



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

133
24

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LA LUZ MONOCROMÁTICA
EN LA ONTOGENIA DEL RITMO CIRCADIANO
DE LA AMPLITUD ELECTORRETINOGRÁFICA
DEL ACOCIL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO PRESENTA:

MIRANDA ANAYA MANUEL

México D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1981.



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCION..... | 2 |
| Ritmos circadianos..... | 5 |
| Historia..... | 5 |
| Osciladores..... | 9 |
| Ontogenia..... | 13 |
| RITMO CIRCADIANO DE LA AMPLITUD | |
| ELECTRORRETINOGRAFICA (ERG)..... | 14 |
| SISTEMA VISUAL DEL ACOCIL..... | 17 |
| Sensibilidad espectral en el ojo del acocil..... | 22 |
| DISTRIBUCION ESPECTRAL EN HABITATS ACUATICOS..... | 25 |
| EFECTO DE LA LUZ MONOCROMATICA SOBRE LOS RITMOS | |
| CIRCADIANOS..... | 25 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 29 |
| HIPOTESIS..... | 31 |
| MATERIAL Y METODO..... | 32 |
| Obtención del ERG..... | 33 |
| RESULTADOS..... | 38 |
| DISCUSION..... | 62 |
| LITERATURA..... | 70 |

RESUMEN

Con el objeto de investigar un posible desarrollo asimétrico de fotorreceptores circadianos sensibles a dos longitudes de onda extrema (410 y 660 nm) en el ojo del acocil *Planorbis glabratus* durante estados de desarrollo temprano: se llevó a cabo el registro del ritmo electroretinográfico (ERG) obtenidos bajo destellos de luz blanca, azul y roja de una misma intensidad de estímulo ($5.1 \mu\text{Einsteins M}^{-2} \text{s}^{-2}$), tanto en acociles juveniles de diferentes edades (desde la eclosion hasta doce semanas de edad), como en acociles adultos. Por otra parte, se realizaron experimentos en las mismas condiciones pero con diferentes intensidades lumínicas.

El ritmo fue registrado siempre en condiciones de oscilación espontánea a oscuridad y temperatura constante y se caracterizó a través del análisis de los parámetros correspondientes (amplitud relativa, relación alto/bajo, periodo y fase).

De acuerdo con los resultados de esta tesis, la longitud de onda parece tener influencia sobre las características del ritmo ERG durante la ontogenia. Tanto la luz azul como la luz roja, indican un ritmo circadiano que en animales jóvenes no es evidente bajo destellos de luz blanca. Las características de la longitud de onda aparentemente hacen cambiar los parámetros del ritmo que aparece ya como circadiano en organismos de la misma edad. Sin embargo en los animales adultos, no parece haber diferencia en las características del ritmo obtenido a los diferentes destellos de luz monocromática.

Estos resultados sugieren un desarrollo asimétrico de dos grupos de fotorreceptores circadianos con diferente sensibilidad espectral, uno fotópico y otro escotópico, sin embargo al tratar de probar esta hipótesis mediante el cambio de intensidad de luces de prueba, no parece seguir la ley de Aschoff.

INTRODUCCION

La idea del tiempo ha sido uno de los conceptos más enigmáticos y controvertidos que ha desarrollado el hombre a través de su historia, ya que el ser humano desde sus orígenes, se enfrentó a un universo al cual ha descrito mediante dos grandes características, por una parte, los objetos ocupan siempre un espacio y por otro lado, los eventos se suceden en largos o cortos periodos de tiempo.

La capacidad del hombre para definir el tiempo en su esencia, ha sido hasta hoy insatisfecha, el ser humano ha intentado conceptualizarlo echando mano de metáforas e implicaciones filosóficas o bien tratando de encajarlo en un concepto científico como es el orden de los acontecimientos (sucesión y simultaneidad) así como la duración o el intervalo entre dos acontecimientos (Piaget J. 1979); sin embargo, a través de la historia, se ha formado un criterio unidireccional del mismo, interpretándolo como cambios consecutivos a través de los ciclos observados empíricamente, como son los ciclos noche-día, el movimiento de los astros, los cambios estacionales que suceden año con año, e inclusive los cambios que sufren los organismos a través de su ontogenia y que parecen ser unidireccionales.

Así, éstos elementos se han utilizado para medir el tiempo, uno de los principales son los ciclos noche-día, como resultado de una revolución completa del planeta sobre su propio eje y los ciclos anuales como resultado de una revolución completa del planeta alrededor del sol, los que se manifiestan en los cambios estacionales observados en la naturaleza.

Los organismos, al estar sometidos a éstos cambios cíclicos muestran de alguna manera una relación conductual y fisiológica con estos ciclos; es decir, la tierra al girar sobre su propio eje una vez cada 24 horas, somete a las plantas y animales a ritmos conspicuos de luz y temperatura; así el comportamiento de los organismos, la alimentación, la actividad de los depredadores etc. se ven afectados por estas variaciones, por lo que no es de sorprenderse que el

metabolismo de muchos organismos siga un patrón de oscilación de 24 horas.

Así como el ciclo noche-día tiene efecto sobre el comportamiento de los organismos, existen también ciclos de mayor duración como los que se presentan con las fases de iluminación de la luna, o bien aquellos ciclos relacionados con las mareas y con los cambios en la estacionalidad anual. En el caso de los ritmos lunares-mareales, los animales que se encuentran en las zonas intermareales están sometidos a cambios continuos en el nivel del agua y en algunas costas con altas amplitudes de mareas de primavera dos veces al mes lunar; de tal manera que los organismos que habitan en aguas poco profundas o en berceletes o rocas de agua dulce, están expuestos a cambios periódicos debidos al brillo de la luna.

Por otro lado el hábitat de la mayoría de los organismos se encuentra sujeto a cambios estacionales, de tal forma que todos los factores físicos ambientales como la temperatura, la duración del día, la precipitación pluvial, etc., que varían con la estación son importantes.

Sin embargo, el papel que juegan las variaciones que ocurren en 24 horas, resalta entre los ritmos mencionados anteriormente, por esta razón se ha creado una subdivisión en el espectro de los ritmos. Basándose en estas variaciones se han clasificado en ritmos ultradianos, circadianos e infradianos (Aschoff, 1964). Con base en la frecuencia del ritmo, la clasificación se basa en la frecuencia $1/T$ tomando como punto de referencia $1/24$ horas, en donde T es el periodo).

Los ritmos conocidos como ultradianos, son aquellos cuyos periodos son más cortos que los cercanos a 24 horas o bien que su frecuencia sea mayor a las 24 horas (Moore-Ede, 1962). Con base en el periodo, los ritmos ultradianos se observan en vertebrados como el hombre, mediante la repetición rítmica de los movimientos

oculares rápidos (MER), durante ciertas fases del estado de sueño, los que se repiten con un intervalo de 90 minutos aproximadamente. Aparentemente, entre más corta sea la frecuencia, la interpretación del ritmo es más compleja (Aschoff, 1984) a pesar de esto, se han podido apreciar y caracterizar ritmos ultradianos a nivel celular, por ejemplo: en algunas reacciones bioquímicas que se llevan a cabo por enzimas catalíticas como es la actividad de la enzima ATPasa, cuyo período es entre 1-2.5 min., o la síntesis proteica, que presenta un período de entre 0.5-1 hora (Edmund L.N., 1988).

El final del espectro, lo ocupan los ritmos infradianos que son aquellos que se manifiestan con períodos superiores a las 24 horas: como ejemplo de ello, Mead en 1970 menciona la oviposición de larvas por un mosquito con una continuidad semanal, los períodos estrales en abejas, en el caso del hombre el resultado de los calendarios de trescientos médicos, con patrones semanales en pacientes. Existen datos que sugieren que en el hombre existe un ritmo de 21 días en la secreción de testosterona (Aschoff, 1984). Así encontramos que una gran cantidad de fenómenos de reproducción en vertebrados son llevados a cabo en épocas cuando el ambiente es favorable, esto es entre el final de la época de primavera y durante el verano. De igual forma, fenómenos como la hibernación, la diapausa y la migración se presentan con un carácter cíclico anual principalmente durante la época de otoño-invierno.

Por último y centralmente están los ritmos circadianos que son aquellos que se manifiestan con períodos cercanos a las 24 horas. La palabra circadiano del latín *circas*-cerca y *diem*-día, fue acuñada por Franz Halberg en 1959 para describir los ciclos que son de aproximadamente 24 horas que son generados endógenamente por los organismos (Moore-Ede et al, 1982).

RITMOS CIRCADIANOS

HISTORIA

La idea de que los ritmos circadianos no son una consecuencia directa de la periodicidad ambiental, fue considerada a partir que Jean Jacques d'Artis de Marion, en 1729, realizó un experimento utilizando la sensibilidad a la luz, de la planta llamada heliotropo (probablemente la especie conocida como Mimosa pudica) que posee la característica de permanecer con las hojas abiertas durante el día y cerradas durante la noche. Al cambiar a la planta de sitio y colocarle en un lugar que no recibía iluminación, observó que la actividad de apertura en las hojas persistía durante el día y el cierre de las mismas durante la noche.

En el mismo año, Henri Louis Dubaval llevó a cabo el experimento de d'Artis de Marion en una cava de vinos con condiciones de temperatura aparentemente constantes, observando que el movimiento de las hojas era independiente de éstos factores, haciendo mención que los organismos vivos poseen un verdadero cronómetro (Nard P. 1972), apoyando la idea de que los ritmos circadianos están presentes aún en ausencia de estímulos ambientales que los pudieran producir. En 1832, Agustín de Candolle, descubrió que aparte de la persistencia en el movimiento de las hojas de Mimosa pudica, en oscuridad constante, la apertura de las mismas era cada día más temprano, con un adelanto hasta de dos horas, mostrando así una periodicidad de entre 22 y 23 horas, pudiendo ser atribuido la presencia de un reloj circadiano en oscilación espontánea, o sea un ritmo endógeno, con un periodo independiente al de 24 horas impuesto por factores de iluminación y temperatura externos.

Darwin en su libro "On the power of the movement of plants" (1880) parece estar convencido de que la periodicidad en el movimiento de las hojas es una propiedad inherente de las plantas (Moore-Ede, 1982).

Desde el experimento de Marian, se ha observado la existencia de relojes biológicos en una gran cantidad de organismos, cuando son sometidos a condiciones constantes de luz y temperatura, mostrando ciclos perdurando a las 24 horas, pero que pueden ser sincronizadas en un ciclo de 24 horas por influencia de factores externos.

La característica de los seres vivos de presentar oscilaciones espontáneas en condiciones aisladas, implica también que dichas características sean capaces de ser transmitidas de generación en generación. Así Aschoff en 1960, mediante un experimento realizado en ratas completamente aisladas de factores ambientales externos, demostró que además de que persiste la ritmicidad circadiana, ésta se presenta en las siguientes generaciones de crías que nunca han tenido ciclos de luz-oscurecimiento ni obstante los estímulos ambientales, además de sincronizar el ritmo endógeno a el ambiente, también pueden detener su funcionamiento cuando la temperatura es muy baja o la intensidad de la luz es muy alta, por lo que se ha propuesto que este fenómeno esté condicionado por la intensidad de el estímulo ambiental sobre el sistema de oscilación (Nijus, McMurry and Hastings, 1977).

La condicionalidad que presentan los organismos a los estímulos ambientales como temperatura, fué estudiada tanto en organismos homeotermos (aquellos que mantienen la temperatura corporal en intervalos estrechos de variación, aun cuando la temperatura ambiental varíe en amplios intervalos), como en poiquilotermos (organismos cuya temperatura corporal varía según la temperatura ambiental, es decir no la autorregulan). Si la velocidad de muchos procesos bioquímicos cambia de 2 a 3 veces cada 10°C ($Q_{10}=2-3$), además si los relojes circadianos dependen de un simple proceso metabólico, el animal podría estimar el tiempo incorrectamente cuando existan cambios en la temperatura ambiental (Everney y Hastings, 1968), la temperatura de muchos mamíferos

tienen un ritmo circadiano prominente con una amplitud de alrededor de 2°C. A pesar de estas variaciones, los ritmos circadianos se manifiestan entre los intervalos de temperatura que mantengan los organismos, mediante mecanismos de compensación, manifestando la independencia de los relojes circadianos a los cambios térmicos; sin embargo el mecanismo exacto de compensación de temperatura no ha sido muy bien entendido (Sweeney y Hastings, 1960).

La longitud de periodo en un ritmo circadiano en oscilación espontánea y de su velocidad de oscilación, esta determinada por la intensidad de luz a la que se encuentra expuesto. Aschoff en 1960, demostró que con intensidades altas de luz, se acorta el periodo en organismos diurnos pero se alarga en organismos nocturnos. Además, bajo luz intensa, el tiempo de actividad de un animal ocupado con su tiempo de reposo se incrementa en especies diurnas y decrece en nocturnas. El periodo en oscilación espontánea es mayor de 24 horas para especies diurnas en oscuridad constante y más corto en especies nocturnas bajo las mismas condiciones.

El efecto de las influencias ambientales sobre los mecanismos responsables de la manifestación de los ritmos circadianos se suma con las propiedades programadas genéticamente del reloj biológico. Hemmingen y Kraup en 1937, sometieron a ratas a ciclos luz-oscuridad (L, 0) 8:8 sin observar cambios en la ritmicidad circadiana en la siguiente generación. Muchos estudios sistemáticos sobre genética circadiana se han llevado a cabo en organismos pequeños (como la mosca de la fruta *Drosophyla*) con ciclos de vida cortos, en los que han sido generados nuevos mutantes, de tal forma que se han encontrado muchos mutantes con diferentes duraciones de periodo en condiciones de oscilación libre, las mutaciones se han llevado a cabo utilizando radiación X, luz ultra violeta y mutágenos químicos. Estos cambios de periodos encontrados en los mutantes en oscilación libre son inherentes a cada generación (Moore-Ede, 1962). Los modelos biológicos de la

mosca de la fruta Drosophyla melanogaster, el hongo Neurospora crassa y el alga Chlamydomonas reinhardi, han hecho posible mapear la localización cromosómica de cada mutación. Así en Drosophyla por ejemplo, mutantes con periodos de 19 a 28 horas además de mutantes arrítmicos se han derivado del tipo común de esta especie en forma silvestre y posee un periodo de 24.2 horas (Moore Ede, 1962). Se ha mapeado cada mutación en el mismo locus genético en el cromosoma X de Drosophyla, sugiriendo lo anterior la existencia de genes específicos de control del ritmo circadiano (Konopka y Benzer, 1974).

El hecho de que se haya demostrado que existan oscilaciones circadianas netamente endógenas, no quiere decir que en forma natural los ritmos biológicos estén en constante oscilación espontánea, pues se encuentran generalmente sincronizados por algún ciclo externo presente en el ambiente: así la frecuencia de los ritmos puede ser forzada a coincidir exactamente con una oscilación externa (la alternancia de luz-oscuridad por ejemplo); cuando esto ocurre se dice que el ritmo ha sido sincronizado por la oscilación externa. La señal responsable de la sincronización ha sido llamada zeitgeber, palabra de origen alemán cuyo significado aproximado es señal de tiempo que implica una oscilación ambiental que sea capaz de ser detectada por un ser vivo, y que sincroniza a un ritmo biológico auto-sostenido (Moore-Ede, 1962).

La sincronización por supuesto, puede tomar lugar solamente mientras esté presente la oscilación externa, por lo tanto cuando un ritmo no está sincronizado y se encuentra en condiciones constantes de luz y temperatura, se le denota como oscilación espontánea (free running), mostrando así su periodo natural aunque éste difiera ligeramente del periodo del zeitgeber. Lo que demuestra una sincronización de éste y por tanto su endogenidad. El zeitgeber denota señales ambientales como iluminación, temperatura, frecuencia de alimentación, sonidos, factores sociales etc., que son importantes para el organismo en estudio.

ORGANIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS

OSCILADORES

Los ritmos biológicos hasta ahora se han observado en un amplio espectro en el nivel evolutivo de los seres vivos, no importa que tan simples o complejos sean los organismos en que se presenten, siempre el ritmo poseerá las mismas propiedades generales. La característica más importante de los ritmos circadianos es su propiedad de ser endógenos, es decir, independientes de la fase del ciclo, manifestándose como la frecuencia natural de oscilación del sistema (Aschoff, 1967).

