Wald, 1967).

El rabdomo está constituido por la agrupación de los rabdomómeros -- (Fig. 2) que son prolongaciones de las siete células retinulares que se agrupan en el centro de la omatidia. Las células retinulares se encuentran dispuestas en forma concéntrica y los rabdomómeros se extienden hacia el centro de la omatidia en capas. Así en una capa son las células 1, 4 y 5 las que contribuyen a formar el rabdomo; en la siguiente son las células 2, 3, 6 y 7 las que lo hacen, aunque no se ha encontrado fusión de membranas o uniones especiales entre ellas (Eguchi, 1965; Eakin 1971).

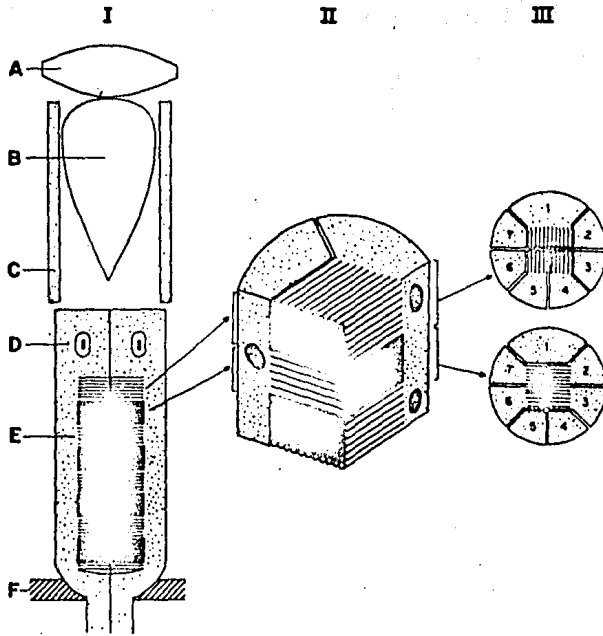


Figura No. 2.- Diagramas de una omatidia del ojo compuesto del acocil. I: corte longitudinal a través del eje óptico. Las estructuras que se muestran son: células corneógenas (A), cono cristalino (B), célula pigmentaria (C), célula retinular (D), rhabdomo (E) y membrana basal (F). II: diagrama estereográfico de una parte del rhabdomo. III: sección --- transversal de la retinula a nivel de dos capas vecinas; los números señalan a las células retinulares. Nótese la participación de las células 1, 4 y 5 en una capa y de las células 2, 3, 6 y 7 en la siguiente. (Modificado de Eguchi, E., 1965).

No todas las células retinulares tienen el mismo tamaño o forma -- (nótese en la figura 2 que la célula 7 es más pequeña que las otras) y -- según algunos autores sus respuestas desde el punto de vista eléctrico, podrían no ser iguales (Járvilheto, 1979). Eguchi, Naka y Kuwabara --- (1963), correlacionaron el desarrollo del rabdomo con la aparición de -- la respuesta eléctrica en el gusano de seda.

Es Hartline en 1928, uno de los primeros en estudiar las respues -- tas eléctricas a la luz de los ojos de insectos y crustáceos utilizando dispositivos análogos al electrocardiógrafo de Einthoven (Einthoven, -- 1908). Este mismo autor va más adelante en sus estudios y trabajando -- con ojos de Limulus registra la actividad de axones provenientes de só -- lo una omatidia (Hartline, 1932). De hecho la respuesta eléctrica que -- presentan ciertos ojos ante la estimulación luminosa ha sido estudiada -- desde mediados del siglo pasado, según Hartline y colaboradores (1952): "...Hace cien años Holmgren descubrió el potencial de acción de la reti -- na..." A lo que seguramente se refería Hartline es al electrorretinogra -- ma (ERG).

A diferencia del vertebrado, el ERG del crustáceo se considera de -- bido únicamente a la actividad de los fotorreceptores (células retinu -- lares) (Naka y Kuwabara, 1959); si bien esto podría ser una ventaja en -- el estudio del proceso de la fototransducción no es suficiente, pues se -- trata de una respuesta en el tiempo y en el espacio de un conjunto muy -- grande de células; evidentemente si se pudiera trabajar con sólo una cé -- lula tal vez sería posible comprender mejor el fenómeno. La introduc -- ción de las técnicas de registro intracelular a finales de la década de -- los cuarenta y principios de la de los cincuenta (Ferris, 1974), hizo --

factible que los estudiosos del proceso de la fototransducción además de complicarse un poco más la vida, avanzaran en forma importante en la comprensión de los mecanismos esenciales de este proceso. Son otra vez Hartline y sus colaboradores (1952) quienes por primera vez la utilizan en el estudio de la actividad visual de Limulus; perforaban la córnea del ojo lateral e introducían una micropipeta, cuya punta tenía un diámetro de una micra; de esta forma detectaron respuestas eléctricas a la estimulación luminosa tanto del tipo espiga como asociadas -- con despolarizaciones lentas.

El uso de un microelectrodo permite hacer la introducción en el ojo hasta profundidades conocidas y de esta manera relacionar el tipo de registro que así se obtiene con la zona de la que se recoge la respuesta. Así, Naka y Kuwabara en 1959 lograron disociar el origen de -- las diferentes partes del ERG en el ojo del acocil. El ERG del acocil consta de dos componentes: H-I y H-II; la primera aparece al inicio de la iluminación y la segunda se mantiene todo el tiempo que permanezca el estímulo. Cuando en el ojo de un acocil, se introduce un microelectrodo a diferentes profundidades, la forma del ERG cambia paulatinamente (Figs. 3 y 5). Si una vez retirada la córnea el electrodo se coloca en la superficie que resta, se obtiene un trazo que corresponde a H-II solamente (Fig. 3A); al descender el electrodo la amplitud de esta componente aumenta. La componente H-I aparece sólo si se hace descender más el electrodo y su voltaje va en aumento de acuerdo a descensos sucesivos. De manera simultánea la amplitud de la componente H-II va disminuyendo hasta que alcanza un valor mínimo o inclusive desaparece cuando el electrodo se coloca muy cerca o en la superficie de la cé

lula retinular (Figs. 3B, 3C y 5a, 5b y 5c). Al atravesar la membrana de la célula retinular se observa una brusca caída de potencial del orden de los 40 mV. Esto nos indica que hemos penetrado una célula retinular cuyo potencial de membrana es de este orden de magnitud. Si en estas condiciones se aplica un destello luminoso se registra un potencial de receptor el cual consta de dos fases: una despolarización rápida, transitoria, cuya magnitud parece depender de la intensidad del estímulo, seguida por una despolarización lenta, sostenida, la cual se ha asociado con la duración del estímulo luminoso (Figs. 3D y 5d). Por lo general se les designa como fases transitoria y estable respectivamente.

En la mayoría de los invertebrados, la respuesta a la luz de las células visuales consiste de una despolarización, en tanto que en los fotorreceptores de los vertebrados lo que se obtiene es una hiperpolarización (Davis, 1961; Järvilehto, 1979). Entre los invertebrados, la forma del potencial de receptor es esencialmente la misma, aunque en algunos casos el potencial puede estar acompañado de una respuesta de tipo-espiga además de las fases transitoria y estable, como sucede con la célula excéntrica de Limulus y con los fotorreceptores visuales del zángano (Järvilehto, 1979; Bader y Cols., 1976; Baumann, 1968; Naka y Eguchi 1962).

Dos son las especies en las que más se ha estudiado el potencial de receptor: Limulus y Apis mellifera. Con base en estos estudios se ha podido asociar la fase transitoria con un cambio en la conductancia de la membrana celular por lo menos para el ion sodio, producido por la activación del fotopigmento (cambio de la forma 11-cis a la forma todo-trans). Por otra parte la fase estable parece desencadenarse como conse

cuencia de la transitoria y en ella el ion más importante es el calcio-- el que parece ocupar los sitios que antes ocupaba el sidio, igual que -- parece ocurrir en otras estructuras neurales (Bader y cols., 1976; Brown y Blinks, 1974; Bullock y cols., 1977; Kuffler y Nichols, 1976; Fulpius- y Baumann, 1969; Lisman y Brown, 1975). Aunque el sodio es el ion más im- portante en la aparición de la fase transitoria, aún no hay acuerdo so- bre el papel que desempeñan en ésta otros iones, en especial el calcio,- pues algunos autorès no han podido descartarlo como acarreador de corri- ente (Bader y cols., 1976; Fulpius y Baumann, 1969). Se ha comprobado -- que un estímulo de larga duración mantiene una despolarización sostenida cuya magnitud se ajusta a lo establecido por Weber y Fechner para la --- adaptación de un receptor (Glantz, 1968), lo que significa que la ampli- tud de la fase estable ante un estímulo sostenido va disminuyendo debido muy probablemente a la acción del calcio dentro de la célula fotorrecep- tora (Bader y cols., 1976; Fulpius y Baumann, 1969). Al emplear técnicas de microinyección por presión o de aplicación de calcio por microiontofo- resis, con el uso de quelantes de calcio o de sustancias luminiscentes - sólo en presencia del calcio como la ecurina (Brown y Blinks, 1974; Lis- man y Brown, 1975), se ha llegado a la conclusión que no parece dejar lu- gar a dudas de que la concentración intracelular de calcio aumenta duran- te la fase estable, se mantiene en niveles altos en el citosol durante - la iluminación, y durante la oscuridad disminuye debido a que el calcio- es retirado hacia el exterior o hacia depósitos intracelulares que lo -- mantienen fijo o lo que es lo mismo en forma no ionizada.

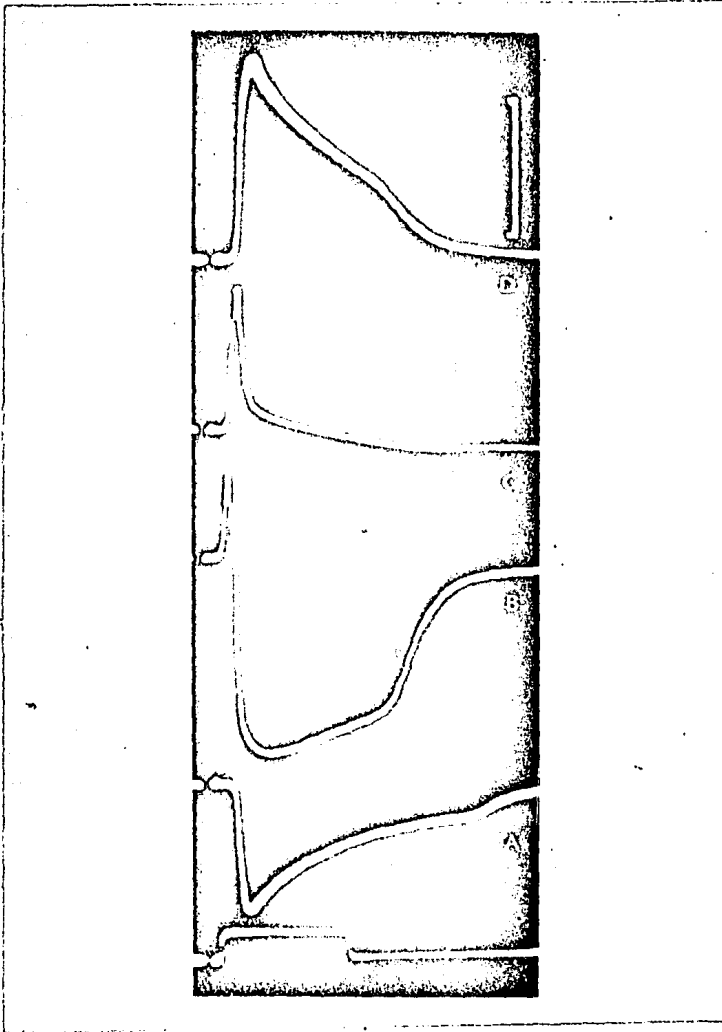


Figura No. 3.- Registros obtenidos con un microelectrodo insertado a diferentes profundidades del ojo del acocil: en la superficie sin córnea (A), a $100\ \mu$ de la córnea(B), a $300\ \mu$ de la córnea(C), después de atravesar la membrana de la célula retinular(D). Entre C y D hubo una caída de potencial de 35mV. Duración del estímulo luminoso: 250ms. Voltaje de referencia: 5mV. (Tomado de Naka, K. y Kuwabara, M., 1959).

Existe una fuerte controversia en cuanto a la participación de una bomba electrogénica en el desencadenamiento de la fase transitoria (Jarvilehto, 1979). En 1968, Smith y cols., propusieron que el potencial de receptor podría ser considerado como el resultado de la suspensión de la actividad de una bomba electrogénica. Este hecho sin embargo, está en contradicción con la falta de acción que tiene la ouabaina sobre el potencial de receptor de los fotorreceptores del zángano descrita por Baumann y Mauro en 1974.

La iluminación del ojo no solo modifica la estructura química del fotopigmento en el rabdomo (con sus consecuentes cambios en la permeabilidad de la membrana). Existe un buen número de evidencias que sugiere que la acción de la luz durante períodos prolongados, la aplicación de destellos únicos, e inclusive algunas modificaciones en la concentración extracelular de ciertos iones, son factores capaces de modificar la estructura de los componentes subcelulares de las células retinulares provocando, por ejemplo, la destrucción del arreglo de los microtúbulos, el aumento en el número y tamaño de los cuerpos multivesiculares, etcétera. (Eguchi, 1965; Eguchi y Waterman, 1967; Eguchi y Waterman, 1976; Horridge y Barnard, 1965).

