

11261
10
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL DEL SEXTO GANGLIO ABDOMINAL EN -
LA SINCRONIZACION DE DOS RITMOS CIRCADI
COS DEL ACOCIL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)

PRESENTA

VIRGINIA INCLAN RUBIO

FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO :

	<u>PAGINA</u>
<u>RESUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
Antecedentes	3
Sincronización	13
Frecuencia natural de oscilación y sincronización	14
Sincronización y relaciones de fase	15
Curva de respuesta de fase	18
Fotorreceptores extrarretinianos	21
Fotorreceptores extrarretinianos en el acocil	23
Función de neuronas fotorreceptoras	27
Ritmos circádicos en el acocil	29
<u>HIPOTESIS</u>	34
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	36
Generalidades	36
1.- Caracterización de los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor	36
2.- Fotoestimulación del sexto ganglio abdominal	39
3.- Estimulación del sexto ganglio abdominal y efectos sobre los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor	40
4.- Establecer la posible relación anatomofuncional entre fotorreceptores caudales y otras estructuras en el acocil	42
<u>RESULTADOS</u>	45
1A.- Ritmo circádico electrorretinográfico	45
1B.- Ritmo circádico locomotor	48
2.- Efecto de la fotoestimulación del sexto ganglio abdominal	50
3.- Efecto de la estimulación del sexto ganglio abdominal sobre los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor	58
4.- Relación entre fotorreceptores caudales y estructuras relacionadas con los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor	68
<u>DISCUSION</u>	76
<u>CONCLUSIONES</u>	89
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	92

RESUMEN

Se sabe que los ritmos circádicos electrorretinográficos y motor --- del acocil Procambarus bouvieri (Ortmann) son susceptibles de ser sincronizados mediante la aplicación de estímulos luminosos sobre los ojos --- (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). Se conoce también la existencia de fotorreceptores extrarretinianos contenidos en el 6o. ganglio abdominal del acocil (Prosser, 1934). Sin embargo no se conoce la participación de los fotorreceptores extrarretinianos en las funciones adaptativas del organismo en particular en la sincronización de los ritmos circádicos.

Se comprobó que la aplicación de luz sobre los fotorreceptores caudales del acocil Procambarus bouvieri provoca cambios en la frecuencia de descarga de las fibras de la cadena ganglionar que dependen de la hora del día. La misma estimulación provoca reducción en la magnitud de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales (ERG).

Se comprobó también que la estimulación del 6o. ganglio abdominal genera un incremento importante en la cantidad de movimiento. Estos hechos ponen de manifiesto una relación anatomo-funcional entre el sistema fotorreceptor caudal y las estructuras responsables de la manifestación de los ritmos circádicos electrorretinográficos y motor. Se procedió a aplicar sobre el 6o. ganglio abdominal estímulos luminosos únicos de intensidad y duración conocidas en distintos momentos de los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor registrando el efecto de esta estimulación sobre ellos. Se midieron el período, la amplitud y la fase antes y después de la estimulación del 6o. ganglio.

Los resultados pusieron de manifiesto que esta estructura es capaz-

de sincronizar los dos ritmos, ya que en ellos se observaron atrasos o adelantos en la fase como resultado del momento durante el que se aplicó el estímulo. Las mismas maniobras se repitieron en acociles gangliectomizados, en los que se observó inversión en la fase del ritmo del ---ERG y un aumento en la cantidad total de actividad en el ritmo circádico locomotor. Se puso de manifiesto que es indispensable la integridad anatómica de las vías entre ganglio caudal, ganglio cerebroide y tallo ocular para que el 6o. ganglio sincronice el ritmo circádico del ERG -- con la participación de por lo menos, los pigmentos retinianos accesorios.

INTRODUCCION.

Antecedentes:

A la recurrencia de algún evento dentro de un sistema biológico -- que se presenta con intervalos más o menos regulares se le puede considerar un ritmo biológico (Kalmus, 1935). La noción de "ritmo" es suficientemente vaga (por ejemplo, no está definida en términos físicos), para podería incluir entre la gran variedad de fenómenos que pueden reflejar mecanismos subyacentes por completo diferentes. En un intento de clasificar a los ritmos, se ha requerido de descripciones restrictivas que dependen de criterios particulares. Los ritmos se pueden distinguir de acuerdo con: a) características intrínsecas como la frecuencia; b) sistema biológico (por ejemplo, la población) en el que se observan; c) tipo de procesos que los generan; d) funciones que desempeñan.

Los ritmos biológicos se extienden en algunas unidades logarítmicas de frecuencia desde un ciclo por milisegundo hasta un ciclo en varios años; se pueden observar en elementos subcelulares, células únicas, redes de órganos y tejidos, organismos íntegros o poblaciones.

La mayor parte de los ritmos que se puede observar en el sistema nervioso central, en el sistema circulatorio o en el aparato respiratorio se caracteriza por mostrar gran variabilidad entre los individuos. Otros ritmos endógenos, como el ciclo ovárico, muestran gran variabilidad entre las especies y pequeña entre los individuos. No se conoce el origen de la actividad rítmica característica de los sistemas biológicos; sólo se ha encontrado que parte de ella parece estar relacionada, de alguna manera, con algunos fenómenos físicos periódicos a saber: las

mareas, el día y la noche, los ciclos lunares y las estaciones del año. Sin embargo si los sistemas biológicos se aíslan de estos cambios ambientales persiste en ellos la actividad periódica poniéndose de manifiesto la "frecuencia natural de oscilación" del sistema (Aschoff, --- 1967) la cual siempre difiere en un corto porcentaje del valor de la frecuencia propia de la señal geofísica a la que el sistema biológico estaba sincronizado. Si esta frecuencia natural de oscilación persiste sin atenuarse durante muchos períodos, puede decirse que el ritmo pertenece a un sistema capaz de producir oscilaciones autosostenidas, o lo que es lo mismo, que el ritmo es endógeno en el sentido estricto de la definición.

De los ritmos endógenos nos interesan en particular, los llamados "circádicos". El prefijo "circa" fue introducido para calificar los ritmos diurnos (de duración cercana a un día) (Halberg, 1954) adoptándose más tarde para designar a los otros ritmos endógenos que están en correspondencia con ciclos del medio ambiente: circatidales, circalunares y circaanuales. El prefijo sólo se aplica para designar aquellos ritmos que son sincronizados de manera usual por ciclos ambientales y que muestran su frecuencia natural (inmanente al sistema) sólo en condiciones especiales.

Según lo expuesto en el párrafo anterior la primera característica de los sistemas circádicos consiste en la posibilidad de que manifiesten una frecuencia natural de oscilación generada en el propio organismo e independiente de la acción de estímulos periódicos externos.

La segunda característica de los sistemas circádicos se refiere a la estrecha relación que guardan con la intensidad de la luz que reci-

ben. Un hecho confirmado en distintos organismos es que su frecuencia natural de oscilación varía en forma lineal con el logaritmo de la intensidad luminosa (Pfeffer, 1915; Johnson, 1939; Hastings y Sweeney, 1958). La tasa de cambio en la velocidad del ritmo depende de la fase en la que éste se encuentre en el momento en el que el sistema quede expuesto a intensidades de luz bajas o altas. Esto significa que la luz determina la velocidad de cambio del sistema, lo que influye en forma directa sobre la frecuencia de oscilación. Cuando se estudia un organismo bajo condiciones constantes, se puede esperar que la variación en la velocidad del sistema se relacione con dos fracciones en el período: la fracción de actividad y la fracción de reposo; si se acepta que el período de actividad coincide con el tiempo en el que la velocidad del sistema es mayor y el período de reposo con el de velocidad menor, se puede esperar que un aumento en la intensidad luminosa produzca mayor velocidad de cambio en los organismos activos durante el día, y que una disminución en el mismo parámetro provoque el efecto contrario; la situación inversa se presenta en los organismos nocturnos. Más aún, es posible suponer que la prolongación del tiempo de actividad cuando el sistema presenta mayor velocidad de cambio provoque un acortamiento del período circádico. Cuando el ritmo se encuentra en condiciones estables la frecuencia natural de oscilación y la relación entre el tiempo de actividad y el de reposo (llamada también relación a/r) son fáciles de medir. Sin embargo, existe otro parámetro un poco más difícil de analizar, pero igualmente importante que el precedente: el nivel de actividad alrededor del cual se presenta la oscilación; hay que aclarar que nivel no es lo mismo que amplitud. La cantidad total de actividad reali

zada por el animal en una unidad de tiempo, puede dar idea de cuál es la medida de esta actividad. Así, la luz la aumenta en los animales diurnos y la disminuye en los nocturnos; ya que una de las primeras reacciones de un organismo ante la aplicación de luz consiste en el aumento o la -- disminución de su estado de excitación. En la mayor parte de los anima -- les estudiados, el nivel de excitación, la frecuencia natural de oscila -- ción y la relación α/ϵ , están correlacionados de tal manera que el cam -- bió en uno de ellos altera en cierta medida a los otros dos. Por ejem -- plo, si se miden estos tres parámetros durante el tiempo en el que un or -- ganismo nocturno es sometido a tres intensidades de iluminación diferen -- tes, se observa que a intensidades altas el animal presenta actividad -- muy baja, tiempo de actividad muy corto y disminución de la frecuencia -- circádica, mientras que a medianas y bajas intensidades, se incrementan -- progresivamente estos tres parámetros (Hoffmann, 1960). En resumen, cuan -- do los organismos diurnos reciben más luz, aumentan la frecuencia, la -- relación α/ϵ y el nivel de excitación en tanto que los nocturnos redu -- cen estos tres parámetros ante la misma situación ambiental. El estable -- cimiento de estos hechos y su generalización se conoce con el nombre de -- "regla circádica de Aschoff" (Aschoff, 1960).

Otra característica de los ritmos circádicos es su "independencia -- de la temperatura", expresión propuesta por Bünning en 1967 y que se re -- fiere a la posibilidad de que los sistemas circádicos no modifiquen el -- valor de su período a pesar de los cambios ambientales de temperatura. -- Sin embargo se debe aclarar que esta independencia es relativa y que no -- indica una falta de sensibilidad del sistema a la temperatura, sino más -- bien establece la posibilidad de compensar los efectos de la misma de --

tal manera que el período circádico no se afecte por perturbaciones térmicas aun cuando éstas modifiquen en cierta medida la amplitud y la fase del ritmo.

En 1956 Leinweber describió cambios en el ritmo circádico del movimiento de las hojas de Phaseolus debidos a cambios térmicos aplicados durante la fase transitoria. En el mismo año Bruce y Pittendrigh (1956) encontraron que la temperatura puede sincronizar los ritmos si los cambios térmicos se aplican a intervalos fijos. Los osciladores funcionan sólo dentro de ciertos valores de temperatura, los que dependen de las condiciones extremas a las cuales se adapta la especie. Por ejemplo, el ritmo circádico de luminiscencia de Gonyaulax (alga marina de agua fría) presenta importantes modificaciones cuando la temperatura es menor de $11,5^{\circ}\text{C}$ (Hastings y Sweeney, 1960).

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre los ritmos biológicos se puede aplicar señales escalón, señales periódicas o señales únicas. El efecto de la temperatura sobre un ciclo circádico depende en forma importante de la fase en que éste se encuentre en el momento de la aplicación del cambio térmico. Esto significa que hay momentos del ciclo en los que los cambios de temperatura no provocan ninguna modificación en el sistema mientras que hay otros en los que se pueden provocar efectos importantes de atraso o de adelanto de la fase (según se apliquen decrementos o incrementos, respectivamente) los cuales se manifiestan después de un período transitorio de duración variable. Sin embargo hay casos en los que el comportamiento del sistema parece ser diferente. Así, por ejemplo, al mantener la luz y la temperatura constantes el movimiento de las hojas de Phaseolus multiflorus presenta un --

ritmo circádico. La aplicación de un cambio térmico de 8° (de 20° a 28° -C) de cuatro horas de duración durante una cierta fase del ritmo provoca un atraso en la aparición del siguiente ciclo mientras que el efecto opuesto se observa si el mismo estímulo térmico se aplica cuatro horas antes. Estos resultados fueron resumidos (Aschoff y cols. 1965) en la llamada "curva de respuesta".

En 1967 se sugirió que en los ritmos circádicos se presentan dos tipos de procesos: los que se activan durante una parte del ciclo y que se incrementan al aumentar la temperatura y los que disminuyen su actividad ante la misma situación y que actúan en otro momento del ciclo -- (Bünning, 1967). Un equilibrio entre estos dos procesos generaría un sistema con periodicidad independiente de la temperatura ambiental, pero susceptible de detectar los cambios que en ella ocurrieran. Esta explicación se reforzó con un modelo según el cual los relojes biológicos operan con alternancia de las fases de tensión y de relajación, siendo la fase de tensión dependiente de la energía química, lo que se equivale a decir que lo es de la temperatura (Wever, 1965).

La tesis de Bünning, fue impugnada fuertemente (Zimmerman y cols. 1968) proponiéndose un mecanismo capaz de compensar la temperatura. La aplicación de señales "impulso" o "escalón" a poblaciones de Drosophila pseudoobscura llevó a Zimmerman y colaboradores a proponer que el ritmo de eclosión de esta especie tiene un Q_{10} de 1.02 y que los incrementos de la temperatura provocan adelanto en la fase del ritmo, en tanto que los decrementos generan un atraso en la misma siendo ambos efectos dependientes del momento circádico en el que se aplique el cambio térmico. Con estos datos los autores concluyeron que el ritmo de eclosión de

Drosophila se comporta como si tuviera un control homeostático de temperatura.

Aunque no esté claro el mecanismo involucrado, parece evidente que la temperatura no afecta de manera importante el período circádico, siempre y cuando el cambio térmico se aplique en la fase estable del ritmo y los intervalos tengan una duración tal que no puedan ser interpretados por el sistema circádico como señales periódicas.

Es posible que el acocil Procambarus bouvieri posea un mecanismo compensador de temperatura: cuando se analiza lo que ocurre sobre su actividad circádica locomotora al cambiar la temperatura de 20° a 12°C., se comprueba que esta disminución provoca una reducción en la amplitud pero no modifica el período, en tanto que si el cambio es de 12° a 20°C. se ve una fase transitoria que dura 36 horas después de la cual hay un importante aumento en la actividad motora sin cambio en el período circádico (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981).

En 1965 apareció una revisión de los trabajos publicados hasta esa fecha acerca de la acción de la temperatura sobre los ritmos circádicos. Se propuso que en algunos casos un cambio de temperatura puede iniciar las oscilaciones en organismos aperiódicos que han estado en condiciones ambientales uniformes durante períodos relativamente grandes y que por lo tanto sólo presentan oscilaciones atenuadas o en organismos que a una cierta temperatura ven inhibidas sus funciones periódicas y sólo ante ese cambio readquieren su capacidad de oscilar. Este último efecto sólo ha sido abordado en algunos ritmos de vegetales y no se conoce nada sobre la posibilidad de que se presente en organismos animales (Wilkins, 1965).

Otra característica de los sistemas circádicos es que mantienen estables la amplitud, la fase y la duración de su período ante un buen número de factores químicos; sin embargo existen datos importantes (Bruce y Pittendrigh, 1960) acerca del efecto del óxido de deuterio sobre el aumento de la duración del período de actividad de Euglena. Bünning y Baltes (Bünning y Baltes, 1963) demostraron que el agua pesada también alarga el período y modifica la fase del ritmo circádico de Phaseolus. El efecto cronomutagénico del óxido de deuterio no ha sido entendido de manera clara pero es posible que actúe sobre el sistema como lo haría un descenso de la temperatura, de acuerdo a los hallazgos de Dowse y Palmer en 1972. Por su parte otros autores (Keller y Enright, 1971) encontraron que el alcohol etílico, la teobromina y la teofilina provocan también el alargamiento del período y el desfasamiento del ritmo circádico de movimiento de las hojas de Phaseolus multiflorus aun cuando tampoco se ha podido explicar su acción sobre los mecanismos de oscilación. Al estudiar el efecto de la puromicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas, sobre Gonyaulax, se observó la supresión del ritmo circádico de luminiscencia característico de esta especie durante la aplicación de la droga. Sin embargo bastaba un simple lavado del inhibidor para que el ritmo reapareciera con la fase que le correspondería exactamente si no se hubiera aplicado la sustancia (Hastings y Keynan, 1965). Estos hechos fueron interpretados en el sentido de que la síntesis de proteínas no está involucrada en la gaza de retroalimentación responsable de la ritmicidad de Gonyaulax. En otros estudios se ha encontrado que algunos alcaloides como la papaverina provocan también el alargamiento del ritmo sin que en ningún caso se hayan podido aportar datos que per-

mitan aproximarse al estudio de la naturaleza de las oscilaciones circádic^uas (Keller, 1960).

Otra característica de los ritmos circádicos es que son innatos y hereditarios. Si desde los primeros estadios de su desarrollo un organismo se somete a condiciones ambientales constantes se puede comprobar que este hecho no interfiere con la aparición de su frecuencia natural de oscilación, lo que permite proponer que el organismo posee una periodicidad innata. El período de un ritmo circádico no se asimila ni se impone en el organismo por medio de estímulos ambientales. Esta afirmación se desprende de los estudios realizados por Semon (Semon, 1908) -- quien encontró un ritmo circádico de expansión y retracción de las hojas de Acacia Lophanta en plantas obtenidas de semillas que habían sido expuestas a diferentes regímenes de luz y oscuridad. A pesar de los regímenes impuestos desde el exterior, las hojas se movían con un período de 24 horas aproximadamente y este período persistía aún después de colocarlas en condiciones constantes de iluminación. Experimentos similares han sido desarrollados en pollos (Aschoff y Meyer-Lohmann, 1954) y en pericos (Hoffmann, 1957). Los autores colocaban huevos de estas especies en condiciones de iluminación con períodos de luz y oscuridad distintos a los naturales, lo que no evitaba que al colocar a los organismos en condiciones constantes, su período de actividad fuera similar al que presentan en condiciones de iluminación natural. Bünning realizó una serie de experimentos con los que puso de manifiesto que el ritmo de aclosión de Drosophila desaparecía si los huevecillos eran colocados en condiciones constantes de oscuridad; la población se mantuvo aritmica durante 15 generaciones sucesivas, pero en el momento en que se le

aplicó un único destello de luz, reasumió la periodicidad circádica que muestra en forma normal (Bünning, 1935).

Estos hechos llevaron al autor a sugerir que el período circádico está genéticamente controlado. Esta sugerencia fue corroborada por --- otros autores (Konopa y Benzer, 1971) quienes indujeron cuatro mutaciones en el cromosoma X que afectaron el período de eclosión y el ritmo de actividad locomotora de la Drosophila melanogaster adulta. Los estudios que realizaron estos autores son tan precisos, que permitieron en otro momento ubicar el locus que al mutar provoca el alargamiento del período circádico en esta especie (Konopa, 1972).

Una propiedad muy importante de los ritmos circádicos consiste en la capacidad que muestran para atrasar o adelantar su fase debido a la aplicación de algún cambio externo, así como la modificación de su frecuencia natural de oscilación que suele aparecer consecutivamente a la aplicación de algún factor periódico externo (luz, temperatura, presión o algún otro menos común). Estas dos propiedades se incluyen en la llamada "capacidad de sincronización de los ritmos circádicos".

Para terminar con la caracterización de los ritmos circádicos cabría incluir una serie de proposiciones establecidas con fuerte base experimental y que se añadirían a las que han sido explicadas en párrafos anteriores: los ritmos circádicos son osciladores de carácter autosostenido; en general esta característica es más ostensible en los animales que en los vegetales, pues en éstos se observa con más facilidad el --- amortiguamiento del ritmo. Sin embargo, no es sencillo determinar si --- la pérdida de la oscilación obedece a una verdadera extinción del ritmo en las células o si sólo refleja la pérdida de la sincronización del --

sistema con respecto a los factores ambientales.

Los ritmos circádicos son ubicuos en los sistemas vivos. No pueden darse ejemplos en que los autores hayan investigado infructuosamente la existencia de algún ritmo circádico.

Existe un alto grado de precisión en los períodos circádicos; en gran número de casos persisten con un grado de variabilidad temporal insignificante.

El período circádico no constituye una característica invariable de los individuos; existe una gama de valores que parece ser propia de cada individuo dentro de la cual se manifiestan cambios en el período circádico.

Algunas especies difieren claramente de otras por lo que respecta a la gama de valores dentro de la cual se presentan sus ritmos circádicos. Se ha sugerido que las especies nocturnas en obscuridad constante presentan períodos menores de 24 horas, a diferencia de las diurnas cuyos períodos, en la misma condición, suelen ser mayores de 24 horas.