Para comprender la organización en un sistema de tiempo circadiano, podemos referirnos a un modelo de caja negra, en donde el contenido del sistema es desconocido; las funciones pueden ser estudiadas a través del registro de ciertas salidas rítmicas y su manipulación por ciertas entradas ambientales (como en el caso de los ciclos de luz-oscuridad). Sin embargo, el sistema circadiano total de un individuo se puede manifestar por medio de diferentes ritmos circadianos en el mismo, en los que el orden temporal es altamente específico. (Moore Ede y Sulzman, 1961).

Los diversos ritmos juegan una relación complicada, alcanzando sus picos máximos en diferentes horas del día circadiano. Aunque en especies distintas, la salida de la expresión circadiana general es diferente, en cada individuo los diferentes ritmos ocupan la misma fase; por ejemplo el ritmo de actividad motora en especies de ratas nocturnas, está 180° fuera de fase con el ritmo motor en el mono ardilla, pero en ambas especies, el ritmo de concentración de corticosteroides en plasma coincide con el inicio de la actividad motora, señalando una organización similar en los sistemas de tiempo circadiano en ambas especies.

La idea de la existencia de osciladores que se expresan

finalmente como la salida externa del tiempo circadiano, se ha apoyado en altos niveles de vertebrados e invertebrados, donde se han localizado supuestos osciladores en el sistema nervioso y en el sistema endócrino; así centros discretos del sistema nervioso aparentan ser responsables de los ritmos circadianos en animales superiores, por ejemplo, en el cerebro de los mamíferos, se hallan centros que contienen marcapasos circadianos localizados en el núcleo supraquiasmático; por otra parte en algunos invertebrados se han localizado en el lóbulo óptico o en células neurosecretoras (de cucaracha o mosca doméstica y el grillo respectivamente), así como en los ojos de algunos gasterópodos marinos como *Aplysia* y *Gygia* (Levand N. Edvard, 1983).

A nivel unicelular, células independientes son capaces de generar ritmos circadianos, estudiados a través de la natación, la sensibilidad fotoeléctrica, la bioluminiscencia etc. en organismos como *Euglena*, *Paramecium* y *Chlamydomonas* (Bünning, R. 1973), así como en la capacidad fotosintética de *Cryptomonas polyedra* en condiciones de luz-luz (L,L) y luz oscuridad (L,O) en donde la producción de oxígeno se manifiesta de forma circadiana (Sweeney, R. 1960). Esto sugiere que la teoría de osciladores, se puede encontrar aún a nivel de organismos unicelulares, por lo que los ritmos circadianos pueden considerarse como una característica inherente en todos los seres vivos.

Muchos investigadores creen que la fisiología circadiana es un resultado de una organización jerárquica de diferentes osciladores, cada especie puede tener su propia jerarquía especializada para adaptarse al tiempo de un ambiente particular. El componente inicial en esta jerarquía se encuentran los órganos que detectan el zeitgeber, posteriormente, un marcapasos en el siguiente nivel posee osciladores autosostenidos (esto es que por sí mismos son capaces de generar una oscilación circadiana). Los marcapasos pueden conducir a otros osciladores autosostenidos o pueden procesar señales que por sí mismas no son capaces de producir una oscilación. Las conexiones entre los componentes de

una jerarquía pueden ser vías nerviosas, hormonas o ambas (Moore-Ede y col., 1976).

En la organización de un sistema circádiano podemos encontrar diferentes mecanismos de interacción, por ejemplo si un marcapaso controla un proceso fisiológico en un organismo, lo podemos denominar como acoplador de los relojes biológicos. Cuando dos ritmos están sincronizados, es decir, tienen la misma fase, se dice que el acoplamiento está ajustado; cuando la fase de dos ritmos con respecto a otro es impreciso el acoplamiento se pierde y se denota como desacoplado. Cuando una oscilación controla a otra, el oscilador controlador se designa marcapaso y la regulación de la oscilación se llama oscilación conducida (también llamado oscilador esclavo) (Moore Ede, y col. 1982).

Así entonces, los mecanismos de acoplamiento de los ritmos circádicos internos para una sincronización única, han sido organizados dentro de jerarquías de osciladores y conductores o vías de conducción. Para cada jerarquía es detectable un zeitgeber (p.e. luz através de fotorreceptores), la información ambiental es entonces retransmitida por diferentes vías (p.e. nervios) hacia el marcapaso (grupo de células), los cuales a su vez aportan oscilaciones medibles y/o respuestas pasivas que controlan efectores. Como se mencionó anteriormente, en las jerarquías, los mecanismos de acoplamiento pueden implicar una gran variedad de procesos fisiológicos (p.e. vías nerviosas, hormonas, temperatura etc; Binkley S., 1990).

De lo propuesto la teoría de dos modelos de osciladores (Moore Ede, 1976; Pittendrigh, 1971). En primer plano un modelo típico de oscilador, que se sincroniza durante la fase correspondiente a la mañana (amanecer) y por otra parte un modelo de oscilador que se sincroniza durante la tarde (crepúsculo). Este tipo de modelo es útil principalmente para investigar el efecto del fotoperiodo sobre los ritmos, así como los ritmos bimodales.

Muchos organismos poseen un calendario biológico que se utiliza para marcar eventos estacionales. El amanecer y el atardecer son señales de tiempo durante el día que pueden ser utilizadas para reiniciar los ritmos circadianos. En muchas latitudes, la longitud del día y de la noche cambia en forma precisa y sistemática a lo largo del año; así los cambios en la iluminación como el amanecer y el anochecer (que han sido denominados: fotoperíodo a la duración del día o fase luminosa y escotoperíodo a la duración de la noche o fase oscura) contienen información estacional así como información diaria. Los organismos pueden usar esta información como calendario para adaptar un proceso fisiológico a los eventos estacionales (Blinkey S, 1990). De esta manera, muchos mamíferos presentan ciclos reproductivos anuales en los cuales aseguran que los organismos jóvenes nacen en las épocas más calurosas del año. Para muchas de estas especies, la variación estacional en la longitud del día o del período luminoso es un indicador de tiempo importante que asegura la sincronización del ciclo reproductivo con la estación más apropiada (Lodge y Salisbury, 1970; Negus y Berger, 1972).

La detección de cambios en la longitud del día o la medición del fotoperíodo de iluminación externa, es una función del sistema circadiano. Büning, en 1936, propuso que el sistema circadiano es insensible a los cambios de luz en muchas partes del ciclo, pero es sensible a cambios en fases claves del ciclo y esto podría ser la base de la inducción de respuestas fisiológicas en algunos organismos (Moore-Ede, 1962), de tal forma que los ritmos circadianos se contemplan como el sustrato de la inducción fotoperiódica.

ONTOGENIA

En los mamíferos, la primer exposición a un ambiente cíclico comienza en el útero. La concertación de nutrientes y hormonas a través de la placenta refleja el ritmo circadiano de la madre sobre el feto (Reppert y col., 1979) esto parece ser suficiente para que exista una sincronización en los marcapasos del feto. Sin embargo, la sincronización del útero es más fuerte que la producida por la madre en etapa postnatal, lo cual se puede manifestar através de una desincronización de los marcapasos mencionados en las primeras etapas postpartum.

No obstante, los marcapasos circadianos de un animal recién nacido, aparentemente conservan el tiempo aunque no se acoplan inmediatamente con otros ritmos existentes sino hasta después de un periodo de tiempo definido. Así, un animal recién nacido desarrolla gradualmente la manifestación de ritmos circadianos en diferentes funciones corporales como aquellas que llegan a ser acopladas durante las primeras semanas y meses de vida, de tal forma que la amplitud del ritmo se va incrementando hasta alcanzar las características del ritmo de un adulto (Hellbrugge, 1960; Davis, 1961).

El hecho de que los ritmos circadianos se encuentran en los animales, y éstos sean una manifestación directa del reloj biológico, los denota como manifestaciones de ritmos endógenos cuya posición de fase puede servir para denotar el tiempo (hora) del día. Sin embargo la estructura interna del reloj y si éste está constituido por uno o por muchos osciladores múltiples arreglados jerárquicamente, sigue siendo un tema de investigación actual. Una forma de abordar este problema, consiste en estudiar la emergencia de la organización de éste sistema, a través del estudio de la ontogenia de los ritmos. La ontogenia del sistema circadiano comprende la manera tanto formal como fisiológica, mediante la cual el sistema emerge y se organiza.

Debe incluir quizá también los mecanismos que guían ésta emergencia y las causas y efectos del envejecimiento (Davis, 1951).

Durante el desarrollo de un animal, diferentes funciones fisiológicas se organizan en el tiempo. Los trabajos que describan como ocurre esta sincronización de forma gradual o abruptamente, de la misma manera o de diferente forma en los ritmos de un animal, por medio del cambio en el periodo o en la forma del ritmo, la fase o amplitud del mismo, la posibilidad de que el ritmo sea sincronizado o no por los cambios del medio, así como la emergencia de los mecanismos compensadores de temperatura, constituirían una fuente valiosa de información para la comprensión de la génesis de los ritmos y por lo tanto, del sustrato del reloj biológico.

RITMO CIRCADICO DE LA AMPLITUD ELECTRORETINOGRAFICA DEL COCCIL (ERG)

El sistema circadiano ejerce un grado considerable de control sobre las vías eferentes del sistema nervioso. Existen evidencias que sugieren la existencia de una modulación circadiana de la excitabilidad del sistema sensorial, particularmente con respecto a la vía visual. Las respuestas sensoriales de esta naturaleza muestran ritmicidad circadiana con estímulos estándar (Jahn y Crescitelli, 1960). Desde entonces los ritmos de amplitud del electroretinograma (ERG) han sido descritos en diferentes invertebrados entre ellos en el coccil (Aréchiga y Wierema, 1968). Frecuentemente éstos ritmos en la sensibilidad reflejan cambios diarios en los pararreceptores (como son los pigmentos accesorios en el coccil) los cuales modulan la entrada de la luz en el fotorreceptor (Aréchiga y Fuentes, 1970; Barlow y col., 1977). Existen evidencias acerca del cambio de sensibilidad en fotorreceptores primarios (células retinulares) que pueden en algunos casos contribuir al ritmo o bien ser las bases primarias

del mismo (Aréchiga y col., 1990; Jahn y Wulf, 1943; Sanchez y Fuentes, 1977).

El electroretinograma (ERG), es el registro extracelular de los cambios de voltaje que se llevan a cabo en el ojo como respuesta a un estímulo luminoso y se puede detectar mediante un dispositivo constituido por un electrodo activo dentro o cerca del ojo y un electrodo indiferente usualmente colocado en un punto inactivo del sistema. Esto refleja la suma de la actividad que se produce en el sistema visual al ser estimulado específicamente (Stephan y Stowe 1962).

Naka y Kawahara en 1966, registraron el ERG en la superficie de la cornea del axccil, encontrando dos componentes principales a los cuales se refieren como HI que responde al encendido de la iluminación y a la respuesta mencionada como HII que se mantiene durante el estímulo, dichos componentes fueron estudiados en forma detallada en 1966 por los mismos autores, a través de registros mediante microelectrodos, proponiendo que los dos componentes se originan de diferentes estructuras en la pared del receptor, donde HI corresponde a la respuesta de las células retinulares y la HII a la respuesta del rabdoma (figura 1).

En el axccil *Epischura clavigera* (Aréchiga y Wierne, 1969), existe un ritmo circadiano en las respuestas de las interneuronas de tipo visual, así como en las fibras de acción sostenida. Estas fibras al registrarse mediante electrodos implantados crónicamente exhiben variación a la respuesta de un pulso estándar de luz, que es muy similar al ERG. Además la actividad espontánea de éstas células en oscuridad constante, muestran un ritmo circadiano, teniendo una mayor amplitud durante la noche subjetiva que durante el día subjetivo (el axccil es un organismo generalmente nocturno en estado adulto), según estos autores, el origen de éste ritmo puede incluir a otras neuronas en la vía visual. El sistema neural mecanorreceptor al parecer está directamente relacionado con el sistema fotorreceptor (Aréchiga y Wierne, 1969).

Durante la ontogenia del *accoil.* es necesario que el sustrato anatómico y las estructuras que intervienen en la oscilación alcancen su madurez y establezcan entre ellas relaciones funcionales con los elementos apropiados (Rensing, 1965; Deguchi, 1975; Davis, 1981). Estos son algunos de los factores que explican la maduración de los organismos y su relación con el sentido del tiempo (Flinklestein y col. 1972; Pittendrigh, 1974). Así en un ritmo biológico los parámetros que cambian durante la ontogenia de los organismos vivos, son principalmente el periodo, el nivel de oscilación y la relación de la fase activa con la de reposo (Rensing, 1965), lo que puede involucrar cambios en la organización del (los) marcapasos y la organización funcional de todos los elementos posibles de la generación y la expresión del ritmo circadiano (Fanjul-Moles y col. 1987).

En el *accoil P. clarkii* se han obtenido registros de ERG y medición en la posición de los pigmentos retinales, medidos en sus primeros estadios de desarrollo y en estado adulto. Estos registros demuestran que en animales de 1 a 6 días después de la eclosión se observa un ritmo de amplitud de ERG con periodos de 15 minutos a 4 horas. En animales más grandes se muestra un aumento progresivo, en la duración del periodo antes de mostrar un patrón circadiano que aparece alrededor de los 30 días de edad, pero aún mostrando diferencias notables con el ritmo obtenido en animales adultos, sugiriendo que el ritmo circadiano del ERG, es un resultado de acoplamiento de osciladores de alta frecuencia (osciladores ultradianos). El acoplamiento de dichos osciladores se cree que es dependiente de la acción de neurosecreciones relacionados con el eje órgano X - glándula sinusal (Fanjul-Moles y col. 1987).

SISTEMA VISUAL DEL ACOCIL

El acocil posee al igual que una gran variedad de invertebrados (principalmente crustáceos) un ojo de tipo compuesto que se localiza en la región distal del tallo ocular, mostrando una periferia hemisférica. El tallo ocular es una estructura cilíndrica aplanada dorsoventralmente de forma discreta, unida en la parte anterior al cefalotórax del acocil (figura 1). El ojo compuesto se forma de varias subunidades llamadas omatidias, cada una con sus elementos ópticos separados (Stephen y Stowe, 1962). La superficie externa del ojo está cubierta por la córnea que es una cutícula transparente de aproximadamente 80 μm de ancho (Christom, 1966). Las subdivisiones omatidiales son usualmente visibles en la superficie del ojo como facetos corneales repetidos. El cono cristalino es la estructura óptica que se encuentra entre la córnea y las células fotorreceptoras de cada omatidia. Es una estructura transparente en la cual hay inclusiones intracelulares de partículas de glicógeno (Elofsson y Odellius, 1975). El cono cristalino es una estructura compuesta de diferentes sectores de diversas células de cono. Las partes centrales opuestas son transparentes.

Después de la córnea y del cono cristalino se encuentra el rabdomo, que es una extensión en forma de bastón de la superficie membranosa de los fotorreceptores o células retinulares. El rabdomo está formado por cientos de pequeños túbulos membranosos también alveolados microvellosidades o microvilli. La omatidia forma las subunidades del ojo y comprende un número determinado de células retinulares asociadas con elementos ópticos por encima y células pigmentarias a los lados.

En cada omatidia del ojo del acocil, se encuentran ocho células retinulares, una de ellas (R8) considerablemente reducida que se encuentra en una posición excéntrica distal mientras que las otras 7 (R1-R7) son más largas se encuentran en posición central y contribuyen todos al rabdomo principal. El citoplasma de

la R6 no está pigmentado y la célula contiene muy pocos organelos (Stephen y Stowe, 1982). La parte basal de la onatidia donde se forma el lazo axónico, está caracterizada por una hoja fibrosa extracelular de algunas micras de ancho, su origen es aún incierto. Los axones de las células retinulares penetran la membrana basal en un patrón específico. Las ocho células retinulares de una onatidia divergen anteriormente a la membrana basal penetrándola y formando fascículos de ocho axones (Sanderman, 1982) que se dirigen a un número de neurótipos organizados en el lóbulo óptico.