Por otra parte si un ojo de crustáceo se mantiene en oscuridad --- constante o en iluminación tenue durante períodos prolongados, se puede comprobar que hay fluctuaciones de potencial las que se han designado con el nombre de "choques cuánticos" y se han relacionado con la absorción de un fotón, o de un cuanto de energía luminosa (Adolph, 1964; Borsellino y cols., 1968; Fuortes y Poggio, 1963).

Sobre la base de falta de fusión entre las membranas del rabdomo,

o lo que es lo mismo, ante la falta de un sustrato anatómico que hable de puentes intercelulares de baja resistencia entre la células retinulares, resulta interesante el hallazgo de Muller, de interacción eléctrica entre las células retinulares cuando son iluminadas con luz polarizada (Muller, 1973). Sin embargo hasta ahora son pocos los trabajos que permiten aceptar o rechazar con poco riesgo de equivocarse la posibilidad de interacciones de las células fotorreceptoras del ojo compuesto.

RESUMEN

De los datos anteriores tenemos, en resumen:

- a) El ojo del acocil es un ojo compuesto que funciona por lo general como un ojo por superposición, pero que en el estado de adaptación a la luz, puede trabajar como un ojo por aposición.
- b) En el ojo del acocil se encuentran dos tipos de células pigmentarias accesorias: las proximales y las distales.
- c) La posición de los pigmentos accesorios es la causa del tamaño de la pseudopupila, los pigmentos funcionan como pantallas que reflejan la luz durante el estado de adaptación a la oscuridad, moviéndose hacia la porción basal del rabdomo, lo que permite que la luz pueda ser reflejada por la capa de pteridinas y guaninas que está por encima de la membrana basal.
- d) Las células pigmentarias accesorias presentan migración circádica, migración que es posible detectar por el tamaño de la pseudopupila.
- e) Es posible también medir la posición del pigmento mediante el estudio histológico del ojo.
- f) El movimiento de los pigmentos accesorios resulta de la acción so-

bre ellos de la hormona de adaptación a la luz.

- g) Esta hormona es producida, al parecer, por todo el sistema nervioso del acocil y es almacenada en la glándula sinusal (Kleinholz, ----- 1966 a; Heffington y Ashby, 1967, 1968).
- h) La glándula sinusal no sólo almacena hormona de adaptación a la luz (HAL) sino también otros productos.
- i) La estimulación eléctrica de la glándula sinusal a frecuencia, voltaje y duración adecuados, produce depleción de la misma.
- j) Los extractos de glándula sinusal o de tallo ocular inyectados a -- acociles adaptados a la oscuridad, producen migración de los pigmentos accesorios hacia la posición de adaptación a la luz, efecto --- atribuible a la HAL.
- k) La potencia de los extractos de tallo ocular o de la glándula sinusal para provocar migración de los pigmentos accesorios, está directamente relacionada con la cantidad de hormona de adaptación a la luz almacenada.
- l) La estimulación luminosa del ojo produce un cambio de potencial que puede ser medido en registro extracelular (ERG) o intracelular (potencial de receptor).
- m) En la génesis del ERG participan únicamente los fotorreceptores.
- n) La magnitud del ERG depende del ciclo luz - oscuridad.
- ñ) Los ritmos circádicos parecen ser la expresión de la interacción de osciladores débilmente acoplados cuya frecuencia puede ser o no circádica. Es posible que la interacción se vea modulada por la acción del sistema nervioso, la del sistema endocrino o ambas.
- o) La magnitud del ERG se ve disminuída por la aplicación de extractos de tallo ocular.

HIPOTESIS

i) Dado que el ERG, el que depende sólo de la actividad de los fotoreceptores, presenta un ritmo circádico de amplitud cuando se registra en animal íntegro y un ritmo circádico modificado cuando se registra de tallos oculares aislados.

Entonces los fotorreceptores deben tener oscilaciones periódicas cuyo origen se podría situar dentro de la célula y que contribuirían al ritmo circádico del ERG del tallo ocular aislado. Estas oscilaciones deben poder apreciarse en el potencial de receptor.

ii) Dado que la aplicación de extractos de tallo ocular provoca una reducción de la pseudopupila siendo responsable de este efecto la HAL y la migración de los pigmentos sigue un patrón circádico.

Entonces la liberación de hormona de adaptación a la luz por parte de la glándula sinusal debe tener un ritmo circádico.

iii) Dado que el ERG se ve modificado por los extractos de tallo ocular debido a una acción que se ejerce en forma directa sobre los fotoreceptores. Entonces la hormona de adaptación a la luz debe influir sobre la actividad de los fotorreceptores visuales.

Para probar cada una de las hipótesis enunciadas, se procederá de la siguiente manera:

- Las oscilaciones en el potencial de receptor se pondrán de manifiesto mediante el registro de esta respuesta durante el ciclo de veinticuatro horas.

- La ritmicidad en la liberación de la hormona de adaptación a la luz desde la glándula sinusal quedará demostrada por la potencia de los extractos de tallos oculares para producir migración de los pigmentos acce

sorios hacia la posición de adaptación a la luz en animales previamente adaptados a la oscuridad, durante el ciclo de veinticuatro horas.

- La influencia de la hormona de adaptación a la luz en la actividad del fotorreceptor visual se pondrá de manifiesto por medio de las modificaciones que se observen en el potencial de receptor como consecuencia de la aplicación de extractos de tallo ocular de potencia conocida.

Los ritmos de respuesta de la glándula sinusal y de los receptores visuales pueden estar o no en fase al estudiarlos, como se pretende, por separado. Su existencia, sin embargo, pondrá de manifiesto la participación de diversos osciladores en la generación de un ritmo circádico: el del ERG del animal íntegro.

MATERIAL Y METODO

El trabajo se dividió en tres etapas:

i) Análisis de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores -- aislados (potencial de receptor) durante el ciclo de veinticuatro horas.

ii) Estudio de la potencia del extracto de tallo ocular sobre la pseudopupila del animal íntegro durante el ciclo de veinticuatro horas.

iii) Efecto del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados.

i) Análisis de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores- aislados (potencial de receptor) durante el ciclo de veinticuatro - horas.

La preparación biológica utilizada fue el tallo ocular aislado del acocil de la especie Procambarus bouvieri (Ortmann). Los acociles se -- mantenían durante un mínimo de tres días en sincronización con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas (12 : 12). Para extraer el tallo, se inserta ba una tijera de punta fina sobre el tejido blando, por detrás del tallo ocular y se efectuaba la sección a este nivel. Una vez seccionado el tallo se cortaba con una navaja fina la parte superior de la córnea procurando que la sección no fuera mayor al 50% de la esfera corneal y se colocaba en la oscuridad. Hecho esto se colocaba el ojo en una caja de Falcon y, bajo control microscópico, se insertaba un microelectrodo en la - porción libre de córnea, en el área central de la misma. A partir de este momento la preparación se dejaba en oscuridad constante. La caja de Falcon contenía 5 cm³ de solución de Van Harrevelde (Van Harrevelde, 1936)

previamente oxigenada y se colocaba dentro de una jaula de Faraday enegrecida a la que sólo le entraba luz por la parte superior (Fig. 4). -- Dentro de la jaula se encontraba el vástago de un portamicroelectrodo - al que se conectaba un microelectrodo de vidrio cuya punta tenía un --- diámetro de 0.2 μm , lleno con una solución de KCl 2.7 M, el que se ma -- nejava por medio de un micromanipulador (Prior, Mod. 55688). Dentro de la caja de Falcon se colocaba un electrodo de platino que servía para - cerrar el circuito. Se medía la resistencia de los microelectrodos en - solución de Van Harreveld y sólo se utilizaban aquellos cuyas resisten- cias tenían de 30 a 80 megohms.

El microelectrodo se conectaba a un preamplificador de alta impe - dancia (WPI, Mod. M701) y éste a un osciloscopio de rayos catódicos --- (Hewlett Packard, Mod. 1201B). Una caída de potencial del orden de los- 40 mV, indicaba que el microelectrodo se encontraba dentro del fotorre- ceptor; esto se comprobaba al aplicar un estímulo luminoso y obtener -- una despolarización (potencial de receptor). Una vez obtenido el poten- cial de receptor, se dejaba fijo el microelectrodo y se procedía a me - dir la respuesta del fotorreceptor a destellos de prueba de entre 10 y- 14 microsegundos de duración y del orden de 85 lux de intensidad, proce- dentes de un fotoestimulador Grass, Mod. PS22. En estas condiciones se- iluminaba con luz tenue la preparación durante diez minutos, lo que te- nía por objeto uniformar el estado inicial de los fotorreceptores. Una- vez terminado el período de iluminación, se dejaba la preparación en la oscuridad, la que sólo se veía interrumpida por destellos de prueba que se aplicaban a intervalos de dos minutos.

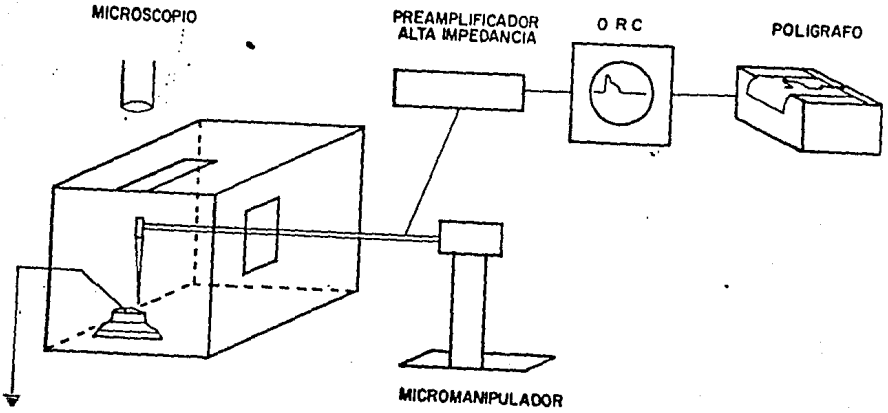


Figura No. 4.- Diagrama del dispositivo de registro utilizado para obtener la respuesta eléctrica de los fotorreceptores aislados del acocil. Para las aplicaciones de extracto de tallo ocular se hizo una perforación en la cara opuesta a la de entrada del vástago del microelectrodo, por donde entraba una cánula inyectora operada mediante un micromanipulador.

Con la aplicación de luz durante diez minutos, se obtenía una caída en la magnitud del potencial de la que el receptor se recuperaba durante su permanencia en la oscuridad (curva de adaptación a la oscuridad); esto significa que a cada destello de prueba la respuesta presentaba un -- crecimiento gradual. La etapa de recuperación se midió durante treinta - minutos.

La curva de adaptación a la oscuridad se obtenía de registros he - chos cada hora durante el ciclo del nictámero y al analizarla, se pusie - ron de manifiesto diferencias y semejanzas de algunas de sus caracterís - ticas principales. Así, se analizaba: el régimen y la magnitud de la -- caída del potencial durante los diez minutos de iluminación constante; - el régimen y la magnitud de recuperación del mismo durante los treinta - minutos de oscuridad; en algunas ocasiones se pusieron de manifiesto di - ferencias en la forma del potencial de receptor.

Una vez obtenidas las curvas y con el fin de hacer comparables los - distintos experimentos, los resultados se normalizaron haciendo su análi - sis con las técnicas estadísticas habituales. Por razones de homogeneidad en el análisis y en la interpretación de los resultados en todos los ca - sos sólo se emplearon pruebas de tipo paramétrico. Las pruebas utiliza - das fueron: la prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas; el -- Análisis de la Varianza para el modelo con un criterio de clasificación - y la prueba de Scheffé para comparaciones múltiples y contrastes.

ii) Estudio de la potencia del extracto de tallo ocular sobre la pseudo - pupila en el animal íntegro durante el ciclo de veinticuatro horas.

Durante esta etapa de la experimentación se trataba de poner de ma - nifiesto posibles cambios en la potencia de los extractos de tallo ocular

dependientes de la hora del día, para lo cual se procedía de la siguiente manera: Los tallos oculares necesarios para hacer las pruebas subsecuentes se seccionaban a las 6 p.m. y se colocaban en una cámara a temperatura controlada (14°C) y oscuridad constante. Con el objeto de que el análisis de la potencia del extracto no se hiciera durante la etapa tránsito - ría del posible ritmo circádico de los tallos oculares, éstos permanecían los dos primeros días en las condiciones constantes de temperatura y oscuridad ya descritas. A partir del tercer día empezaba la elaboración de -- extractos a una concentración de 10 tallos/cm³ a diferentes horas del día durante el ciclo de veinticuatro horas probándose su efecto sobre la migración de los pigmentos retinianos accesorios, la que se medía en forma indirecta por medio del área de reflexión de luz incidente sobre el ojo - (pseudopupila). Las determinaciones se hicieron siempre a la misma hora ya que se sabe que en condiciones normales la pseudopupila presenta también un ritmo circádico y no se quiso interferir con el mismo, como sucedería si se hubieran hecho determinaciones a cualquier hora del día.