Sincronización.-

Los ritmos circádicos son susceptibles de ser sincronizados por señales externas. Las señales externas que se aplican pueden ser de tres tipos: i) proporcionales; ii) diferenciales; iii) tipos impulso o únicas. Cuando los cambios externos son señales únicas, la sincronización se manifiesta por cambios de fase, sean atrasos o adelantos lo que depende del momento en que se aplique la señal externa. Otros efectos potenciales de las señales externas son: a) sincronizar una periodicidad circádica con el medio ambiente; b) sincronizar varios relojes circádicos en un organismo; c) sincronizar individuos de una misma especie y

mantenerlos en fase; d) influir al patrón circádico, (Aschoff, 1960).

De todos los potenciales sincronizadores la luz y la temperatura -- han sido los más estudiados.

Frecuencia natural de oscilación y sincronización.-

Pittendrigh (1960) fue el primero en establecer que la sincronización con estímulos de diferentes características puede dar como resultado diferencias en los valores del período circádico (τ) medido en condiciones constantes. El autor propuso dos tipos de efecto posteriores al estímulo: a) el período circádico se ve influido por la relación luz-obscuridad (fotoperíodo) del estímulo sincronizante o b) el período circádico es afectado por el período del estímulo. Hay una gran correlación entre τ y el período del estímulo (T) con el que el ritmo ha sido previamente sincronizado. Por su parte otros autores propusieron otros efectos posteriores al estímulo sincronizante: si éste se interpone entre -- dos ciclos circádicos o si se aplica un estímulo único, se puede provocar un cambio de fase. Con frecuencia un avance en la fase de como resultado el acortamiento de τ en tanto que un atraso provoca un aumento del mismo (Aschoff, 1979a; Pittendrigh y Daan, 1976a). Por último se ha propuesto que se puede provocar otro efecto sobre τ posterior al estímulo cuando se aplica luz relativamente brillante después de que el sistema -- estuvo sometido a obscuridad constante o a una intensidad luminosa baja. El efecto de alternar intensidades de iluminación provoca un acortamiento global de los períodos circádicos que se registran después del cambio. Se ha propuesto (Menaker, et. al. 1978; Aschoff, 1978b) que la posible participación de múltiples osciladores en la generación de los ritmos circádicos, puede ser la base para explicar el hecho de que distin-

tos ritmos presenten distinto comportamiento ante la aplicación de un mismo estímulo. Una de las consecuencias de este comportamiento diferente es la "sincronización parcial", situación en la que ante la presencia de un estímulo, algunas partes del sistema circádico modifican su oscilación en tanto que otras se mantienen sincronizadas (Aschoff, 1978).

Sincronización y relaciones de fase.-

Ángulo de fase: En el estado estable de la sincronización la diferencia del ángulo de fase (ψ) entre el ritmo y el estímulo sincronizante dependen de: (1) las propiedades del estímulo y (2) la capacidad de respuesta del sistema circádico ante el estímulo sincronizante; unidos estos dos factores constituyen lo que Aschoff designó como "intensidad del estímulo sincronizante" (Aschoff, 1960). Dada una cierta intensidad del estímulo, el factor determinante de ψ es la relación entre τ antes del estímulo y T; la relación entre ψ y τ , se pone de manifiesto por la aplicación de un estímulo sincronizante, el que provoca que un ritmo relativamente rápido adelante su fase a la del estímulo (ψ positiva) en tanto que un ritmo lento la atrase (ψ negativa); lo opuesto ocurre cuando un ritmo de frecuencia media es sincronizado por un estímulo de alta frecuencia (ψ negativa) o de baja frecuencia (ψ positiva).

Dependencia de τ y T.

Algunos autores (Aschoff y Wever, 1966; Hoffman, 1969), analizaron la relación entre ψ y τ colocando lagartijas y pinzones en condiciones ambientales que permitían medir su τ ; posteriormente las lagartijas eran sincronizadas con ciclos de temperatura y los pájaros con ci -

culos de luz y oscuridad. En ambas especies los valores de Ψ eran más pequeños conforme τ aumentaba. En otro experimento Aschoff y sus colaboradores (Aschoff y cols., 1979) registraron la actividad del canario Serinus canaria del que midieron la frecuencia natural de oscilación en condiciones de luz constante y más tarde sincronizaron el ritmo con ciclos de luz y oscuridad de diferente duración.

Valores de sincronización y pérdida de la misma.-

Las oscilaciones autosostenidas pueden modificar su período original sólo dentro de ciertos límites. Los valores de las correspondientes frecuencias se conocen como "gama de sincronización" (Klotter, 1960) y se ha propuesto que ésta aumenta en la medida que aumenta la intensidad del estímulo sincronizante. De experimentos realizados en diferentes especies (Aschoff y Pohl, 1978) se ha llegado a dos conclusiones: (1) la gama de frecuencia en la que los organismos pueden modificar su frecuencia natural de oscilación es relativamente pequeña en los vertebrados (10 horas), tiene valores intermedios en los insectos (cerca de 20 horas) y alcanza valores máximos en plantas y organismos unicelulares; (2) para obtener un cambio en el Ψ del sistema circádico (que es la base para los cambios de frecuencia) se requiere aplicar un cambio en el T de la señal sincronizante de por lo menos una hora de aumento o de disminución. Si los valores de T son cercanos, múltiplos o submúltiplos de τ suele presentarse lo que se conoce con el nombre de sincronización por desmultiplicación. Existen dificultades para medir con precisión la gama de sincronización de un determinado organismo ya que muchas veces ocurre que cerca de los valores límite de la sincronización ésta empieza a ser inestable lo que da como resultado fluctuaciones pe-

riódicas de τ . A este fenómeno Wever lo designó como "sincronización-relativa" (Wever, 1972). Por otra parte algunos ritmos evidentes en --- ciertos organismos suelen mostrar diferentes gamas de sincronización en otros sistemas circádicos (Aschoff, 1978a), fenómeno complementario al de la "sincronización parcial". La sincronización parcial se lleva a ca bo ante la presencia de un estímulo sincronizante y consiste en que algunas partes del sistema circádico mantienen su frecuencia natural de - oscilación en tanto que otras llegan a ser sincronizadas (Aschoff, --- 1978b). Por último, algunos datos sugieren que así como un sistema circádico puede "alargarse" y "comprimirse" por estímulos sincronizantes - de períodos largos o cortos; respectivamente, también puede perder su - capacidad para producir oscilaciones autosostenidas; este fenómeno da - como resultado un incremento en la gama de sincronización la que puede llegar a ser ilimitada.

Por lo que respecta al papel de la luz como sincronizador de los - ritmos circádicos hay que hacer notar que el grado de sincronización -- que produce varía mucho en las distintas especies aunque se acepta, en general, que los organismos más complejos están menos capacitados para cambiar su frecuencia natural de oscilación a frecuencias alejadas de - las 24 horas. Se ha propuesto (Bruce, 1960) que la fotofracción (parte del período durante el cual la intensidad luminosa esta por arriba del mínimo) y la relación entre los valores de intensidad luminosa máxima y mínima (Swade y Pittendrigh, 1967), son los valores que realmente interesan en la sincronización, mucho más por ejemplo, que el nivel promedio de la iluminación lo que resulte sorprendente si se consideran las propiedades adaptativas del sistema visual. Asimismo se ha comprobado -

la importancia que tiene la duración del ciclo sincronizador (entre 22 y 25 horas) en las relaciones de fase que existen entre éste y el ciclo sincronizado.

Aun cuando las posibilidades de sincronización son muy variadas, este fenómeno presenta ciertos aspectos básicos que se pueden considerar comunes a la mayoría de los casos. Uno de ellos es la poca transferencia de energía que se observa entre la señal sincronizadora y el oscilador sincronizado.

Existen sincronizaciones débiles o fuertes dependiendo de la señal sincronizadora y el método de acoplamiento que hay entre ella y el sistema que sincroniza. El acoplamiento a su vez, puede ser directo e indirecto. Dos osciladores pueden sincronizarse mutuamente o puede uno de ellos sincronizar al otro, en forma unilateral. Un oscilador puede sincronizarse a la misma frecuencia del sincronizador o a una frecuencia menor. Cuando un oscilador deja de operar por aplicación constante de luz, la interrupción de ésta puede reiniciar la actividad rítmica.

Curvas de respuesta de fase.-

En un buen número de trabajos algunos autores (Pittendrigh y Bruce, 1957; Pittendrigh, 1958; 1960; 1961; Burchard, 1958) publicaron los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la aplicación sistemática de perturbaciones únicas sobre la frecuencia natural de oscilación de los ritmos circádicos. Los autores demostraron que se puede observar un atraso, un adelanto o una falta de efecto, dependiendo de la fase del sistema en la que se aplique la perturbación.

En 1965 aparecieron dos trabajos, uno de Aschoff y otro de Pittendrigh en los que los autores resumieron buen número de datos obtenidos

hasta esa fecha sobre los resultados de la aplicación del tipo de perturbación al que se alude en el párrafo anterior. Al sistematizar los resultados así obtenidos, se encontró que mediante una "curva de respuesta de fase" se pueden analizar en forma más sencilla los efectos provocados por un estímulo único sobre el sistema circádico. La curva de respuesta de fase se construye al graficar en el eje de las abscisas el "tiempo circádico" (TC) del sistema en el que se aplicaron los estímulos únicos y en el de las ordenadas los efectos que estos provocaron sobre la fase del sistema. El TC corre de cero a veinticuatro horas y mide un ciclo completo de un organismo. Con propósitos comparativos el período de un ciclo se normaliza (recuérdese que el período de los ciclos circádicos es cercano pero no igual a 24 horas) a la duración del TC, TC=0 es el punto del ciclo en el que la actividad excede el 50% de la amplitud del ciclo; TC=24 ocurre un ciclo completo después. Los estímulos únicos se aplican durante diferentes momentos del TC sólo cuando el ciclo está en estado estable; los efectos de los estímulos sobre la fase se miden en el cuarto ciclo registrado después de la perturbación, ya que después de este tiempo es muy probable que el sistema haya recuperado el estado estable que suele desaparecer después de la aplicación del estímulo.

la proyección unidimensional de la curva de respuesta de fase, indica el grado de sincronización de un organismo (Enright, 1965a). Al analizar las curvas que resultan se puede apreciar la dependencia que existe entre la oscilación forzada y el estímulo, así como el momento circádico en el que los cambios externos dejan de producir efecto en el sistema. El punto de la abscisa en el cual la curva de respuesta tiene-

un valor igual al período de la oscilación sincronizadora representa la fase de equilibrio entre el sistema circádico y la señal sincronizadora.

Recientemente apareció un trabajo en el que los autores sincronizaron el ritmo circádico de respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (ERG) del acocil utilizando estímulos luminosos únicos y construyeron la curva de respuesta de fase del sistema (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983). Los efectos que estos autores observaron fueron: adelanto de la fase cuando el estímulo se aplicaba entre las 5 y las 13 horas (TC), atraso cuando el TC de aplicación era entre las 20 y las 5 horas y falta de efecto cuando el estímulo se aplicaba entre las 13 y las 20 horas (TC). También postularon que las células fotosensibles se activan mediante señales luminosas del medio ambiente y transmiten la información por vía nerviosa haciéndola llegar a algún centro capaz de cambiar la reactividad a la luz de los osciladores responsables del ritmo circádico electrorretinográfico.

Sincronización por efecto de la temperatura.-

En otra sección de la introducción se había ya aludido al papel que desempeña la temperatura sobre los ritmos circádicos; a las acciones descritas en esa sección habría que añadir que un cambio térmico de intensidad y duración específicas es capaz de provocar cambios en la fase (atrasos o adelantos) y que la aplicación de señales de temperatura de ciertas frecuencias puede sincronizar un determinado ritmo imponiéndole su propia frecuencia. Experimentos sobre la eclosión de larvas de Drosophila (Bruce, 1960; Pittendrigh, 1959) muestran la posibilidad de sincronizar un ritmo circádico con cambios de temperatura. Al comparar los resultados obtenidos por la aplicación de señales térmicas a diferentes regi-

menés de iluminación se encontró que con un ciclo de temperatura y luz constante se obtiene un pico de eclosión muy estrecho que se repite cada 24 horas; algo semejante pero con fase distinta se registra si se aplica el mismo cambio de temperatura pero en condiciones de oscuridad constante: Si por otra parte, el registro se hace en condiciones de temperatura y luz constantes, se obtiene un ritmo en el que se puede ver que la eclosión se lleva a cabo casi a cualquier hora del ciclo aún cuando hay ciertos momentos del día en el que la misma alcanza su máximo. Algo semejante pero con distinta fase se observa si el registro se hace con temperatura y oscuridad constantes.

Sin embargo, no todos los ritmos son sincronizables por temperatura, aunque debe hacerse notar que, en general, si se compara la fase de un ritmo sincronizado por ciclos de luz y oscuridad la actividad asociada con la mayor temperatura es la que corresponde a la de la fase diurna y viceversa.

Los datos publicados hasta la fecha muestran que no hay posibilidad de sincronizar un ritmo circádico cuando se utilizan ciclos de temperaturas diferentes a 24 horas, por lo que el papel de la temperatura como posible sincronizador de los ritmos circádicos no se ha podido establecer con precisión.

Fotorreceptores extrarretinianos.-

La duración de la luz es una de las pocas variables del medio ambiente que se puede precisar y predecir cada día, siendo por esta razón que muchos organismos la usan como un "reloj del medio ambiente". La intensidad de la luz también es predecible y muchos organismos la utilizan para orientarse y moverse en el espacio. Sin embargo a pesar de la

gran importancia que representa la captación de luz para la mayor parte de los seres vivos, los sistemas fotorreceptores que se encuentran en sitios diferentes a la retina han recibido muy poca atención hasta el momento.

El hecho de que algunos animales puedan percibir la luz de manera extraóptica se conoce desde inicios de este siglo. Los primeros datos sobre el particular fueron proporcionados por Parker (1903) y por Pearse (1910) quienes estudiaron la sensibilidad ocular y dérmica a la luz de los anfibios. En 1911, Von Frisch encontró una relación entre la captación de luz por vía no ocular y las modificaciones en la posición de los pigmentos cutáneos de peces. En algunas especies de anfibios se ha demostrado la existencia de una respuesta extrarretiniana a la luz y esta capacidad se ha relacionado con cambios pigmentarios (Bagnara y Hadley, 1970; Bogenschütz, 1965; Oshima y Corbman, 1969), con movimientos relacionados con la orientación (Landreth y Ferguson, 1967) y con ritmos endógenos (Adler, 1968; 1969a y 1970a).

Inicialmente la fotorrecepción extraocular se relacionó con la "sensibilidad dérmica a la luz" aunque este término no tiene justificación morfológica ya que la mayor parte de los fotorreceptores extrarretinianos no se localizan en la dermis (Steven, 1963). La alusión a la sensibilidad dérmica a la luz implica que debe haber alguna respuesta a la captación de radiaciones electromagnéticas de longitudes de onda de 400 a 700 nm; radiaciones mayores de 750 nm (la región del infrarrojo) son responsables de la sensación de calor. Aunque estas diferencias son sólo cuantitativas, permiten suponer que los receptores a la luz y al calor son biológica y morfológicamente diferentes. Sin embargo esta es-

una consideración parcial, ya que buen número de autores clasifican la fotorrecepción dérmica y la dividen en dos tipos: (a) respuestas reflejas de una parte del cuerpo, que requieren de la participación de elementos nerviosos y (b) respuestas táctiles, cinéticas o de otro tipo -- que se llevan a cabo sin la intervención de algún mecanismo central que coordine los órganos accesorios involucrados. Mientras Adler prefiere utilizar el término de fotorreceptores extraoculares (Adler, 1970 a,b), Block utiliza el término de fotorreceptores extrarretinianos, ya que no descarta la probable existencia de fotorreceptores extrarretinianos intraoculares por lo menos en Aplysia (Block, 1973).

A pesar de que las estructuras fotorreceptoras extrarretinianas -- pueden ubicarse en múltiples sitios, su lugar más probable parece ser el sistema nervioso (Prosser, 1934; Welsh, 1934; Lisk y Kannwischer, -- 1964; Oishi y Kato, 1968; Hermann, 1972; Block, 1973, 1974; Page y Larimer, 1976; Adler, 1970b; Zwicky, 1968; Binkley, 1976, 1978). De la experimentación de éstos y otros autores, resulta evidente la necesidad de que se preserve la integridad de las vías nerviosas próximas a los fotorreceptores extrarretinianos a fin de que las distintas funciones -- asociadas con ellos se puedan mantener. Sin embargo, hay que considerar que desde el punto de vista de otros autores (Yoshida, 1979) la fotorrecepción extrarretiniana no necesariamente supone la participación -- del sistema nervioso central.

Fotorreceptores extrarretinianos en el acocil.-

El estudio de los elementos fotorreceptores extrarretinianos en el acocil se inició en 1934, cuando Prosser realizó experimentos tendientes a sistematizar la respuesta eléctrica a la luz de la cadena ganglio

nar abdominal en la especie Cambarus virilis. Las experiencias que llevaron a Prosser a proponer la existencia de fotorreceptores caudales se pueden resumir de la siguiente manera: al hacer un registro eléctrico de la actividad espontánea de la cadena ganglionar se notaba en ella un incremento como resultado de la aplicación de señales luminosas que se hacían llegar a la región del 6o. ganglio abdominal y que se había cuidado que no pasarán por la región cefálica. Este aumento de actividad coincidía con el momento de aplicación del estímulo y persistía algunos segundos después de que éste se había suspendido. Más aún, animales a los que se les había extirpado previamente los tallos oculares y cadenas ganglionares separadas del resto del animal seguían respondiendo a los estímulos luminosos. El aumento de la actividad eléctrica se podía obtener de cualquier segmento de la cadena pero sólo cuando la luz se hacía incidir sobre el 6o. ganglio abdominal. Los potenciales provocados por la luz se podían registrar en la región torácica, las comisuras esofágicas y en la porción izquierda o derecha de la cadena si previamente ésta se había escindido. La aplicación de calor en la zona caudal no se acompañaba de modificaciones en la actividad eléctrica espontánea lo que indicaba que los receptores de esa zona no eran termorreceptores. El mismo autor encontró que los fotorreceptores caudales respondían con mayor lentitud, con mayor umbral y eran de adaptación más lenta que los visuales. Por su parte Kennedy (1958) continuó estos estudios usando cadenas abdominales aisladas de las que había eliminado la actividad eléctrica espontánea mediante la aplicación de bajas temperaturas (de 8° a 10°C durante las 12 a 30 horas anteriores al registro) o por adición al medio de una solución de cloruro de potasio 3M; el autor encontró en ---

las fibras aferentes de los fotorreceptores del ganglio abdominal caudal, un patrón de descarga tónica de gran latencia, bajo nivel de adaptación y postdescarga. También propuso que mientras la frecuencia de disparo aumenta en forma proporcional con el aumento de la intensidad del estímulo, la latencia disminuye de manera exponencial ante la misma situación. La actividad sináptica del neuropilo del ganglio caudal fue estudiada con microelectrodos de registro intracelular (Kennedy y Preston, 1960). Con este método los autores identificaron las siguientes clases de interneuronas: - 1) fibras gigantes que responden a estímulos táctiles generando espigas únicas o trenes de espigas; estas unidades usualmente tienen extensos campos receptivos y actividad espontánea; 2) grupos de fibras que responden a estímulos táctiles y a la activación de los fotorreceptores del 6o. ganglio abdominal, esto es, son activadas por interneuronas de segundo orden; 3) grupos de fibras que responden a estímulos propioceptivos con descargas tónicas y 4) unidades cuya frecuencia de descarga constante no se modifica por ninguna de las entradas aferentes conocidas. Los mismos autores propusieron algunos mecanismos sinápticos que integran la actividad del ganglio caudal del acócil, como son por ejemplo, los potenciales postsinápticos de diferentes entradas susceptibles de suma espacial. Algunas unidades presentaron características que sugirieron la presencia de un umbral graduado relacionado con la generación de espigas en la fibra postsináptica. Otras unidades respondieron a la estimulación aferente con descargas de espigas de dos amplitudes diferentes: espigas pequeñas que parecen asociarse con la actividad local de ramas del axón postsináptico y entrada eferente que inhibe la descarga iniciada por otras entradas presinápticas.

Estudios de Hama sobre la estructura de la cadena abdominal (Hama, 1961) le llevaron a proponer la posibilidad de que hubiera fotorreceptores en todos los ganglios ya que en los seis que integran la cadena, el autor encontró cuerpos formados por una pila de estructuras membranosas y multivesiculares que recuerdan la organización característica de las células fotorreceptoras visuales. Esta proposición sugirió a otros autores (Hermann y Stark, 1963) aplicar diferentes intensidades de iluminación a los ganglios abdominales y analizar los efectos provocados en cada uno de ellos. Los resultados pusieron de manifiesto que sólo el ganglio caudal contiene elementos fotorreceptores. Los mismos autores obtuvieron la función de transferencia de los fotorreceptores caudales y señalaron algunos datos interesantes: pequeñas fluctuaciones sinusoidales en la intensidad de la luz cercana a determinado valor de corriente directa producen disparo de frecuencia regular; a la frecuencia del estímulo se le puede asociar dos características de la respuesta: la frecuencia y la fase. Aquélla permite medir la ganancia del sistema (relación entre las frecuencias de salida y de entrada) mientras que la fase mide la latencia del sistema. En los fotorreceptores caudales hay predominio de bajas frecuencias, gran tiempo de latencia y poca adaptación al estímulo. Al comparar las respuestas de las unidades aisladas con las de la población se comprueba que los dos sistemas tienen características dinámicas similares.