El neurótipo que está situado inmediatamente detrás de la retina es la lámina ganglionaris, posteriormente existen dos unidades ganglionares que son la médula externa y la médula interna. Los axones que van de la lámina ganglionaris a la médula externa y de ésta a su vez a la médula interna forman entrecruzamientos en forma de quiasma. En crustáceos decápodos con pedúnculos oculares, se continúan dos neurótipos diferentes dentro del lóbulo óptico, estos son la médula terminal y el cuerpo hemielipsoidal que se distinguen de los tres neurótipos anteriores en su unión repetida geométricamente. La médula terminal posee un neurótipo no estructurado característico del cerebro, mientras que el cuerpo hemielipsoidal se contiene en el neurótipo glomerular. En el aboíl los cinco ganglios de los lóbulos ópticos están relativamente esquetados y contenidos en el segmento distal del tallo ocular (Farker, 1987).

El neurótipo óptico anterior y el neurótipo óptico posterior, son los neurótipos principales responsables del control ocular y se encuentran insertados en el protocerebro. Las neuronas oculomotoras controlan los músculos oculares del aboíl (Mellon, y col, 1976; Mellon, 1977) el número preciso de células y su relación específica con los músculos del ojo son desconocidas. El soma celular de las neuronas oculomotoras está distribuido en tres grupos, el racimo motor anterior, el racimo motor lateral y las células gigantes (Mellon, 1977). Las neuronas motoras del racimo anterior tienen axones que recorren el nervio óptico para

inervar los músculos que son responsables de la elevación y depresión de los ojos. Las células con soma en el racimo lateral tienen sus axones separados del nervio oculomotor y producen movimientos en el plano horizontal. Las células gigantes tienen axones en el nervio óptico y son responsables de producir la retracción protectora de los ojos.

El orgánulo especializado para la absorción de la luz es el rabdomo, formado por una gran cantidad de microvellosidades empaquetadas en la parte central de la omatidia. Estas microvellosidades (microvilli) se extienden de la superficie de la membrana de las células reticulares. Los microvilli de una célula están dispuestos a 90° de la célula vecina, formando un cilindro común de absorción de la luz. Los microvilli de la célula R8, se disponen en forma horizontalmente paralela en el género *Ephemera* (Eguchi y Waterman, 1969).

Entre las células reticulares existen uniones intercelulares del tipo desmosoma. Las cuales corren a lo largo de la omatidia por la parte exterior del rabdomo; se supone que son solamente estructura de soporte. El compartimiento extracelular del rabdomo comprende un anillo de desmosomas permeables a través extracelulares; en el axonil cerca del 10% del volumen del rabdomo puede ser espacio extracelular (Krebs, 1974). Probablemente este volumen es suficiente para el mantenimiento iónico del potencial de receptor. Además se han encontrado uniones comunicantes en las células del cono óptico (Rosen, 1970).

El color distintivo del ojo de éstos crustáceos proviene de la luz reflejada por los gránulos pigmentados (melaninas, hemocromos, pteridinas, purinas) y otro tipo de inclusiones. Ambos se encuentran tanto en los fotorreceptores como en las células pigmentarias accesorias. Actúan como trampas reflectoras de luz que se desvía dentro del ojo. También actúan para variar la apertura óptica en la visión de superposición.

Los pigmentos visuales del rabadomo del acocil son principalmente rodopsinas con un cromóforo 11-cis-retinal aparentemente derivado de la vitamina A. (Goldsmith, 1972), encontrándose en altas cantidades en el rabadomo. Todas las rodopsinas poseen una amplia banda de absorción espectral desde la luz ultravioleta (UV), hasta los 530 nm. aproximadamente (King y Goldsmith, 1977). La concentración del pigmento visual en las células retinulares es aproximadamente de 1 mM con una distancia intermolecular de rodopsina de 75-106 Å, con un empaquetamiento óptimo. En diversos análisis en el género *Euglossa*, el ERG en adaptación crónica y oscura, muestran la existencia de dos subsistemas espectrales en el ojo compuesto. En azul, la longitud de onda máxima es entre 430 y 440 nm y varía a 550 nm. Aunque posteriormente se demostró que es posible obtener respuestas a longitud de onda larga en los 515 nm dependiente de la estacionalidad (Goldsmith y Fernández, 1968; Nosaki, 1968; Suzuki, 1968). Estos fotopigmentos se descomponen principalmente por la acción de la luz sobre la metarodopsina.

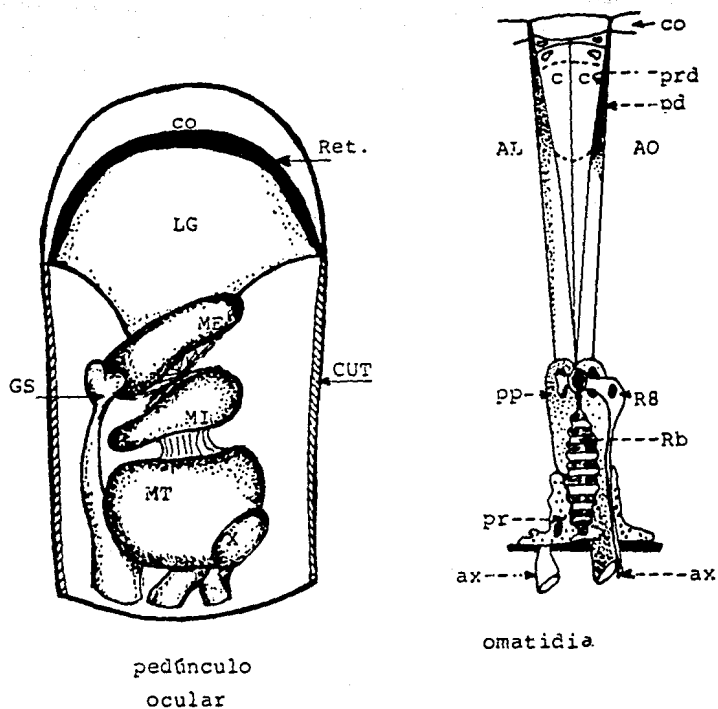


Figura 1. Pedúnculo ocular: co: córnea, Ret: retina, LG: lámina ganglionaris, ME: médula externa, MI: médula interna, MT: médula terminalis, X: Órgano X, GS: glándula sinusal, CUT: cutícula.

Ommatidia: co: córnea, prd: pigmento reflectante distal, pd: pigmento distal, AO: adaptación a la oscuridad, AL: adaptado a la luz cc: cono cristalino, RB: célula retinular 8, Rb: rabdomo, pr: pigmentos reflectantes, pp: pigmento proximal, ax: axón.

SENSIBILIDAD ESPECTRAL EN EL OJO DEL ACOCIL

El 11 *cis*-retinal (aldehído de la vitamina A "retinol") que al combinarse con la correspondiente opsina forma la rodopsina, se consideró como el cromóforo universal en los fotopigmentos de invertebrados. Observaciones recientes han cambiado esta generalización, ya que el ojo del acocil *Procambarus* así como en muchos vertebrados de agua dulce, contiene el 3-dehidroretinal que va a originar la porfirropsina además del retinal mencionado (Suzuki y col. 1984). La porfirropsina es un fotopigmento capaz de absorber la luz con longitudes de onda más larga que las que absorbe la rodopsina, probablemente como una respuesta de adaptación al espectro luminoso del agua de los ríos, que permite el paso de longitudes de onda más larga a los encontrados en un ambiente terrestre (Bridges, 1972; Knowles y Dartnall, 1977). La proporción de los dos aldehídos varía estacionalmente, el primero está presente en un 40 % durante el invierno y virtualmente desaparece a finales del mes de julio y agosto (Nesaki, 1983). Además se ha observado una disminución drástica cuando el animal es conservado a temperatura de 25°C, cuando la iluminación es constante o bien cuando existe un fotoperíodo (Goldsmith y Bernhard, 1985). Sin embargo, no se modifica en oscuridad constante o cuando la temperatura se mantiene a 10°C, sin importar el patrón de iluminación (Suzuki y cols., 1985).

En el acocil *Procambarus clarkii*, los valores de sensibilidad espectral son diferentes. Se han obtenido valores que discrepan de experimento a experimento, ya sea obtenidos por procedimientos electrofisiológicos o por microespectrofotometría. En el primer caso la sensibilidad espectral medida como una función de magnitud del ERG muestra un máximo de 565-570 nm (Kenedy y Bruno, 1981; Goldsmith y Fernández, 1983; Wald, 1968) y un segundo pico que emerge a los 430 nm por adaptación selectiva del ERG a la luz roja. Mientras que la microespectrofotometría sugiere la presencia de solo un fotopigmento sensible a los 520 nm. llamado receptor al naranja (Goldsmith, 1976 a).

De igual carácter se han reportado medidas de sensibilidad espectral entre los 450 y los 634 nm sugiriendo dos poblaciones distintas de células retinulares en el ojo del acoel Procambarus (Noseki, 1962) como consecuencia debido principalmente a diferencias estacionales, siendo debido a la acción filtrante de los pigmentos accesorios en la luz incidente (Höglund, 1965) o a una metacromasia de fotopigmento similar al encontrado en peces (Marshall y Lenton, 1962; Walz, 1963) mostrando así dos tipos de fotorreceptores selectivamente definidos en diferentes regiones espectrales. Con registros intracelulares, se ha encontrado que de 81 células, 17 respondían a longitudes de onda cortas (440 nm.) y 74 al color amarillo-naranja (574 nm.), con una localización de las células sensibles al violeta en un cuadrante anterior del ojo (Watterman y Fernández, 1970). Por otra parte, Eguchi y cols., para identificar las células sensibles a color rojo, adaptaron ojos selectivamente con luz monocromática de 450 y 500 nm. La condición de adaptación a la luz se evaluó a través de la acumulación diferencial de cuerpos multivesiculares asociados a lisosomas, estableciendo la existencia de dos grupos de fotorreceptores que responden en forma directa y específica a los tipos de luz monocromática utilizada.

En otro tipo de estudios, particularmente con las técnicas de marcaje con amarillo de lucifer en células retinulares en el acoel Procambarus, se encontró que el cuerpo celular del fotorreceptor localizado de forma distal al rabdomo principal como la octava célula retinular (R8), es el que responde al color violeta, mientras que las células que respondían a longitudes de onda mayores correspondían a las células que forman el rabdomo principal, o sea las R1 a R7 (Cummins y Goldsmith, 1981); éstos resultados fueron comprobados por microespectrofotometría.

La presencia de dos grupos de fotorreceptores para sensibilidad espectral en el acoel Procambarus clarkii ha quedado plenamente corroborada; mediante la realización de curvas de

sensibilidad espectral para cuatro neuronas de acción sostenida, cuya respuesta se registró en forma extracelular en fibras de acción sostenida del nervio óptico de este animal. Después de la adaptación a la oscuridad, la sensibilidad mayor fué de 575 nm., la adaptación de la luz roja suprime esta sensibilidad, altera el patrón de descarga de las neuronas y pone al descubierto una respuesta para una longitud de onda máxima de 445 nm., sugiriendo que las fibras de acción sostenidas pueden llevar información compatible con la visión en color (Trevisó y Larimer, 1970; Keesen et al., 1971).

Lo anterior es compatible con los hallazgos encontrados en otros grupos de invertebrados que poseen un tipo similar de fotorreceptores, se ha demostrado que al aplicar luz azul y ultravioleta sobre la retina de la polilla Dellephila alpenor, los pigmentos fotosensibles se localizan en elementos que se encuentran fuera de las células visuales, sin excluir que éstas participen en la regulación normal de la dispersión del pigmento protector (Hendoff y cols., 1966).

Por otra parte se ha reportado que existen cambios en el ojo del acodil de forma dramática a lo largo de sus estadios de desarrollo durante la ontogenia (Hendoff y cols., 1962). En estudios recientes se han encontrado variaciones significativas en la detección de luz monocromática a lo largo de los estadios de desarrollo, en donde los animales más jóvenes muestran una sensibilidad mayor a longitudes de onda cortas como azul y ultravioleta, cambiando esta sensibilidad a longitudes de onda largas, en luz verde y roja, cuando el acodil se aproxima a su estado adulto. Esto está relacionado con cambios en el sistema óptico, así como los pigmentos retinulares accesorios y quizá a cambios "per se" del receptor (Fanjul-Moles y Fuentes Pardo, 1968), que para la longitud de onda más baja (300-390 nm) se presenta una mayor sensibilidad entre las 4 y 12 semanas de edad.

DISTRIBUCION ESPECTRAL EN HABITATS ACUATICOS

En todos los sistemas acuáticos, tanto en agua dulce como en agua salobre y marina, la zona fótica está fuertemente limitada por la profundidad del cuerpo de agua un ejemplo de ello es que en aguas estuarinas existe una marcada diferencia entre la intensidad relativa correspondiente a la longitud de onda entre los 400 y 500 nm registrada en la superficie y los 0.60 m. de profundidad, mientras que las longitudes de onda lejanas de 600-700 nm no son afectadas a esta profundidad. Es importante mencionar que una gran cantidad de absorción a la luz azul cambia de 33 m. en las aguas más claras hasta los 0.5 metros en algunos estuarios y ríos, dependiendo principalmente de la carga y apte de sedimentos además de la carga de nutrientes que presente el cuerpo de agua (Howard, 1977).

EFFECTO DE LA LUZ MONOCROMATICA SOBRE LOS RITMOS CIRCADIANOS

El efecto de la luz monocromática sobre los ritmos circadianos ha sido poco entendido en los animales, sin embargo parece que la sensibilidad espectral de los fotorreceptores puede tener influencias tanto en la sincronización como en la duración del periodo de ritmos biológicos (Ninnewann, 1979).

La capacidad que tiene un ritmo de ser sincronizado esta representado por la capacidad de cambiar su velocidad de oscilación ante estímulos externos como son la luz y la temperatura y ésta capacidad está representada en la curva de respuesta de fases (la curva de respuesta de fases representa la parte del tiempo circadiano en el que la aplicación de un estímulo externo de duración definida produce adelantos o atrasos en el periodo circadiano). En casi todos los casos en los que se ha probado la acción de luz azul (entre 390 y 500 nm) produce una curva de respuesta de fase típica.

En la especie de la fruta *Drosophila pseudoobscura*, se ha

descrito sensibilidad espectral diferencial del sistema circadiano en el cual se sugieren dos procesos distintos de fotorrecepción que pueden incidir en el sistema oscilante: aunque hay autores que proponen que la acción producida por la luz monocromática parece ser debido a diferencias en la respuesta del sistema oscilante que a cambios en los mismos fotorreceptores (Chandrasekaran y Engelmann, 1973). En *Pectinophora* sp. los ritmos de ovoposición, de la emergencia del adulto y en la eclosión son muy semejantes en su curva de respuesta de fase a la luz, sin embargo difieren en oscilación espontánea y en sensibilidad a la luz roja (600 nm).

En el murciélago *Hipposideros speoris* (Joshi y Chandrasekaran, 1965) se han descrito curvas de respuesta de fase diferenciales a luz monocromática azul y roja, en este animal la longitud de onda corta parece producir retrasos en tanto que la longitud de onda larga produce adelantos.

En el cocodrilo adulto se han descrito curvas de respuesta de fase estables, tanto a la luz azul como a la luz roja y verde (Icañán Rubio, 1989). Dentro de la gran cantidad de observaciones hechas con longitudes de onda corta, principalmente con luz azul, se han encontrado una cantidad de efectos importantes que nos llevan a pensar que el papel de la luz azul sobre los sistemas vivos puede influir en parte de su desarrollo. La inducción de los ritmos circadianos por luz azul, ha sido reportada ocasionalmente. El término inducción es utilizado para caracterizar la información de que un comportamiento arritmico, bajo un estímulo, llega a ser un comportamiento de carácter rítmico, debido al inicio de operación del reloj biológico. Por otro lado, el comportamiento arritmico de un individuo o de una población, puede deberse a la asincronía de ritmos preexistentes en células o en individuos. En este caso el estímulo es solamente un sincronizador que hace obvia la expresión del ritmo.