El extracto de tallo ocular se preparaba siguiendo el procedimiento que a continuación se detalla: los tallos se extirpaban de la manera descrita en la sección precedente, se sumergían en solución de Van Harrevelde y se les quitaba la cubierta de quitina. El tejido libre de la porción -- pigmentaria se colocaba en 4 cm³ de acetona y se trituraban hasta que ésta se evaporara. Se agregaban a continuación 8 cm³ de cloroformo y se seguía moliendo hasta la evaporación del mismo. Por último, se aforaba con solución de Van Harrevelde para obtener la concentración de 10 tallos por centímetro cúbico. Una décima de centímetro se inyectaba a un acócil previamente sincronizado el que se fijaba mediante una pinza, en el interior

de una cámara oscura. Uno de los ojos se inmovilizaba colocando en su base un fragmento de algodón. A la cámara oscura sólo le entraba luz por la parte superior donde estaba colocado un microscopio estereoscópico. El animal estaba colocado de manera que se pudiera ver la pseudopupila y al mismo tiempo se tuviera acceso a la región ventral, a nivel de las patas ambulatorias, sitio en el que se inyectaba el extracto. Teniendo a la vista la pseudopupila, se contaba el número de facetas claras; posteriormente se iluminaba el ojo durante diez minutos al cabo de los cuales se contaba de nuevo el número de facetas claras; luego se mantenía en oscuridad constante sólo interrumpida por la luz que se aplicaba cada diez minutos y que permitía contar el número de facetas claras. Cuando el número de facetas claras había alcanzado un valor igual o mayor al control cuando menos en dos mediciones sucesivas, se inyectaba el extracto de tallo ocular en la porción ventral, entre el tercero y cuarto par de patas ambulatorias. Diez minutos después de inyectar el extracto se volvía a contar el número de facetas claras, repitiéndose la medición a intervalos iguales durante no menos de una hora.

iii) Efecto del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados.

Para estudiar el efecto de los extractos de tallo ocular sobre la actividad eléctrica de los receptores, se empezaba por obtener una preparación biológica en forma semejante a como se describió en la sección i) y por preparar el extracto de tallo ocular como se describió en la sección ii). Antes de aplicar el extracto a los fotorreceptores se aseguraba su potencia relativa aplicando una dosis de efecto conocido a un

acocil previamente adaptado a la oscuridad del que se medía la reducción de la pseudopupila consecutiva a la inyección del extracto, la aplicación de este a los fotorreceptores se hacía por medio de una cánula inyectora con una punta de 0.5 mm de diámetro, operada por un micromanipulador en una de las caras de la jaula de Faraday. Por ella se inyectaba 0.1 cm^3 de extracto de tallo ocular el que se elaboraba a las 12:00 horas y se aplicaba por las mañanas o por las noches, con intervalos de una hora entre las 12 y las 15 y las 24 y las 3 horas respectivamente. La inyección se hacía colocando, al iniciar el registro, la punta de la cánula sobre el área sin córnea, de manera que quedara exactamente arriba del sitio donde se colocaba el microelectrodo. Se dejaba en esta posición y se registraba el potencial de receptor durante los treinta minutos necesarios para obtener una curva de adaptación a la oscuridad. Una vez que el potencial de receptor se había estabilizado se inyectaba (en la oscuridad) el volumen de 0.1 cm^3 de la concentración que se deseara. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 0.1, 1, 2, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 tallos/ cm^3 . La velocidad de aplicación fue de $0.01 \text{ cm}^3/\text{s}$ y una vez terminada la aplicación, se seguían obteniendo las respuestas a la luz durante los siguientes veinte minutos.

Los resultados normalizados fueron analizados con las técnicas estadísticas utilizadas en la primera etapa.

RESULTADOS

- i) Análisis de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados (potencial de receptor) durante el ciclo de veinticuatro horas.

La respuesta eléctrica de los fotorreceptores a la estimulación lumi-
na en registros extracelulares, consta de un trazo bifásico (Fig. -
5) cuyas componentes H-I y H-II están relacionadas con la intensidad y
la duración del estímulo. Cuando el microelectrodo se hacía descender -
desde la superficie corneal hasta la superficie de la célula retinular,
se podía comprobar la presencia de las dos componentes lo que va de a -
cuerdo con los hallazgos de Naka y Kuwabara en 1959. La figura 5 mues -
tra un registro de este tipo obtenido con un microelectrodo de vidrio -
el que se hizo descender a tres profundidades diferentes (Fig. 5a, 5b y
5c) antes de que la punta del electrodo penetrara la célula retinular -
(Fig. 5d). Al atravesar la membrana de la célula retinular se presenta
la caída de potencial correspondiente al potencial de membrana el que -
en nuestros experimentos alcanzó valores de -34.89 ± 0.84 mV. Cuando se
comparan entre sí los valores promedio de este potencial no parecen ---
existir diferencias significativas asociadas a la hora del día (Fig. --
6).

La aplicación de un destello luminoso de intensidad y duración co-
nocidas provocaba en el fotorreceptor una respuesta consistente en un -
cambio de potencial en el que se podían observar dos fases: una despo-
larización inicial más o menos rápida llamada fase transitoria y una --
despolarización sostenida conocida como fase estable la que lentamente-
decae hacia una repolarización, evento que suele ser un poco más rápido

que la despolarización sostenida. Un potencial de receptor típico se ve con claridad en las figuras 5d y 7. En algunas ocasiones las células retinulares eran sometidas a dif... tiempo de adaptación a la oscuridad comprobándose que este hecho provoca aumento en la duración de la fase estable del potencial de receptor (Fig. 8).

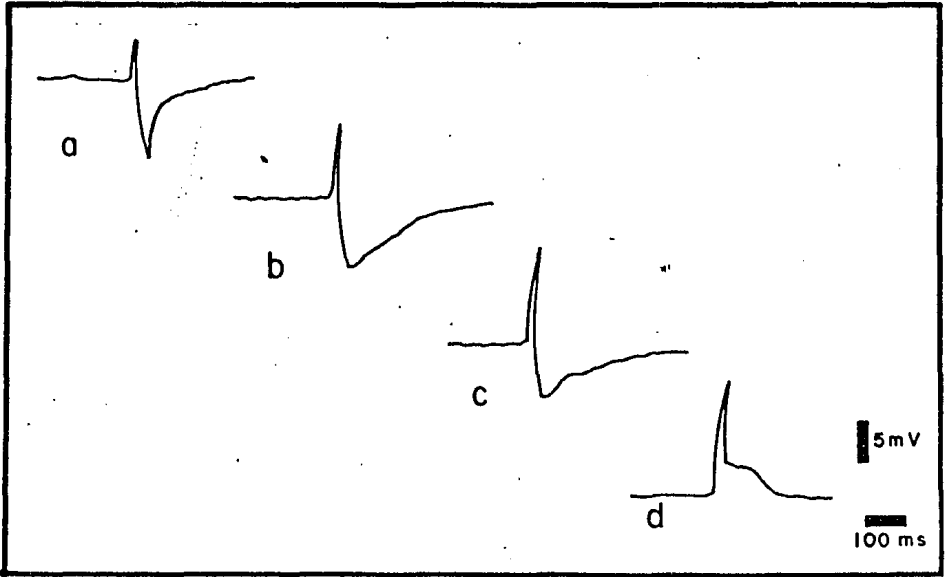


Figura No. 5.- Registros de la respuesta eléctrica del tallo ocular aislado ante estímulos luminosos de duración e intensidad constantes. -- El electrodo era colocado inicialmente en la superficie sin córnea (a) y se hacía descender en forma paulatina (b, c) hasta atravesar la membrana de la célula retinular y obtener un potencial de receptor típico (d). -- Entre los registros c y d hubo una caída de potencial de 40 mV.

Cuando se aplicaba luz durante un período de diez minutos se comprobaba que la amplitud del potencial de receptor en sus dos fases se reducía hasta cerca del 30% del valor original. Si inmediatamente después -- del período de iluminación el ojo se mantenía en oscuridad (excepto por los destellos de prueba) se observaba una recuperación en la amplitud -- del potencial de receptor la que después de dos minutos correspondía a un 70% en la fase transitoria y 90% en la fase estable. Las respuestas -- se seguían obteniendo cada dos minutos hasta completar treinta minutos -- de oscuridad. Al término de este período se había generado una "curva de adaptación a la oscuridad". Los resultados promedio de diez experimentos se muestran en la figura 9. A diferencia de lo que se observa durante la iluminación que parece afectar en forma semejante a las dos componentes -- del potencial receptor, la recuperación es claramente diferente durante -- la adaptación a la oscuridad ya que después de veinte minutos en esta -- condición la fase transitoria se recuperó 80% y la estable llegó hasta -- el 100% del valor original. En la figura 10 se muestran las respuestas -- control (Fig.10a), primera al término de la iluminación (Fig.10b) y vein -- te minutos después de iniciada la oscuridad (Fig.10c). La amplitud de -- la fase transitoria se midió considerándola como el cambio de potencial -- desde el valor del potencial de membrana hasta el pico máximo. Al obser -- var la figura 10c, se puede notar que la medición de la fase transitoria -- no representa problemas, lo que no ocurre con la fase lenta puesto que -- no siempre es claro en qué momento se inicia y por lo mismo, qué ampli -- tud tiene. Por ello se decidió hacer la medición de esta fase a un tiem -- po constante y dependiente de la fase transitoria. Se encontró que cuan -- do ha transcurrido tres veces el tiempo necesario para que la fase tran -- sitoria alcance el 63% de su valor máximo, la despolarización se encuen --

tra en fase estable. El método se ilustra en la figura 11.

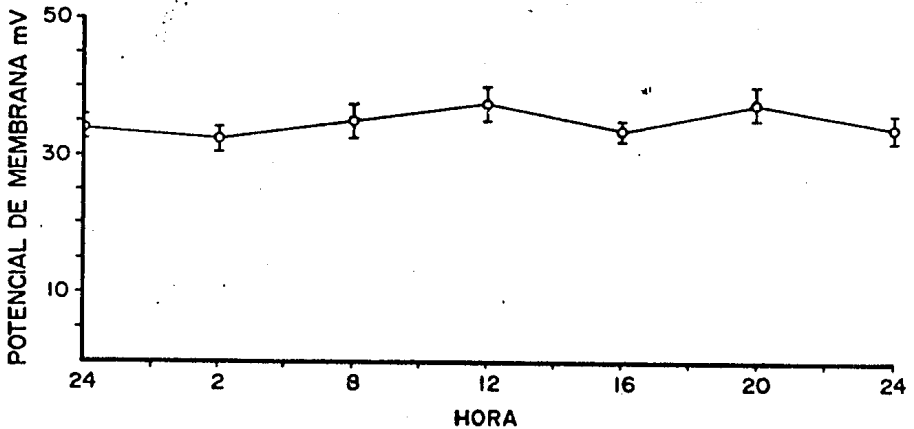


Figura No. 6.- Valores promedio del potencial de membrana a lo largo del ciclo de 24 horas. Cada punto representa el promedio de 15 experimentos. las barras verticales indican el error estándar.

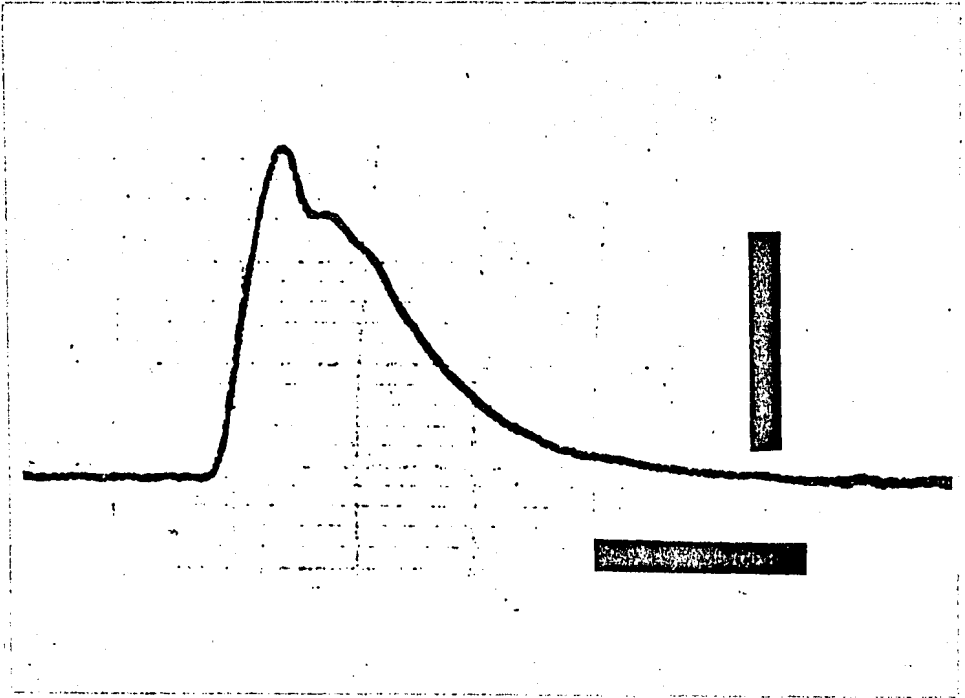


Figura No. 7.- Registro poligráfico del potencial de receptor en una célula retinular del acocil, ante un destello de $14 \mu\text{s}$ de duración y de 85 lux de intensidad. Nótese la diferencia de amplitud entre las fases transitoria y estable. Calibración: barra vertical 10 mV, barra horizontal 100 ms.

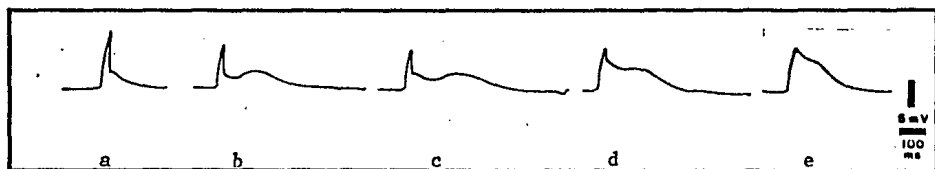


Figura No. 8.- Modificaciones en el potencial de receptor asociadas con la adaptación a la oscuridad. El ojo aislado del acocil se mantenía en oscuridad constante, sólo interrumpida por los destellos de prueba que se aplicaban cada dos minutos. Registros obtenidos antes de la iluminación sostenida. El primer registro (a) se obtuvo un minuto después de seccionar el ojo.