Los fotorreceptores del 6o. ganglio son elementos fotorreceptores primarios y sus aferencias contralaterales están relacionadas con la inhibición (Wilkins y Larimer, 1972, 1976; Kennedy, 1963; Preston y Kennedy, 1963; Preston y Kennedy, 1960). En la obscuridad los impulsos

espontáneos muestran una frecuencia que oscila entre 5 y 15 impulsos por segundo y si se seccionan las raíces aferentes los intervalos son constantes. El ritmo de descarga se inicia por impulsos antidrómicos u ortodrómicos y parece muy probable que esté involucrado un marcapaso de potenciales endógeno; los elementos fotorreceptores son también interneuronas de segundo orden con posibilidad de integrar estímulos mecánicos originados en los apéndices del telson.

Función de las neuronas fotorreceptoras.-

Hace casi 50 años fue sugerida una posible relación entre la actividad de los fotorreceptores caudales y la locomoción (Welsh, 1934). La organización de las conexiones aferentes del 6o. ganglio apoya esta posibilidad ya que estas aferencias afectan en forma tónica la actividad de alguna interneurona o interneuronas que también reciben entradas desde regiones periféricas. Por otra parte se ha propuesto que el fotorreceptor caudal puede sustituir al ojo compuesto en la regulación del ciclo de actividad locomotora diurna del acecil (Chapple, 1960).

El que las mismas unidades actúen como los elementos fotorreceptores primarios y como interneuronas secundarias hace pensar en la posibilidad de que la información táctil se vea modificada por la actividad tónica provocada por la luz. También es factible que los fotorreceptores faciliten la transmisión de otros tipos de información sensorial debido a efectos subliminales que se ejercen sobre la excitabilidad postsináptica. El sistema fotorreceptor muestra conexiones aparentemente no funcionales con buen número de interneuronas (incluidas las gigantes) que en condiciones normales median las reacciones de escape.

Las primeras medidas de sensibilidad espectral del 6o. ganglio ab -

dominal mostraron que las neuronas caudales adaptadas a la obscuridad -- presentan diferencias con respecto a los fotorreceptores visuales en la misma situación de adaptación (Bruno y Kennedy, 1962). Mientras la sensibilidad máxima de los fotorreceptores caudales se presenta a los 500 nm, la de los fotorreceptores visuales se manifiesta a los 570 nm. Con base en técnicas electrorretinográficas y utilizando adaptaciones a la luz azul y a la luz roja, se ha propuesto que los ojos de Procambarus clarkii poseen dos pigmentos cuyas sensibilidades espectrales están claramente desplazadas de la de los fotorreceptores del ganglio caudal --- (Wald, 1962, 1963). Sin embargo al analizar las sensibilidades espectrales de los fotorreceptores caudales de distintas especies de acociles se encontró que son idénticas (Larimer y cols., 1966).

La identificación de la cuatro neuronas (dos de cada lado) que funcionan en el ganglio caudal como fotorreceptores y el conocimiento de -- que la primera sinápsis se establece hasta el ganglio esofágico se deben a los estudios de Hermann (1972) quien pudo registrar cambios en esta estructura como respuesta a un aumento en la frecuencia de impulsos provenientes de la unidad fotorreceptora caudal. Estos cambios se traducen en trenes de impulsos nerviosos que generan movimientos coordinados de las patas torácicas.

Al estudiar los posibles mediadores químicos involucrados en la --- respuesta de los fotorreceptores caudales se observa que la aplicación tópica de acetilcolina provoca una modificación importante en los patrones temporales de respuesta. Este hecho dió base a la proposición de que la acetilcolina es el neurotransmisor inhibitorio de la actividad de los fotorreceptores caudales del acocil (Hermann y Skiles, 1969).

Ritmos circádicos en el acocil.-

Dada la facilidad de registro, uno de los ritmos más comúnmente estudiados es el de actividad locomotora (caminar, nadar, correr, volar). De los ritmos de actividad locomotora se conoce mucho sobre sus características (curso temporal, fase), poco sobre sus mecanismos de regulación y nada sobre su origen. Un autor (Roberts, 1942) estudió el ritmo locomotor de algunos crustáceos decápodos y encontró que su mantenimiento dependía, en buena parte, de la integridad del sistema nervioso central. Algo semejante había sido propuesto antes en trabajos realizados con acociles del género Cambarus (Kalmus, 1938; Schalleck, 1942). Muchos años después apareció un trabajo (Aréchiga y cols., 1973a), en el que se propuso la existencia de un ritmo locomotor en el acocil Procambarus bouvieri, en condiciones constantes de luz y obscuridad. Más tarde otros autores señalaron la participación del sistema nervioso en la regulación del ritmo motor de Procambarus clarkii (Page y Larimer, 1975).

Recientemente apareció un trabajo (Fuentes-Pardo e Inclán Rubio, -- 1981), en el que las autoras detallan las características del ritmo locomotor de Procambarus bouvieri. Según ellas el período circádico es de -- 23.1 horas en obscuridad constante y de 26.5 horas en un medio con luz -- constante de 2 lux de intensidad. La actividad locomotora alcanza su valor máximo alrededor de la 1:00 horas y como es de esperarse de un animal nocturno los ciclos circádicos tienen mayor amplitud cuando el animal se mantiene en obscuridad constante. El ritmo es bimodal; el segundo pico de actividad se presenta por lo general hacia las 11:00 horas. Si se disminuye la temperatura de 20° a 12°C. no se observa ninguna modificación en el ritmo y si el cambio es de 12° a 20°C., sólo se provocan cam --

bios en el transitorio pero no en el período medido en la fase estable. De hecho los cambios térmicos sólo parecen afectar la amplitud del ritmo locomotor lo que significa que los aumentos y disminuciones de la temperatura la incrementan o la disminuyen respectivamente, sin afectar el período. La aplicación de un pulso único de luz de 20 lux cuando el animal está en condiciones de oscuridad constante, provoca cambios en la fase pero no en el período. Al extirpar el ganglio supraesofágico se observan algunas modificaciones en el ritmo locomotor siendo las más evidentes el aumento en el nivel de actividad y el aumento en la frecuencia natural de oscilación.

Además de los cambios locomotores, han sido estudiados otros cambios circádicos en el acocil, particularmente en las diferentes estructuras del sistema visual. Así, por ejemplo, Bennitt, (1932), registró la persistencia de un ritmo diurno en el movimiento del pigmento retiniano proximal del acocil Cambarus virilis. En este trabajo el autor colocaba un gran número de acociles en oscuridad completa y después de 24 horas mataba tres animales a intervalos de tres horas durante las siguientes 75 horas; los ojos de estos acociles eran macerados y examinados. Welsh (Welsh, 1939, 1941), detectó un ritmo en el diámetro de la pseudopupila utilizado como índice de la posición de los pigmentos retinianos accesorios proximal y distal (hoy se sabe que es principalmente el pigmento distal el responsable del diámetro de la pseudopupila). Este investigador sugirió que el ritmo observado podría atribuirse a la variación regular en la actividad de centros nerviosos inhibitorios (controlados, en parte, por los niveles de glucosa sanguínea), los cuales causarían una variación en la cantidad de hormona que lleva los ---

pigmentos a la posición de adaptación a la luz (HAL), liberada por la glándula sinusal.

Trabajando en acociles implantados con microelectrodos colocados en forma permanente en diferentes elementos del sistema visual se puede demostrar la existencia de cambios periódicos en la amplitud del electrorretinograma y de la frecuencia de descarga de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa o "fibras de acción sostenida" (Aréchiga y Wiersma, 1969). Estos cambios pusieron de manifiesto una mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día. Más tarde se comprobó (Aréchiga y cols. 1973b) que los cambios de amplitud del electrorretinograma correspondían a un verdadero ritmo circádico cuyo período dependía de la cantidad de luz que recibiera el animal. Por otra parte (Aréchiga y Fuentes, 1970), se demostró la estrecha correlación que existe entre la posición de los pigmentos retinianos accesorios y la amplitud del ERG a lo largo del nictámero.

Se ha propuesto que lesiones realizadas en distintas regiones del ganglio cerebroide provocan modificaciones en la amplitud y el período del ritmo circádico electrorretinográfico del acocil (Barrera Mera, --- 1976). Este autor observó que el ritmo persiste, aunque disminuido, después de la destrucción del protocerebro, del deutocerebro o del ganglio cerebroide en su totalidad y que algo comparable se presentaba en el ritmo de la pseudopupila.

Page y Larimer (1975a) encontraron que la sección de las comisuras circunesofágicas no interfería con el ritmo circádico de amplitud electrorretinográfica o con su sincronización. Sin embargo, la ritmicidad desaparecía si se seccionaba el nervio óptico. Los resultados sugi-

riaron que el origen de la oscilación circádica se encontraba en el gan
glio supraesofágico y que se acopla al ojo a través del nervio óptico.-
El hecho de que la bisección del gan
glio cerebroides abolió la ritmicidad circádica en ambos ojos, apoyaba estas suposiciones; por otro lado-
los resultados obtenidos con registros bilaterales de la amplitud del -
ERG tanto de animales intactos como lesionados sugirieron que el ritmo-
en los dos ojos se encuentra acoplado por un mecanismo central de tipo-
neurál.

La persistencia del ritmo circádico electrorretinográfico en ta -
llos oculares seccionados de acocil fue interpretado como el resultado-
de que la actividad periódica se ve influida pero no queda determinada-
por la acción del sistema nervioso (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977). Los
autores observaron sólo algunas modificaciones en el ritmo electrorreti
nográfico del ojo aislado con respecto al que se obtiene de animales in
tegros.

Finalmente, Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal (1983) encuentran que -
la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales del acocil Pro -
cambarus bouvieri (Ortmann) tiene un ritmo circádico con una duración -
de 23.5 horas cuando se registra en condiciones de oscuridad y tempera-
tura constante y que ante la aplicación de un estímulo luminoso único,-
se presenta un adelanto o un atraso en la fase del ritmo que dependen -
de la hora circádica en la que se aplica el pulso.

De estos antecedentes se puede resumir lo siguiente:

(a) La existencia de ritmos circádicos en distintos organismos se-
pone, de manifiesto cuando, mediante maniobras experimentales especifi -
cas, emerge una actividad recurrente con un período cercano a 24 ho -

ras, dependiente de la luz, independiente hasta cierto punto de otros factores ambientales y susceptible de verse modificado en el período o en la fase por la presencia de señales externas periódicas o únicas. Esta modificación se conoce como sincronización y dada la importancia que tiene la luz en las propiedades de los ritmos circádicos suele ser provocada mediante señales luminosas.

(b) Los fotorreceptores mejor estudiados hasta ahora son los retinianos. En la escala animal hay, sin embargo, un buen número de fotorreceptores extrarretinianos cuyo funcionamiento permanece todavía sin esclarecer. Entre estos fotorreceptores destacan los ubicados en el 6o. ganglio abdominal del acocil.

(c) En el acocil han sido estudiados distintos ritmos circádicos, entre ellos el electrorretinográfico y el locomotor. Aunque estos ritmos han sido más o menos bien caracterizados falta, sin embargo, conocer muchos aspectos referentes a su capacidad de sincronización. Interesante, entonces, estudiar esta propiedad analizando al mismo tiempo la participación que tiene en ella la actividad de los fotorreceptores caudales.

HIPOTESIS.

La posibilidad de modificación de los ritmos circádicos depende de la capacidad del sistema para captar las señales potencialmente sincronizadoras. Esta capacidad se basa en la existencia de estructuras receptoras del estímulo sincronizante (fotorreceptores si se trata de la luz) y en la susceptibilidad del sistema circádico para alterar su estado funcional de acuerdo con las señales que reciba.

Si existe una organización estructural que asegure la interacción funcional de los fotorreceptores caudales con las estructuras responsables de que se genere un ritmo circádico en el acecil, entonces la aplicación de luz al 6o. ganglio abdominal debe provocar modificaciones en el ritmo circádico correspondiente.

En la generación del ritmo circádico electrorretinográfico participan diferentes estructuras entre las que se cuentan los fotorreceptores, los pigmentos retinianos accesorios, y el sistema neuroendócrino. Potencialmente, los cambios que se presenten en cualquiera de estas estructuras provocarían modificaciones en el ritmo circádico en el que participan.

Si existe comunicación anatomofuncional entre el 6o. ganglio abdominal y las estructuras responsables de que se genere el ritmo circádico electrorretinográfico, entonces la estimulación de aquél provocará modificaciones en éstos que serán proporcionales a la respuesta que los fotorreceptores caudales den al estímulo que se aplique y que se traducirán en cambios en el ritmo circádico electrorretinográfico.

En la regulación del ritmo circádico locomotor participa en forma importante el sistema nervioso central, en particular el ganglio cerebroi

de., Si existe comunicación anatomofuncional entre el 6o. ganglio abdominal y el ganglio cerebroides, entonces la estimulación de aquél provocará cambios en este que dependerán en forma importante del tiempo circádico en el que se aplique el estímulo y que se traducirán en modificaciones en el ritmo circádico locomotor.

Para probar las hipótesis anteriores el trabajo experimental se desarrolló en cuatro etapas: (1) Se hicieron registros que permitieron corroborar la existencia del ritmo circádico electrorretinográfico y se comprobó la capacidad que tienen estos ritmos de alterar sus características por la aplicación de señales luminosas únicas sobre los fotorreceptores visuales. Algo semejante se hizo con el ritmo locomotor. (2) Se estimuló fóticamente el 6o. ganglio abdominal y se comprobó la existencia de fotorreceptores extrarretinianos caudales en el acocil Procamburus bouvieri. Se probó el efecto de la estimulación luminosa a distintas horas del día. (3) Se probó el efecto de la estimulación luminosa del 6o. ganglio sobre los ritmos circádicos electrorretinográficos y motor midiendo las características de estos ritmos antes y después del estímulo; (4) Se probó la posibilidad de que hubiera comunicación anatomofuncional entre el 6o. ganglio y algunas estructuras relacionadas con la aparición y persistencia de los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor.

MATERIAL Y METODOS:

Generalidades.-

Acociles adultos de la especie Procambarus bouvieri (Ortmann), procedentes de Uruapan, Michoacán, sin distinción de sexo, con un peso aproximado de 18 a 26 gramos, fueron utilizados en la etapa experimental. Los animales se trabajaron en forma individual, colocando cada acocil dentro de un refrigerador que mantenía la temperatura cercana a los 16° C. y en oscuridad constante. Los acociles se sumergían parcialmente en el agua dentro de una caja de lucita negra que se encontraba dividida en dos compartimentos, lo que permitía separar las porciones cefálica y caudal del animal y, en su caso, estimular cada región con distintos regímenes de luz, (

1.- Caracterizaciones circádicas electroretinográficas y motor:

1A.- Los registros que permitieron obtener y caracterizar el ritmo circádico electroretinográfico del acocil se llevaron a cabo de la siguiente manera: a un acocil sujeto por el caparazón y parcialmente sumergido en el agua se le colocaba un electrodo de metal de 1 a 5 μ m de diámetro sobre la superficie de la córnea. El electrodo recogía la respuesta de los fotorreceptores a los destellos luminosos enviados por un fotoestimulador a intervalos de tres minutos y estaba conectado a un preamplificador (Tektronix 122) del que salían dos señales en paralelo, una hacia un osciloscopio (Tektronix 502A) y otra hacia un polígrafo (Grass-P7). Con este último aparato se obtenía un registro gráfico todo el tiempo que durara el experimento (no menos de 14 días). Hacia el 4o. día de registro se aplicaba sobre los ojos del animal un estímulo de 20 lux de

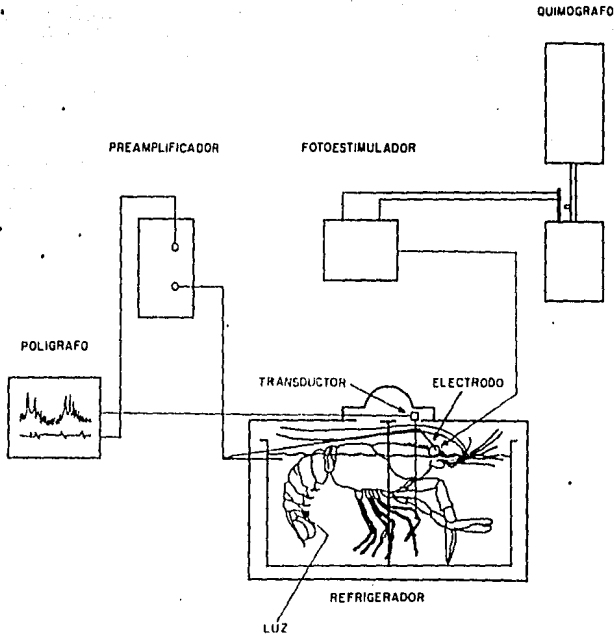


Figura 1.- Esquema del dispositivo empleado para la estimulación luminosa de los fotorreceptores caudales y visuales, el registro de la actividad eléctrica de los fotorreceptores y el registro de la actividad locomotora usado en nuestros experimentos. Nótese la completa separación que hay entre los dos compartimentos en los que se colocan el cefalotórax y el abdomen del acocil.

intensidad durante 10 minutos después del cual se regresaba a la aplicación de un destello cada tres minutos durante por lo menos 10 días más.- En distintos experimentos el estímulo luminoso de 10 minutos se aplicaba a diferentes momentos circádicos.

El análisis de estos experimentos consistía en la determinación cada 30 minutos de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) - de los fotorreceptores visuales (Naka y Kuwabara, 1959). Los valores así obtenidos se graficaban teniendo al tiempo en el eje de las abscisas. -- Con estas gráficas se pusieron de manifiesto cambios periódicos en la amplitud del ERG pudiéndose establecer el carácter circádico de los mismos así como la relación α/ϵ y la amplitud de los ciclos. Asimismo se podía analizar las alteraciones de los ciclos circádicos del ERG como consecuencia de la aplicación del estímulo luminoso a diferentes momentos circádicos.

1B.- Para la obtención y caracterización del ritmo circádico locomotor se procedía de la siguiente manera: los acociles parcialmente sumergidos en el agua se sujetaban por el caparazón y sus patas ambulatorias se ataban a hilos delgados que se hacían llegar a un transductor de fuerza (Grass, modelo FT03C) de éste se enviaba una señal hasta un polígrafo Grass (P7) cada vez que el animal movía una o más de las patas amarradas. Con las señales enviadas al polígrafo se tenía un registro ininterrumpido de la actividad motora durante los 10 a 14 días del experimento. Ha cia el 4o. día se aplicaba un estímulo luminoso de 20 lux durante 10 mi- nutos, después del cual se volvía a mantener el registro en condiciones constantes de oscuridad. En distintos experimentos se aplicaba este estímulo en diferentes momentos circádicos. El análisis de los resultados-

se hacía midiendo el área en mm^2 del trazo que correspondía a las señales enviadas por el transductor cada 30 minutos y graficando los valores así-obtenidos con respecto al tiempo. De esta manera se puso de manifiesto -- que la actividad motora del acocil muestra un patrón de actividad circádica pudiendo medirse la duración del período, la amplitud del ritmo y la-relación ω/ϵ antes y después de la aplicación del estímulo luminoso a - distintos momentos circádicos.