Un ejemplo de inducción es el que se muestra con el ritmo de eclosión de los huevecillos de la polilla *Pectinophora gossypiella*

(Bruce y Minis, 1969) con un pulso de luz azul que posee un intervalo de espectro comprendido entre los 300 y 500 nm (a los 520 nm es ya ineffectivo). Los huevecillos son altamente sensibles a periodos de luz cortos menores de dos minutos con una intensidad de 10^{-7} $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}$, los cuales son suficientes para iniciar el ritmo, siendo la inducción posible durante el quinto día de la embriogénesis. Por otra parte, considerando a los vegetales, la luz azul con banda estrecha, provoca un ritmo fotosintético en el alga verde Acetabularia mediterranea en la cual el cambio tanto de duración como de intensidad de luz de fondo monocromática azul y roja producen cambios en la amplitud y en la duración del periodo (Clausen, 1979).

La luz continua puede influenciar el periodo de las oscilaciones libres de acuerdo con la regla de Aschoff. El periodo se acorta en organismos diurnos al aplicar un aumento en la intensidad luminosa, mientras que en organismos nocturnos llega a ser más largo. Una de las excepciones a esta regla lo es el alga Acetabularia. En la migración circadiana de cloroplastos bajo luz roja, no solo decrece la amplitud del ritmo con la duración de la iluminación sino que también llega a acortar su periodo a 20.5 y 22 horas (Schmid, 1984:). Periodos alargados son producidos por el incremento en la intensidad de luz azul bajo luz roja de fondo en forma constante, generando periodos hasta de 29 horas. Los nuevos periodos son adaptados solo después de pasar de dos a cuatro ciclos transitorios. Estos cambios en el periodo circadiano no son provocados al variar el incremento de la luz roja bajo una luz constante azul (Schmid, 1987).

En este capítulo quisiera hacer evidente dos funciones diferenciales de los osciladores circadianos endógenos. Ambas funciones requieren que el ritmo endógeno sea sincronizado con el ciclo geofísico externo. En la primer función, los ritmos circadianos sirven como un mecanismo para "conocer" el tiempo externo, las actividades fisiológicas cambian en forma diversa y el organismo puede responder de una manera favorable a las

presencia de osciladores esclavos en los que existen la ausencia de vías a un marcapasos central o bien la ausencia del mismo por no estar completamente desarrollado. Así se ha llegado a proponer, que el retardo en la expresión del ritmo circadiano evidente durante la ontogenia pudiera ser debido a que algunas estructuras del sistema neuroendócrino del avocil (órgano X-glándula sinusal) no están completamente desarrolladas en el animal recién eclosionado requiriendo de algunas semanas para alcanzar su completo desarrollo. Estas estructuras podrían ser parte del sistema marcapasos responsable de la sincronización de un sistema multioscilar que daría como resultado el ritmo circadiano de la amplitud del ERG. Una posibilidad es que los fotorreceptores del ojo del avocil formen parte de este sistema multioscilar, formando ellos mismos grupos de fotorreceptores circadianos. Si la sensibilidad espectral de los fotorreceptores del ojo del avocil cambia durante el desarrollo y estos fotorreceptores son circadianos se podría esperar que las características del ritmo ERG obtenidas con luz monocromática sean distintas a las características del ritmo obtenido con luz blanca.

El que se haya propuesto una sensibilidad espectral diferencial en los sistemas circadianos nos llevó a pensar en el uso de la luz monocromática como una variable adecuada para poder validar la proposición de la existencia de fotorreceptores circadianos en el ojo del avocil, por lo que el problema es en este caso ¿en que forma la maduración de los sistemas responsables de la sensibilidad espectral en el avocil, pueden generar una expresión circadiana, si es que se consideran a éstos como osciladores retinianos?

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El ritmo de amplitud ERG del *scocil*, cambia durante la ontogenia: en el animal recién eclosionado, aparece como un ritmo ultradiano del cual emerge un ritmo circadiano, cuyos parámetros (relación α/ρ , amplitud relativa, duración del periodo y fase) son totalmente distintos a los del animal adulto, pero que a través del desarrollo va adquiriendo las características del ritmo propio de un animal maduro (Fanjul-Moles y col., 1987). Por otra parte se ha encontrado que la sensibilidad espectral del ojo del *scocil* cambia durante el desarrollo (Fanjul-Moles y col., 1988) de tal forma que los animales jóvenes presentan una sensibilidad mayor a las longitudes de onda corta y progresivamente va apareciendo una mayor sensibilidad a longitudes de onda larga (400-700 nm). Proponiéndose en el trabajo antes citado la existencia de tres grupos de fotorreceptores en el *scocil* adulto, los cuales tienen desarrollo asimétrico durante la ontogenia.

En 1977, Sánchez J. y Fuentes P., reportaron que en el tallo ocular aislado de *scociles* adultos, se han registrado oscilaciones circadianas del ritmo ERG que perduran por lo menos durante cuatro días, pero que muestran características de periodo y de fase así como de amplitud, diferentes a las de ritmos de ERG de registros de animales íntegros. Estas oscilaciones llevan superpuestos ritmos ultradianos que los autores han interpretado como una expresión de osciladores desacoplados, quizá debido a la falta de marcapasos centricos.

En 1988, Fanjul-Moles y col., encontraron en *scociles* juveniles ritmos ultradianos y ritmos circadianos con ritmos ultradianos superpuestos, similares a los encontrados en el ritmo ERG de ojo aislado de adulto, debido a que en estados tempranos de desarrollo no se han alcanzado todavía los niveles de desarrollo de los sistemas neuroendócrinos que podrían estar encargados de la sincronización de los ritmos. Se propuso entonces que los animales juveniles podrían ser un buen sistema para estudiar la

variaciones diarias del medio ambiente. En la segunda función, los ritmos circadianos sirven como un mecanismo para adaptarse a las estaciones del año, las variaciones en el período circadiano debido a la luz azul (como se puede observar en el alga *Acetabularia*), se pueden interpretar como una especie de adaptador estacional, puesto que en el verano existe una mayor intensidad de luz azul que durante el invierno de la misma forma que en el amanecer (Wald, 1953; Giese, 1964). Así mismo un mecanismo muy relacionado con la medición fotoperiódica es la utilización del sistema circadiano para medir la longitud de los períodos luminosos y los períodos oscuros durante un día. El principio general establece que los organismos actúan a través fases totofílica y totofóbica de los ritmos que tienen de manera circádica y sus son capaces de medir estos períodos de luz y oscuridad.

Probablemente un fotorreceptor no podría ser considerado como la parte principal del reloj circadiano (Ninnemann, 1972; Engelmann, 1961; Hamm, 1975; Nakashima, 1980). El mecanismo del reloj biológico es aún desconocido; sin embargo, la observación de los procesos de la señal de transducción de la luz, puede ofrecernos muchas posibilidades para tratar de caracterizar las propiedades circadianas básicas de un oscilador (en caso de presentarse de forma individual). Se han propuesto una gran cantidad de modelos (Njus, 1974; Schweiger, 1977) de los cuales sólo algunos de ellos contemplan procesos fotorreceptivos (Miyata, 1979; Schweiger, 1977). Ninguno de los modelos explica completamente todos los fenómenos observados por la acción de la luz (Engelmann, 1961). Por lo tanto, la pregunta permanece abierta, sobre si el mecanismo de un oscilador es idéntico en todos los organismos.

HIPÓTESIS

Con base en lo anterior, la hipótesis del presente trabajo es la siguiente: si los fotorreceptores del ojo del acocil, a través del cual se expresa el ritmo ERG, están constituyendo grupos de fotorreceptores circadianos que presentan una diferente sensibilidad espectral, entonces la luz monocromática actuará diferencialmente en ellos de acuerdo con las características de sensibilidad espectral que presenten durante la ontogenia; teniendo como resultado cambios en el ritmo de amplitud de ERG expresado durante la ontogenia.

Los objetivos del siguiente trabajo son:

-Observar si existe diferencia en el ritmo circadiano de la amplitud del ERG en el acocil *Frocamparus clarkii*, con luz blanca y con luz monocromática, esto permitiría comprobar si existen fotorreceptores circadianos específicos para luz monocromática.

-Observar si existen diferencias en las características del ritmo circadiano del ERG del acocil, utilizando estímulos luminosos con longitudes de onda extremas (azul y rojo), lo cual nos permitiría comprobar que existen al menos dos grupos de fotorreceptores circadianos en estos organismos.

-Observar si los grupos de fotorreceptores circadianos tienen diferente función en el sistema circadiano, siendo sensible a la fase escotópica y a la fase fotópica, pues se podría pensar que se trata de poblaciones diferentes, una con una función escotópica y otra con una función fotópica, comprobándolo a través de la regla de Aschoff.

MATERIAL Y METODO

En un primer diseño experimental, se usaron cuarenta acochiles de los cuales solo se pudieron utilizar veinte para análisis, el resto no se usó puesto que la mortalidad durante los experimentos fue alta debido a la edad de los animales.

Para estos experimentos se emplearon acochiles del género Procambarus clarkii (Ortman), con edades comprendidas de un día a doce semanas posteriores a la eclosión, además de usar organismos adultos procedentes de Chihuahua. Los animales adultos fueron mantenidos en el laboratorio y su reproducción se llevó a cabo en acuarios con un fotoperíodo de luz-oscuridad natural. Los organismos juveniles eran separados de la madre en los días en los que requería hacer registro de los mismos durante los primeros días posteclosión; en edades mayores se esperó a que se separaran naturalmente de la madre y se mantuvieron en acuarios marcados con la fecha de eclosión.

La clasificación de las edades se llevó a cabo de la siguiente forma: los organismos juveniles en dos a cuatro semanas (los registros realizados con animales menores no tuvieron repetición ya que el índice de mortalidad fué alto en condiciones experimentales), cuatro a ocho semanas, ocho a doce semanas y como último lote a los organismos adultos.

Durante la realización de los experimentos se trabajaba de manera individual, es decir se empleaba un solo acochil de edad definida para obtener los registros correspondientes a un intervalo de edad, repitiéndose con nuevos acochiles cada vez que se requería. Para mantener al acochil juvenil inmóvil, se le colocaba ventralmente sobre un dispositivo de plástico con una red de malla de aproximadamente 1 mm de luz de donde era parcialmente inmovilizado con cera, de tal forma que permaneciera expuesta la parte correspondiente al cefalotórax junto con el restrum pero no los apéndices anteriores. Una vez inmovilizado el animal se le

colocaba un pequeño algodón en la parte interna del rostrum para evitar la contracción de los pedúnculos oculares, con animales muy pequeños (hasta cuatro semanas) esto se evitaba pues no muestran movimiento peduncular (Sandeman y Sandeman, 1990), entonces eran parcialmente sumergidos en agua para una respiración adecuada.

Los sociiles adultos eran montados en forma distinta, ya que estos eran sujetados mediante corchos pegados al cefalotórax con acrílico de línea dental, que a su vez rellenaba los espacios que se encontraban entre los pedúnculos oculares separados por algodón. Una vez lista la preparación se sumergía parcialmente en agua de tal forma que el agua cubriera a las branquias pero que no llegara a tocar el rostrum) el dispositivo de registro se muestra en la figura 1.

Ambas preparaciones eran colocadas de forma independiente, dentro de un refrigerador que mantenía la temperatura a 20 ± 1 bajo oscuridad constante.

RETENCION DEL ERG

Una vez que se encontraba el sociil en las condiciones ya mencionadas, se le implantaba en la zona de la córnea un electrodo de acero con una punta de 5-10 μm . de diámetro, el cual estaba directamente conectado a un preamplificador (Grass mod. 7P122E) que a su vez estaba conectado a un polígrafo (Grass mod. 79E).

El estímulo luminoso se llevó a cabo mediante un fotoestimulador (Grass F822) provisto de una lámpara de xenón, además de utilizar filtros de gelatina (Kodak Wratten filters) con bandas de cien nm. cada uno y una transmitancia de una longitud de onda de 400 a 500 nm. cuya intensidad fue calibrada mediante el uso de un radiómetro-fotómetro (Li-cor 185) con un sensor fotométrico (Li-210 SB).

La intensidad de luz fue fija en $5.1 \mu\text{Einsteins M}^{-2} \text{s}^{-1}$ en

el espectro visible. Cuando fue necesario, se usaron además filtros de interferencia y filtros cutt-off e infrarrojo. El fotoestimulador era accionado periódicamente por un quimógrafo calibrado con un ciclo para cada tres minutos y en otros casos con un ciclo cada cuatro minutos. La duración del estímulo luminoso fue de 15 μ s.

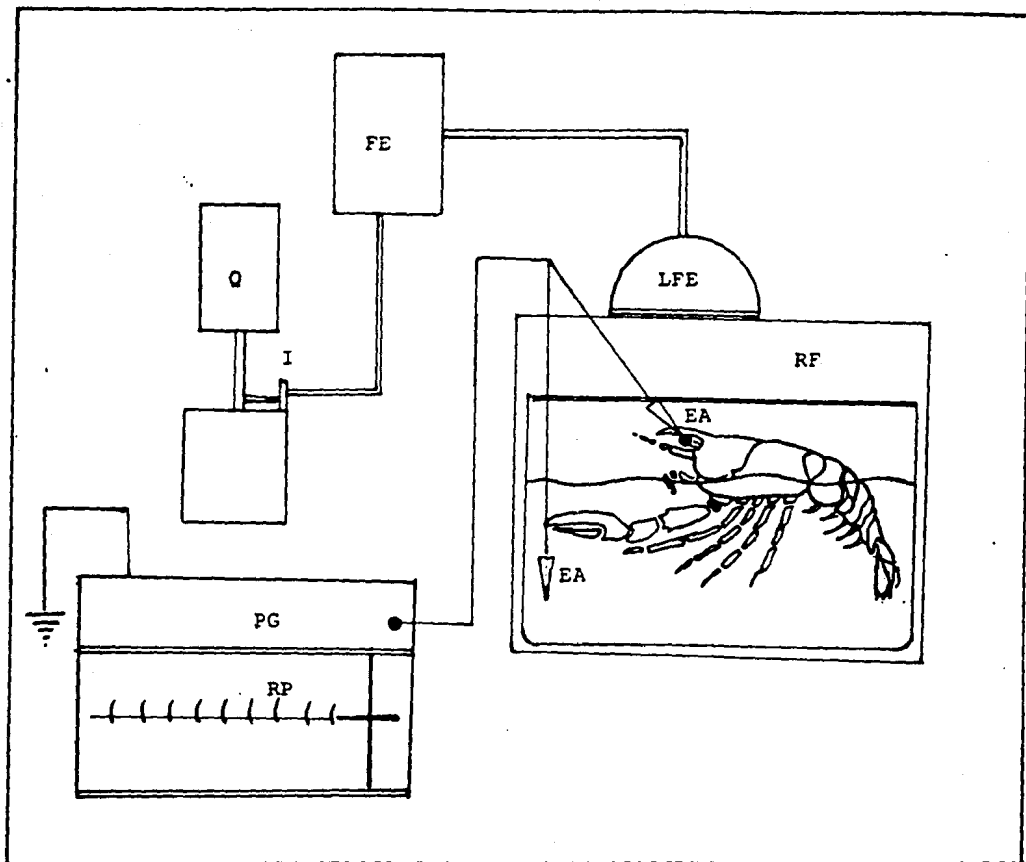
El ojo estaba situado a 10 cm de distancia de la fuente luminosa. El estímulo de intensidad fija, producía una respuesta electroretinográfica, cuya amplitud fue considerada como índice de actividad de los fotorreceptores a la luz monocromática y blanca. Los valores para el análisis de oscilación espontánea fueron tomados de la amplitud de la respuesta H1 despreciando la respuesta de respuesta. Las características del ERG del apocni.

La condición inicial en oscilación espontánea se realizó con destellos de luz blanca durante los primeros días de registro; la aplicación de destellos de luz azul y roja se llevó a cabo durante tres a cuatro días siguientes, iniciando con luz azul. Los valores de amplitud de ERG eran medidos cada 15 minutos en cada condición y se graficaban en crudo con respecto al tiempo externo.