De esta manera se leían las amplitudes de las dos fases, se transformaban a milivolts y se normalizaban. El promedio de por lo menos diez experimentos permitía construir una gráfica como la que se muestra en la figura 9, haciéndose algo semejante para cada hora del día. Posteriormente se hizo la comparación estadística de las gráficas promedio.

Al comparar la forma y la amplitud de los potenciales no parece haber diferencias significativas relacionadas con la hora del día ($F=7.965$; G.L.=23; $p < 0.05$). Lo mismo ocurre cuando las gráficas promedio se comparan entre sí: no se encuentran diferencias importantes en lo que respecta a la amplitud o la velocidad de recuperación de la respuesta; sin embargo, cuando se analiza la capacidad de recuperación de los fotoreceptores se pone de manifiesto que hay cambios en ella relacionados con la hora del día. Para medir esta capacidad se promediaban las amplitudes del potencial de receptor después de los diez minutos de iluminación y cada dos minutos de los treinta que permanecía el ojo en la oscuridad. Los promedios de estas dieciseis lecturas se obtuvieron de cada hora del ciclo nictameral. Los promedios de recuperación se midieron por separado para la fase transitoria y la fase estable y los resultados de este análisis se muestran en la figura 12. En el caso de la fase estable se encontraron tres picos máximos a las 01, 06 y 14 horas ($F=5.225$; G.L.=23; $p < 0.05$). En el caso de la fase transitoria aunque también existen tres picos máximos, no se manifestaron con tanta claridad como los de la fase estable (la tabla 1 muestra los valores de la prueba de Sheffé para cada pico). Más aún, en algunos casos un pico es diferente a las horas que le anteceden, pero no a las que le siguen. A pesar de esto en la figura se pueden observar tendencias al aumento o a

la disminución en cuanto al porcentaje de recuperación promedio. En otra etapa del análisis, el ciclo de veinticuatro horas se dividió en periodos de cuatro y se compararon los valores agrupados tanto de la fase estable como de la transitoria (Fig. 13). En este caso se encontraron notables diferencias. En la fase transitoria se registraron dos picos máximos y tres picos mínimos. En la fase estable persisten los cambios que se habían observado. Sin embargo al comparar las dos gráficas se pone de manifiesto que los ciclos de las dos fases muestran un claro desacoplamiento entre ellos: cuando la fase transitoria aumenta hay una disminución en la estable y lo mismo ocurre cuando la estable es la que crece.

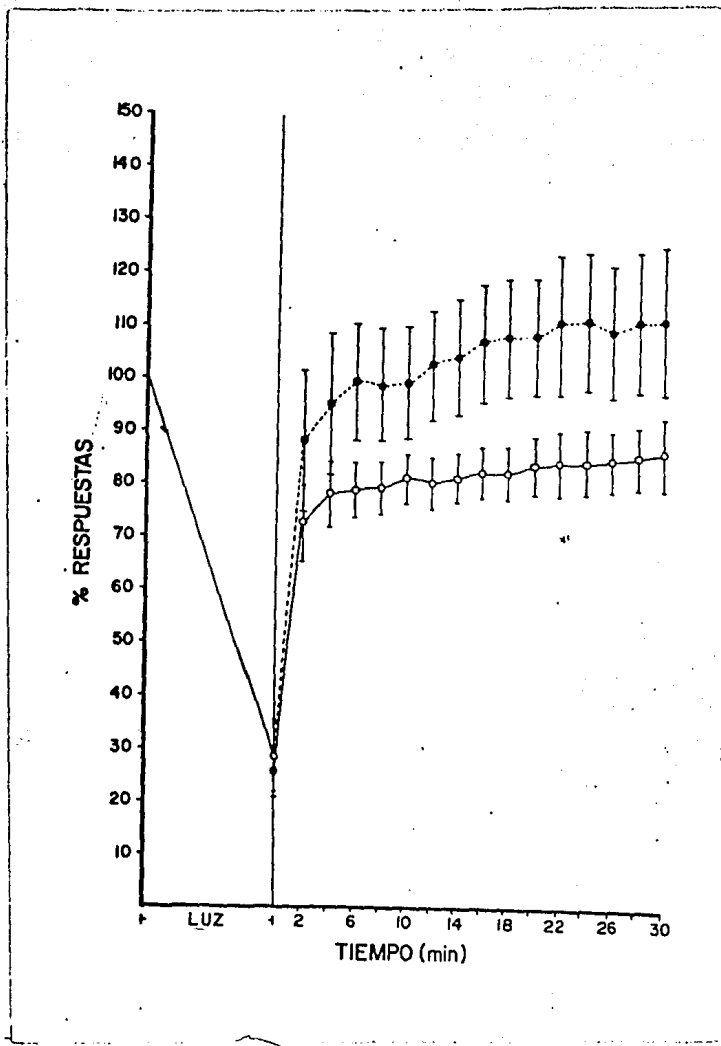


Figura No. 9.- Curva de adaptación a la oscuridad promedio obtenida de registros hechos a las 24:00 horas. En círculos oscuros se muestra el valor de la fase estable, en círculos claros los de la fase transitoria. Cada punto representa el promedio de por lo menos diez experimentos. Nótese que después de diez minutos de iluminación sostenida la magnitud de ambas fases cae alrededor del 70% del valor original. En la oscuridad la velocidad de recuperación para ambas fases es muy parecida pero la fase estable alcanza valores mayores a los iniciales.

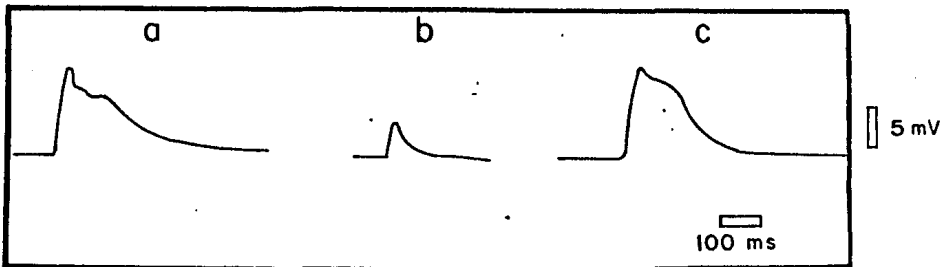


Figura No. 10.- Potencial de receptor obtenido en diferentes momentos de una curva de adaptación a la oscuridad. Respuesta control -- (a); respuesta después de diez minutos de iluminación tenue (b); respuesta veinte minutos después de iniciada la oscuridad (c).

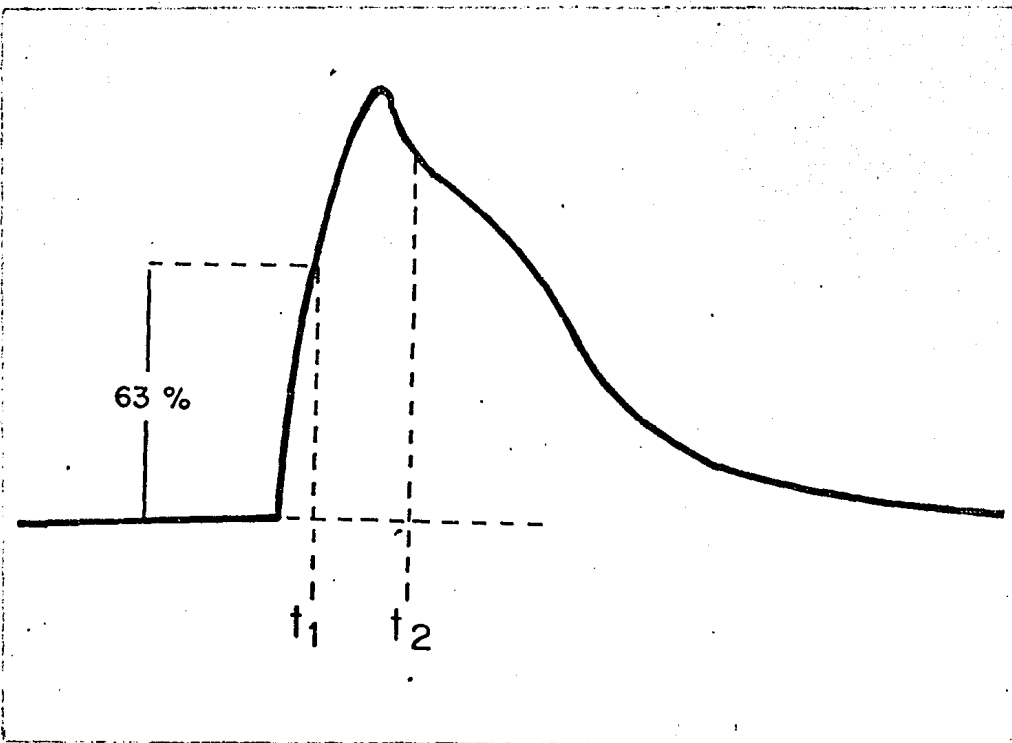


Figura No. 11.- Método de medición de las dos fases del potencial de receptor. El cambio de potencial desde el valor del potencial de reposo hasta el pico máximo es el valor de la fase transitoria. t_1 representa el momento en que se alcanza el 63% del valor máximo; t_2 representa tres veces el valor del tiempo t_1 que coincide con la amplitud máxima de la fase estable.

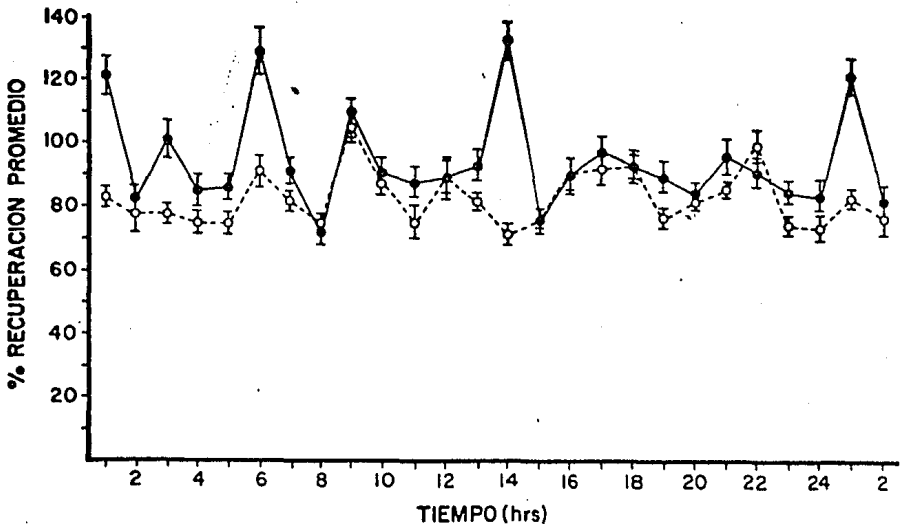


Figura No. 12.- Porcentaje de recuperación promedio de las dos fases del potencial de receptor. Círculos claros: fase transitoria. Círculos-oscuros: fase estable. Cada punto representa el promedio de diez experimentos. El porcentaje de recuperación promedio se obtenía sumando, para cada experimento y para cada hora, la amplitud desde la primera hasta la última respuestas y dividiéndolo entre el número de ellas. Nótese que -- las diferencias son poco significativas en el caso de la fase transitoria, no así en el de la estable.

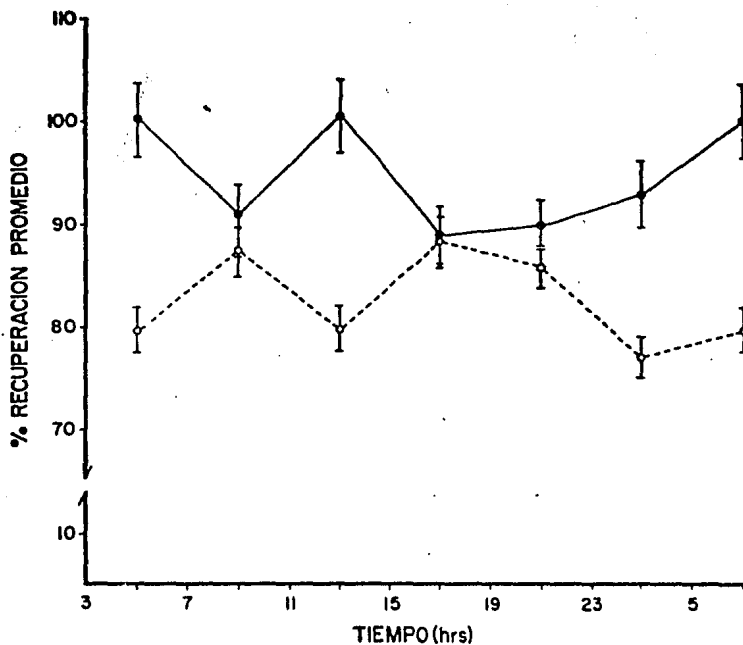


Figura No. 13.- Porcentaje de recuperación promedio de las dos fases del potencial de receptor, agrupando los valores en los intervalos de horas señalados en las abscisas. El método de cálculo de los valores promedio es el indicado en la figura 12. Círculos oscuros: fase estable. Círculos claros: fase transitoria. Las barras verticales indican el error estándar. Nótese el desfase entre ambas oscilaciones.