2.- Fotoestimulación del 6o. ganglio abdominal. En otro grupo de ex-perimentos se pusieron de manifiesto la capacidad del 6o. ganglio abdomi-nal para responder a estímulos luminosos y los cambios de sensibilidad -- que muestra esta estructura durante las distintas horas del nictámero. Pa-ra ello se hicieron pruebas en el animal íntegro y en la cadena abdominal aislada. Las pruebas "in situ" consistían en hacer una incisión ventral - del exoesqueleto que permitía llevar a cabo una disección que dejaba al - descubierto el 5o. y el 6o. ganglios abdominales. Se colocaba entre ellos un electrodo de succión que contenía solución de Van Harreveld (Van Harre-veld, 1936) con el que se recogía la actividad eléctrica espontánea que - se enviaba a un preamplificador (Tektronix, modelo 122); éste estaba co-nectado a un osciloscopio (Tektronix, modelo 502) del que se fotografía -ban las señales con una cámara quimográfica (Grass, modelo C4) para su -- análisis ulterior. En otro momento del experimento se aplicaba una señal-luminosa de 20 lux de intensidad y 31 minutos de duración sobre la región ventral del telson midiendo la frecuencia de disparo a intervalos de 30 - segundos durante los 1300 segundos del estímulo a fin de compararla con - la frecuencia de descarga espontánea. Estos procedimientos se seguían en-registros diurnos y nocturnos (9 y 21 horas, respectivamente), a fin de -

comprobar la posibilidad de cambios en la frecuencia de respuesta que -- pudieran atribuirse a la hora del día. Para las pruebas " in vitro" la -- cadena abdominal separada del animal se colocaba en una caja de Petri -- que contenía solución de Van Harrevelde y se procedía a registrar la acti -- vidad espontánea y provocada por la luz en forma semejante a como se -- describió en el párrafo anterior. Los resultados obtenidos en esta sec -- ción, se muestran en gráficas en las que los puntos corresponden al va -- lor promedio de 12 experimentos. Se midió el error estándar para cada -- punto y se compararon las pendientes obtenidas para cada situación expe -- rimental; por último se hizo un análisis de regresión simple por el méto -- do de mínimos cuadrados.

3.- Estimulación del sexto ganglio abdominal y efectos sobre los -- ritmos circádicos electroretinográfico y motor. Se probó el efecto de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal sobre los ritmos circádi -- cos electroretinográfico y motor. Para ello se hacían primero registros a corto plazo que consistían en obtener el ERG de animales íntegros -- puestos en condiciones semejantes a las descritas previamente. Se regis -- traba la primera respuesta ante un destello luminoso de prueba. El ani -- mal recibía iluminación constante durante 10 minutos (estado de adapta -- ción a la luz) por lo que el animal presentaba "cero respuesta a la luz", conveniente para poder hacer comparaciones válidas entre los individuos. A partir de estos momentos el animal quedaba en oscuridad constante só -- lo alterada por la aplicación de destellos luminosos de prueba con los -- que obtenía un ERG cada 10 minutos. De esta forma se generaba una "curva -- de adaptación a la obscuridad". Se consideraba que el animal estaba en -- estado de adaptación a la obscuridad cuando no había ya crecimiento en la

magnitud del ERG después de tres estimulaciones sucesivas, lo que sucedía después de cerca de una hora. En este estado se aplicaba luz sobre el 6o. ganglio abdominal y se seguía registrando el ERG durante 120 minutos más. Es importante hacer notar que los dos compartimentos de la cámara de lucita en la que se colocaba al animal estaban completamente aislados el uno del otro lo que evitaba que la luz necesaria para la obtención del ERG llegará al telson y la luz que se aplicaba al 6o. ganglio afectara los fotorreceptores visuales. El análisis de estos experimentos consistía en medir la amplitud del ERG durante la adaptación a la oscuridad y después de que se hubiera aplicado el estímulo luminoso por el 6o. ganglio. En una curva de adaptación a la oscuridad, cada punto correspondía al promedio de medidas obtenidas de diferentes experimentos. Con fines de comparación los promedios se porcentualizaron correspondiendo el 100% al máximo valor que alcanzara la respuesta en cualquier momento del experimento. A fin de probar una acción de los fotorreceptores caudales que pudiera atribuirse a la hora del día, los registros se hicieron por la mañana y por la noche.

Con éstos experimentos se puso de manifiesto una relación anatómico-funcional entre los fotorreceptores extrarretinianos del 6o. ganglio y los fotorreceptores visuales responsables del ERG. Establecida esta relación se procedió a comprobar el efecto que pudiera tener la estimulación del 6o. ganglio sobre el ritmo circádico electrorretinográfico para lo cual se obtenía y posteriormente se analizaba un registro a largo plazo del ERG tal y como se describió en la sección 1A. La única diferencia era que el estímulo luminoso de 20 lux y de 10 minutos se aplicaba sobre el telson y no sobre los ojos del animal.

Todos los procedimientos que se han descrito con los que se pretendió poner de manifiesto la interacción entre los sistemas fotorreceptores caudal y visual, fueron seguidos para saber si el 6o. ganglio abdominal es capaz de sincronizar el ritmo circádico locomotor.

Por último, habría que agregar que para probar si los efectos que se observaban por estimulación de los fotorreceptores caudales sobre las funciones visual y motora correspondían, efectivamente, a la acción sincronizadora de los fotorreceptores extrarretinianos, se procedió a extirpar quirúrgicamente el 6o. ganglio abdominal haciendo los registros correspondientes 10 días después de la operación, a estimular foticamente la región que ocupaba el ganglio y a registrar en estas condiciones en experimentos a corto y a largo plazo, la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales y la actividad locomotora del acocil.

4.- Establecimiento de la posible relación anatomofuncional entre fotorreceptores caudales y otras estructuras en el acocil. La última sección experimental tenía por objeto probar la posible relación anatomofuncional entre los fotorreceptores extrarretinianos y algunas estructuras relacionadas con el origen o la modulación de los ritmos circádicos electroretinográfico y motor. Se escogió una de las estructuras que se sabe que juega un papel importante en el ritmo del ERG: el sistema de pigmentos retinianos accesorios. Como índice de la posición de los pigmentos accesorios se midió el número de facetas claras en la superficie de la córnea (pseudopupila) ante la llegada de un estímulo luminoso. El procedimiento que se seguía era el siguiente: acociles íntegros, inmersos parcialmente en el agua y sujetos por medio de una pinza, eran colocados ante un microscopio estereoscópico (Zeiss) con el que se

podían ver con facilidad las facetas claras de la córnea. En estas condiciones se aplicaban diez minutos de luz constante de 20 lux de intensidad, lo que llevaba los pigmentos accesorios a un estado de adaptación a la luz (pseudopupila reducida). Inmediatamente después se leía el número de facetas claras y a partir de ese momento el animal quedaba en oscuridad constante, sólo interrumpida por la luz del microscopio indispensable para contar el número de facetas claras. Esto se hacía cada 10 minutos hasta que el ojo se adaptaba a la oscuridad, lo que se consideraba que había ocurrido cuando el número de facetas claras era el mismo después de tres mediciones sucesivas. En estas condiciones se procedía a plicar por el telson del animal un estímulo luminoso de 20 lux y 10 minutos y se continuaba con la lectura de la pseudopupila durante otros 120 minutos más a fin de comprobar si la actividad de los fotorreceptores caudales había afectado la posición de los pigmentos retinianos accesorios. Los resultados se incluyeron en gráficas en las que cada punto se obtenía después de promediar los valores correspondientes a 10 experimentos y en los que se incluye el error estandar. Con fines comparativos, los promedios se porcentualizaban correspondiendo el 100% al máximo valor que alcanzaba la pseudopupila en cualquier momento del experimento.

En un último grupo de experimentos se quiso probar si el paso de información desde los fotorreceptores caudales hasta las estructuras responsables de los ritmos electroretinográfico y motor se llevaba a cabo por el nervio óptico para lo cual se procedió a seccionar quirúrgicamente uno de ellos haciendo los registros correspondientes 10 días después de la sección. El registro del ERG se hacía en ambos ojos, el -

homolateral y el contralateral a la de la estimulación luminosa del 6o. ganglio sobre las características de los dos ritmos electroretinográfico obtenido. Para conocer la participación del nervio óptico en el envío de señales desde los fotorreceptores caudales hasta los centros integradores del ritmo motor, se procedía de la misma forma que se señala en el párrafo anterior sólo que se registraba la actividad locomotora homolateral o contralateral a la sección aunque los resultados se ejemplifican con experimentos únicos, se registraron 5 acociles en estas condiciones.

RESULTADOS. -

1A.- Ritmo circádico electroretinográfico:

En la primera parte de la figura 2 se muestra un registro típico de la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil obtenida durante varios días de un animal íntegro. En ella se puede ver el ritmo circádico característico de un animal nocturno. A partir del momento en que se inicia el registro se puede observar una etapa transitoria (que no se incluye en la figura) en la que las fluctuaciones de amplitud del ERG no son caracterizables. Uno o dos días más tarde se estabiliza el patrón de respuesta y se puede comprobar que hacia las 17 horas empieza a presentarse un aumento en la amplitud del ERG el que alcanza su máximo aproximadamente a las 24 horas. La reducción en la amplitud de la respuesta empieza hacia las 7 horas alcanzando el ERG su valor mínimo hacia las 12 horas. El valor promedio del período circádico en la población fue de 23.7 horas y el de la relación entre los períodos de actividad y de reposo (relación α / ϵ) fue de 1.12. Estas características del ritmo circádico electroretinográfico aparecen en forma sistemática a partir del tercer día de registro y puede continuar durante muchos días más si las condiciones se mantienen constantes. Se puede comprobar que después de muchos días de registro empieza a haber disminuciones importantes en la amplitud del ritmo del ERG, aunque la periodicidad circádica permanece sin alteración, este hecho se conoce con el nombre de amortiguamiento. Por otra parte, si durante la fase estable del ritmo se aplica sobre los ojos un pulso único de luz (en nuestros experimentos fue de 10 minutos de duración), se producirán cambios

en el ritmo circádico que se manifestarán por la aparición de otro transitorio de duración variable de 2 a 4 días después del cual el ritmo circádico se reasumirá con un cambio de fase que depende siempre de la hora circádica a la que se aplicó el estímulo luminoso. Estos hechos se conocen con el nombre de "sincronización". En el experimento que se ilustra en la figura 2 el estímulo luminoso se aplicó a las 22 horas circádicas (TC) y la fase se adelantó 2.42 horas. La determinación de la fase consecutiva a la aplicación de la señal luminosa se hizo el cuarto día después de la aplicación de ésta.

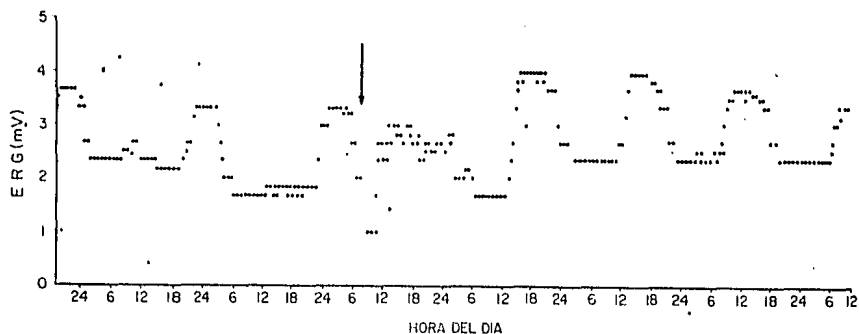


Figura 2.- Registro típico de los cambios de amplitud del ERG de un acocil íntegro obtenido durante 6 días en condiciones constantes de luz y de temperatura. Las fases de ascenso y descenso de la respuesta ponen de manifiesto un ritmo circádico característico de un animal nocturno cuyo período es de 23.3 horas y en el que la relación μ / ϵ es de 1.03. La flecha indica el momento de la aplicación por los ojos de un estímulo luminoso único de 20 lux y 10 minutos de duración. Nótese cómo a la aplicación de la señal luminosa sigue una etapa transitoria de $1\frac{1}{2}$ días de duración después de la cual el ritmo reasume sus características anteriores pero con un cambio de fase de 2.42 horas de adelanto.

1B.- Ritmo circádico de actividad locomotora:

Bajo condiciones constantes de oscuridad y de temperatura, se comprobó la existencia de fluctuaciones rítmicas de período de 26.5 horas la actividad locomotora.

La actividad locomotora presentó un primer pico de actividad a las 24 horas y un segundo pico a las 11:30 horas, aproximadamente; la relación α/ϵ promedio fue de 1.4. En un registro típico como el que se muestra en la figura 3 se puede ver que la aplicación de un pulso de luz sobre los ojos a las 20 horas TC, desencadena una fase transitoria que en este caso particular duró cuatro días después de la cual el ritmo circádico reasume sus características iniciales mostrando sólo un cambio de fase equivalente a un adelanto de 8 horas (medido al cuarto día después de la aplicación del estímulo).

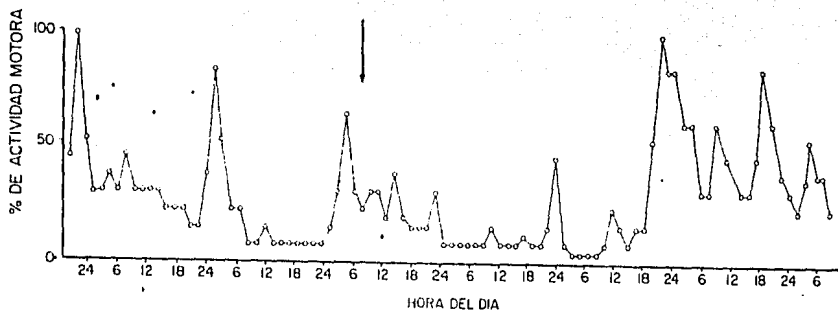


Figura 3.- Cambios en la actividad locomotora de un acocil registrados durante seis días en condiciones constantes de oscuridad y de temperatura. Las fases de ascenso y descenso del trazo ponen de manifiesto el carácter circádico bimodal de la actividad motora. La flecha indica el momento de la aplicación de una señal luminosa única de 20 lux y 10 minutos de duración a las 20 horas TC. Después de una fase transitoria que duró 2 1/2 días, el ritmo volvió a mostrar sus características originales con un adelanto en la fase de ocho horas.

2 - Efecto de la fotoestimulación del 6o. ganglio abdominal:

La cadena ganglionar abdominal del acócil consta de seis pares de ganglios (el último está fusionado) nombrados del 1o. al 6o. del cefálico al caudal y unido cada uno de ellos por porciones nerviosas llamadas conectivos y formadas por los axones de las neuronas que constituyen los ganglios. Experimentos "in situ" e "in vitro" pusieron de manifiesto que cuando el electrodo de registro se colocaba entre el 6o. y el 5o. ganglios abdominales, se podía detectar la llamada actividad eléctrica espontánea, que en realidad resulta de las múltiples aferencias que recibe el 6o. ganglio. Esta actividad se envía hacia el resto de la cadena, la cadena ganglionar torácica y el ganglio supraesofágico como se puede ver en el esquema de la figura 4. Si se aplica un pulso de 0.5 lux sobre el 6o. ganglio, se comprueba que, con una latencia de 4 segundos, hay un aumento en la frecuencia de descarga de los potenciales desde un 50 hasta un 100% del valor previo a la estimulación. Este aumento permanece todo el tiempo que dure el estímulo luminoso y persiste algunos segundos después de la suspensión del mismo (figura 5). También se puede comprobar que la latencia disminuye en forma proporcional al aumento de la intensidad del estímulo. Si la misma intensidad luminosa se aplica a cualquiera de los otros cinco ganglios de la cadena, no se aprecia ningún cambio en la frecuencia de descarga de la misma, lo que se ha interpretado como prueba a favor de que las neuronas fotorreceptoras se localizan sólo en el 6o. ganglio de la cadena abdominal y que la descarga que se produce como resultado de que su excitación se propaga a lo largo de la cadena y se puede captar en cualquier punto de la misma. Tanto la frecuencia espontánea de la cadena abdominal como la acti-

SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DEL ACOCIL

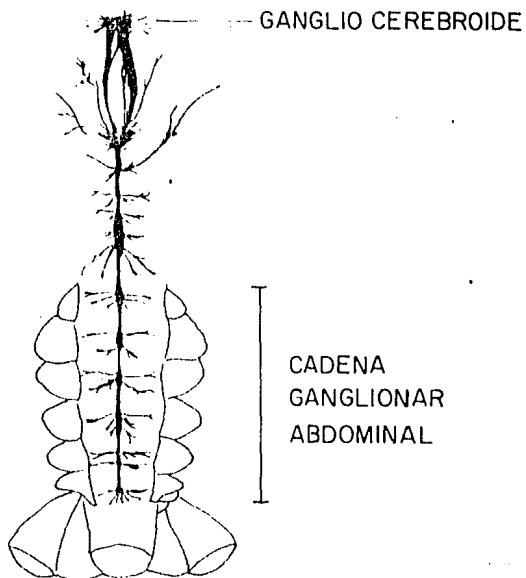


Figura 4.- Esquema del sistema nervioso central del acocil, en el que se aprecia la comunicación que existe entre el 6o. ganglio abdominal, estructura que ocupa la posición más caudal de la cadena, la cadena torácica y el ganglio cerebroide, importante centro integrador del acocil.

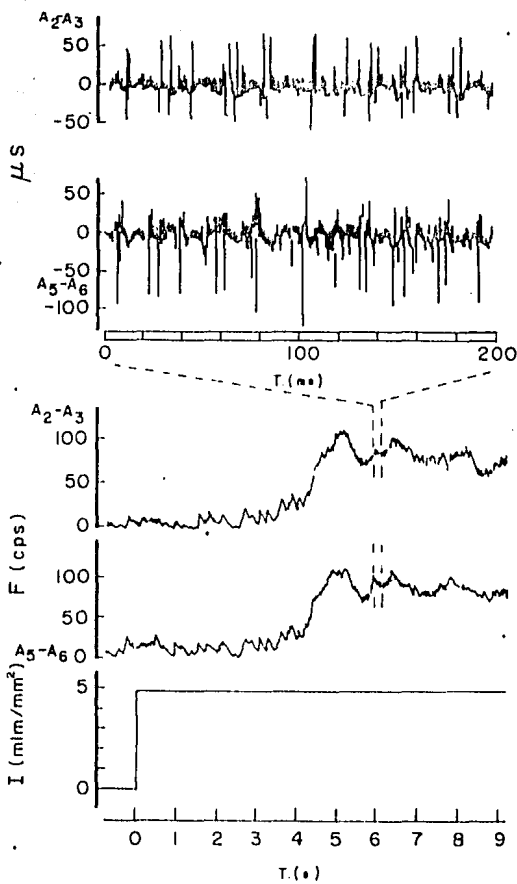


Figura 5.- Registro de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores caudales contenidos en el 6o. ganglio de la cadena abdominal. El --trazp inferior muestra la entrada del impulso luminoso. Los dos siguientes trazos (de abajo para arriba) corresponden a los cambios de frecuencia de disparo medidos en dos distintas regiones de la cadena abdominal (A₅-A₆ y A₂-A₃, respectivamente). Los dos trazos superiores muestran la actividad unitaria obtenida durante 200 ms de registro en las mismas --dos regiones de la cadena--utilizados en el caso anterior (Tomado de Hermann y Stark, 1963).

vidad provocada por la estimulación luminosa, varían de manera importante dependiendo de la hora del día a la que se haga el registro. Estas diferencias en la sensibilidad del 6o. ganglio se pueden constatar con los datos que se incluyen en las figuras 6, 7 y 8. En la figura 6 el trazo superior corresponde a un registro obtenido a las 9 horas en tanto que el trazo inferior corresponde a un experimento hecho a las 21 horas. Se puede notar que el número de espigas generado antes y después del momento de la aplicación del estímulo luminoso (señalado por la flecha) es notablemente mayor en el registro nocturno (21 hrs) que en el diurno (9 hrs).

La figura 7 corresponde a la gráfica obtenida al incluir el valor de la frecuencia acumulada que presenta el 6o. ganglio abdominal en forma espontánea (círculos vacíos, pendiente: .2639) y el de la frecuencia de descarga registrada inmediatamente después de la estimulación luminosa (círculos llenos, pendiente: .3199), el experimento se realizó a las 9 horas.

La figura 8 muestra la frecuencia acumulada de potenciales obtenida como resultado de la estimulación del 6o. ganglio abdominal a las 21 horas (círculos llenos) en comparación con la que se obtiene a la misma hora, de manera espontánea (círculos vacíos); es evidente la diferencia de pendiente en cada caso (.3042 en la curva de respuesta espontánea y .5228 en la curva obtenida por la estimulación del 6o. ganglio).

Efecto de la estimulación del 6o. ganglio abdominal sobre el ERG en animal íntegro.

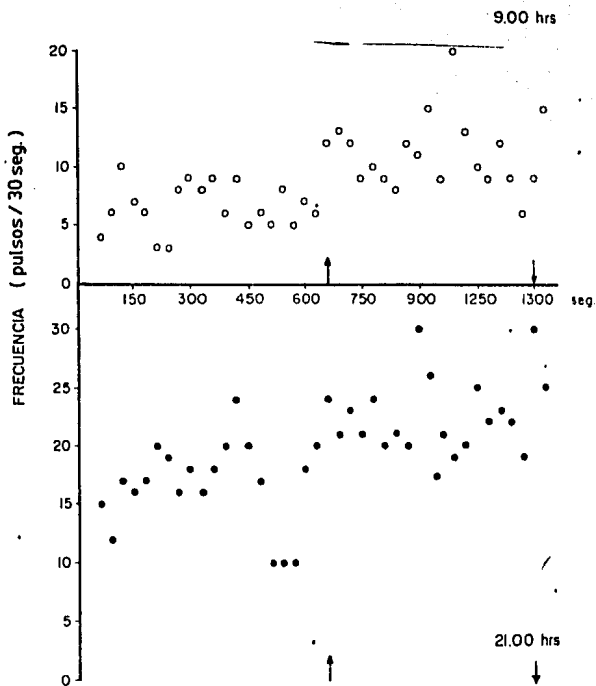


Figura 6.- Frecuencia de descarga registrada en el segmento comprendido entre el 5o. y el 6o. ganglios abdominales. Las flechas marcan los momentos de entrada y salida de una señal luminosa de 20 lux sobre el 6o. ganglio abdominal. El trazo superior corresponde a un experimento diurno (9 horas) mientras que el trazo inferior corresponde a un experimento que se llevó a cabo a las 21 horas.