En una segunda parte del diseño experimental con objeto de estudiar si los fotosistemas propuestos seguían la ley de Aschoff, se utilizaron 2 animales juveniles con edad cercana a 8 semanas. En este tipo de experimentos sus animales permanecían en condiciones constantes de temperatura y oscuridad, a lo largo del registro realizado en la misma forma que en el diseño experimental anterior, esta vez variando la intensidad de estímulo con luz azul de 0.85, 1.65 y 3.5 μ Einstein $M^{-2} s^{-1}$, asignadas como menor, media y mayor respectivamente. La intensidad para luz roja fue 0.3, 0.57 y 1.15 respectivamente.

Las gráficas obtenidas fueron analizadas con el método mostrado en la figura 3. Todos los datos fueron resumidos

estadísticamente y representados en barras para ambos diseños experimentales, principalmente los correspondientes a periodo y relación alfa/rho. Para los casos de 2 a 4 semanas bajo estímulos de luz blanca y luz azul, los datos se analizaron a través del periodograma propuesto por Enright en 1964. Para las oscilaciones que mostraban periodos ultradianos de alta frecuencia, se usó además el análisis de series de tiempo con el método de densidad espectral, con la ayuda del paquete Statgraphycs versión 2.1, en una PC.



EA Electrodo de acero

RF Refrigerador

LFE Lámpara del fotoestimulador

FE Fotoestimulador

Q Quimógrafo

PG Polígrafo

RP Registro en papel

I Interruptor

Figura 2 Diseño experimental.

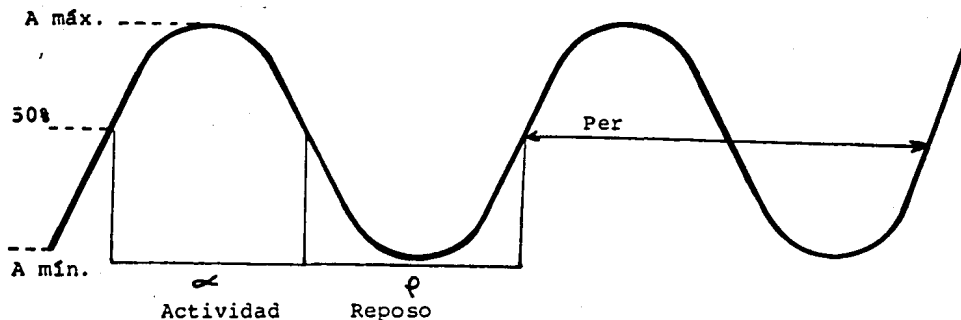


Figura 3. Parámetros estimados en la medición de una oscilación circadiana:

A máx: Amplitud máxima (voltaje máximo obtenido para cada ciclo).

A mín: Amplitud mínima (voltaje mínimo obtenido en cada ciclo).

La relación $A \text{ máx}/A \text{ mín}$ se considera como amplitud relati
va del ritmo obtenido.

Per: Periodo de la oscilación.

α : Fase de actividad.

ρ : Fase de reposo.

La relación que existe entre la fase activa con respecto a la fase de reposo se le denota en este trabajo como α/ρ .

RESULTADOS

Ontogenia del ritmo circadiano del ERG bajo condiciones de luz monocromática en comparación con destellos de luz blanca.

La primer parte de los resultados que se presentan, comprende aquellos que muestran las diferencias obtenidas en el ritmo circadiano del ERG en el acocil del género *Eregetbarus*, con registros de animales comprendidos entre edades de dos y doce semanas después de la eclosión y en organismos adultos, que fueron sometidos a la misma intensidad de estimulación en cada una de las diferentes condiciones experimentales (luz azul, roja y blanca). En cada uno de los casos se muestran tres registros típicos (bajo estímulo de luz blanca, azul y roja respectivamente), cada uno de los cuales corresponde a un animal.

Cabe señalar que los registros de diferentes edades mostrados en las gráficas de esta primer parte, no corresponden al mismo animal, es únicamente un registro individual para cada condición de estimulación.

En organismos cuya edad se encontraba entre 2 y 4 semanas post-eclosión, bajo estímulos luminosos de luz blanca se encontró una gran cantidad de ritmos ultradianos (ritmos de alta frecuencia y periodo corto). Un ejemplo de ello se muestra en la figura 4A en donde se muestra la gráfica correspondiente a la relación entre el tiempo externo (en horas) y la amplitud del ERG, que oscila entre 10 y 60 μ V, en un animal de aproximadamente 12 días de edad. Los ritmos ultradianos de alta frecuencia se hicieron resaltar a través de líneas que unen los puntos correspondientes. La definición exacta de la duración del periodo mostrado en ésta figura, fué obtenida mediante el método para periodograma propuesto por Enright, además se sometieron los datos a análisis de frecuencias de tiempo, en éste caso a un análisis de densidad espectral. En el periodograma se pueden observar picos máximos de 1.8, 2.4, 3.5, 7.5 12 y 16 horas repectivamente (figura 4B), la

dificultad de decidir sobre los periodos principales fué apoyada por el análisis espectral, cuyos picos mayores corresponden a periodos de 1, 1.25, 2.5 y 3.4 horas respectivamente (figura 4C). Por lo anterior se considera que los periodos principales en dicha oscilación de alta frecuencia, comprenden de 1 a 3.5 horas con énfasis en este último. Sin embargo en otros registros con organismos de 2 a 4 semanas, se encontraron periodos aunque no muy conspicuos de aproximadamente 15 a 17 horas.

En organismos de cuya edad se encuentra entre 2 y 4 semanas, bajo estímulos luminosos de onda corta (400-500 nm), existe una diferencia significativa en comparación con los obtenidos bajo luz blanca. La figura 5A muestra una gráfica que corresponde al mismo organismo de la edad anterior, cuya oscilación espontánea se obtuvo bajo estímulos de luz azul de intensidad definida. En ésta figura se observa una oscilación cuyo periodo, en comparación al obtenido en luz blanca, es circadiano, la fase de mayor actividad se encuentra en la noche como sucede en organismos adultos, cuya actividad es nocturna, de la misma forma, la fase de menor actividad se presenta durante el día; una característica importante de ésta condición es que la duración de la fase de actividad es mayor con respecto a la fase de reposo, el intervalo de voltaje en el que sucede la oscilación es mayor que el que aparece bajo luz blanca, con una amplitud máxima de 90 μ V y la mínima de 40 μ V. Se puede notar en forma directa que están bien diferenciadas la noche (máxima actividad) del día (mínima actividad) lo que corresponde a la fase subjetiva de un animal nocturno. En la mayoría de los registros obtenidos en esta edad y en esta condición, el periodo aparece mayor a las 24 horas, la figura 5A no muestra precisamente este periodo por haberse recortado los ciclos en la gráfica para mostrar el mismo tiempo que en la primera figura, sin embargo, en el registro completo, al realizar el periodograma de Enright (figura 5B), muestra un periodo prominente a las 25 horas precedido de uno de 22 horas. El análisis espectral en este caso no se llevó a cabo, pues este registro muestra una oscilación circadiana evidente.

En esta edad no se pudo llevar a cabo la experimentación correspondiente a la estimulación con luz roja ya que no es posible obtener un ERG en organismos tan pequeños a la intensidad luminosa de estimulación, este hecho se fundamenta posteriormente en la discusión.

Para las edades comprendidas entre las 4 y 8 semanas después de la eclosión, la figura 6 muestra una oscilación espontánea de un acantil juvenil bajo destellos de luz blanca de la intensidad definida. Se muestran tres ciclos circadianos donde se aprecia una oscilación circadiana en donde la fase activa parece tener una tendencia nocturna aunque no muy clara. En la mayoría de los registros obtenidos en esta condición para un intervalo de edad de 1 a 4 semanas, se manifiestan ritmos ultradianos con períodos cercanos a las 12 horas superpuestos en ambas fases de la oscilación circadiana sin embargo no se muestran los periodogramas correspondientes por considerarse muy evidentes los datos crudos, los valores máximos de voltaje corresponden para éste caso 410 μV y los mínimos de 250 μV . La fase de actividad sigue siendo mayor que la fase de reposo ($\alpha/\rho = 3.2$).

En esta misma edad y en el mismo animal, se muestra un registro para el caso correspondiente a luz azul (400-480 nm) la figura 7 muestra un ritmo circadiano obtenido con destellos de intensidad fija. Se manifiesta un ritmo conspicuo con la actividad activa entre las 11 y las 13 horas del día geográfico, mientras que la se inactiva entre las 21 y las 06 horas. En esta gráfica se aprecia con claridad un ritmo ultradiano con un período aproximado de 12 horas superpuesto tanto en la fase de actividad como en la de reposo del ritmo circadiano, la oscilación general se manifiesta con un voltaje máximo de 600 μV y uno mínimo de 350 μV . Esto es, una amplitud relativa de 1.63, con una relación $\alpha/\rho = 1.55$ y un período de 25 horas, determinado por el periodograma de Enright.

En la figura 8 se muestra un registro de ERG el mismo animal de 4 a 8 semanas de edad sometido a estímulos de luz roja (600-700 nm). Este organismo estuvo previamente sometido a luz azul de la misma intensidad, que muestra una oscilación bien diferenciada en comparación a las anteriores. La fase de actividad es muy semejante a la correspondiente de reposo. La fase de mayor actividad se encuentra entre las 16 y 8 horas, lo que representa un cambio de fase (tomando la fase como el principio de actividad) en relación con el registro del mismo animal obtenido bajo luz azul, en donde el comienzo de actividad esperado debería de darse a las 24 horas (figura 9). La cantidad de ritmos ultradianos observados disminuye en la fase de actividad llegando a desaparecer casi por completo. El voltaje máximo observado en ésta gráfica es de 100 μV y la mínima de 55 μV , con una amplitud relativa de 1.1, una relación autotorno de 1.6 y un periodo de 21.5 horas. Comparando las tres gráficas podemos notar que la que muestra mayor amplitud relativa es la condición en azul. Simultáneamente se pueden observar cambios de fase en las tres condiciones experimentales (fig. 9 A, B y C). Bajo condiciones de destellos blancos no se observa una fase estable a pesar de que ya existe un ritmo circadiano evidente (fig. 9 A), tomando los dos últimos ciclos de este registro esperaríamos que el principio de actividad en el momento en que comienza el registro bajo destellos de luz azul, tendría que encontrarse en las 20 horas, en tanto que el principio de actividad en el primer ciclo de la condición azul está a las 17 horas.

Al terminar el registro bajo luz azul, el inicio de actividad está en las 22 horas, por lo tanto al iniciarse la condición de rojo, esperaríamos la misma fase a las 23 horas, sin embargo al comenzar el registro en rojo el inicio de la fase se corre a las 16 horas, lo que está demostrando un cambio de fase en las diferentes condiciones experimentales.

Para la edad correspondiente entre 6 y 12 semanas después de la eclosión (fig. 10), la oscilación libre del ERG en el acocil

aún no se manifiesta por completo en una forma circadiana. Cabe señalar que éste registro corresponde aun animal diferente al del registro anterior, que aunque tiene una mayor edad presenta una menor madurez en el ritmo del ERG obtenido con destellos de luz blancos. En la figura 10, se muestran ciclos ultradianos obtenidos bajo destellos de luz blanca. Se quiere hacer notar que éste registro no se tomó en cuenta para promediar los periodos correspondientes a ésta edad, sin embargo la quise incluir dentro de los registros típicos para hacer más evidente el efecto de la luz monocromática sobre el ritmo ERG.

Parece existir una tendencia de ciclos ultradianos con un periodo de 2 a 11 horas dentro de un día geofísico, sin definir si el organismo es diurno o nocturno. La fase de éste ritmo muestra una gran inestabilidad y el periodo una gran variación (véase figura 9 D), pues en la hora 14 del primer ciclo se presenta la menor actividad invirtiéndose en el segundo ciclo geofísico. La amplitud relativa total observada es de 1.24.

Esta característica cambia en forma notable cuando se utilizan destellos de luz azul de la misma intensidad. La figura 11 muestra una oscilación espontánea bajo destellos azules (400-460 nm) en el mismo animal (8-12 semanas) mostrando un comportamiento circadiano con fase nocturna e inicio de actividad a las 18 horas en el primer ciclo y una relación α/ρ de 1.7, el periodo corresponde a 22.4 horas en promedio y la amplitud relativa es de 1.52. Aún se observan los ritmos ultradianos en la fase de actividad, dos para el primer ciclo y tres para el posterior. La fase de inicio de actividad para el cuarto día de luz azul se esperaría a las 24 horas (fig. 9 C).

Después de la luz azul, las oscilaciones obtenidas con destellos de luz roja mostradas en la figura 12, muestran en el primer ciclo un inicio de actividad a las 20 en lugar de aparecer a las 24 horas como era esperado (fig. 9 F). En éste registro aumenta la amplitud relativa a un valor de 1.6 permitiendo notar con mayor claridad los ciclos circadianos de éste organismo

Juvenil (8-12 semanas). La presencia de ritmos ultradianos se manifiestan con una frecuencia de dos a tres ciclos en cada fase activa, apreciando también el aumento de dicha fase con respecto a la de reposo, o sea una relación $\alpha/\rho = 2.08$, una relación noche día de 2 y un periodo de 23.0 horas.

Los registros obtenidos con animales adultos muestran una oscilación circadiana conspicua, la figura 13 muestra el ritmo ERG de un scocil adulto sometido a destellos de luz blanca de intensidad fija, los ciclos mostrados denotan una oscilación bien determinada con una fase completamente nocturna, con una fase de actividad desde las 18 horas hasta las 10 horas del tiempo externo, la mínima actividad aparece muy cercana a las 12 horas, los valores de amplitud máxima de voltaje son de 900 μv y la mínima de 140 μv . La tasa activa es notablemente mayor que la tasa de reposo.

La figura 14 muestra la oscilación libre de l ritmo ERG cuando se somete al mismo organismo a destellos de luz azul, las características de la oscilación no parecen alterarse en gran medida, la diferencia que se puede observar son principalmente en la duración de la fase activa de la fase de reposo, la amplitud de voltaje máxima es de 700 μv y la mínima de 225 μv , la fase activa es nocturna como en el caso de la luz blanca.

Cuando al mismo organismo se le aplican destellos de luz roja de la misma intensidad (figura 15), la relación entre la fase de actividad y la de reposo se acercan a un valor constante sin alterar la oscilación, pero con la características de que el periodo se acorta y la amplitud máxima de voltaje disminuye (350 μv) al igual que la mínima amplitud (30 μv).

De la figura 16 a la figura 18 se muestran los valores promedio de los parámetros del ritmo de cinco animales para cada una de las edades estudiadas, así como para los animales adultos. Se quiere hacer notar que no se tomaron en cuenta los registros

obtenidos bajo luz blanca que no mostraban una oscilación evidente como se señaló para la figura 10.

Los cambios en la relación noche-día, (amplitud relativa), se muestran en la figura 16, donde se observa un valor mayor en registros obtenidos con accediles de 3 - 4 semanas bajo destellos de luz de onda corta (400-430 nm). En comparación con los promedios obtenidos en la misma condición en animales de mayor edad. Definitivamente el valor mayor de éste parámetro se encuentra para animales de 2 a 4 semanas dando la impresión de que la diferencia de sensibilidad a la luz azul en los animales pequeños es mucho mayor que en animales de mayor edad indicando cambios muy conspicuos en el umbral de los fotorreceptores circadianos a la luz azul entre 17 días y el día durante el desarrollo.

Esta situación se invierte para la luz roja, en animales pequeños hay mucha menor diferencia en el umbral de los fotorreceptores circadianos para luz roja, aumentando esta diferencia según el animal se va desarrollando, estabilizándose en los animales adultos siempre con valores altos en el parámetro estudiado. Todo lo anterior parece indicar cursos temporales diferentes en el desarrollo de la respuesta circadiana al rojo y al azul.