Tabla 1
Valores de la Prueba de Scheffé

Hora	24 : 00	01 : 00	02 : 00
SH	4.96		5.21
Hora	05 : 00	06 : 00	07 : 00
SH	5.75		5.00
Hora	13 : 00	14 : 00	15 : 00
SH	5.18		7.50

La igualdad de valores se rechaza, con una $p < 0.05$, cuando el valor de SH es mayor o igual a 5.9889. En la columna central se incluyen las horas pico. Aunque se compararon todos los valores obtenidos durante -- el nictámero, sólo se incluyen los resultados para cada hora pico y las inmediatas anterior y posterior. Para todas las horas $n = 16$.

ii) Estudio de la potencia del extracto de tallo ocular sobre la pseudo pupila del animal íntegro durante el ciclo de veinticuatro horas.

Al analizar el efecto del extracto de tallo ocular se encontró que su potencia relativa juzgada por la capacidad de llevar los pigmentos -- retinianos accesorios a la posición de adaptación a la luz, depende en forma importante de la hora del día a la que se obtenga el extracto. Así a las 6 p.m., en animales adaptados a la oscuridad después de haber recibido luz durante diez minutos, se medía el número de facetas claras ---- (pseudopupila) como índice de la posición de los pigmentos retinianos ac cesorios y una vez que éstos se habían adaptado a la oscuridad se inyectaba al acocil 0.1 cm^3 de extracto de tallo ocular obtenido a una cierta hora del día a una concentración de 10 tallos/cm^3 en solución de Van --- Harrevelde; se medía el porcentaje de reducción del número de facetas claras provocado por la inyección del extracto. De esta manera se encontró que extractos obtenidos a las 6:00 a.m. provocan en el animal íntegro -- una reducción promedio del 40% del número de facetas claras de la pseudo pupila de un ojo previamente adaptado a la oscuridad (Fig. 14) mientras que el valor de la reducción se incrementa a 80% cuando el extracto se obtuvo a las 12 a.m. (Fig. 15). A las 6 p.m. y a las 12 p.m. los efectos obtenidos fueron de 40% y 50% respectivamente (Figs. 14 y 22).

La aplicación de extractos de músculo no provocó ningún efecto ni -- sobre la posición de los pigmentos accesorios ni sobre el ERG (Fig. 16).

La acción de los extractos de tallo ocular también se puso de manifiesto en preparaciones de tallo ocular en las que se medía el electro -- rretinograma comprobándose que, de nueva cuenta la mayor reducción del --

ERG se obtenía cuando se aplicaba el extracto obtenido a las 12 a.m. -- (Fig. 14). Hay que hacer notar que en el tallo ocular aislado los pigmentos accesorios no parecen moverse a la posición de adaptación a la luz aun cuando se apliquen dosis comparables a las que sí provocan ---- efecto en el animal íntegro, lo cual fue interpretado como señal de que el extracto afecta directamente la capacidad de responder a la luz de los fotorreceptores visuales.

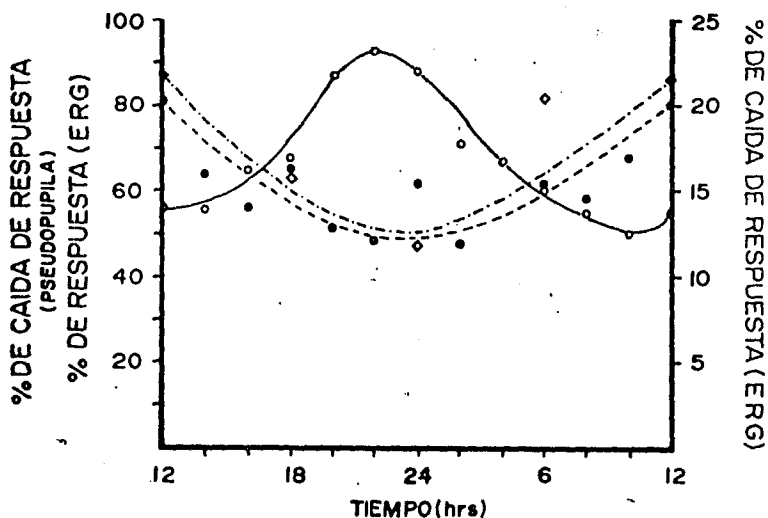


Figura No. 14.- Acción del extracto de tallo ocular sobre la pseudopupila (círculos oscuros) y sobre el electrorretinograma (rombos). Los extractos fueron preparados a las horas señaladas en las abscisas y se aplicaron siempre a la misma hora (6:00 p.m.). La mayor reducción en el tamaño de la pseudopupila y en la amplitud del ERG se obtiene al aplicar extractos preparados a las 12:00 a.m. y que el menor efecto se presentaba cuando el extracto se obtenía a las 12:00 p.m. En línea continua y círculos claros se indica la magnitud porcentual del ERG a lo largo del día.

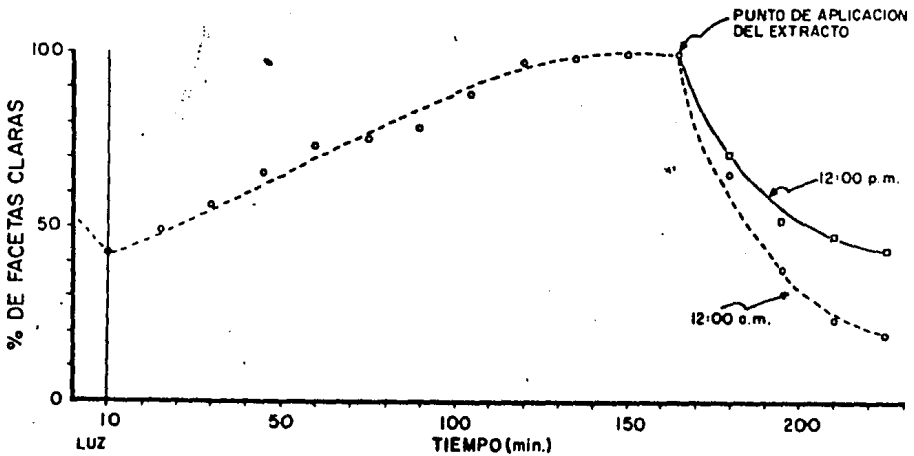


Figura No. 15.- Acción del extracto de tallo ocular sobre la pseudopupila. El 100% de la respuesta lo constituye el valor estable en el número de facetas claras que se observa después de diez minutos de iluminación sostenida. La flecha marca el momento de la inyección de extracto de tallo ocular (0.1 cm^3 , 10 tallos/cm^3) obtenido a las 12:00 p.m. (cuadrados) o a las 12:00 a.m. (círculos). Nótese que la reducción en el número de facetas claras es muy clara en los primeros diez minutos que siguen a la inyección y es mayor (mayor potencia del extracto) con el extracto obtenido durante el día que con el que se obtiene durante la noche. Experimentos únicos realizados a la misma hora del día (6:00 p.m.).

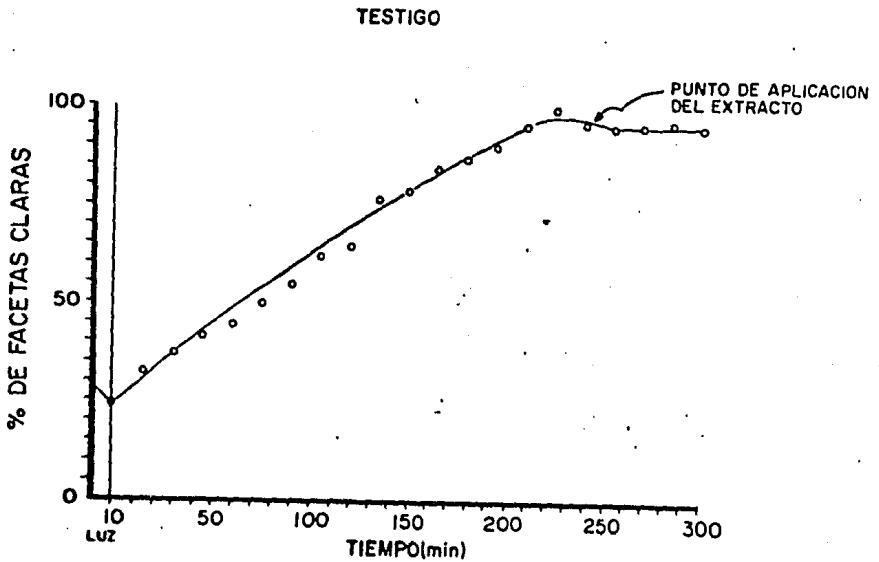


Figura No. 16.- Experimento que muestra la acción del extracto de músculo estriado sobre la pseudopupila. El método de obtención del extracto y de comparación de su efecto fue el mismo que el que se siguió para comparar la acción de los extractos de tallo ocular sobre los pigmentos accesorios. Nótese la ausencia de modificaciones en el número -- (porcentaje) de facetas claras.

ii) Efecto del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados.

Teniendo en cuenta que la mayor potencia de los extractos de tallo ocular en la disminución del tamaño de la pseudopupila se observa en preparaciones hechas a las 12:00 horas y que algo semejante se observa en el ERG, se procedió a probar el efecto que pudieran tener sobre el potencial de receptor utilizando para ello diferentes concentraciones del extracto obtenido siempre a esa hora. Las concentraciones utilizadas fueron de 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 80.0, 90.0 y 100 tallos/cm³ de solución de Van Harrevelde. La aplicación del extracto se realizó en experimentos efectuados entre las 24:00 y las 04:00 horas y entre las 12:00 y las 16:00 horas. Cabe mencionar que sólo en un caso se encontró disminución en la amplitud de la respuesta al inyectar el extracto a la concentración de 50 tallos/cm³. Sin embargo al repetir el experimento o utilizar concentraciones mayores, no hubo modificación alguna en ninguno de los parámetros que se midieron (Figs. 17 y 18). Al comparar las rectas control obtenidas mediante regresión lineal simple, con sus respectivas rectas problema, tanto para la fase transitoria como para la estable (Figs. 19 y 20), no se encontraron diferencias significativas desde el punto de vista de sus pendientes o de sus interceptos.

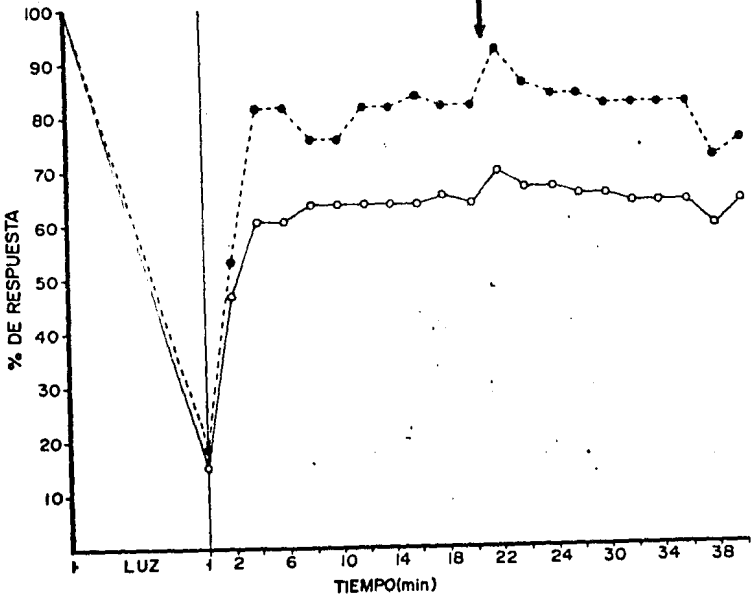


Figura No. 17.- Experimento que muestra la acción del extracto de tallo ocular sobre el potencial de receptor. Curva de adaptación a la-
oscuridad efectuada a las 12:00 p.m. Círculos claros fase transitoria;
círculos oscuros: fase estable. La flecha indica el momento de aplica-
ción (a través de una cánula) de 0.1 cm^3 de extracto de tallo ocular a
una concentración de 50 tallos/cm^3 , preparado a las 12:00 a.m. No hay
efectos sobre la amplitud de las fases a pesar de la elevada concentra-
ción del extracto. Obsérvese también que tampoco influye el momento de
la aplicación del extracto (ver Fig. 18).

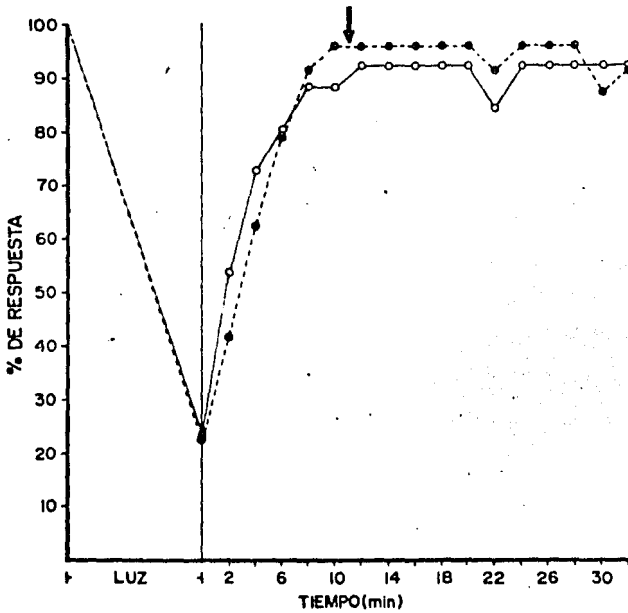


Figura No. 18. - Experimento que muestra la acción del extracto de tallo ocular sobre el potencial de receptor. Curva de adaptación a la oscuridad obtenida de experimento registrado a las 12:00 a.m. Círculos claros: fase transitoria; círculos oscuros: fase estable. La flecha indica el momento de aplicación (a través de una cánula) de 0.1 -- cm^3 de extracto de tallo ocular a una concentración de 50 tallos/ cm^3 , - elaborado a las 12:00 a.m. A pesar de la elevada concentración utilizada no hay ningún efecto en la amplitud de las fases.