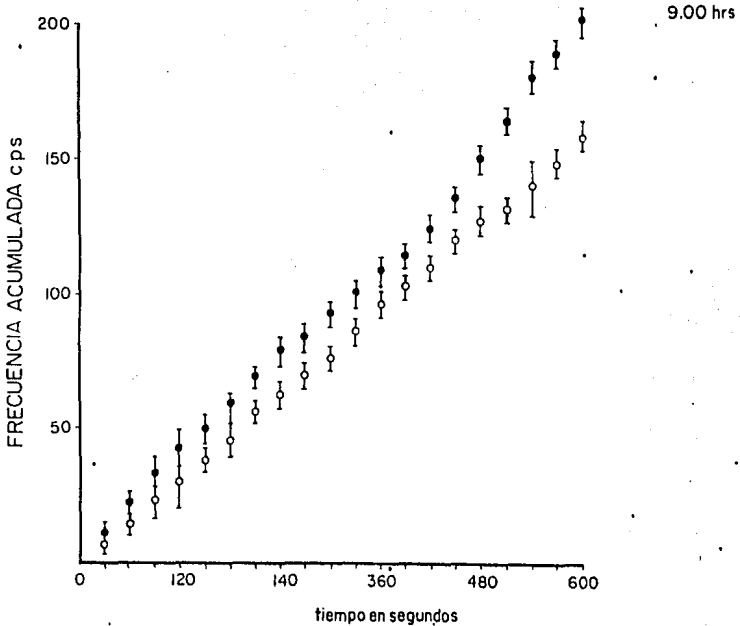


Figura 7.- Frecuencia acumulada de descarga registrada en la porción comprendida entre el 5o. y el 6o. ganglios de la cadena abdominal, consecutiva a la aplicación de un estímulo constante de luz de 20 lux sobre los fotorreceptores caudales (círculos llenos). Los círculos vacíos corresponden a la frecuencia espontánea acumulada de la cadena abdominal. El experimento se realizó a las 9 horas. Cada punto corresponde a un promedio de 12 datos. Las barras indican el error estándar. Los valores de la frecuencia acumulada de la respuesta espontánea y provocada fueron de 160/600_s y 204/600_s respectivamente. Los valores de los pendientes fueron, en cada caso, 0.2639 y 0.3199.

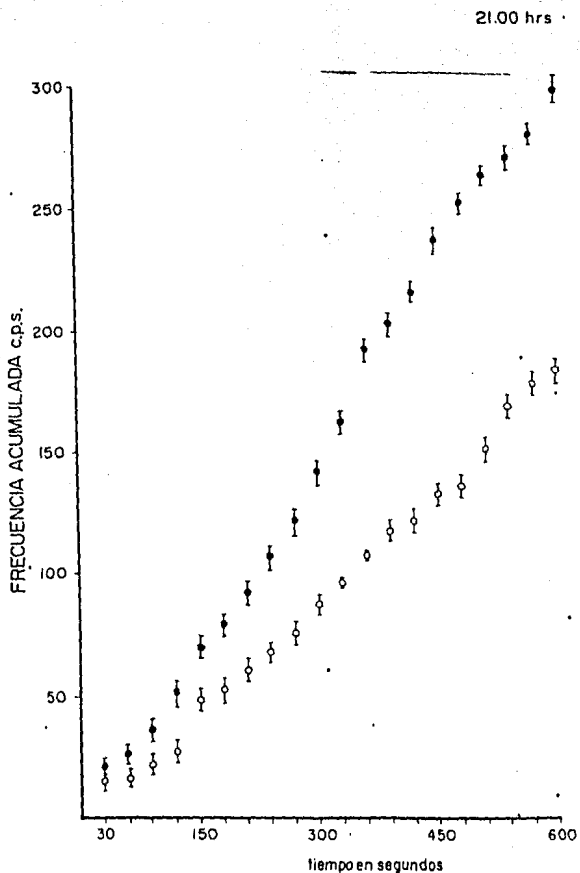


Figura 8.- Frecuencia acumulada de descarga registrada en la porción comprendida entre el 5o. y 6o. ganglios de la cadena abdominal, -- consecutiva a la aplicación de un estímulo constante de luz de 20 lux sobre el 6o. ganglio abdominal (círculos llenos). Los círculos vacíos corresponden a la frecuencia espontánea acumulada de la cadena abdominal. El experimento se realizó a las 21 horas. Cada punto corresponde a un promedio de 12 datos. Las barras indican el error estándar. Los valores de las frecuencia acumulada de las respuestas espontánea y provocada -- fueron de 182/600_s y 300/600_s, respectivamente. Los de las pendientes -- fueron de cada uno, de 0.3042 y 0.5228. Compare estos valores con los de la gráfica de la figura 7.

Experimentos a corto plazo.

En la figura 9 se puede observar los cambios en la amplitud del ERG consecutivos a la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal. La aplicación de luz sobre los receptores visuales (trazo inferior) en animales completamente adaptados a la oscuridad provoca una reducción en la amplitud del ERG del orden del 55% del valor al que había llegado durante su estado previo de adaptación a la oscuridad. Por su parte, la llegada de un estímulo luminoso semejante al que se aplicó sobre los ojos (20 lux durante 10 minutos) pero dirigido ahora hacia los fotorreceptores caudales, produjo también una reducción significativa en la amplitud del ERG (45%), trazo intermedio de la figura 9. Este hecho fue interpretado como el resultado de una comunicación funcional entre los dos tipos de fotorreceptores. Hay que hacer notar que la latencia es muy corta (nótese la reducción en el ERG en la primera medida obtenida después del estímulo por el 6o. ganglio) y el efecto muy prolongado, ya que sólo después de transcurridos 60 minutos se empieza a recuperar la amplitud del ERG. El trazo superior de la misma figura corresponde a un registro control.

La figura 10 muestra las variaciones de amplitud en el ERG como consecuencia de la estimulación de los fotorreceptores caudales a dos diferentes horas del día. Se puede observar una disminución en la amplitud del ERG como consecuencia de la estimulación de los fotorreceptores caudales con 20 lux de intensidad durante 10 minutos, hecha a las 9 horas. (círculos claros) y a las 21 horas (círculos llenos). Es evidente que no sólo la reducción del ERG es diferente en los registros diurnos y nocturnos sino que además hay marcadas diferencias en los regímenes de caída -

consecutivos a la estimulación habiendo una pendiente inicial de descenso mucho más pronunciada en los registros nocturnos que en los diurnos.

Experimentos a corto plazo en acociles sin 6o. ganglio abdominal.

La figura 11 muestra la amplitud del ERG obtenido de animales a los que previamente les había sido extirpado el 6o. ganglio abdominal. A diferencia de lo que sucede en los animales íntegros la amplitud del ERG de los acociles gangliectomizados es consistentemente mayor en el día -- (trazo superior) que en la noche (trazo inferior).

La aplicación de luz sobre el sitio que ocupaba el 6o. ganglio abdominal no modificó el estado de adaptación a la obscuridad de los fotorreceptores visuales, los que redujeron ostensiblemente su respuesta a la luz cuando se les hacía llegar por los ojos un estímulo luminoso de las mismas características del anterior (figura 12).

3.- Efecto de la estimulación del 6o. ganglio abdominal sobre los ritmos circádicos electroretinográfico y motor.

La aplicación de luz de 20 lux de intensidad durante 10 minutos sobre el 6o. ganglio abdominal de un acocil cuyo ritmo circádico electroretinográfico presenta una frecuencia natural de oscilación en fase estable, provoca en el ritmo del ERG la aparición de una fase transitoria que sigue a la aplicación del estímulo y que dura entre 5 y 7 días. Después de este lapso, el ritmo se vuelve a estabilizar y muestra sólo un cambio de fase (adelanto o atraso) que depende del TC durante el que se aplicó el estímulo luminoso.

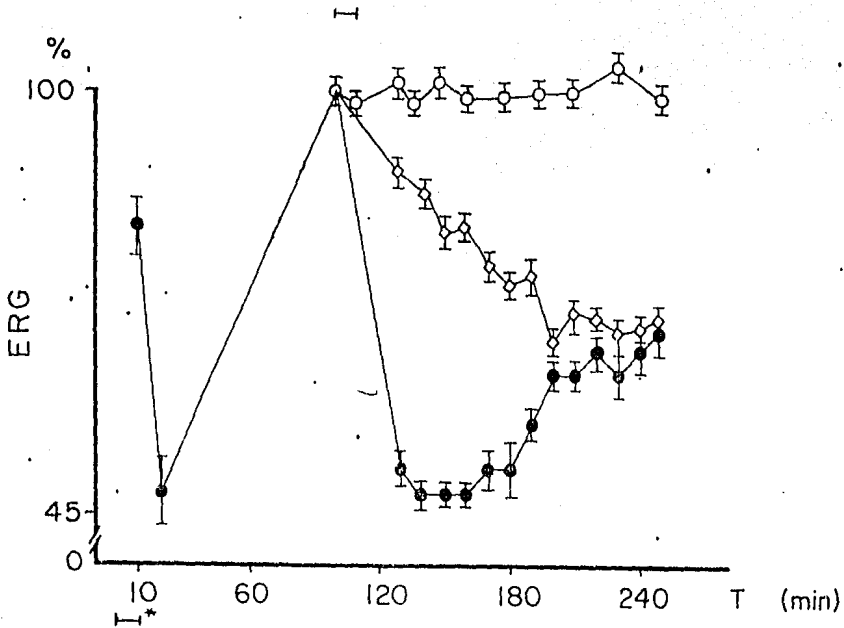


Figura 9.- Cambios porcentuales de amplitud de la respuesta eléctrica a la luz (ERG) de los fotorreceptores visuales al inicio del experimento, después de la aplicación de 10 minutos de luz (←*) y después de haber mantenido al animal en oscuridad constante hasta que la respuesta se mantuviera estable, lo que sucedía después de 100 minutos de oscuridad. En los registros control se mantenían los mismos valores de ERG durante las dos horas siguientes (trazo superior). La barra horizontal (←) señala la aplicación durante 10 minutos de un estímulo luminoso de 20 lux al 6o. ganglio abdominal (trazo intermedio) o a los ojos (trazo inferior). La recuperación parcial del ERG se inicia hasta pasados 60 minutos de la iluminación. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.

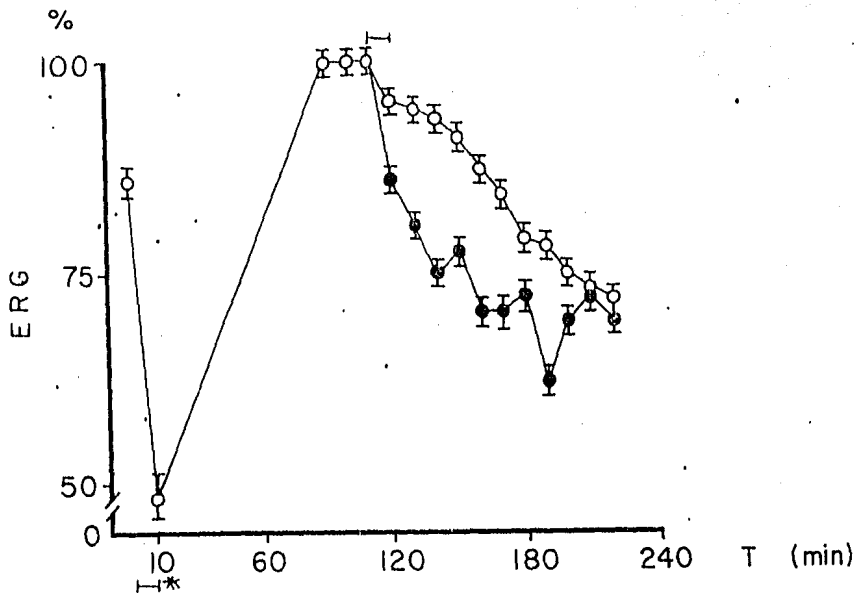


Figura 10.- Variaciones porcentuales de la amplitud del ERG consecutivas a la aplicación de una señal luminosa de 20 lux y 10 minutos sobre el 6o. ganglio abdominal. El trazo superior corresponde a experimentos hechos a las 9 horas y el inferior a los obtenidos a las 21 horas. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las líneas verticales indican el error estándar. (—*) 10 minutos de luz sobre los ojos (—) 10 minutos de luz sobre el 6o. ganglio.

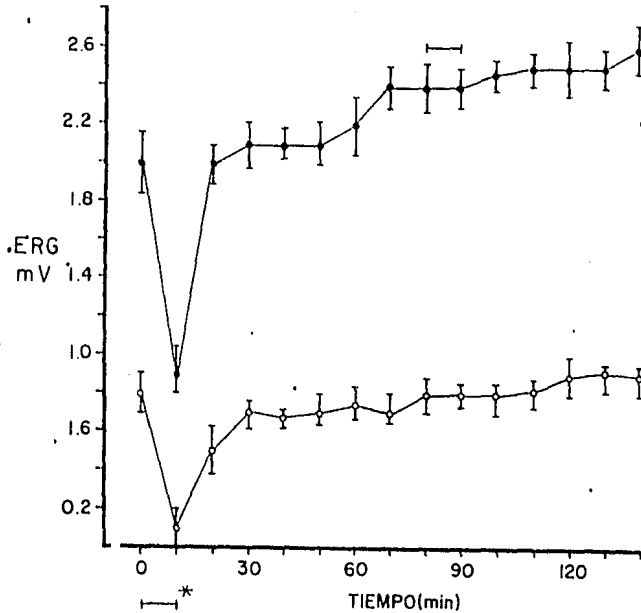


Figura 11.- Amplitud del ERG durante 120 minutos obtenida de acociles sin 6o. ganglio abdominal. El voltaje más alto corresponde al ERG de acociles que se trabajaron a las 9 horas (trazo superior), en tanto que los acociles que se trabajaron a las 21 horas tuvieron una respuesta con valor del 50% en relación al otro grupo. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.
(—*) 10 minutos de luz sobre los ojos;
(—) 10 minutos de luz sobre el 6o. ganglio.

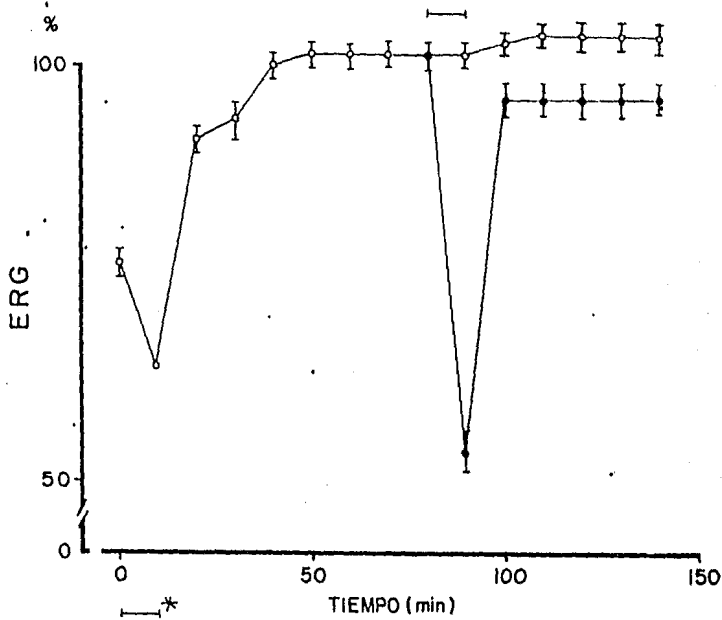


Figura 12.- Efecto de la aplicación de una señal luminosa de 20 lux y 10 minutos sobre los fotorreceptores visuales (trazo inferior) y sobre el lugar que originalmente ocupaban los fotorreceptores caudales (trazo superior). Sobre la amplitud del ERG de animales gangliectomizados. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.

(—*) 10 minutos de luz sobre los ojos.

(—) 10 minutos de luz sobre el 6o. ganglio.

En el ejemplo de la figura 13 (período promedio de 24.3 horas y relación α / ϵ de 1.3 antes del estímulo) el estímulo luminoso se aplicó a las 20 horas TC provocando una fase transitoria que duró 6 días y un adelanto de fase, medido cuando el ritmo se había vuelto a estabilizar, de 4.3 horas. La relación α / ϵ después del pulso fué de 1.2.

En otro grupo de experimentos se extirpó el 6o. ganglio abdominal. El promedio del período circádico del ERG no se alteró con respecto a los animales íntegros (23.4 horas). Sin embargo, el registro de los acociles privados de 6o. ganglio (figura 14) mostró una clara inversión de la fase ya que la máxima actividad se presentaba en el día alcanzando su pico máximo hacia las 12 horas e iniciando su fase de descenso hacia las 24 horas y su respuesta mínima hacia las 5 horas; la relación α / ϵ fué de 1.1. Cuando el estímulo luminoso único se aplica en el lugar que ocupaba el 6o. ganglio, no se obtienen modificaciones de ningún tipo sobre la frecuencia natural de oscilación del ritmo (figura 15). En ningún caso se observó amortiguamiento en la amplitud de la oscilación a pesar de que 3 acociles fueron registrados durante más de 30 días.

En la figura 16 vemos lo que ocurre con el ritmo circádico motor (RCM) cuando se aplica un estímulo único de luz sobre el 6o. ganglio, una vez que la frecuencia natural de oscilación se encuentra en estado estable. En este experimento, el estímulo se aplicó a las 6 horas circádicas y provocó un transitorio muy largo (cinco y medio días) después del cual el ritmo volvió a estabilizarse y mostró sólo un atraso de fase de 11 horas; a partir de este momento el RCM presentó las mismas características bimodales previas a la estimulación.

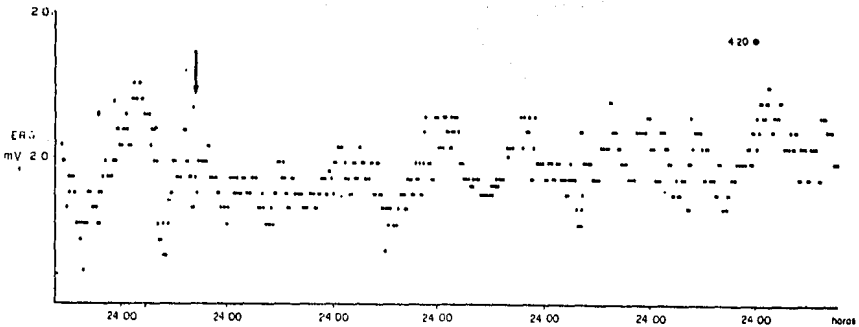


Figura 13.- Variaciones de amplitud del ERG obtenido de un acocil-
 íntegro en condiciones constantes de luz y de temperatura. La flecha in-
 dica el momento de aplicación de un estímulo luminoso de 20 lux y 10 --
 minutos sobre el 6o. ganglio abdominal. El transitorio consecutivo a es-
 te estímulo duró 5 días después de los cuales el ritmo reasumió sus ca-
 racterísticas originales con un adelanto de 4.3 horas. Las barras verti-
 cales señalan los momentos en los que se esperaba la aparición de la --
 máxima actividad en cada ciclo y se utilizan para poder medir el cambio
 de fase que muestra el ritmo consecutivo al estímulo luminoso.