Lo anterior parece repercutir en la relación alfa/rho, en donde encontramos relaciones de cursos temporales similares a través del desarrollo aunque no tan conspicuas como en la relación noche-día. Esto parece indicar que en animales muy jóvenes el tiempo de actividad es mucho mayor bajo destellos de luz azul y este periodo activo va disminuyendo hasta estabilizarse en el adulto. Sin embargo en el caso de la luz roja, el tiempo de actividad parece ser directamente proporcional al crecimiento del animal estabilizándose también en la edad adulta. Estos dos parámetros (relación noche-día y relación alfa/rho) aumentan poco a poco en el ritmo obtenido bajo luz blanca estabilizándose en el adulto, pero este aumento es mucho menos conspicuo que los cambios

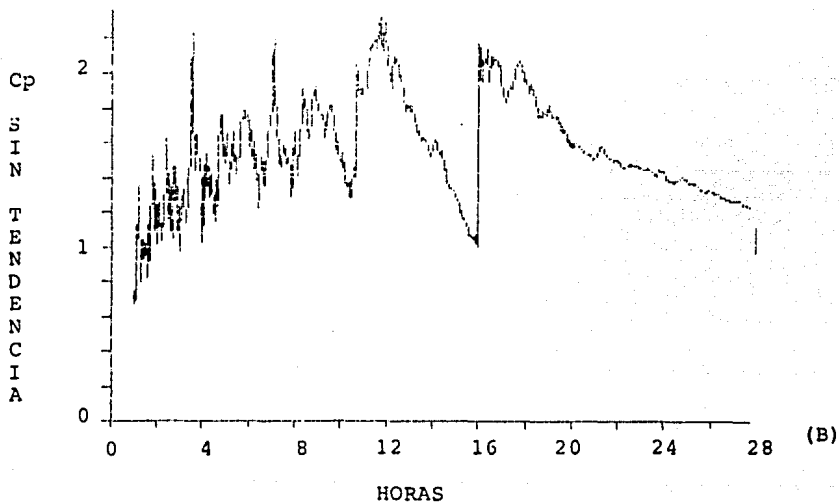
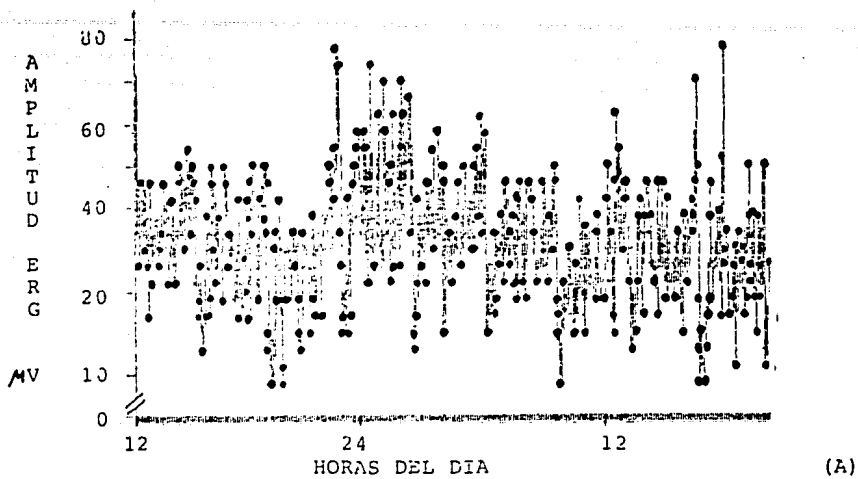
producidos bajo luz azul y bajo luz roja.

El promedio obtenido para el periodo de los diferentes animales a través del desarrollo y en las diferentes condiciones experimentales muestra cambios notables en los animales más jóvenes. La condición en luz blanca arroja un valor de 12 horas \pm 1.3, hay que tener en cuenta que en esta edad hay todavía una actividad ultradiana muy conspicua que hace que en promedio el valor sea menor del circadiano, la gran variabilidad de la duración del periodo en estas edades está indicada por el error estándar relativamente alto. En esta edad sin embargo, los animales ya muestran un ritmo circadiano conspicuo bajo luz azul que apenas presenta una variabilidad mucho menor (error estándar 0.7). Al ir aumentando en edad (a la 2 semana) el periodo circadiano bajo luz blanca se estabiliza (aunque hay algunas excepciones como señalamos anteriormente). El periodo para luz azul disminuye a 22.5 horas, pero aumenta su variabilidad y aparecen las oscilaciones circadianas para rojo con un periodo muy aproximado de 24 horas. En animales de más edad se siguen observando cambios en el periodo del ritmo obtenido bajo luz azul, aumenta a más de 26 horas, en tanto que el periodo del ritmo obtenido bajo luz roja continua en valores muy cercanos a las 24 horas. En animales adultos, los valores del periodo obtenidos en las tres condiciones experimentales son muy similares aunque el azul se mantiene con el periodo más largo. Todo lo anterior parece indicar un desarrollo asimétrico en los osciladores circadianos propuestos.

Con el objeto de comprender si los dos grupos de fotorreceptores tienen el comportamiento de sistema diurno o nocturno de acuerdo con la ley de Aschoff, la segunda parte de los resultados comprende registros realizados a muy largo plazo, en donde los organismos se mantenían en registro durante tres o cuatro semanas, sometidos a diferentes intensidades de estímulo luminoso para cada condición experimental (luz azul y luz roja) que fueron mencionados en la sección de material y método. El

orden de los experimentos comienza con destellos de luz azul con una intensidad de 3.5 microeinsteins $M^{-2} \text{ seg}^{-2}$ continuando con 1.65 y al finalmente con 0.85 (en las figuras correspondientes, las intensidades se señalan como menor, media y mayor en cada condición según los valores anteriormente señalados). Posteriormente se aplicaban destellos de luz roja con las siguientes intensidades 1.15, 0.57 y 0.3 microeinsteins $M^{-2} \text{ seg}^{-2}$ respectivamente.

La figura 19 muestra la relación alfa/rho de las oscilaciones obtenidas con luz azul y con luz roja en un poptil cuya edad al comenzar el registro fue de 5 semanas. Es evidente que para los destellos de luz azul, la fase activa va siendo cada vez mayor conforme se aumenta la intensidad de estímulo, de tal forma que se sigue el comportamiento de un sistema circadiano típico de un animal diurno, esto es, responde a la longitud de onda corta como una señal de inicio de actividad, sin embargo, en animales adultos este cambio se debe notar con longitudes de onda largas ya que son las que predominan en el atardecer; esto, para luz roja, no se cumple pues aunque en las dos primeras intensidades de estímulo aumenta, la última es significativamente menor que las anteriores. Para los períodos (figura 20), no parece existir cambios significativos en ambas condiciones; los errores estándar no aparecen ya que no es posible obtenerlos con tan pocos casos experimentales. A pesar de esto, los destellos con luz azul provocan en todas las condiciones de intensidad de estimulación, un período relativamente menor al que se presenta con la luz roja, dicho comportamiento coincide con los casos señalados anteriormente con intensidad luminosa fija pero a través de diferentes edades.



Pié de figura en la siguiente página.

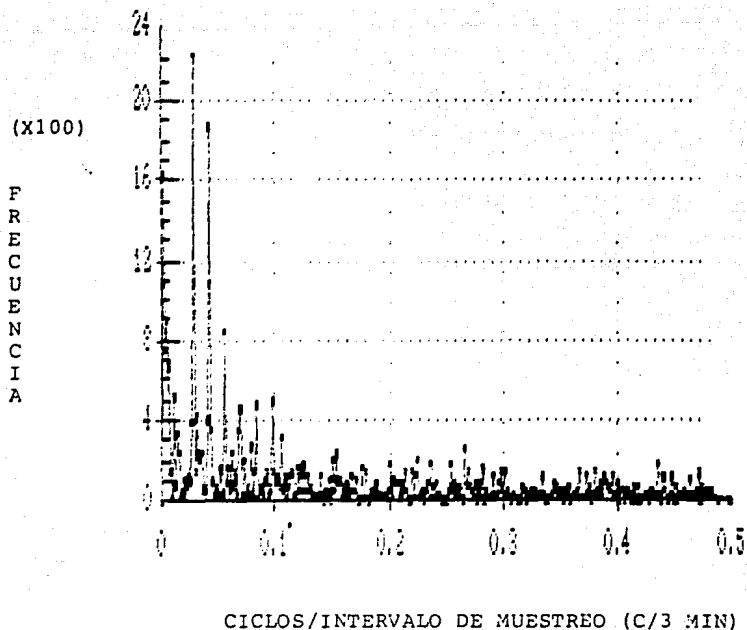


Figura 4 Las tres gráficas (dos en la página anterior) muestran la oscilación espontánea del ritmo ERG en un animal de 2-4 semanas de edad bajo destellos de luz blanca de intensidad definida, la gráfica (B) muestra el periodograma de Enrighth y la gráfica (C) el análisis espectral de la oscilación, en donde según los análisis mostrados existen periodos de 1 a 3.5 horas.

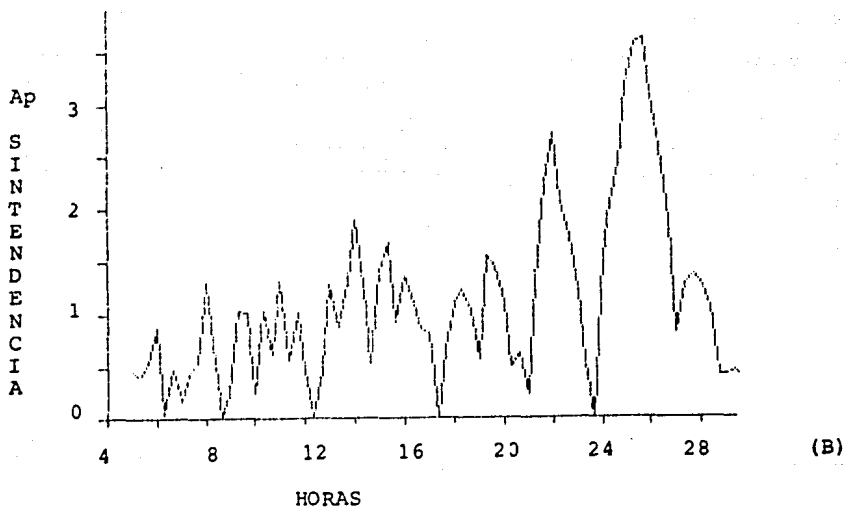
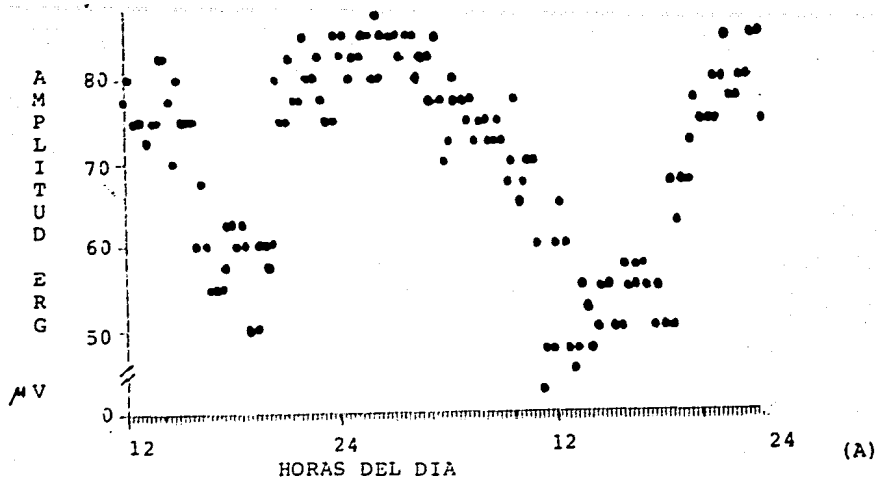


Figura 5 Oscilación espontánea del ritmo ERG de un acocil de 2-4 semanas de edad bajo destellos de luz azul de intensidad de finida. La figura (A) muestra los datos en crudo, la figura (B) muestra el periodograma según Enrighth.

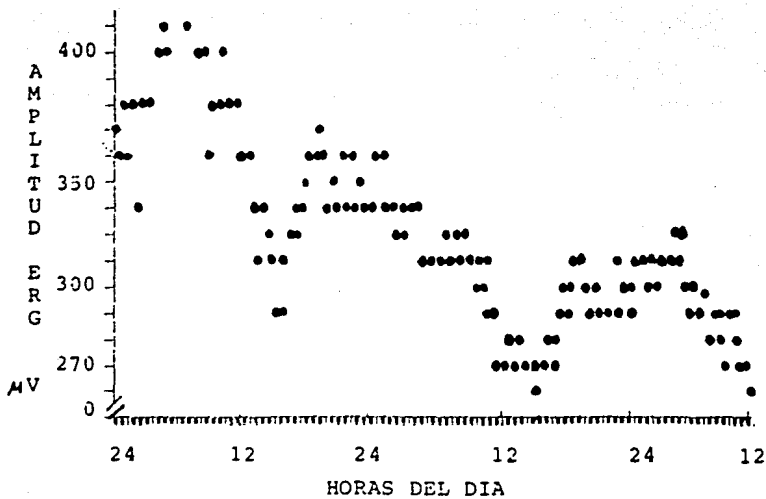


Figura 6 Oscilación libre, destellos de luz blanca edad 4-8 semanas.

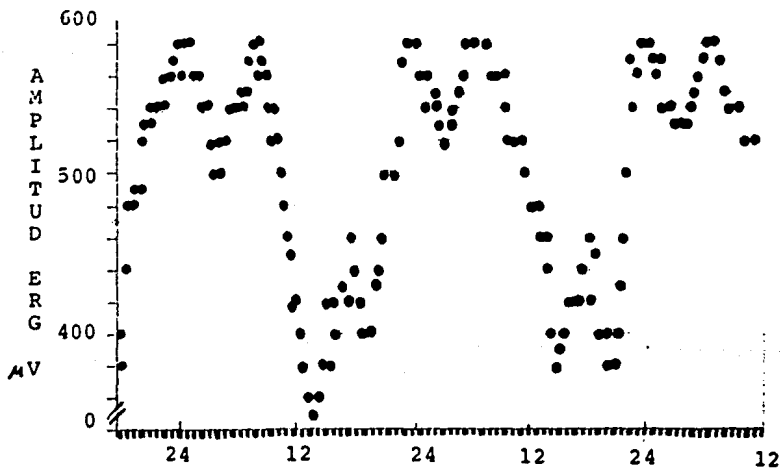


Figura 7 Oscilación libre, destellos de luz azul de intensidad definida, 4-8 semanas post-eclosión.

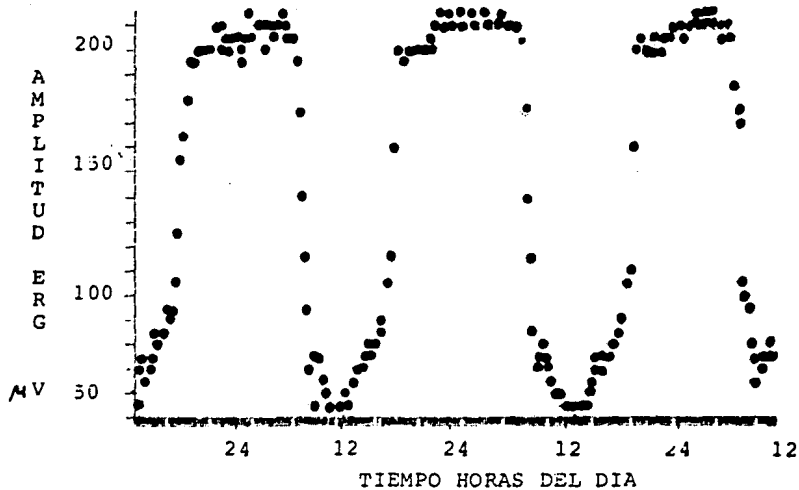


Figura 8 Oscilaci3n libre del ritmo ERG de un acicil de edad correspondiente a 4-8 semanas, bajo est3mulos de luz roja.