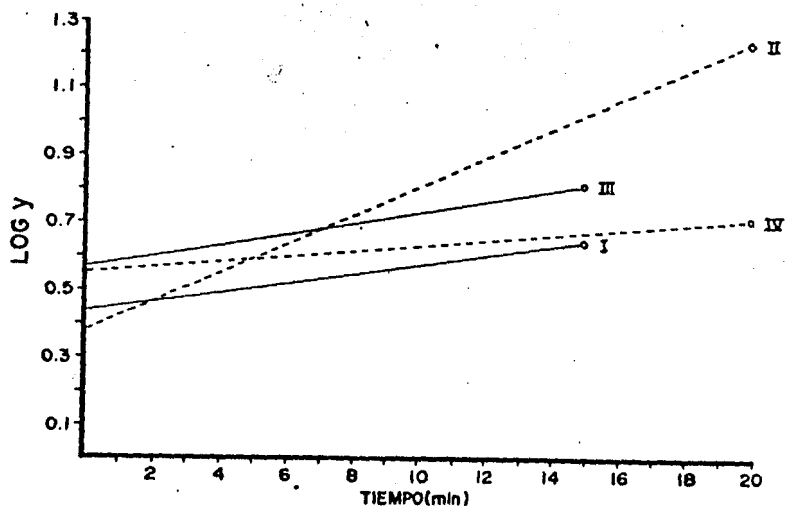


Figura No. 19.- Rectas teóricas promedio ajustadas de curvas de adaptación a la oscuridad para experimentos control (línea continua) y para experimentos con extracto de tallo ocular (línea discontinua) preparado a las 12:00 a.m. Círculos: fase estable; rombos: fase tránsito. Nótese la similitud entre las pendientes de III y IV y entre los valores de los interceptos. Aunque las pendientes de I y II son diferentes ($p < 0.05$) al hacer el análisis de varianza para comparación de pendientes se encontró que los interceptos no lo son. II y IV incluyen todas las concentraciones utilizadas. Las cuatro rectas corresponden a experimentos nocturnos (ver el texto).

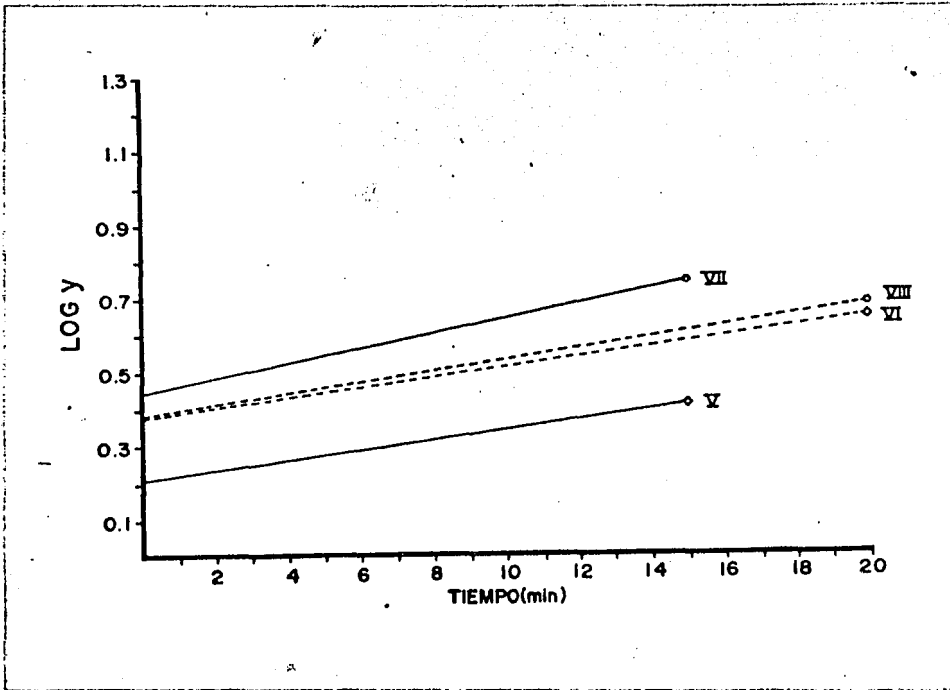


Figura No. 20.- Rectas teóricas promedio ajustadas de curvas de adaptación a la oscuridad para experimentos control (línea continua) y para experimentos con extracto de tallo ocular (línea discontinua) preparado a las 12:00 a.m. Círculos: fase estable; rombos: fase transitoria. Nótese la similitud entre las cuatro pendientes y entre los tres interceptos superiores (el intercepto de V es diferente al de VI, $p < 0.05$). VI y VIII incluyen todas las concentraciones utilizadas. Las cuatro rectas corresponden a experimentos diurnos (ver el texto).

DISCUSION

En los registros de actividad eléctrica de células fotorreceptoras se debe descartar la posibilidad de que la actividad provenga de cualquier otra estructura o región vecina. Para ello y ante la carencia de controles histológicos o de un acceso muy claro al sitio donde se encuentra el microelectrodo, se hace necesario el uso de por lo menos un criterio que indique que el electrodo se encuentra en la zona fotorreceptora. Sólo cuando se está en ella se puede obtener un potencial de receptor como respuesta a un estímulo luminoso con sus fases transitoria y estable (Naka y Kuwabara, 1959; Eguchi y cols., 1963); en ausencia de rhabdomo o fuera de la célula retinular no hay respuesta o ésta carece de sus componentes típicos. Por otra parte, al atravesar la membrana de la célula retinular se observa una caída de potencial, el potencial de membrana, lo que confirma que el sitio de registro es el correcto. Los potenciales que se registraron fueron semejantes a los obtenidos en crustáceos por otros autores, lo que permite afirmar que el trabajo experimental se realizó en células retinulares.

Nuestros resultados confirman las experiencias de otros autores en lo que respecta a la forma, magnitud y duración del potencial de receptor del acocil (Eguchi, 1965; Naka, 1961). Muy interesantes resultaron por otra parte, los datos obtenidos de la observación de la forma que suele tener el potencial de receptor en diferentes condiciones experimentales. Así, cuando el registro se hacía en células retinulares previamente sometidas a oscuridad, no sólo había cambios en la amplitud del potencial de acuerdo a lo que es de esperar de una estructura fotosensible, sino que ambas fases presentaban modificaciones en la forma -

y en la relación entre ellas; la más afectada fue la fase estable, sobre todo en lo que respecta a la duración la que se ve reducida cuando el estímulo luminoso se repite; es decir, la duración parece guardar -- una relación inversa con el tiempo de oscuridad previo. Esta interpretación coincide con los hallazgos de otros autores (Baumann, 1968; Fulpius y Baumann, 1969; Brown y Blinks, 1974) en diferentes especies. La relación entre la duración de la fase estable y el tiempo de oscuridad previa ha sido explicada en función de los niveles de calcio libre intracelular, los que serían mínimos o nulos en la oscuridad y están claramente incrementados durante la iluminación por lo que de alguna manera que aún no ha sido hasta ahora establecida, regularían la amplitud y la duración de esta fase.

El estudio de la actividad de los fotorreceptores aislados requiere que hasta donde sea posible el estado funcional de los mismos sea similar; sólo así las comparaciones podrán tener validez. Debido a ello es que sólo se trabajó con células que tuvieran un potencial de membrana no menor a -25 mV lo que aseguraba hasta cierto punto la posibilidad de que la respuesta fuera estable. Por otro lado no se compararon respuestas aisladas (Fig. 23) sino cambios ante diferentes situaciones experimentales. De esta manera el experimento se iniciaba cuando se -- aplicaban diez minutos de iluminación constante de baja intensidad, lo que permitía llevar a las células retinulares a un estado funcional semejante. Posteriormente se analizaba la capacidad de la célula para recuperar su respuesta original midiendo los cambios sucesivos de amplitud del potencial a partir del momento en que el ojo había permanecido en oscuridad constante. Fue esta la razón de las curvas de adaptación a

la oscuridad que aquí se presentan y mediante las cuales se determinó el estado funcional de los fotorreceptores durante los diferentes momentos del día (Fig. 9).

Que la capacidad de respuesta de los fotorreceptores del acocil depende de la hora del día se desprende de los trabajos que se han realizado sobre el ERG registrado en forma ininterrumpida durante varios días en el animal íntegro y en el tallo ocular aislado (Figs. 20 y 21). Como la respuesta electroretinográfica se ha asociado en forma exclusiva con la actividad de las células fotorreceptoras, y hasta ahora no ha habido argumentación alguna en contra, y como por otra parte en el tallo ocular aislado se ha descartado la participación de los pigmentos retinianos accesorios en la oscilación del ERG ya que la pseudopupila permanece paralizada, no resulta aventurado suponer que la oscilación tiene una componente importante representada por cambios periódicos en los fotorreceptores. El registro de la actividad eléctrica de sólo una célula retinular por períodos prolongados presenta dificultades de orden técnico que por el momento no tienen solución; sin embargo, el trabajar con poblaciones celulares relativamente grandes, aunque se trate de diferentes células procedentes de animales distintos, permite el manejo del problema desde el punto de vista estadístico. Así, a pesar de que en una primera aproximación no parecen existir diferencias en la respuesta o en la velocidad de recuperación de los fotorreceptores a una iluminación sostenida, la capacidad de recuperación promedio presenta diferencias que dependen de la hora del día y que son lo suficientemente grandes como para que las pruebas de estadística paramétrica las detecten. En el caso de la fase estable la homogeneidad de varianzas, demostrada por medio de la prueba-

de Bartlett, permitió aplicar un análisis de varianza para el modelo con un criterio de clasificación de suficiente confiabilidad. El uso de la prueba de Scheffé para comparaciones múltiples permitió identificar los grupos que se comportaron en forma diferente. El mismo procedimiento se aplicó para analizar la fase transitoria lo que puso de manifiesto diferencias significativas entre los grupos por lo que no parece haber dudas con respecto a la confiabilidad de los resultados. Los fotorreceptores aislados presentan entonces capacidad oscilatoria que evidentemente no es de carácter circádico ya que su período es menor a veinticuatro horas. Por otro lado el desacoplamiento entre las dos fases no es un artefacto y parece reflejar la independencia de por lo menos dos osciladores a nivel de membrana, cada uno perteneciente a distinto o distintos canales iónicos, los responsables de las dos fases del potencial de receptor.

Es evidente que estos resultados plantean más dudas que soluciones. Por ejemplo: ¿cuál es el mecanismo de acoplamiento entre estos dos osciladores? ¿qué determina la salida circádica que se obtiene cuando se registra la respuesta a la luz de grupos de fotorreceptores? ¿hay alguna relación de dependencia entre la fase estable y la transitoria? Este estudio no proporciona elementos que permitan contestar estas preguntas. Sin embargo se sugieren algunas respuestas por más que sólo tengan carácter tentativo. Es posible que el acoplamiento se lleve a cabo por la interacción de múltiples elementos entre ellos mismos. Esta interacción podría darse entre las células por medio de puentes de baja resistencia (Muller, 1973). Si bien es cierto que la frecuencia particular de cada oscilador no es circádica, del acoplamiento entre ellos emergería una --

salida "cercana a veinticuatro horas" debida a la acción moduladora de señales químicas, eléctricas, mecánicas, generadas en alguna región presente en nuestra preparación o en las células fotorreceptoras mismas. Desde el momento en que el tallo ocular queda separado del resto del organismo, es evidente que el acoplamiento entre los osciladores ya no es el mismo. Prueba de ello son los ciclos de alta frecuencia (con período de media hora) que encontraron Sánchez y Fuentes-Pardo (1977) en la preparación de tallo ocular aislado y que fueron interpretados como la expresión de osciladores que se desacoplaron al faltar en el tallo algunos elementos presentes en el animal íntegro. Bajo este punto de vista el acoplamiento de las fases del potencial de receptor podría ser el reflejo de las interacciones de osciladores de diferente frecuencia a nivel de membrana, tal y como los "miniciclos" podrían ser reflejo de la interacción de grupos de fotorreceptores oscilando a frecuencias mayores a la circádica

Más aún, la separación del tallo ocular del resto del animal hace evidente la existencia en el animal íntegro, de cuando menos un mecanismo de acoplamiento, entre grupos celulares que oscilan a diferentes frecuencias. Es posible que este hipotético mecanismo resida fuera del tallo ocular; sin embargo, como el ritmo circádico persiste en el tallo ocular aislado, debe haber mecanismos que actúan dentro del mismo aun cuando no sean del todo eficientes. Otra explicación plausible acerca de los mecanismos responsables del acoplamiento entre los osciladores, se tendría al considerar que la oscilación circádica resultaría de la interacción de grupos de elementos con capacidad oscilatoria muy variada los que al faltar parte del sistema (en el ejemplo que usamos, al --

seccionar el tallo ocular) cambiarían su patrón de respuesta ya que -- perderían parte de su organización inicial y, probablemente, establecerían nuevas relaciones en la organización actual. De las proposiciones anteriores resulta evidente que el ritmo circádico no queda determinado por estructuras generadoras bien localizadas, sino que más bien procede de interacciones entre osciladores los que podrían funcionar con frecuencias subarmónicas a la frecuencia circádica.