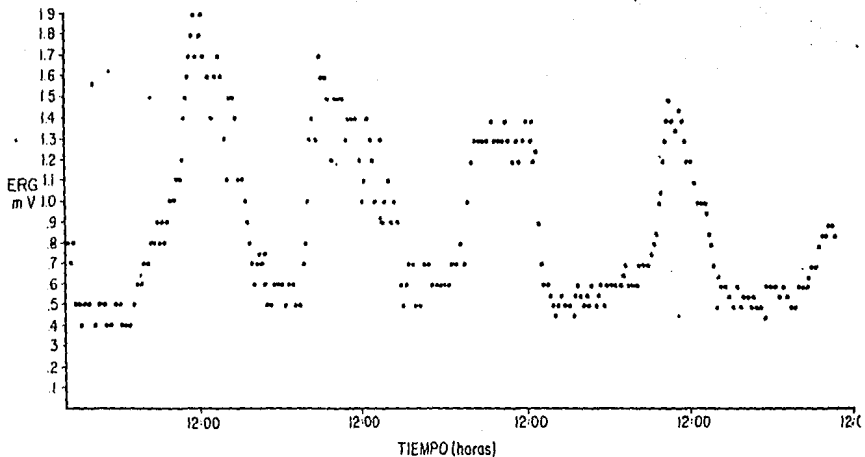


Figura 14.- Cambios de voltaje del ERG registrados durante cinco días en un acocil desprovisto de 6o. ganglio abdominal. Nótese que hay una inversión de fase del ritmo de casi 180° con respecto al que se registra de animales íntegros. En este caso el período fue de 23.4 horas y la relación α/e de 1.1.

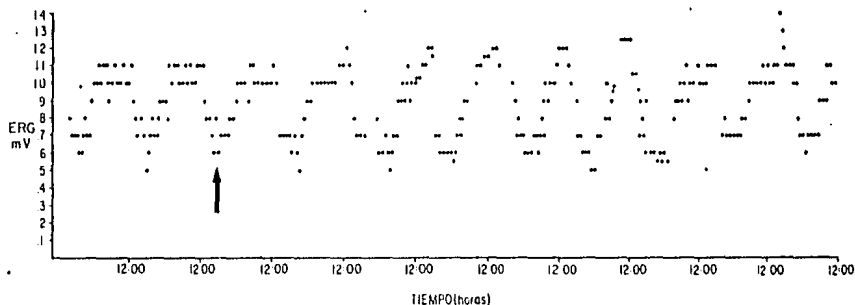


Figura 15.- Registro de los cambios de voltaje del ERG obtenido de un acocil gangliectomizado. La flecha marca el momento en el que se aplicó un estímulo luminoso de 20 lux y 10 minutos sobre el sitio en el que se encontraba el 6o. ganglio abdominal. Se puede comprobar que en este caso las características del ritmo electroretinográfico son las mismas antes y después de la aplicación del estímulo luminoso. El ritmo tuvo una duración de 23.4 horas, con una relación α/ρ de 1.1.

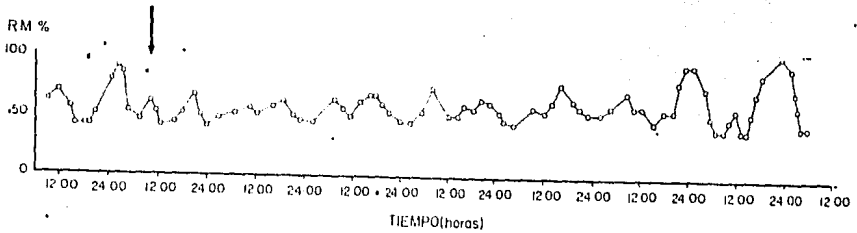


Figura 16.- Efecto de la activación de los fotorreceptores caudales sobre el ritmo circádico locomotor. El registro que se muestra se había iniciado dos días antes (no se incluyen en la figura) de tal manera que cuando se había estabilizado se aplicó una señal luminosa de 20-lux y 10 minutos de duración a las 6 horas TC sobre el 6o. ganglio abdominal. Nótese la duración de la fase transitoria de 5.5 días y cómo el ritmo se reasume con un cambio de fase de 11 horas.

En acociles sin 6o. ganglio abdominal el RCM mostró las siguientes características: es bimodal, con un pico principal de actividad alrededor de las 24 horas y un pico secundario que aparecía hacia las 12 horas. De hecho el único cambio significativo que se encontró en estos animales fue que el nivel total de actividad medido como área bajo la curva es mucho mayor que el correspondiente a animales íntegros que se registran en las mismas condiciones. Si un pulso de luz se aplica sobre el lugar que ocupaba el 6o. ganglio no se observan modificaciones sobre el ritmo de ningún tipo (figura 17).

4.- Relación entre los fotorreceptores caudales y algunas estructuras relacionadas con los ritmos circádicos electrorretinográfico y motor:

Se probó el efecto de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal sobre la posición de los pigmentos retinianos accesorios ya que se ha propuesto que las células pigmentarias podrían jugar un papel importante en la generación del ritmo circádico del ERG. La posición de los pigmentos se determinó en forma indirecta midiendo el área de reflexión de la luz en la superficie de la córnea (pseudopupila) cuando se hace llegar a ella la luz del microscopio con el que se hace la determinación. En la figura 18 se puede observar los resultados del promedio de 15 experimentos en los que los acociles recibieron luz por los ojos durante 10 minutos después de los cuales se medía la pseudopupila. Esta evidentemente se redujo (adaptación a la luz), como resultado de la iluminación. A partir de esos momentos se dejaba al animal en condiciones constantes de oscuridad, condición que provocó que la pseudopupila aumentará de diámetro (adaptación a la oscuridad) hasta que llegó a un ta

maño estable después de, aproximadamente, 70 minutos. En la figura se puede observar que mientras en los registros control (trazo superior) no hubo modificaciones en el área de reflexión de la luz, en los registros correspondientes a animales estimulados fóticamente por el 6o. ganglio abdominal (trazo intermedio) la pseudopupila se redujo aproximadamente en 25% del valor anterior y cuando la estimulación luminosa se aplicó por los ojos (trazo inferior) la reducción de la pseudopupila alcanzó el 35%. La recuperación que se observó después de la caída por la estimulación del 6o. ganglio abdominal, fue más lenta y menor que la que se obtuvo después de la estimulación de los fotorreceptores visuales. Si la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal se hacía por la mañana, el efecto ejercido sobre la pseudopupila era menor (20%) --- que cuando el experimento se llevaba acabo durante la noche (30%) (figura 19). Si se trabajaba con acociles gangliectomizados y se les aplicaba el mismo tratamiento de iluminación inicial y de adaptación a la oscuridad subsecuente midiendo en cada caso la pseudopupila y estimulando fóticamente los ojos o el sitio donde se encontraba el 6o. ganglio abdominal, se podía comprobar que mientras la estimulación por ojos provocó una brusca reducción de la pseudopupila, el diámetro de ésta no se modificó como resultado de la aplicación de luz en el sitio que ocupaba el 6o. ganglio abdominal (figura 20).

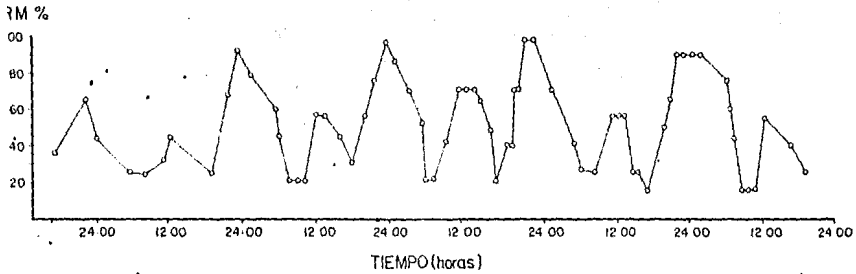


Figura 17.- Actividad circádica locomotora en un acocil sin 60.º ganglio abdominal. La flecha indica el momento de aplicación de una señal luminosa de 20 lux y 10 minutos de duración a las 9 horas TC en el lugar que ocupaba el 60.º ganglio (nótese que el nivel total de actividad es mayor que el de acociles íntegros y que la señal aplicada no provocó ningún cambio detectable).

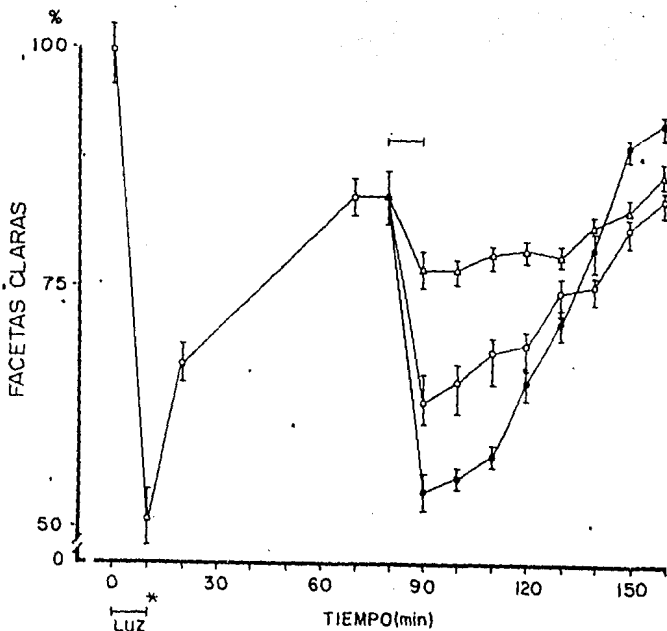


Figura 18.- Cambios en el área de reflexión de la luz sobre la córnea como resultado de la aplicación de un estímulo luminoso de diez minutos de duración y la recuperación consecutiva a la permanencia en la oscuridad durante los 80 minutos siguientes. Una vez estabilizada la pseudopupila se aplicaba un estímulo luminoso de 20 lux y 10 minutos de duración sobre los ojos (trazo inferior) o sobre el 60. ganglio abdominal (trazo intermedio). El trazo superior corresponde a los controles. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.

(—*) 10 minutos de luz sobre los ojos.

(—) 10 minutos de luz sobre el 60. ganglio.

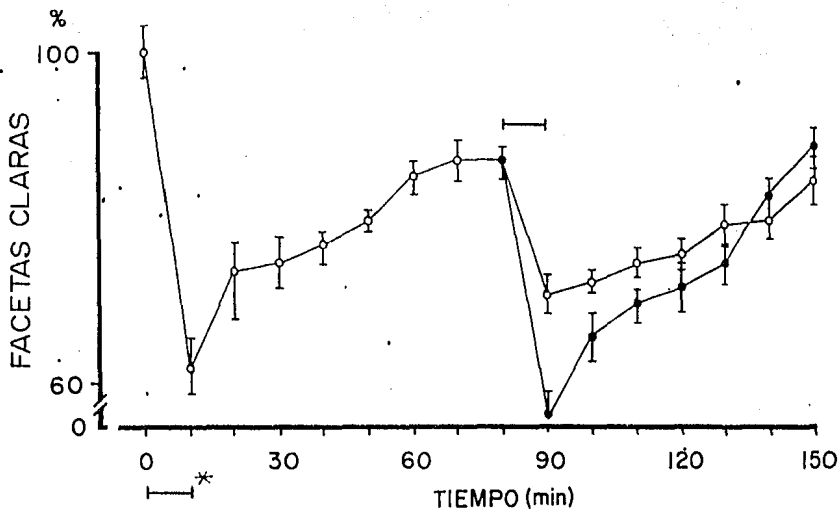


Figura 19.- Efecto en la pseudopupila de la aplicación de un estímulo luminoso de 20 lux y 10 minutos de duración sobre el 6o. ganglio - abdominal en experimentos efectuados a las 9 horas (trazo superior) y a las 21 horas (trazo inferior). Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.

(—*) 10 minutos de luz sobre los ojos.

(—) 10 minutos de luz sobre el 6o. ganglio.

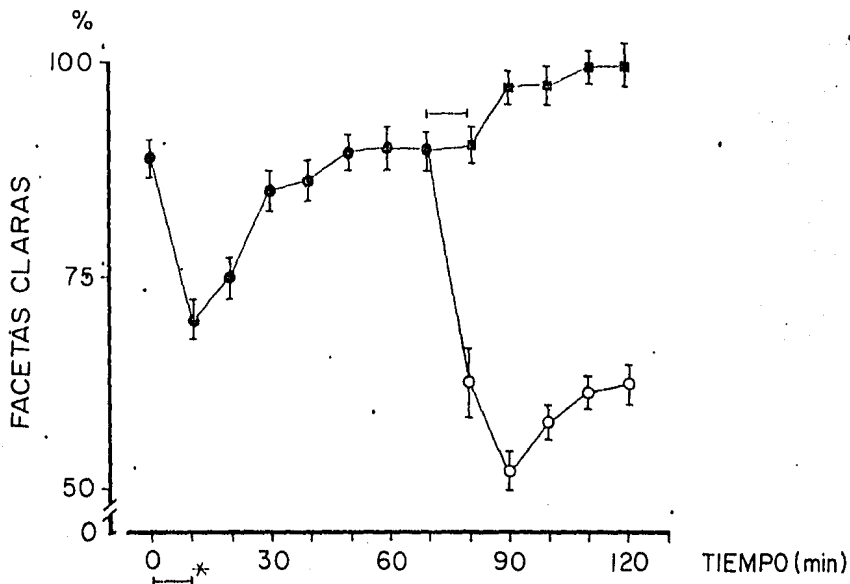


Figura 20.- Efecto de la aplicación de un estímulo luminoso de 20-lux y 10 minutos de duración en la pseudopupila de animales gangliectomizados. El trazo superior corresponde a los experimentos en los que la luz se aplicó en el sitio que ocupaba originalmente el 6o. ganglio abdominal y el trazo inferior representa las modificaciones de la pseudopupila que resultan de la aplicación del estímulo sobre los ojos del animal. Cada punto corresponde a un promedio de 10 datos. Las barras verticales indican el error estándar.

(—*) 10 minutos de luz sobre los ojos.

(—) 10 minutos de luz sobre el 6o. ganglio.

La interrupción unilateral de la comunicación entre el ganglio cerebroide y el tallo ocular tuvo por objeto comprobar si esta relación era importante en la manifestación de los efectos de sincronización que se habían observado en los ritmos electrorretinográfico y motor consecutivos a la estimulación luminosa de los fotorreceptores caudales. La figura 21 muestra los resultados obtenidos en un experimento típico hecho en un animal al que se le seccionó el nervio óptico del lado izquierdo y del que se registraron en forma simultánea los ritmos circádicos electrorretinográficos de ambos ojos y el ritmo circádico locomotor del lado izquierdo. Cuando los ritmos estaban en fase estable se estimuló fóticamente el 6o. ganglio abdominal pudiendo comprobarse que antes de la estimulación por el 6o. ganglio los ritmos circádicos electrorretinográficos de ambos ojos mostraban sólo pequeñas diferencias en el período con respecto a los valores que se observaban en animales íntegros. Al aplicar el estímulo por el 6o. ganglio se puso de manifiesto que mientras el ritmo registrado contralateralmente al sitio de la lesión mostraba las modificaciones características de la sincronización: una fase transitoria que duró cinco días y un cambio de fase que en este caso fue de 4.5 horas de atraso; el ritmo electrorretinográfico registrado del lado de la lesión no mostraba modificación alguna que se pudiera asociar con la estimulación del 6o. ganglio. En cuanto al ritmo locomotor se puso de manifiesto que antes de la estimulación del ganglio caudal el período era semejante al obtenido de animales íntegros (26 horas) y que asociado con la estimulación luminosa se provocó una sincronización del ritmo, tanto si se registraba como como contralateralmente a la sección. En cualquier caso se provocó un transitorio que duraba a-

proximadamente 5 días después del cual se reasumía el periodo original - con un atraso que en este experimento fue de 1.5 horas.

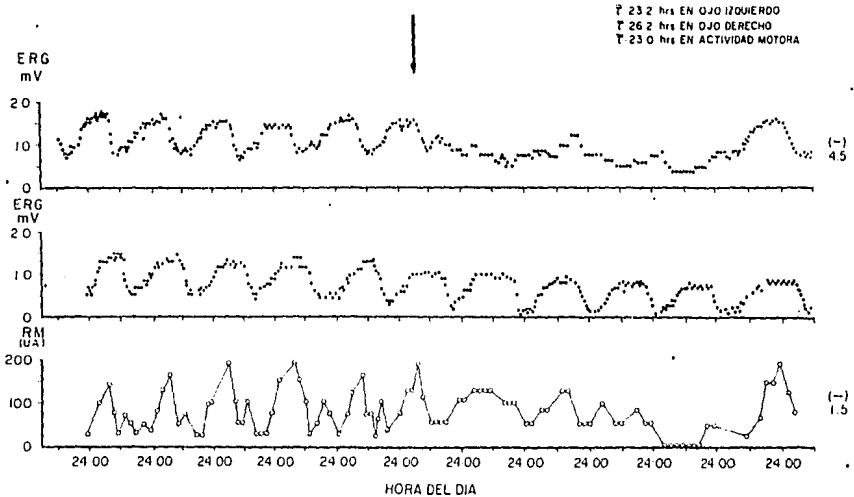


Figura 21.- Actividad electroretinográfica obtenida del ojo izquierdo (trazo superior) del ojo derecho (trazo medio) y de la actividad locomotora del lado derecho, de un acocil con lesión unilateral derecha del nervio óptico. La flecha marca el momento de la aplicación de un estímulo luminoso de 20 lux de intensidad y 10 minutos de duración sobre el 6o. ganglio abdominal. Nótese que en el registro del ERG contralateral a la sección el ritmo se vió afectado por la señal luminosa, lo que no sucedió en el ERG obtenido del otro ojo. El ritmo motor se vió afectado y se pudo comprobar que el cambio se daba cuando el registro se hacía de uno u otro lado de la sección.

DISCUSION

La actividad electroretinográfica que se obtuvo del ojo compuesto, del acocil, presenta en nuestros registros, características circádicas, semejantes a las que han encontrado otros autores (Aréchiga y Fuentes, 1970; Aréchiga, Fuentes y Barrera, 1973; Page y Larimer, 1975b; Fuentes Pardo e Inclán-Rubio, 1981; Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983). Nuestros datos apoyan el carácter unimodal del ritmo electroretinográfico, la duración de su período circádico cercana a las 24 horas, la presencia de un pico de actividad máxima durante la noche y otro de actividad mínima durante el día y los cambios de algunos parámetros del ritmo (amplitud, período, relación τ/τ) asociados con las condiciones de iluminación en las que se realice el experimento (figura 2). También comprobamos que de acuerdo a lo que han encontrado otros autores el ritmo circádico electroretinográfico del acocil es susceptible de ser sincronizado cuando se utilizan estímulos luminosos, bien sean periódicos (Page y Larimer, 1975a) o únicos (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983) como se ve en la figura 2. Si bien es cierto los experimentos de sincronización no explican por sí mismos el fenómeno implícito, apoyan fuertemente la existencia de fotorreceptores encargados de recibir las señales luminosas externas y enviarlas hasta las estructuras (osciladores?) involucradas en los atrasos o adelantos que presenta el ritmo como consecuencia del estímulo luminoso.

Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981) mostraron que el ritmo motor del acocil es bimodal cuando se registra en condiciones de oscuridad constante. Sin embargo, otros autores consideran que sólo hay bimodalidad

dad en el ritmo motor del acicil si éste es sometido a un determinado fotoperíodo (Page y Larimer, 1975b). Por último, se ha propuesto que el ritmo circádico motor es el resultado de la interacción de osciladores-múltiples algunos de los cuales podrían ser las estructuras involucradas en el movimiento (Viccon y Fuentes-Pardo, 1977).

Nuestros registros obtenidos en oscuridad constante muestran un -- ritmo circádico claramente bimodal con un período promedio de 26 horas, susceptible de modificarse dependiendo de la cantidad de luz que reciba el sistema; actividad máxima durante la noche (el pico principal de actividad se presenta alrededor de las 24 horas); y sobre todo, capacidad para ser sincronizado por estímulos únicos cuyo efecto dependerá del momento circádico en el que se apliquen (figura 3).

2.- Cuando se analizan los resultados obtenidos después de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal se puede comprobar un aumento de la actividad eléctrica de la cadena tal y como fue propuesto por Prosser hace ya algunos años (Prosser, 1934). Estos resultados se obtuvieron tanto en animales íntegros como en cadenas aisladas y en este último caso, lo mismo si se había dejado la actividad espontánea como si había sido eliminada por enfriamiento previo de la solución en la cual se encontraba, se vio un incremento paulatino de la frecuencia de descarga, con una alternancia que dependía de la intensidad de la luz aplicada. Este patrón sólo aparecía cuando la luz se aplicaba sobre el 6o. ganglio, a pesar de que se podía registrar en cualquier segmento de la cadena (figura 5), lo que va de acuerdo con la proposición hecha por -- Hermann y Stark en el sentido de restringir sólo al 6o. ganglio la capacidad fotorreceptora de la cadena abdominal (Hermann y Stark, 1963). --

Por otra parte, nuestros resultados pusieron de manifiesto claras diferencias en la actividad fotorreceptora del 6o. ganglio abdominal dependientes de la hora del día (figuras 6, 7 y 8) lo que sugiere fuertemente un ritmo circádico en la actividad de la cadena, fenómeno que hasta ahora nadie ha probado. Este hecho puede determinar una acción importante en el papel que juega el 6o. ganglio como sincronizador de otros ritmos circádicos y lo discutiremos más adelante.