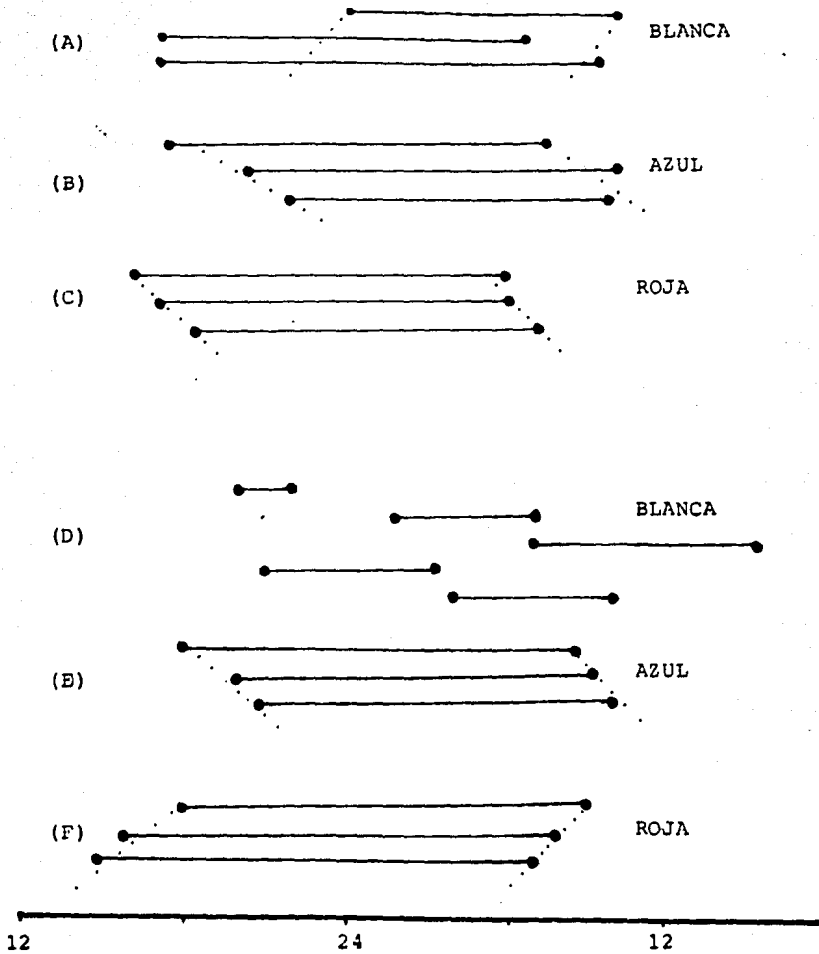


Figura 9. Inicio de actividad y duración de la misma, en las oscilaciones mostradas para edades de 4 a 8 semanas (A, B y C) y para 8 a 12 semanas (D, E y F).

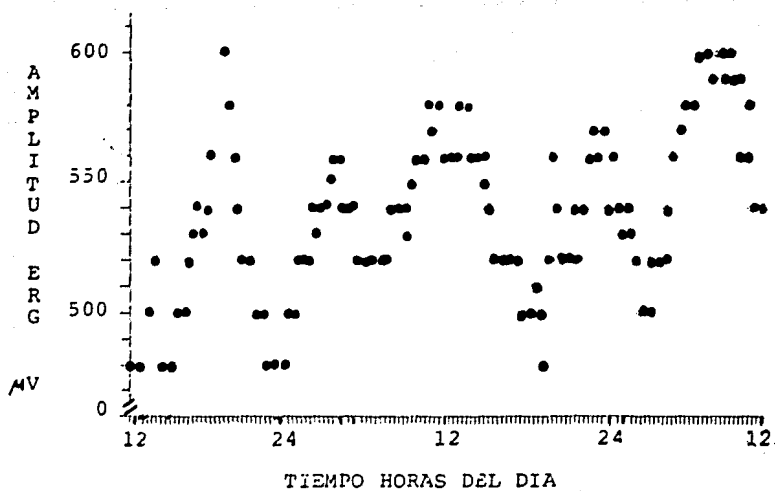


Figura 10 Ritmo ERG de un acocil de -12 semanas de edad con destellos de luz blanca de intensidad definida.

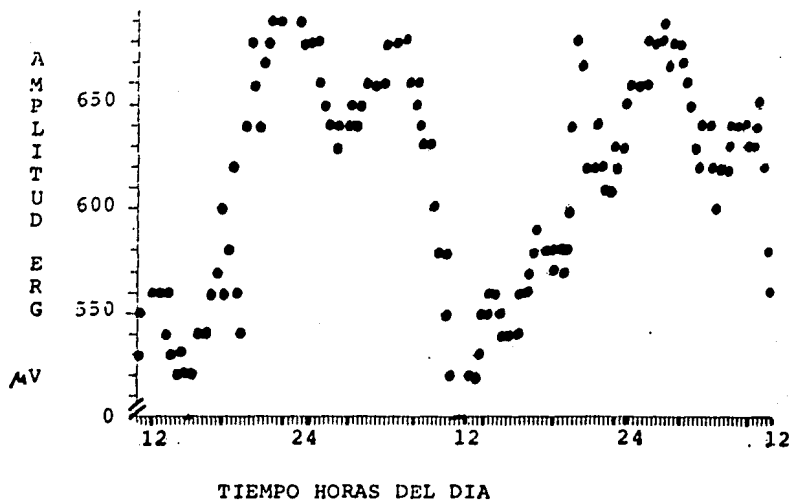
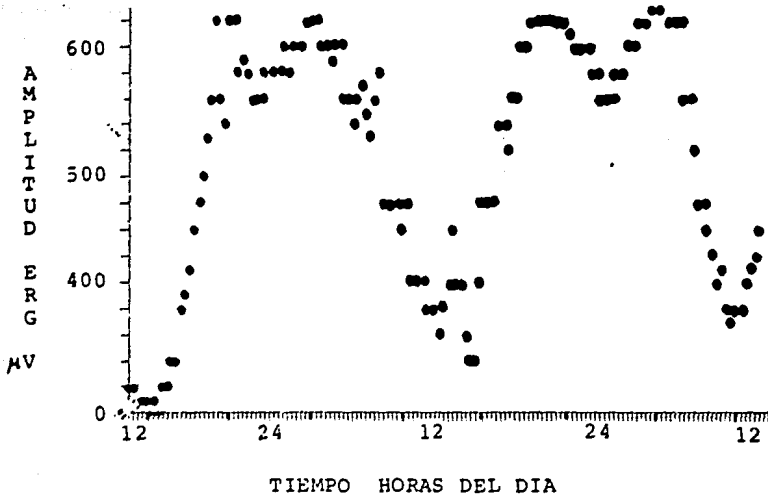


Figura 11 Ritmo ERG de el acocil anterior con edad de 8-12 semanas, bajo destellos de luz azul.



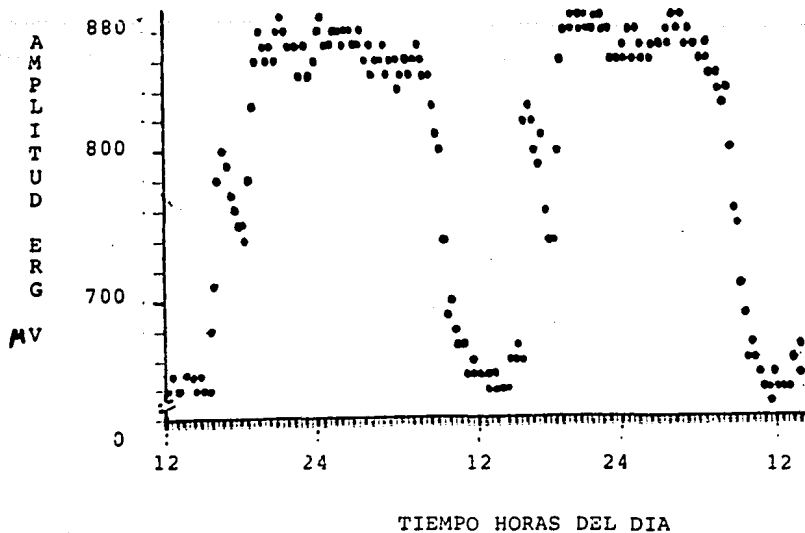


Figura 13. Ritmo ERG de un acocil adulto bajo destellos de luz blanca de intensidad definida.

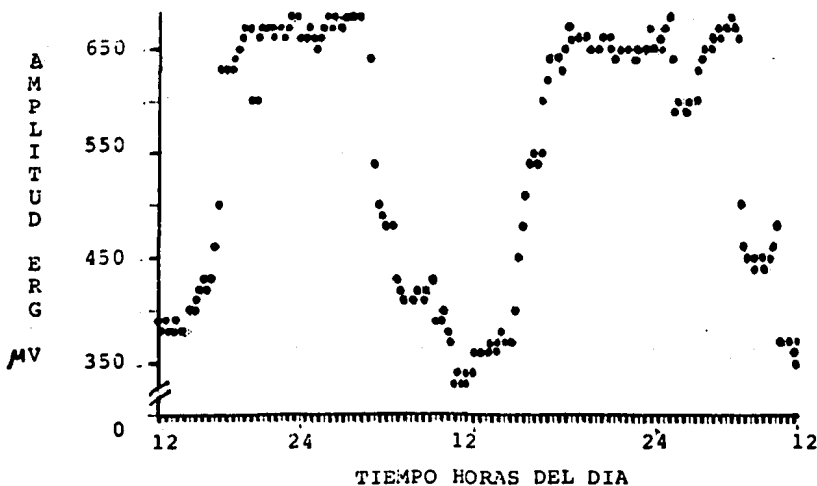


Figura 14. Ritmo ERG del mismo organismo adulto, bajo destellos de luz azul de intensidad definida.

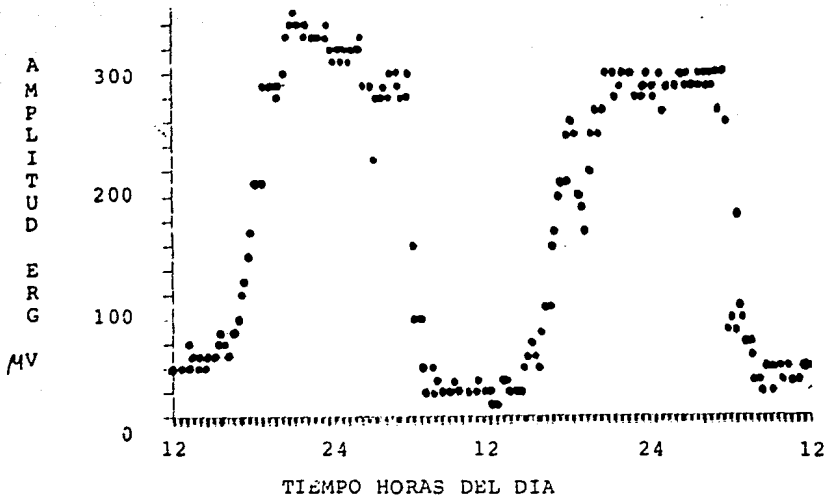


Figura 15. Ritmo ERG del mismo acocil del caso anterior, esta vez bajo destellos de luz roja de intensidad definida.

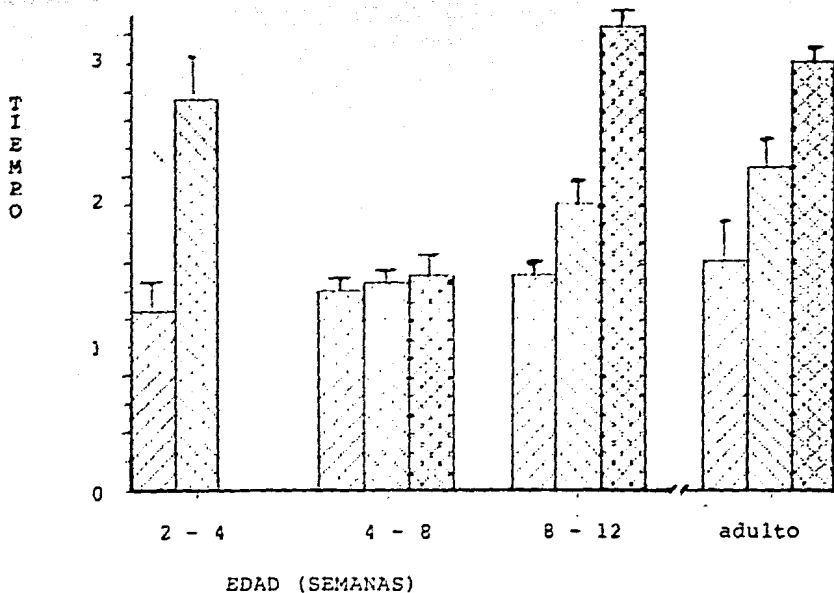


Figura 16.

Relación noche-día (amplitud relativa) de los registros correspondientes a acaciales juveniles y adultos.

blanca
azul
roja



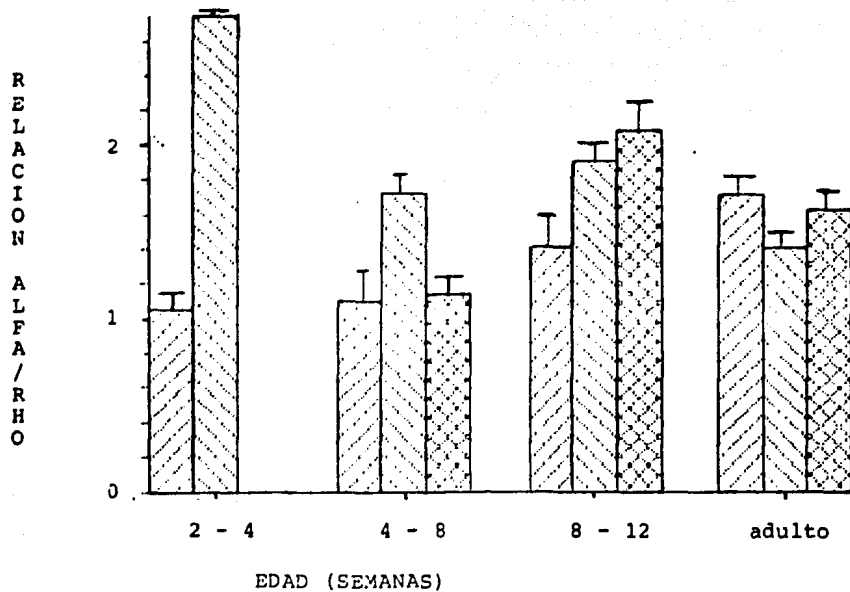


Figura 17.

Relación actividad/reposo en diferentes edades del acocil-



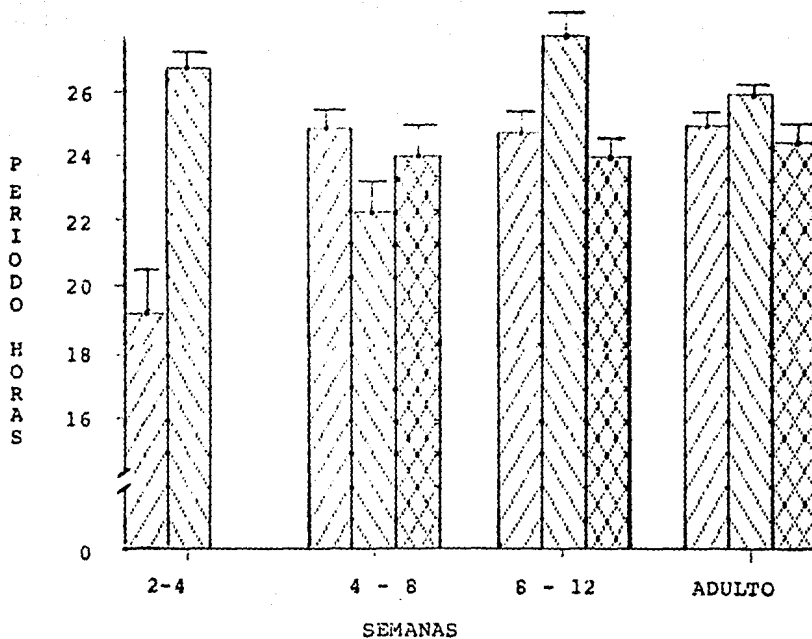


Figura 18 Barras que muestran el periodo promedio de cinco casos de acociles con diferentes edades bajo diferentes condiciones de estímulo.