La actividad de la hormona que lleva los pigmentos a la posición de adaptación a la luz (HAL) es función directa de la concentración a la que se encuentre en la glándula sinusal. La acción relativa de los extractos de tallo ocular, juzgada por medio de la capacidad que tienen para reducir el diámetro de la pseudopupila de acociles adaptados a la oscuridad, depende claramente de la hora del día a la que se obtuvo el extracto (Fig. 14) lo cual va de acuerdo con las proposiciones de Welsh (Welsh, 1941) y de Bennit (Bennit, 1932) acerca de la presencia de un ritmo circádico en la posición de los pigmentos retinianos accesorios del acocil ya que ésta depende de la actividad de la HAL. Sin embargo se debe tomar en cuenta que la curva que se muestra en la figura 22 se construyó con los valores de actividad del extracto de tallos oculares aislados lo cual impide la obtención de registros circádicos, no obstante lo cual se puede asegurar que a pesar de la separación de los tallos oculares del resto del organismo, persiste en ellos la capacidad de producir mayor cantidad de HAL durante el día que durante la noche. Por otra parte, la potencia relativa de los extractos también se puso de manifiesto al analizar su acción sobre el ERG registrado en el tallo ocular aislado.

Se sabe que el extracto que contiene HAL es capaz de reducir la amplitud del ERG en una proporción que depende de la dosis que se aplique (Vera, K., 1978) y en una situación en la que los pigmentos se mantienen paralizados. En nuestros experimentos se puso de manifiesto que el ERG disminuye más cuando se aplican extractos de tallos oculares obtenidos a las 12 a.m. que a las 24 p.m. (Fig. 14), corroborándose así lo propuesto en el párrafo anterior acerca de la presencia de un ritmo circádico en la producción de HAL en los tallos oculares aislados del acocil.

El que haya mayor producción de HAL a las 12 horas del día, lo utilizamos como dato para asegurarnos que los fotorreceptores aislados recibieran una dosis relativamente elevada de esta hormona. Sin embargo, en ningún caso hubo en ellos algún cambio que se pudiera asociar con la HAL aplicada. La falta de respuesta por parte del fotorreceptor aislado a concentraciones muy altas de extracto de tallo ocular obtenido siempre a la hora en que hay máxima producción de HAL, no invalida los efectos observados con el ERG. El ERG es una respuesta compleja, producto de la interacción de multitud de células; el extracto de tallo ocular actúa en todas estas células y no es posible pensar que lo haga de la misma manera o en la misma magnitud cuando su acción se analiza en sólo un fotorreceptor. La acción difusa de la HAL puede ser la razón por la que a nivel de cada célula no se detectan cambios aun cuando éstos si se registren en un conjunto suficientemente grande de células, lo que significa que habría que aumentar el número de células registradas en forma simultánea hasta valores suficientemente grandes para que se pudiera detectar suma de efectos. En líneas anteriores se ha mencionado -

como posibilidad la existencia de mecanismos de acoplamiento o ajuste fuera del área del tallo ocular. Es posible que los haya no sólo dentro de esta área sino también en regiones intraoculares e intrarretinianas, y si bien el ERG se debe sólo a los fotorreceptores, podrían existir -- además, mecanismos de regulación y ajuste intrarretinianos que fueran -- los afectados por el extracto de tallo ocular; mecanismos de acción difusa que no es posible detectar por medio de registros unitarios.

Es evidente que el tema no está agotado y las preguntas latentes -- sugieren continuar trabajando en esta dirección con el objeto de abrir -- perspectivas que lleven a la mejor comprensión del origen de los rit -- mos circádicos en general y en particular del ritmo circádico electro -- rretinográfico del acocil.

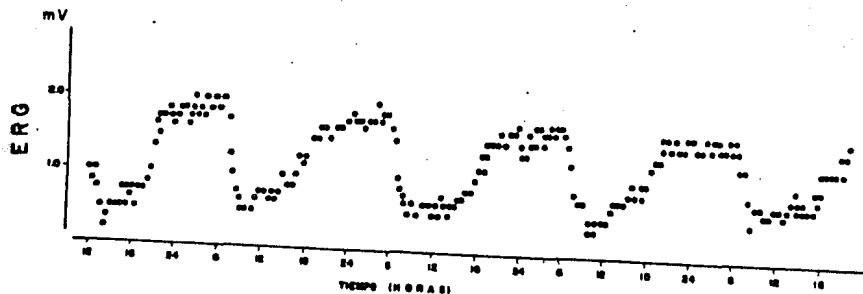


Figura No. 21.- Ritmo circádico electroretinográfico en el acocil íntegro. Animal mantenido en oscuridad y temperatura constantes. Nó - tense los cambios de amplitud en el electroretinograma ante destellos de prueba aplicados cada tres minutos. El pico de máxima amplitud se presenta alrededor de las 24:00 horas y el mínimo alrededor de las ---- 12:00 horas (Tomado de Moreno-Sáenz, E., 1981).

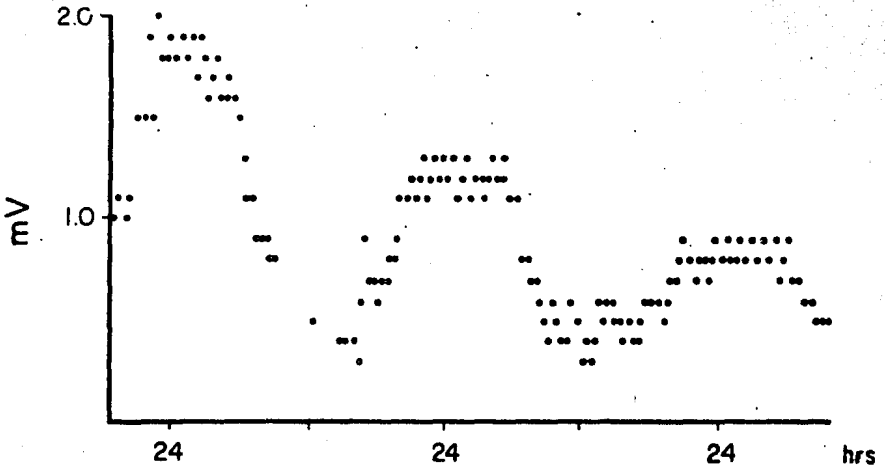


Figura No. 22.- Electrorretinograma de un tallo ocular aislado. - Nótese que la amplitud del ERG presenta un pico máximo alrededor de las 24:00 horas y uno mínimo alrededor de las 12:00 horas. Destellos de prueba aplicados cada tres minutos (Tomado de Verdugo-Díaz, L., --- 1982).

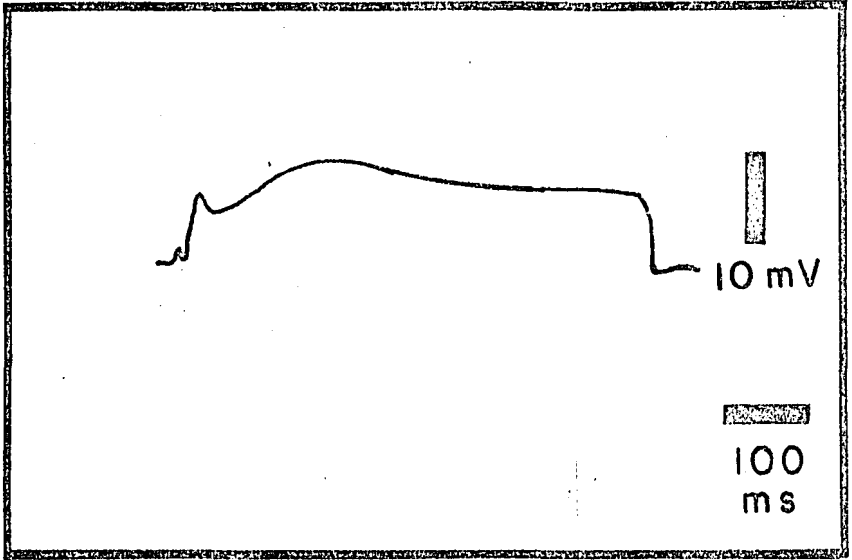


Figura No. 23.- Potencial de receptor atípico. Nótese la gran --
amplitud de la fase estable (1.5 veces mayor que la transitoria). Es-
te tipo de respuestas fue ocasional y no se incluye en el análisis.

CONCLUSIONES

- La capacidad de respuesta a la luz que poseen los fotorreceptores visuales aislados del acocil oscila a lo largo del día.
- La oscilación no es circádica; su frecuencia es mayor.
- La glándula sinusal libera mayor cantidad de hormona de adaptación a la luz durante el día que durante la noche.
- No parece haber acción significativa del extracto de tallo ocular sobre la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores aislados lo que apoya la posibilidad de que las oscilaciones que presentan estas estructuras tengan carácter intrínseco.

BIBLIOGRAFIA

- Abramowitz, A.A. (1936). The action of intermedin on crustacean melanophores and of the crustacean hormone on elasmobranch melanophores. Proc Natl. Acad. Sci. 22 : 521-523.
- Abramowitz, A.A. and Abramowitz, R.K. (1938). On the specificity and related properties of the crustacean chromatophoric hormone. Biol. Bull., 74 : 278-296.
- Adolph, A. (1964). Spontaneous slow potential fluctuations in the Limulus photoreceptors. J. Gen. Physiol., 48 : 297-322.
- Aréchiga, H. and Fuentes-Pardo, B. (1970). Correlative changes -- between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. The Physiologist., 13 : 137.
- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. and Barrera, B. (1973). Circadian rhythm in the visual system of the crayfish. In : --- Neurobiology of invertebrates. Edited by Sálánky. --- Tihany, Hungary., pp. 403-421.
- Aréchiba, H. and Wiersma, C.A.G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. J. Neurobiol., 1 : 71-85
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harbor. Symp. on Quant. -- Biol., 25 : 11-28.
- Bader, C.R., Baumann, F. and Bertrand, D. (1976). Role of intracellular calcium and sodium in light adaptation in the retina of the honey bee drone Apis mellifera (L.). J. Gen. Physiol., 67 : 475-491.
- Bader, Ch., Bertrand, D. and Perrelet, A. (1974). A pressure device for intracellular injection. Experientia., 30/11 : 1366-1367.
- Barrera-Mera, B. (1976). Effects of cerebroid ganglion lesions on electroretinographic circadian rhythm of the crayfish. Physiol. Behav., 17 : 59-64.
- Baumann, F. (1968). Slow and spike potential from reticular cells of the honeybee drone in response to light. J. Gen. - Physiol., 52 : 855-875.

- Baumann, F. and Mauro, A. (1974). Effets de l'hypoxie et de la ouabaine sur le potentiel recepteur de la cellule retiniene du faux-bourdon. *J. Physiol. (Paris)*, 69 : 187A.
- Beling, L. (1929). Über das Zeitgedächtnis der Bienen. *Z. vergl. Physiol.*, 9 : 259-338. Citado por Bünning, E. - (1960).
- Bennit, R. (1932). Diurnal rhythm in the proximal pigment cells-of the crayfish retina. *Physiol. Zool.*, 112 : 267- - 275.
- Bliss, D. E., Durand, J. B. and Welsh, J. H. (1954). Neurosecretory systems in decapod crustacea. *Zeitschr. F. --- Zelf. u. mikr. Anat.*, 39 : 520-536.
- Borsellino, A., Fuortes, M.G.F. and Smith, T.G. (1968). Respon - ses to single photons in visual cells of Limulus. *J.- Physiol.*, 196 : 507-539.
- Brown, F.A., Jr. (1935). Control of pigment migration within --- chromatophores of Palaemonetes vulgaris. *Jour Exper. Zool.*, 71 : 1.
- Brown, F.A. Jr. (1938). An internal secretion affecting viabili - ty in crustacea. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, 24 : - 551-555.
- Brown, J. E. and Blinks, J.R. (1974). Changes in intracellular - free calcium concentration during illumination in in - vertebrate photoreceptors. Detection with aequorin.- *J. Gen. Physiol.*, 64 : 643-665.
- Brown, F.A., Jr. and Cunningham, O. (1939). Influence fo the si - nus gland of crustaceans on normal viability and ec - dysis. *Biol. Bull.*, 77 : 104-114.
- Brown, F.A., Jr., Hines, N.M. and Fingerman, M. (1952). Hormonal regulation of distal retinal pigment of Palaemonetes. *Biol. Bull.*, 102 : 212-225.
- Bullock, T. H., Orkand, R. and Grinell, A. (1977). An introduc - tion to nervous systems. pp 130-176. W.H. Freeman - and Co. New York.
- Bünning, E. (1960). Opening adress: Biological clocks. Cold -- Spring Harbor, Sym. on Quant. Biol., 25 : 1-9.