Al analizar el efecto que tiene la fotoestimulación del 6o. ganglio abdominal sobre la actividad del ERG se puede comprobar que hay una disminución importante en su amplitud, la que sigue un curso temporal diferente al que se observa cuando la aplicación de luz se hace sobre los fotorreceptores visuales (figura 9), ya que en este caso no sólo la reducción es más grande sino que requiere de muy poco tiempo para manifestarse. Estas diferencias resultan evidentes si se considera el sustrato anatómico en el que se basa cada una de las interacciones ya que mientras la estimulación del sistema visual desencadena, probablemente, un reflejo neuroendócrino que se puede integrar en algún ganglio óptico (Fuentes-Pardo y García, 1979), la estimulación de los fotorreceptores caudales provoca la activación de una vía aferente mucho más larga que llegaría a hacer sinápsis en el ganglio cerebroide (Hermann, 1972), sitio desde el cual se activaría probablemente alguna otra vía que provocaría, a su vez, activación del sistema neuroendócrino con la consiguiente activación de los efectores pigmentarios, fenómeno muy común en la reducción de amplitud del ERG.

Con este tipo de registros se vuelve a sugerir que la descarga de los fotorreceptores caudales sigue un patrón circádico ya que su acción

reductora del ERG es bastante más potente por la noche que durante el día. La extirpación del 6o. ganglio abdominal y la ausencia de efecto de la estimulación luminosa cuando se aplicó en el sitio que ocupaba el ganglio caudal, refuerzan la posibilidad de que de las diferentes estructuras de la cadena sólo el 6o. ganglio contenga fotorreceptores extrarretinianos. Un dato interesante que también se desprende de estos experimentos es el aumento de voltaje del ERG en los registros diurnos con respecto a los nocturnos, cuando el acocil se encuentra privado de 6o. ganglio. Pareciera que la falta de éste altera de alguna manera, la condición original de los osciladores con respecto al carácter nocturno que le imprimen al acocil.

En algunos registros hechos en el laboratorio se puso de manifiesto un aumento en la descarga de los fotorreceptores caudales a consecuencia de la estimulación de los fotorreceptores visuales (Inclán-Rubio y cols., 1981). Aun cuando éstos son datos sólo preliminares, cuyo significado habrá que replantear en otro momento, no deja de ser interesante el hecho de que la conexión también se dé en la dirección sistema visual-sistema caudal.

Es evidente que los resultados que se muestran en esta sección apoyan la interacción anatomofuncional de los dos sistemas fotorreceptores del acocil. Por lo que respecta a la relación sistema caudal-sistema visual, se sabe que la estimulación luminosa del ganglio caudal permite registrar potenciales provocados en la cadena abdominal, la región torácica y las comisuras circunesofágicas (Prosser, 1934; Hermann, 1972). La relación inversa (sistema visual-sistema caudal) también ha sido propuesta, al estimular los ojos y registrar actividad eléctrica en las comisuras

suras circunnesofágicas y la cadena torácica (Prosser, 1934). Es probable que las técnicas de registro de esa época no hayan permitido seguir con mayor detalle la trayectoria de las vías correspondientes y que aun cuando no se haya encontrado evidencia anatómica de comunicación directa entre los dos sistemas (Wiersma y Mill, 1965; Wiersma y Yamaguchi, 1966) - las fibras de los dos sistemas fotorreceptores caudal y visual converjan a centros integradores comunes lo que aseguraría la interacción de ambos.

El fenómeno de la sincronización ha sido muy estudiado desde hace muchos años debido al carácter adaptativo que le imprimen a los ritmos que la presentan. La primera pregunta que muchos autores se han hecho a propósito de este fenómeno es dónde se ubican las estructuras que desencadenan el proceso, pues como se mencionaba, al quedar implícito en el fenómeno la participación de una señal externa (luminosa, en gran número de casos) debe haber receptores específicos (fotorreceptores) encargados de su detección. Los candidatos obvios a desempeñar esta función son los fotorreceptores visuales, aunque mucho ha llamado la atención el hecho de que algunos fenómenos de sincronización por luz persistan después de la ablación o extirpación del sistema visual y que inclusive se encuentren en organismos que carecen en forma natural de ojos como son algunos animales que han vivido por muchas generaciones en sitios carentes de luz y que poseen un sistema visual completamente atrofiado. Estos hechos llevaron a algunos autores (Page, 1979; Truman y Riddiford, 1970; Truman, 1972, 1974; Engelmann y Honneger, 1966; Zimmerman e Ives, 1971; Lohén y Chandrashekeran, 1970), a asociar el fenómeno de la sincronización con la presencia de fotorreceptores extrarretinianos. Se ha encontrado que

el gusano de seda tiene posibilidad de sincronizar su ritmo de eclosión gracias a la participación de fotorreceptores ubicados en el cerebro, - lo que se apoya con los datos que indican que la eclosión de Antheraea pernyi y de Hyalophora cecropia se sincroniza aun en condiciones experimentales de cerebro aislado neuralmente, o de cerebro trasplantado en el abdomen. También se ha encontrado que el ritmo de muda de estas mismas especies se puede sincronizar extrarretinalmente, (Truman y Riddiford, 1970; Truman, 1972, 1974).

Otros autores han aportado pruebas a favor de la sincronización del ritmo de eclosión de Drosophila la que se puede manifestar como con secuencia de la aplicación de ciclos de luz y oscuridad aun en larvas - mutantes que carecen de ojos y de ocelos (Engelmann y Honegger, 1966) o en estadios larvarios primarios que están lejos aún de haber desarrollado los ojos compuestos (Zimmerman e Ives, 1971). El ritmo de oviposición del saltamontes parece también ser susceptible de sincronización por la activación de fotorreceptores extrarretinianos (Loher y Chandrashekeran, 1970), ya que los autores la siguieron observando como resultado de la aplicación de señales luminosas a pesar de la ablación quirúrgica de los ocelos y los ojos compuestos.

En Aplysia (Hebre de mar) el ritmo circádico de actividad del nervio óptico puede ser sincronizado por ciclos de luz blanca cuando el ojo se encuentra aislado en medio de cultivo, lo que demostró que los fotorreceptores oculares son suficientes para sincronizar el ritmo circádico de impulsos en el nervio óptico (Eskin, 1971); también en Aplysia se ha encontrado (Block y Smith, 1972) que los fotorreceptores localizados en el ganglio cerebral son responsables en forma predominante de los cambios

de actividad de los nervios pedales que siguen al inicio de la luz; se propuso que la integridad de las conexiones cerebro-pleurales y pleuro-pedales es esencial en el fenómeno de la sincronización que inician los fotorreceptores cerebrales. Basados en estos resultados, se obtuvo la sincronización del ritmo circádico de frecuencia de descarga del ganglio abdominal registrado en la neurona R15 de liebres de mar sin ojos, aplicando luz sobre el mismo ganglio abdominal (Lickey y Zack, 1973). Más tarde se propuso que el ritmo diurno de actividad conductual de Aplysia no requiere de los fotorreceptores oculares para poder ser sincronizado; la actividad es diurna bajo ciclos de luz y presenta una frecuencia natural de oscilación en condiciones de oscuridad constante después de que los ojos han sido extirpados (Block y Lickey, 1973). Pareciera, sin embargo, que los ojos juegan un papel en la modulación de la actividad rítmica. Al extirparlos se observa un cambio en la distribución temporal de la actividad diurna ya que se modifica la hora de inicio de la actividad, aumenta el tiempo de actividad nocturna y disminuye la cantidad total de actividad. Los autores consideran que los osciladores responsables de la actividad circádica rítmica conductual de Aplysia son, por un lado el fotorreceptor ocular y muy probablemente otros osciladores situados en alguna porción del sistema nervioso de la liebre de mar.

La participación del fotorreceptor abdominal cuya sensibilidad es espectral máxima se encuentra en el rojo y la integridad del nervio óptico parecen ser factores importantes en la sincronización del ritmo circádico de frecuencia de descarga del nervio óptico (Block y cols., 1974). También en el escorpión Urodacus se ha encontrado un fotorreceptor extraocular situado en la región metasómica. Este fotorreceptor se encuen-

tra en los segmentos libres de ganglios de la cadena abdominal y ha podido demostrarse la capacidad que tiene para sincronizar el ritmo de actividad locomotora de este animal (Zwicky, 1968, 1972). En apoyo de este hecho están los hallazgos obtenidos en el escorpión Heterometrus el cual muestra defecación de la luz en los nervios del telson (Geethabali y Kandula, 1973).

En el acocil también se ha explorado la participación de la fotorrección extrarretiniana en el fenómeno de la sincronización (Page y Larimer, 1972). La extirpación de los ojos compuestos o del neuropilo óptico distal, no modifican la sincronización del ritmo circádico de actividad locomotora en esta especie. Según estos autores, la extirpación del ganglio caudal de la cadena abdominal tampoco influye en la sincronización de este ritmo la que se mantiene cuando se aplica un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Estos hechos llevaron a Page y Larimer a proponer que el acocil posee un fotorreceptor extrarretiniano-extracaudal que constituye un camino adecuado para recibir la señal sincronizante. En otros estudios sobre el ritmo de la amplitud del ERG se ha sugerido que el fotorreceptor extrarretiniano-extracaudal se podría ubicar en el ganglio supraesofágico; conclusión a la que se llegó después de aplicar un cierto régimen de luz a un ojo del acocil Procambarus clarkii y otro ciclo diferente al otro ojo; un tercer ciclo se aplicaba al ganglio supraesofágico e invariablemente éste era el ciclo de luz que sincroniza ba al ritmo del ERG; aunque la posibilidad de que la luz haya alcanzado los lóbulos ópticos no se puede excluir, estos resultados hacen suponer que un fotorreceptor localizado en el cerebro es capaz de iniciar el fenómeno de la sincronización.

Nuestros resultados muestran en forma clara, que los fotorreceptores retinianos son una vía de entrada adecuada para efectuar la sincronización tanto del ritmo circádico electrorretinográfico como el de actividad motora. En las figuras 3 y 4 se muestra cómo ambos ritmos son sincronizados cuando se aplica un pulso único de luz sobre los ojos. En la sincronización se observan dos etapas: la fase transitoria en la que es característica la pérdida de la ritmicidad y la etapa en la que el período original se reasume con un cambio de fase, que depende del momento circádico de la aplicación del estímulo.

Por otra parte, el papel sincronizador del 6o. ganglio abdominal en relación con estos dos ritmos del acocil, queda claro. Los resultados a corto plazo pusieron de manifiesto la posibilidad de comunicación entre el ganglio caudal y las estructuras responsables al menos de la expresión del ritmo (figuras 9 y 10) y los de largo plazo mostraron las modificaciones inducidas sobre la frecuencia natural de oscilación que se provoca en ambos ritmos como resultado de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal. Las figuras 13 y 16 muestran el inicio de la etapa transitoria que sigue a la estimulación de los fotorreceptores caudales. Esta etapa dura entre 5 y 7 días después de los cuales el ritmo recupera sus características originales. No se tiene ninguna explicación para esta duración tan prolongada de la fase transitoria, aunque se ha presentado en forma sistemática en todos nuestros registros. Pasada esta fase, los dos ritmos recuperan sus características típicas, con un adelanto o un atraso en la fase dependiente del momento del ciclo durante el cual se aplicó el estímulo luminoso. Es posible que la hora de aplicación del estímulo no sólo afecta la acción provocada por el estímulo

sincronizante debido a que el sistema circádico visual tiene una susceptibilidad al cambio diferente durante los distintos momentos de su ciclo, sino que a esta acción se añade el resultado de que la actividad de los fotorreceptores caudales mismos no sea igual durante todas las horas del día, es decir que muestre un ciclo circádico de respuesta a la luz. De hecho, basados en los resultados que se obtuvieron es posible proponer que el fenómeno de la sincronización implique la interacción de distintos tipos de osciladores (figura 13 y 16).

El registro a largo plazo del ritmo circádico electrorretinográfico en animales gangliectomizados puso de manifiesto la participación del ganglio caudal en los procesos involucrados en darle al organismo íntegro el carácter de animal nocturno. No quiere esto decir que se conozcan estos procesos y mucho menos el tipo de participación que tendría en ellos el ganglio caudal, sólo se alude al hecho de que cuando éste falta hay una inversión circádica de casi 180° (figura 14). Otros datos de la literatura (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) muestran que ante la ausencia de ganglio cerebroide por ejemplo, el ritmo circádico electrorretinográfico del acocil deja de seguir la reglas de Aschoff para animales nocturnos. Es posible entonces que sólo cuando esté presente la totalidad de osciladores involucrados en la generación de un cierto ritmo puede éste mostrar los aspectos adaptativos que son propios de la especie.

En cuanto al ritmo locomotor que se registra de animales sin 6o. ganglio abdominal, se muestra como característica peculiar un aumento en la amplitud con respecto al que se registra de animales íntegros el cual se puede interpretar como el resultado de haber quitado alguna influencia inhibitoria de la actividad locomotora. Se mantiene sin embargo el

carácter bimodal aunque los momentos coincidentes con los picos de actividad máxima parecen estar un tanto desplazados. Resulta interesante, -- por último, hacer notar que la ausencia de 6o. ganglio no modifica la -- capacidad de sincronización de los fotorreceptores visuales. Cabe la interpretación de que ambos sistemas no sólo poseen umbrales diferentes si no que además tienen relevos sinápticos que si bien es cierto pueden converger, son independientes. Esto aseguraría el mantenimiento del fenómeno de la sincronización en gamas muy amplias de iluminación ambiental.

La comunicación anatomofuncional entre el 6o. ganglio abdominal y los pigmentos retinianos accesorios se puso de manifiesto por medio de los cambios que se registraron en éstos consecutivos a la estimulación luminosa de aquél.

La figura 18 muestra que, en efecto, la pseudopupila se reduce como consecuencia de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal y que esta reducción cambia a lo largo del nictámero (figura 19). Este hecho adquiere importancia si se considera la estrecha relación que existe entre la posición de los pigmentos retinianos accesorios y la amplitud del ERG (Aréchiga y Fuentes, 1970) lo que da base para proponer que el ritmo electrorretinográfico depende en buena medida de la posición de los pigmentos retinianos accesorios. Por otra parte que ésta depende en forma importante de la acción de hormonas liberadas desde la glándula sinusal en particular de la hormona de adaptación a la luz (HAL) (Kleinholz, --- 1936; Welsh, 1939). Esto lleva a proponer que la acción de los fotorreceptores caudales se traduce en la activación del ganglio cerebroides con la consiguiente liberación de HAL. A su vez la HAL es producida por buena parte del sistema nervioso, pero en particular por el ganglio cere --

broide.

Estos hechos sugieren que el 6o. ganglio abdominal, cuyo carácter circádico se pudo evidenciar también en estos experimentos ya que el mismo estímulo luminoso provocó mayor efecto durante la noche que durante el día, puede ejercer su acción sincronizadora alterando, al menos, un grupo de osciladores involucrados en el ritmo circádico electrorretinográfico: los responsables de los cambios periódicos en la posición de los pigmentos retinianos accesorios, osciladores que se ubican muy probablemente en el ganglio cerebroide y que, al ser afectados, provocarían a su vez cambios en los pigmentos y por ende en el ritmo circádico electrorretinográfico.

Ahora bien, si esta idea es correcta ello querría decir que la sincronización que ejerce el 6o. ganglio sobre el ritmo electrorretinográfico requiere de la integridad de las vías del circuito: ganglio caudal-ganglio cerebroide-pigmentos retinianos accesorios. Con el fin de probar la validez de esta aseveración fue que en una parte de la etapa experimental se seccionó uno de los dos nervios ópticos que establecen en buena medida la comunicación entre el ganglio cerebroide y los pigmentos accesorios. La figura 21 muestra los efectos de esta maniobra con la que se confirma que como resultado de la estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal el ritmo electrorretinográfico registrado homolateralmente a la sección del nervio no sufrió ninguna modificación, mientras que el ritmo registrado del lado contrario se atrasó 4.5 horas como consecuencia del mismo estímulo. La falta de efecto que se observó en el ritmo circádico locomotor registrado homo o contralateralmente a la lesión, puso de manifiesto que la sincronización que ejerce el 6o. ganglio sobre

este ritmo se lleva a cabo por una ruta diferente a la que se sigue en la sincronización del ritmo electroretinográfico.

CONCLUSIONES.

1.- El registro de la respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma, ERG) en condiciones constantes de luz y de temperatura, pone de manifiesto cambios periódicos en la amplitud del ERG que siguen un patrón de carácter circádico.

2.- La aplicación de un estímulo luminoso de 20 lux y 10 minutos de duración a un animal en registro de ERG provoca cambios en el ritmo circádico que se manifiestan por la aparición de un transitorio después del cual hay una recuperación de las características de amplitud y período originales con un cambio de fase que depende del momento en el que se aplicó el estímulo.

3.- Cuando se coloca un acocil en condiciones constantes de luz y de temperatura y se registra durante varios días la actividad locomotora, se ponen de manifiesto cambios periódicos en la cantidad de movimiento que siguen un patrón circádico bimodal.

4.- La aplicación de un estímulo luminoso a un animal del que se registra la actividad locomotora a largo plazo, provoca cambios en el ritmo circádico que se manifiestan con un transitorio después del cual el ritmo readquiere sus características originales de amplitud y frecuencia con un cambio de fase que depende del momento circádico en el que se aplicó el estímulo.

5.- El registro de la actividad eléctrica de la cadena abdominal aislada o "in situ" pone de manifiesto una descarga de potenciales de acción cuya frecuencia aumenta claramente como resultado de la aplicación de un estímulo luminoso sobre el 6o. ganglio.

6.- La estimulación luminosa del 6o. ganglio abdominal provoca una reducción en la amplitud del ERG cuando se hacen registros de esta respuesta en experimentos a corto plazo. La estimulación de los fotorreceptores visuales provoca, a su vez, un aumento de la frecuencia de descarga del 6o. ganglio abdominal. Estos hechos apoyan claramente una relación anatomofuncional entre ambos sistemas fotorreceptores.

7.- La aplicación de un estímulo luminoso sobre el 6o. ganglio abdominal de animales en registro a largo plazo de su ERG provoca la aparición de un transitorio muy prolongado después del cual el ritmo circádico electroretinográfico vuelve a manifestar sus características originales de amplitud y frecuencia con un cambio de fase que depende del momento en el que se aplicó el estímulo.

8.- La aplicación de un estímulo luminoso sobre el 6o. ganglio abdominal de animales en registro a largo plazo de su actividad motora provoca la aparición de un transitorio muy prolongado después del cual el ritmo circádico motor vuelve a manifestar sus características originales de amplitud y frecuencia con un cambio de fase que depende del momento en el que se aplicó el estímulo.

9.- La aplicación de un estímulo luminoso sobre el 6o. ganglio abdominal de animales a los que se registra la posición de los pigmentos retinales accesorios midiendo el área de reflexión a la luz o pseudopupila, provoca la reducción de ésta, lo que es causa a su vez de cambios en el ERG. Una maniobra experimental semejante en animales gangliectomizados (aplicando la luz sobre el sitio que ocupaban los fotorreceptores) no provoca ningún cambio.

10.- La interrupción de la comunicación entre el tallo ocular y el-

ganglio cerebroide de animales en registro a largo plazo de ERG y de actividad motora impide que se lleve a cabo el fenómeno de sincronización del ritmo electrorretinográfico pero no del ritmo motor cuando se estimula al 6o. ganglio abdominal.

92

BIBLIOGRAFIA.

- Adler, K. (1968): Extraoptic light entrainment of circadian rhythm in salamanders. *J. Herpetol.* 2 : 176.
- Adler, K. (1969): Extraoptic phase shifting of circadian locomotor rhythm in salamanders. *Science*. 164 : 1290-1292.
- Adler, K. (1970a): Pineal and organ: role in entrainment of circadian locomotor rhythm in frogs. In: M. Menaker (ed.) *Biochronome* - *try*. Publ. U.S. Natl. Acad. Sci., Washington.
- Adler, K. (1970b): The role of extraoptic photoreceptors in Amphibian rhythms and orientation: A review. *J. Herpetology*. 4 (3-4) : 99-112.
- Aréchiga, H. and C.A.G. Wiersma, (1969): Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1 : 71-85.
- Aréchiga, H. and B. Fuentes, (1970): Correlative changes between retinal shielding pigments position and ERG in crayfish. *The Physiologist*. 13 : 137.
- Aréchiga, H., B. Fuentes and B. Barrera, (1973a): Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. *Neurobiology of Invertebrates*, Ed. Sálánky. Tihany, Hungary. pp. 403--421.
- Aréchiga, H., B. Fuentes and B. Barrera, (1973b): Influence of retinal-shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta-Physiol. Latin. Am.* 24 : 601-611.
- Aschoff, J. (1960): Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological clocks*. Cold. Spring Harbor. Symposium on Quantitative Biology., 25 : 11-28.
- Aschoff, J. (1965a): The phase-angle difference in circadian periodicity. In: *Circadian clocks*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 262-276.
- Aschoff, J. (1965b): Response curves in circadian periodicity. In: *Circadian clocks*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 95-111.
- Aschoff, J. (1967): Adaptative cycles: their significance for defining-environmental hazards. *International Journal of Biometeorology* 11 : 255-278.