- Davis, H. (1961). Some principles of sensory receptor action. -- *Physiol. Rev.*, 41 : 391-416.
- De Candolle, A.P. (1835). *Physiologie végétale*. Paris. Citado por Bünning, E. (1960).
- De Bruin, G.H.P. and Crisp, D.J. (1957). The influence of pigment migration on vision of higher crustacea. *J. Exp. Biol.*, 34 : 447-463.
- De Mairan (1729). *Observation botanique. Histoire de l'Académie Royale des Sciences*. Paris, Pág. 35. Citado por --- Bünning, E. (1960).
- Duhamel du Monceau. (1758). *La physique des arbres*. Vol. 2, pp. 158-159. Paris. Citado por Bünning, E. (1960).
- Dutrochet, H. (1837). *Mémoires pour servir à l'histoire des végétaux et des animaux*. Brussel, p. 237. Citado por -- Bünning, E. (1960).
- Eakin, R. (1971). Structure of invertebrate photoreceptors. In: *Handbook of Sensory Physiology*. Vol VII/I : 626-684. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Eguchi, E. (1965). Rhabdom structure and receptor potentials in single crayfish reticular cells. *J. Cell and Comp. Physiol.*, 66 : 411-430.
- Eguchi, E., Naka, K. and Kuwabara, M. (1963). The development of the rhabdom and the appearance of the electrical response in the insect eye. *J. Gen. Physiol.*, 46 : ---- 143-157.
- Eguchi, E. and Waterman, T.H. (1967). Changes in retinal fine structure induced in the crab *Libinia* by light and dark adaptation. *Z. Zellforsch.*, 79 : 209-229.
- Eguchi, E. and Waterman, T.H. (1976). Freeze-etch and histochemical evidence for cycling in crayfish photoreceptor membranes. *Cell. Tiss. Res.*, 169 : 419-434.
- Einthoven, W. (1908). *Weitres über das Elektrokardiogramm*. *Pflügers Arch.*, 122 : 517-584.
- Exner, S. (1889). *Durch licht bedingte Verschiebungen des Pigmentes in Insektenauge und deren physiologische Bedeutung*. *Ebenda.*, 983: 143-151. Citado por Parker, G.H. (1932).

- Ferris, C.D. (1974). Introduction to bioelectrodes. Plenum Press, 1st. Ed. New York.
- Forsgren, E. (1928). On the relationship between the formation of bile and glycogen in the liver of rabbit. Scand. Arch. Physiol., 53 : 137. Citado por Bünning, E. (1960).
- Fuentes-Pardo, B. (1977). Correlación entre los ritmos circádicos electroretinográfico y motor del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann). Tesis, Fac. Ciencias, U.N.A.M. --- México.
- Fuentes-Pardo, B. and García, M.C. (1979). Effect of the light --- deprivation on the neurohumoral activity of the visual system of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 64A : 549-555.
- Fuentes-Pardo, B. and Inclán, V. (1981). Analysis of the correlation between two circadian rhythms in the crayfish. --- Comp. Biochem. Physiol., 68A : 477-485.
- Fulpius, B. and Baumann, F. (1969). Effects of sodium potassium --- and calcium ions on slow and spike potentials in single photoreceptors. J. Gen. Physiol., 53 : 541-561.
- Fuortes, M. G.F. and Poggio, G.F. (1963). Transient responses to sudden illumination in cells of the eye of Limulus. J. Gen. Physiol., 46 : 435-452.
- Glantz, R.M. (1968). Light adaptation in the photoreceptor of the crayfish Procambarus clarkii. Vision. Res., 8 : 466- --- 483.
- Goldsmith, T.H. (1958). The visual system of the honey bee. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 44 : 123-126.
- Goldsmith, T.H. and Warner, L.T. (1964). Vitamin A in the vision of insects. J. Gen. Physiol., 47 : 433-441.
- Guyselmann, J.B. (1957). Solar and lunar rhythms of locomotor activity in the crayfish Cambarus virilis. Physiol. Zool., 30 : 70-87.
- Halberg, F. (1954). Temperature rhythms in blind mice. Fed. --- Proc., 13 : 65.
- Hanström, B. (1935). Preliminary report on the probable connection between the blood gland and the chromatophore activator in decapod crustaceans. Proc. Natl. Acad. Sci., 21 : --- 584-585.

- Hartline, H.K. (1928). A quantitative and descriptive study of the electric response to illumination of the arthropod eye. *A.J. Physiol.*, 83 : 466-483.
- Hartline, H.K. and Graham, C.H. (1932). Nerve impulse from single receptors in the eye. *J. Cell Comp. Physiol.*, 1: 277-295.
- Hartline, H.K., Wagner, H.G. and Mac Nichol, E.F. Jr. (1952). -- The peripheral origin of nervous activity in the visual system. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 17 : 125-141.
- Heffington, B.A. and Ashby, A.E. (1967). Ultrastructure of the sinus gland of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Gen. Comp. End.*, 9 : 334-342.
- Heffington, B.A. and Ashby, A.E. (1968). Ultrastructural changes in the crayfish sinus gland following electrical stimulation. *Gen. Comp. End.*, 10 : 376-382.
- Hofmeister, W. (1867). *Die lehre von der Pflanzanzelle*. Leipzig. Citado por Bünning, E. (1960).
- Horridge, G.A. and Barnard, P.B.T. (1965). Movement of palisade in locust retinula cell when illuminated. *Quart. J. micr. Sci.*, 106,2 : 131-135.
- Järvilehto, M. (1979). Receptor potentials in invertebrate visual cells. In : *Handbook of Sensory Physiology, Vision in Invertebrates*. Edited by : Autrum, H. Vol. -- VII/6A : 315-356. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Kalmus, H. (1934). Über die Natur des Zeigedächtnisses der Bienen. *Z. vgl. Physiol.*, 20 : 405-419. Citado por ---- Bünning, E. (1960).
- Kiesel, A. (1894). *Untersuchungen zur Physiologie des facettierten Auges*. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien.*, 97-139. -- Citado por Bünning, E. (1960).
- Kleinholz, L.H. (1936). Crustacean eyes-talk hormone and retinal pigment migration. *Biol. Bull.*, 70 : 159-184.
- Kleinholz, L.H. (1942). Hormones in crustacea. *Biol. Rev.*, 74 :- 278-296.
- Kleinholz, L.H. (1966a). Separation and purification of crustacean eyestalk hormones. *Am. Zool.*, 6 : 161-167.

- Kleinholz, L.H. (1966b). Hormonal regulation of retinal pigment - migration in crustaceans. In : The functional organi - zation of the compound eye. Edited by C. G. Bernhard - Pergamon Press, pp. 89-101.
- Kleinholz, L.H., Burguess, P.R., Carlisle, D.B. and Pflueger, O. - (1962). Neurosecretion and crustacean pigment hormo - ne: distribution of light adapting hormone. Biol. ---- Bull., 122 : 73-85.
- Kleinholz, L.H., Kimball, F. and McGarvey, M. (1967). Initial --- characterization and separation of hyperglycemic (dia - betogenic) hormone from crustacean eyestalk. Gen. and - Comp. Endocrinol, 8 : 75-81.
- Kleinboonte, A. (1929). Über die durch dans licht regulierten --- autonomen Bewegungen der Canavalia-Blätter. Arch. ---- néerl. Sci, ex. et nat. 11b, 5 ; 1-110. Citado por --- Bünning, E. (1960).
- Köller, G. (1928). Verusche über die inkretorischen Vorgänge beim Garnelenfarbwechsel. Zeitschr. Vergl. Physiol., 8 : - 601. Citado por Kleinholz, L.H. (1936).
- Köller, G. (1930). Weitere Untersuchungen über Farbweschel und -- Farbwachselhormone bei Cragnon vulgaris. Zeischr. ---- vergl. Physiol., 12 : 632. Citado por Brown, Jr. F. A. (1939).
- Kuffler, S.W. and Nichols, J.G. (1976). From neuron to brain. --- 3hrd. Printing, 1st. Edition, pp. 77-144. Sinauer ---- Assoc., New York.
- Lisman, J.E. and Brown, J.E. (1975). Effects of intracellular --- injection of calcium buffers on light adaptation in -- Limulus ventral photoreceptors. J. Gen. Physiol., 66 : 489-506.
- Moreno-Sáenz, E. (1981). Ritmo circádico en la respuesta eléctrica a la luz polarizada de los fotorreceptores visuales del acocil. Tesis, Fac. Ciencias, U.N.A.M., México.
- Muller, J.K. (1973). Photorreceptors in the crayfish compound --- eye: Electrical interactions between cells as related to polarized-light sensitivity. J. Physiol., 232 : --- 573-595.
- Naka, K. (1961). Recording of retinal action potentials from single cells in the insect compound eye. J. Gen. Physiol, 44 : 571-584.

- Naka, K. and Eguchi, E. (1962). Spike potentials recorded from -- the insect photoreceptor. *J. Gen. Physiol.*, 45 : 663 - 680.
- NAKA, K. and Kuwabara, M. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exptl. Biol.*, 36 : 51-61.
- Parker, G.H. (1891). The compound eyes in crustaceans. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 21 : 45-142.
- Parker, G.H. (1895). The retina and optic ganglia in decapods, -- especially in *Astacus*. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.*, 12 : 1-73. Citado por Parker, G.H. (1932).
- Parker, G.H. (1896). Pigment migration in the eyes of *Palaemonetes*. *Zool. Anj.*, 19 : 281-284. Citado por Parker, G.H. (1932).
- Parker, G.H. (1897). Photomechanical changes in the retinal pigment cells of *Palaemonetes*, and their relation to the central nervous system. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 30 : 273-300. Citado por Parker, G.H. (1932).
- Parker, G.H. (1932). The movements of the retinal pigment. ----- *Ergeb. Biol.*, 9 : 239-291.
- Perkins, E.B. (1928). Color change in crustaceans, especially in *Palaemonetes*. *J. Exp. Zool.*, 50 : 71-105. Citado por Welsh, J. (1930).
- Pfeffer, W. (1873). *Physiologische Untersuchungen*. Leipzig. Citado por Bunning, E. (1960).
- Pfeffer, W. (1875). *Die periodischen Bewegungen der Blattorgan*. Leipzig. Citado por Bünning, E. (1960).
- Pfeffer, W. (1915). Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der ---- Schlafbewegungen. *Abhandl. Math. Phys. Kl. Kön. Sächs. Ges. d. Wiss.*, 34 : 1-54. Citado por Bünning, E. ----- (1960).
- Pittendrigh, C.S. (1965). On the mechanisms of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In : *Circadian clocks*. North Holland Publishing Co. Amsterdam. pp. 277 - 297.
- Powell, B.L. (1965). The hormonal control of the tidal rhythm of locomotor activity in *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. ---- Endocr.*, 5 : 705.

- Roberts, T. W. (1941). Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish Cambarus virilis (Na gen). Anat. Rec. (Suppl.), 181 : 46-47.
- Sachs, J. (1857). Über das Bewegungsorgan und die periodischen.- Bewegungen der Blätter von Phaseolus und Oxalis. Botan. Zeitung., 15, 47 : 814. Citado por Bünning, E. ---- (1960).
- Sánchez, J. A. and Fuentes-Pardo, B. (1977). Circadian rhythm -- in the amplitude of ERG in the isolated eyestalk of - the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 56 : 601-605.
- Schalleck, W. (1942). Some mechanisms controlling locomotor ac - tivity in the crayfish. J. Exp. Zool., 91 : 155-166.
- Smith, T.G., Steel, W.K. and Brown, J.E. (1968). A role for the - sodium pump in photoreception in Limulus. Science, -- 162 : 456-458.
- Stavenga, D.G. (1979). Pseudopupils of compound eyes. In : Han - dbook of Sensory Physiology, Vision in Invertebrates. Edited by: Autrum, H. Vol. VII/6A : 358-429. Springer Verlag. Berlin, Germany.
- Stefanowska, M. (1890). La disposition histologique du pigment - dans les yeux des arthropodes sous l'influence de la - lumière directe et de l'obscurité complète. Rec. Zool Suisse, 5 : 151-200. Citado por Parker, G.H. (1932).
- Stoppel, R. (1910). Über den Einfluss des Lichtes auf das Oeff - nen und Schliessen einiger Blueten. Z. f. Bot., 2 : - 369-453. Citado por Aschoff, J. (1960).
- Szczawinska, W. (1890). Contribution à l'etude des yeux de quel - ques crustacés et recherches expérimentales sur les - mouvements du pigment granuleux et des cellules pig - mentaires sous l'influence de la lumière et de l'obs - curité dans les yeux des crustacés et des arachnides. Archives de Biol. 10 : 523-566. Citado por Parker, -- G.H. (1932).
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological solution for freshwa - ter crustaceans. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 34 :428-432.
- Vera, M.K. (1978). Acción del extracto de tallo ocular sobre la - respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores - visuales del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann). - Tesis Fac. Ciencias, U.N.A.M., México.

- Verdugo-Díaz, S.L. (1982). Efecto del calcio sobre el ritmo circádico de la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil. Tesis, Facultad de Ciencias, U.-N.A.M., México.
- Wald, G. (1967). Visual pigments of crayfish. *Nature*, 215 : 1131-1133.
- Wald, G. and Hubbard, R. (1957). Visual pigment of a decapod crustacean : The lobster. *Nature (Lond.)*, 180 : 278 - 280.
- Waterman, T.H. (1979). Polarization Sensitivity. In : *Handbook of Sensory Physiology., Vision in Invertebrates*. Edited by: Autrum, H. Vol. VII/6B : 281-469. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Welsh, J.H. (1930). Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 16 : 386-395.
- Welsh, J.H. (1937). The eyestalk hormone and rate of heart beat in crustaceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.*, 23 : 458-460.
- Welsh, J.H. (1939). The action of eyestalk extracts on retinal pigment migration in the crayfish Cambarus bartoni. *Biol. Bull.*, 77 : 119-128.
- Welsh, J.H. (1941). The sinus gland and 24-hours cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool.*, 86 : 35-49.