- Aschoff, J. (1978a): Circadian rhythms within and outside their ranges of entrainment. In: I. Assemacher and D. Harver. (Eds.); Environmental Endocrinology. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag.
- Aschoff, J. (1978b): Features of circadian rhythms relevant for the design of shift schedules. Ergonomics, 21 : 739-754.
- Aschoff, J. (1979): Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. --- Zeitschrift für Psychologie, 49 : 225-249.
- Aschoff, J. and Meyer-Lohman, (1954): Angeborene 24-Stunden Periodik --- beim Kuckuck. Pflügers Arch., 260 : 170-176.
- Aschoff, J., K. Klotter and R. Wever, (1965): Circadian vocabulary. In: Aschoff, J. (Ed.): Circadian clocks. Amsterdam: North-Holland-Publ. Comp., pp. 10-18.
- Aschoff, J. and R. Wever, (1966): Circadian period and phase-angle --- difference in chaffinches, (Fringilla coelebs L.), Comp. Biochem. Physiol. 18 : 397-404.
- Aschoff, J. and M. Pohl, (1978): Phase relations between a circadian --- rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. Naturwissenschaften, 65 : 80-84.
- Aschoff, J., P. Berthold, E. Gwinner, H. Pohl and Saint Paul, U. Von, --- (1979): Biological clocks in birds. Proceedings of the 17th International Congress of Ornithology, Berlin.
- Bagnara, J.T. and M.E. Hadley, (1970): Endocrinology of the amphibian --- pineal. Amer. Zool. 10 : 201-216.
- Barrera, B. (1976): Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. Physiol. Behav., 17 : 59-64.
- Benitt, R. (1932): Diurnal rhythm in the proximal pigment cells of the crayfish retina. Physiol. Zool., 5 : 65-72.
- Binkley, S. (1976): Pineal Gland Biorhythms: N-Acetyltransferase in --- chickens and rats. Proceedings of the Federation of Societies for Experimental Biology, 35 (12) 1247-2352.
- Binkley, S.A., J.B. Riechman and K.B. Reilly, (1978): The pineal gland: --- A biological clock in vitro. Science 202 (4373): 1198-1201.

- Block, G.D., M.E. Lickey, (1973): Extraocular photoreceptors and oscillators can control the circadian rhythm of behavioral activity in Aplysia. J. comp. Physiol. 84 : 367-374.
- Block, G.D. and J.T. Smith, (1973): Cerebral photoreceptors in Aplysia. J. Comp. Biochem, Physiol. 46A : 115.
- Block, G.D., D.J. Hudson and M.E. Lickey, (1974): Extraocular photoreceptors can entrain the circadian oscillator in the eye of -- Aplysia. J. Comp. Physiol. 89 : 237-249.
- Bogenschütz, H. (1965): Untersuchungen über den lichtbedingten Farbwechsel der Kaulquappen. Zeitsch. f. Vergl. Physiol. 50 : 598-614.
- Bruce, V.G. (1960): Environmental entrainment of circadian rhythms. In: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25 : 29-48.
- Bruce, V.G. and C.S. Pittendrigh, (1956): Temperature independence in a unicellular "clock". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 42 : 676--682.
- Bruce, V.G. and C.S. Pittendrigh (1960): An effect of heavy water on the phase and period of the circadian rhythm in Euglena. J. Cell. Comp. Physiol. 56 : 25-31.
- Bruno, M.S. and D. Kennedy (1962): Spectral sensitivity of photoreceptor neurons in the sixth ganglion of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 6 : 41-46.
- Bünning, E. (1935) : Zur Kenntnis der endogenen Tagesrhythmik bei Insekten und bei Pflanzen. Ber deutsch. bot. ges., 53 : 594-623.
- Bünning, E. (1960): Opening adress: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Biological Clocks, 25 : 1-9.
- Bünning, E. (1967): The Physiological clock. Springer-Verlag. Berlin - and New York.
- Bünning, E. and J. Baltes (1963): Zur Wirkung von Schweren Wasser auf die endogene Tagesrhythmik. Naturwiss. 50 : 622.
- Burchard, J.E. (1958): Ph. D. Thesis, Princeton Univ.
- Chapple, W.D. (1960): M.S. Thesis. Syracuse Univ. Citado por Fuentes--Pardo, B. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, U.N.A.M., --- México, 1977.
- Dowse, H.B. and J.D. Palmer (1972): The chromomutagenic effect of deuterium oxide on the period and entrainment of a biological -- rhythm. Biol. Bull. 143 : 513-524.

- Engelmann, W. and H.W. Honegger (1966): Tagesperiodische Schupfrhythmik einer angenosen Drosophila melanogaster-mutante. Zeitschrift-für Naturforschung. B22 : 1-2.
- Enright, J.T. (1965): Synchronization and ranges of entrainment. In: -- Circadian clocks. North-Holland Publishing Co., Amsterdam. pp. 112-124.
- Enright, J.T. (1971a): Heavy water slows biological timing process. Z. verlg. Physiol. 72 : 1-16.
- Enright, J.T. (1971b): The internal clock of drunken isopods. Z. verlg. Physiol. 75 : 332-346.
- Eskin, A. (1971): Properties of the Aplysia visual system: In vitro --- entrainment of the circadian rhythm and centrifugal regulation of the eye. Zeitschrift für Vergleichende Physiologie, 74 : -- 352-371.
- Fuentes-Pardo, B. and M.C. García, (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 V. Inclán-Rubio, (1981): Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish Procambarus bouvieri (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. - 68A : 477-485.
- Fuentes-Pardo, B. and J. Ramos-Carvajal, (1983): The phase response --- curve of electroretinographic circadian Rhythm of crayfish. - Comp. Biochem. Physiol. 74A (3) : 711-714.
- Geethabali and Kandula Pampathi Rao, (1973): A metasomatic neural photo receptor in the scorpion. J. Exp. Biol. 58 : 189-196.
- Halberg, F. (1954): Temperature rhythms in blind mice. Fed. Proceedings 13 : 65.
- Hama, K. (1961): A photoreceptor-like structure in the ventral nerve --- cord of the crayfish, Cambarus virilis. Anat. Rec. 140 : 329-- 336.
- Hastings, J.W. and B.M. Sweeney, (1958): A persistent diurnal rhythm of luminiscence in Gonyaulax polyedra. Biol. Bull., 115 : 440-458.
- Hastings, J.W. and Keynan, A. (1965): Molecular aspects of circadian --- systems. In: Aschoff (Ed). Circadian Clocks. Amsterdam: North-Holland Publ. Comp. pp. 167-182.

- Hermann, H.T. (1972): Analysis of the properties of the crayfish caudal photoreceptor (PRU-Photoreceptor unit). Exp. in Physiol.- and Biochem. 5 : 155-192.
- Hermann, H.T. and M.S. Skiles, (1969): Cholinergic inhibition of the crayfish caudal photoreceptor. Comp. Biochem. Physiol. 31(4): 575-588.
- Hermann, H.T. and L. Stark, (1963): Prerequisites for a photoreceptor-structure in the crayfish tail ganglion. 147 : 209-216.
- Hermann, H.T. and L. Stark, (1963a): Single unit responses in a primitive photoreceptor organ. 26 : 215-228.
- Hoffmann, K. (1957): Angeborene Tagesperiodik bei Eidechsen. Naturwiss. 44 : 359-360.
- Hoffmann, K. (1960): Versuche zur Analyse der Tagesperiodik. I. Der -- Einfluss der Lichtintensität. Z. vergl. Physiol. 43 : 544-566.
- Hoffmann, K. (1969): Zum Einfluss der Zeitgeberstärke auf die Phase - lage der synchronisierten circadianen Periodik. Zeitschrift - für Vergleichende Physiologie. 62 : 93.
- Inclán-Rubio, V., B. Fuentes-Pardo, J.M. Villarías y C. Domínguez (1981) ---- Papel de los fotorreceptores visuales en la sincronización de la actividad circádica en el acocil. Programa general y resúmenes de las comunicaciones. XXIV congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Jalapa, Veracruz.
- Johnson, M. (1939): Effect of continuous light on periodic spontaneous-activity of white-footed mice (Peromyscus). J. Exp. Zool. 82: 315-328.
- Kalmus, H. (1934): Über die Naturdes Zeitgedächtnisses der Bienen. Z.-Verlag. Physiol. 20 : 405.
- Kalmus, H. (1935): Periodizität und Autochronie als zeitregelnde Ei - genschaften der Organismus, Biologia Generalis. 11 : 93-114.
- Kalmus, H. (1938): Das Aktogramm des Flusskrebsses und seine Beeinflussung durch Organextrakte. Z. vergl. Physiol. 25 : 798-802.
- Keller, S. (1960): Über die Wirkung chemischer Faktoren auf die Tages - periodischen Blattbewegungen von Phaseolus multiflorus. Z. -- Bot. 48 : 32.
- Keller, S. and Enright, T. (1971): Temperature: a phase setting effect J. Exp. Biol. 40 : 669-679.

- Kennedy, D. (1958): Responses from the crayfish caudal photoreceptor. - Amer. J. Ophth. 46 : 19-24.
- Kennedy, D. (1958a): Electrical activity of a "primitive" photoreceptor. In: Conference on Photoreception, Ann. New York Acad. Sci. 74 : 329.
- Kennedy, D. (1963): Physiology of photoreceptor neurons in the abdominal nerve cord of the crayfish. J. Gen. Physiol. 46 : 551-572.
- Kennedy, D. and J.B. Preston (1960): Activity patterns of interneurons in the caudal ganglion of the crayfish. 43 : 655-669.
- Kennedy, D. and M.S. Bruno (1961): The spectral sensitivity of crayfish and lobster vision. J. Gen. Physiol. 44 : 1089.
- Klotter, K. (1960): General properties of oscillating rhythms. Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 25 : 185.
- Konopa, R.J. (1972): Circadian clock mutants of Drosophila melanogaster. Ph. D. Thesis, California Institute of Technology, Pasadena, 1972.
- Konopa, R.J. and S. Benzer, (1971): Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68 : 2172.
- Landreth, H.F. and D.E. Ferguson, (1967): News: sun-compass orientation. Science. 158 : 1459-1461.
- Larimer, J.L. (1966): The presence of a functional caudal photoreceptor in blind cavernicolous crayfish. Nature, London. 210 : 204-205.
- Larimer, J.L., Trevino, D.L. and E.A. Ashby (1966): A comparison of spectral sensitivities of caudal photoreceptors of Epigeal and Cavernicolous crayfish. 19 : 409.
- Leinweber, F.J. (1956): Über die Temperaturabhängigkeit der Periodenlänge bei der endogenen Tagesrhythmik von Phaseolus. Zeit. f. Bot. 44 : 337-364.
- Lickey, M.E. and S. Zack (1973): Extraocular photoreceptors can entrain the circadian rhythm in the abdominal ganglion of Aplysia. J. comp. Physiol. 84 : 361.
- Lisk, R.D. and L.R. Kannwischer (1964): Light: evidence for its direct effect on hypothalamic neurons. Science. 146 : 272-273.

- Loher, W. and M.K. Chandrashekar (1970): Circadian rhythmicity in the oviposition of the grasshopper *Chorthippus curtipennis*. *J. of Insect Physiology*. 16: 1677-1688.
- Menaker, M, J.S. Takahashi and A. Eskin, (1978): The physiology of circadian pacemakers. *Annual Review of Physiology*. 40 : 501-526.
- Naka, K. and M. Kuwabara (1959): Two components from the compound eye - on the eye on the crayfish. *J. exp. Biol.* 36 : 51-61.
- Oishi, T. and M. Kato (1968): Pineal organ as possible photoreceptor in photoperiodic testicular response in Japanese quail. *J. Sci. - Kyoto Univ. Biol.* 2 : 12-18.
- Oshima, K. and A. Gorbman (1969): Pars intermedia: unitary electrical activity regulated by light. *Science*. 163 : 195-197.
- Page, T.L. (1979): Control of circadian rhythmicity in invertebrates. - In: *Biological Rhythms*. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. London. pp. 145-169.
- Page, T.L. and J.L. Larimer (1972): Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 78 : 107-120.
- Page, T.L. and J.L. Larimer (1975a): Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97 : 59-80.
- Page, T.L. and J.L. Larimer (1975b): Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97 : 81-96.
- Page, T.L. and J.L. Larimer (1976): Extraretinal photoreception in entrainment of Crustacean circadian rhythms. *Photochemistry and Photobiology*. 23 : 245-254.
- Parker, G.H. (1903): The skin and eyes as receptive organs in the reaction of frogs to light. *Amer. Jour. Physiol.* 10 : 28-36.
- Pearse, A.S. (1910): The reactions of amphibians to light. *Proc. Amer. Acad. Arts. Sci.* 45 : 161-208.
- Pfeffer, W. (1915): Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Schlafbewegungen. *Abhandl. Math. Phys. Kl. Kon. Sachs. Ges. Wiss.* 34 : 1-54. - Cited by Büning in 1960.

- Pittendrigh, C.S. (1958): Perspective in the study of biological clocks. In: Symposium on perspectives in Marine Biology. Berkeley, California. Univ. of California Press. pp. 239-268.
- Pittendrigh, C.S. (1959): Daily rhythms as coupled oscillator systems -- and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. Photo periodism and related phenomena in plants and animals. Amer. -- Assoc. Advanc. Sci. Washington, D.C. pp. 475-505.
- Pittendrigh, C.S. (1960): Circadian rhythms and the circadian organiza - tion of living systems. Cold. Spring. Harbor. Symp. on Quant. - Biol. 25 : 159-184.
- Pittendrigh, C.S. (1961): Harvey Lectures (Academic). 56 : 93.
- Pittendrigh, C.S. (1965): On the mecanism of the entrainment of a circa - dian rhythm by light cycles. In: Circadian clocks. North-Hol - land Publishing Co., Amsterdam. pp. 277-297.
- Pittendrigh, C.S. and V.G. Bruce, (1957): Rhythmic and synthetic proces - ses in growth. Ed. Rudnick (Princeton, Univ. Press) pp. 57.
- Pittendrigh, C.S. and D.H. Minis (1964): The entrainment of circadian -- oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. - Amer. Natur. 98 : 261-294.
- Pittendrigh, C.S. and S. Daan (1976): A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. Stability and lability of - spontaneous frequency. J. Comp. Physiol. 106 : 291-331.
- Preston, J.B. and D. Kennedy (1960): Integrative synaptic mechanisms in - the caudal ganglion of the crayfish. 43 : 671-681.
- Prosser, C.L. (1934a): Action Potentials in the nervous system of the -- crayfish. I. Spontaneous impulses. J. Cell and Comp. Physiol. - 4 : 184-210.
- Prosser, C.L. (1934b): Action Potentials in the nervous system of the -- crayfish. II. Responses to illumination of the eye and caudal - ganglion. J. Cell. Comp. Physiol. 4 : 363-377.
- Roberts, T.W. (1942): Behavior of organisms. Ecol. Mono. 12 : 339-412.
- Sánchez, J. and B. Fuentes-Pardo (1977): Circadian rhythm in the amplitu - de of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the --- crayfish. Comp. Biochem. and Physiol. 56A : 601-605.

- Wever, R. (1965): Pendulum versus relaxation oscillation. In: Circadian clocks. Ed. by Jürgen Aschoff. North-Holland. Publishing Co. - Amsterdam. pp. 47-63.
- Wever, R. (1972): Virtual synchronization towards the limits of the -- range of entrainment. J. of Theoretical Biology. 36 : 119-132.
- Welsh, J.H. (1930): Diurnal rhythm of the distal pigment cells in the - eyes of certain crustaceans. Proc. Nat. Acad. Sci: U.S.A. 16 : 386-395.
- Welsh, J.G. (1934): The caudal photoreceptor and responses of the crayfish to light. J. Cell. and Comp. Physiol. 4 : 379-388.
- Welsh, J.H. (1935): Further evidence of a diurnal rhythm in the move - ment of pigment cells in eyes of crustaceans. Biol. Bull. 68 : 247-252.
- Welsh, J.H. (1936): Diurnal movements of the eye pigments of Archistoj des. Biol. Bull. 70 : 217-227.
- Welsh, J.H. (1939): The action of the eyestalk extracts on retinal pig - ment migration in the crayfish Cambarus bartoni. Biol. Bull. - 77 : 119-125.
- Welsh, J.H. (1941): The sinus glands and 24-hour cycles of retinal pig - ment migration in the crayfish. J. Exp. Zool. 86 : 35-49.
- Wilkins, B. (1965): The influence of temperature changes and temperatu - re on biological clocks. In: Circadian clocks. North-Holland - Publishing Co. Amsterdam, pp. 146-163.
- Wilkins, L.A. and J.L. Larimer (1972): The CNS photoreceptor of cray - fish: Morphology and synaptic activity. J. Comp. Physiol. 80: 389-407.
- Wilkins, L.A. and J.L. Larimer (1976): Photosensitivity in the sixth ab - dominal ganglion of decapods crustaceans: A comparative study. J. Comp. Physiol. 106 : 69.
- Wiersma, C.A.G. and P.J. Mill (1965): "Descending" neuronal units in -- the commissure of the crayfish central nervous system and -- their integration of visual, tactile and proprioceptive stimu - li. J. comp. Neur. 125 : 67-94.
- Wiersma, C.A.G. and T. Yamaguchi (1966): The neural components of the -- crayfish as studied by single unit analysis. J. Comp. Neurol. - 128 : 333.
- Yoshida, M. (1979): Extraocular photoreception. In: Handbook of Sensory Physiology. Vision in Invertebrates. Ed. Autrum. Springer-Ver - lag.

- Semon, R. (1908): Hat der Rhythmus der Tageszeiten bei Pflanzenerbliche Eindrücke hinterlassen? Biol. Central, 28 : 225-243.
- Steven, D.M. (1963): The dermal light sense. Biol. Rev. Cambridge ---, Philos. Soc. 38 : 204-240.
- Swade, R.H. and C.S. Pittendrigh (1967): Circadian locomotor rhythms of rodents in the Arctic. Amer. Natur. 101 : 431-466.
- Sweeney, B. and J.W. Hastings (1960): Effects of temperature upon diurnal rhythms. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25 : 87-104.
- Taylor, D.H. and D.E. Ferguson (1970): Extraoptic celestial orientation in the southern cricket frog Acris gryllus. Science. 168 : 390-392.
- Truman, J.W. (1972): Physiology of insect rhythms. II. The silk moth -- brain as the location of the biological clock controlling eclosion. J. Comp. Physiol. 81 : 99-114.
- Truman, J.W. (1974): Physiology of insect rhythms. IV. Role of the --- brain in the regulation of the flight rhythm of the giant silk moths. J. Comp. Physiol. 95 : 281.
- Truman, J.W. and L.M. Riddiford (1970): Neuroendocrine control of ecdysis in silkworms. Science. 167 : 1624.
- Van Harreveld, A. (1936): A physiological solution for freshwater Crustacea. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34 : 428-432.
- Viccon-Pale, J.A. y B. Fuentes-Pardo (1977): Cambios de excitabilidad durante un ciclo circádico motor en el acóel Procambarus bouvieri. XIII Congreso Latino Americano de Ciencias Fisiológicas Resúmenes de las Comunicaciones. México, D.F.
- Von Frisch, K. (1911): Beiträge zur Physiologie der Pigmentzellen in der Fishhaut. Pflügers Arch. Ges. 38 : 319-387. Citado por --- Adler, 1970.
- Wald, G. (1962): Visual pigments of the freshwater crayfish. Fed. Proc. 21 : 344.
- Wald, G. (1963): Single and multiple visual systems in arthropods. Fed. Proc. 22 : 519.
- Wald, G. (1968): Single and multiple visual systems in Arthropods. J. Gen. Physiol. 51(2) : 125.

- Zwicky, K.T. (1968): A light response in the tail of Urodacus, a scorpion. Life Sciences, 7 : 257-262.
- Zwicky, K.T. (1972): The special sensitivity of the tail of Urodacus. - Locomotor entrainment. Experientia, 26 : 317.
- Zimmerman, W.F., C.S. Pittendrigh and T. Pavlidis (1968): Temperature-compensation of the circadian oscillation in Drosophila pau - doobscura and its entrainment by temperature cycles. J. Insect. Physiol. 14 : 669.
- Zimmerman, W.F. and D. Ives (1971): Some photophysiological aspects of circadian rhythmicity in Drosophila. In: M. Menaker (Ed.) --- Biochronometry. Washintong, D.C. National Academy of Science.