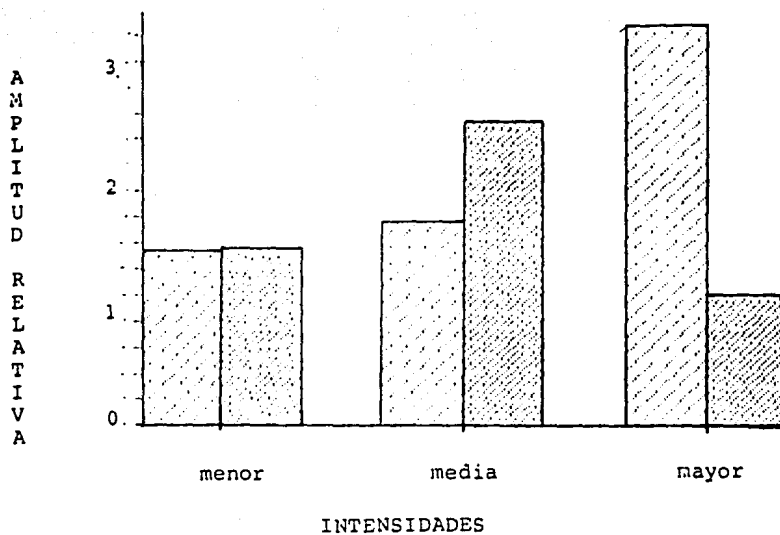




Figura 19.

Amplitud relativa de los registros correspondientes a - animales juveniles bajo diferentes intensidades.

azul 

roja 

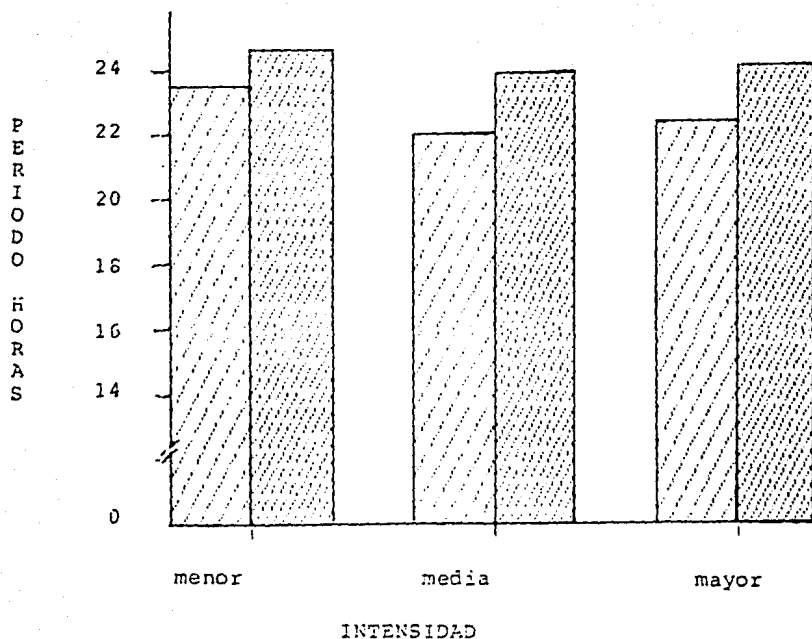
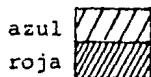


Figura 1D.

Cambios en el periodo de la oscilación espontanea de acoci-les juveniles sometidos a diferentes intensidades de luz - monocromática azul y roja.



DISCUSION

El *acocuil* es un crustáceo que aparentemente casi ha completado su desarrollo en el momento de la eclosión, es decir no existen estadios larvales previos a la emergencia del adulto (desarrollo holometábolo). Sin embargo este animal pasa por tres estados bien definidos (separados por mudas a intervalos de 14 días aproximadamente) antes de desprenderse de la madre. Después de la tercera muda emerge un adulto diminuto.

Lo anterior ha sido descrito por Sandeman y Sandeman (1988) en *Oberix destructor* y corroborado por nosotros en la especie *Procamburus clarkii* durante el desarrollo de esta tesis. Sin embargo los animales continúan mudando a intervalos de 11 a 13 días durante el primer año de desarrollo después del cual las mudas se establecen a solo 2 periodos al año, lo que parece indicar una estabilización del sistema neuroendocrino (relación órgano X - glándula sinusal y órgano Y ; Prosser, 1971). Durante los estadios juveniles, estos organismos muestran un gran número de modificaciones estructurales, tanto en el desarrollo del sistema nervioso (Sandeman y Sandeman, 1990) como en el desarrollo del sistema visual, particularmente en el ojo compuesto (Harner y col., 1982). Estos cambios estructurales se manifiestan en la capacidad de respuesta de los fotorreceptores tanto a la calidad como a la cantidad del estímulo luminoso (Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo, 1988), los cuales se muestran en la figura 21. Los resultados de esta tesis coinciden con los reportados en este trabajo, pues tanto la magnitud de la respuesta a una cantidad fija de luz (5.1 einsteins K^{-2} seg^{-2}) como la magnitud de la misma a diferentes longitudes de onda (azul, rojo, blanco) cambian durante el desarrollo del animal, aparentemente apareciendo primero las respuestas a longitudes de onda corta y haciéndose progresivamente más conspicuas las respuestas a longitudes de onda larga.

Una manifestación fisiológica importante que refleja la inmadurez anatómica de las estructuras neurales en estos primeros estadios de desarrollo del acocil debe ser indudablemente el retardo con el que aparece un ritmo circadiano evidente en la amplitud del ERG, cuando el ritmo se obtiene con destellos de luz blanca, ritmo circadiano que además parece emerger de un ritmo ultradiano con un periodo variable, como se puede observar en la fig. 4A. Estos resultados son similares a los encontrados por Ruth Bennet en el ritmo de amplitud del ERG en Manduca sexta (1983). La presencia de este ritmo ultradiano previo en el ritmo ERG de Epidendaurus y la persistencia de los ritmos ultradianos superpuestos en el ritmo circadiano de estos organismos durante los primeros estadios juveniles ya se demostró en otras especies en un trabajo anterior, en el cual los destellos de prueba para la obtención del ritmo fueron exclusivamente de luz blanca (Fanjul-Moles y col. 1987). En este trabajo se sugirió que la emergencia del ritmo circadiano en estos organismos podría ser el resultado de un acoplamiento de osciladores de alta frecuencia posiblemente localizados en el ojo compuesto (Sánchez y Fuentes-P. 1977) que serían dependientes de una acción sincronizadora del sistema neuroendócrino (órgano X - glándula sinusal). Los resultados de esta tesis parecen apoyar esta idea, apoyándose también en la manifestación de los diferentes osciladores circadianos en tallo ocular que presentan diferentes fases en el inicio de actividad (véase fig. 9).

Los animales de 2 a 4 semanas presentan un claro ritmo ultradiano bajo destellos de luz blanca (fig. 4). Sin embargo, del mismo animal emerge un ritmo circadiano evidente al obtener el ritmo ERG con destellos de luz azul de la misma intensidad (ver figuras 4 y 5). Los periodogramas así como el análisis de densidad espectral, mostrados en estas figuras hacen cuantificables los periodos ultradianos (bajo luz blanca) y circadiano (bajo luz azul).

Como se señaló en los resultados, en los animales de esta edad no fué posible obtener resultados bajo destellos de luz roja debido a la poca sensibilidad a esta longitud de onda por la que se caracterizan los acodios en esta edad temprana, lo que por otra parte parece ser debido a efectos relacionados con la inmadurez del eje órgano X - glándula sinusal que en alguna forma afectan la síntesis de la porfirpropsina (Fanjul-Moles y col, 1990).

En animales un poco mayores (4-6) semanas, la luz roja ya hace evidente un ritmo de amplitud de ERG que a pesar de aparecer ya como circadiano bajo los destellos de luz blanca, no tiene las características de un ritmo bien desarrollado (fase, relación alta-baja, amplitud relativa) y que bajo luz monocromática (roja y azul) aparece no solo igual al adulto sino inclusive con un valor mayor en los parámetros estudiados. Existe la posibilidad de que la manifestación del ritmo circadiano evidente en animales juveniles sea debido no a nuestra hipótesis, es decir la longitud de onda específica que está sincronizando a un grupo de osciladores específicos para ella, sino debido a una probable inducción del ritmo por la longitud de onda corta (luz azul), como se ha reportado en el caso de algunos ritmos circadianos de plantas y animales (Rainer, 19879 y posterior) a la luz azul, sea posible manifestar una oscilación circadiana por efecto de la luz roja como si el oscilador de esta última longitud de onda fuese denotado como oscilador "esclavo" del oscilador que responde a la luz azul. La respuesta azul fué descartada desde un inicio debido a la incapacidad del sistema fotorreceptor a desarrollar una respuesta visual a la intensidad de estimulación que se utilizaba con las diferentes longitudes de onda (fig. 21).

En la secuencia experimental el control fué, para el primer grupo de experimentos, el ritmo obtenido en oscilación libre bajo destellos de luz blanca y generalmente éste fué seguido por tres días de oscilación libre bajo luz azul dejando los tres días finales para los destellos de luz roja.

La siguiente fase experimental para comprobar lo anterior sería someter a organismos de la misma edad señalada en este trabajo, a destellos de longitud de onda larga inmediatamente después de haber obtenido el ritmo ERG con destellos de luz blanca, para observar si existe una emergencia de ritmo circadiano con luz roja. También puede tratarse de un grupo de osciladores que estén respondiendo a una longitud de onda específica. Lo anterior parece haberse demostrado en el acocil adulto P. digneti en el cual las curvas de respuesta de fase para el ritmo de amplitud de ERG que se producen por el efecto de la luz azul tienen características totalmente distintas a las producidas por la luz roja y verde (Inclán-Rubio, 1988); esto apoya la teoría de los sistemas de osciladores múltiples con características cromáticas diferentes ubicados en el tallo ocular (Sánchez y Fuentes-P, 1977), además de los cambios de fase que se muestran al inicio de actividad de las figuras mostradas en esta tesis.

La diferencia obtenida en los parámetros del ritmo de amplitud de ERG bajo destellos de prueba con características cromáticas distintas, parecen indicar diferencias ontogénicas de los grupos de fotorreceptores que determinan tanto la detección de información como la salida de la misma, así como las características de los parareceptores asociados con éstos (pigmentos retinianos accesorios). Cummings y Goldsmith (1981) han propuesto dos fotosistemas importantes en el ojo del acocil Procambarus, uno involucrado en la detección y la transmisión de la información de longitudes de onda corta (UV, violeta) formado por la célula retinular R8, con una sinápsis específica en la médula interna (Goldsmith, 1978a) y otro encargado de la detección de onda larga (verde-naranja) formado por las siete células retinulares restantes que hacen sinápsis en la lámina ganglionaris. Los resultados obtenidos en esta tesis, en relación con las diferencias obtenidas en los parámetros del ritmo ante los destellos de prueba azul y rojo van de acuerdo con la proposición de estos autores, esto es, parecen existir dos tipos de fotorreceptores en el ojo del acocil y nosotros agregamos que son

capaces de modificar las características del ritmo ERG según el tipo de longitud de onda que se aplique; lo que se supone, parece apoyar la idea de que ambos grupos de fotorreceptores se mantienen de manera independiente en organismos juveniles acoplándose completamente en acociles adultos. La evidencia de esto es la forma en que se expresan las características del ritmo circadiano con diferentes intensidades de estímulos luminosos con luz monocromática que, al parecer, son capaces de modificar la actividad de éstos organismos, particularmente bajo la condición de luz azul, donde al aumentar la actividad en una oscilación espontánea se comporta como un sistema diurno, mientras que en el sistema que corresponde a longitud de onda larga, el efecto parece mostrar una tendencia contraria. Sin embargo, esto no puede ser considerado como definitivo, ya que por una parte los registros obtenidos para la comprobación de la regla de Aschoff (1960), no muestran cambios significativos que apoyen dicha hipótesis, además que la casuística es baja para poder aplicar algún análisis estadístico que pueda apoyar o bien desechar dicha hipótesis sobre efectos de intensidad luminosa en los ritmos circadianos. Una siguiente fase de experimentación sería además, tratar de obtener diferencias en las características del ritmo a través de la ontogenia con diferentes intensidades de estímulo luminoso con luz cualitativamente diferente, durante la oscilación espontánea en oscuridad constante y en luz constante; apoyando ésto además con curva de respuesta de fases para cada intensidad de estímulo utilizada.

Las diferencias que existen en los parámetros del ritmo para los posibles grupos de osciladores, deben implicar cambios tanto en el sistema neuroendócrino como en el sistema visual del acocil, como se ha señalado previamente. Aréchiga y col., (1990) demostraron que la sensibilidad luminosa del sistema fotorreceptor del acocil adulto es dependiente de neurotransmisores como la serotonina, la cual parece modular la fase nocturna en el ritmo circadiano de sensibilidad retiniana (específicamente a través de la acción sobre el pigmento proximal): encontrando un grupo de

axones en la lámina ganglionaris que presenta inmunoreactividad a la serotonina (5 HT), que se localizaron en la vecindad de los axones de las células retinulares; así mismo los antagonistas de la 5 HT, produjeron un bloqueo en la movilidad de los pigmentos accesorios proximales durante la noche.

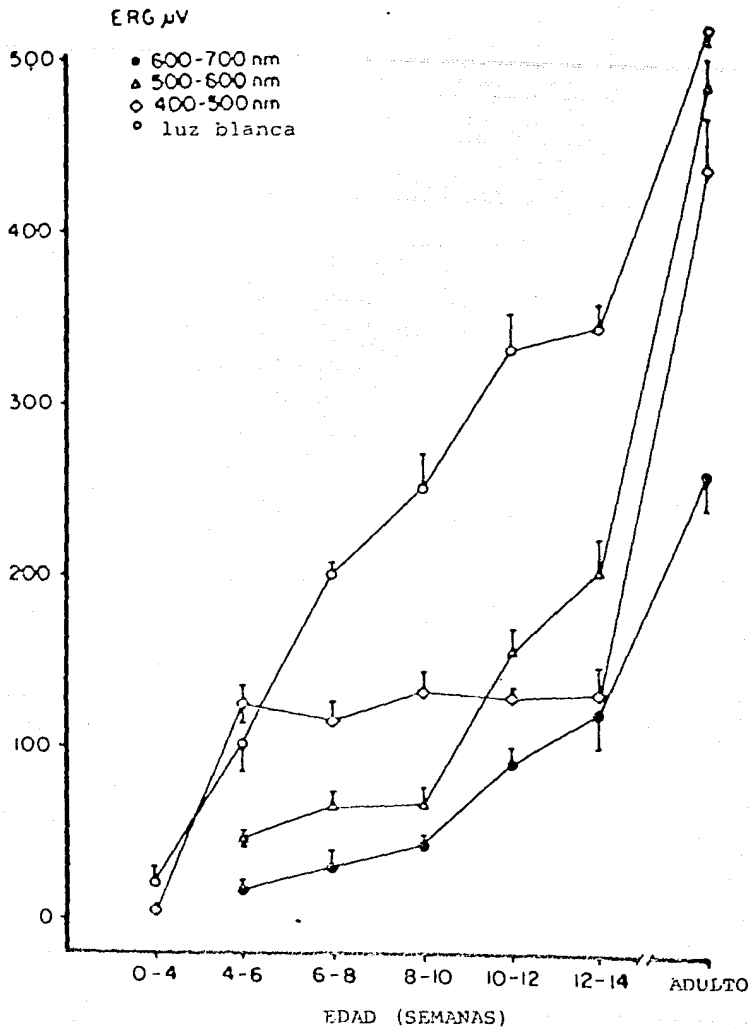
El avance de las técnicas de inmunocitoquímica y en las de genética molecular, han promovido un gran desarrollo en el estudio de vías neurales en diferentes especies de animales. Estudios realizados sobre el desarrollo del sistema nervioso durante la ontogenia de peces *Charax destructus*, han demostrado la formación de neuronas serotoninérgicas cuando se ha desarrollado en un 75% el sistema nervioso, incrementándose en los estadios postecisión y completándose en el estado adulto. La aparición temprana de neuronas serotoninérgicas en el cerebro del acooil y su persistencia durante la vida de estos animales, se puede relacionar no solo con la función de neuromoduladores del sistema nervioso, sino además con la capacidad de la regeneración de apéndices y receptores, así como la regulación de la correcta corrección de vías aferentes de receptores con el cerebro del acooil (Sandeman y Sandeman, 1990).

Por otra parte, los estudios realizados sobre el efecto de luz azul (longitud de onda 390-520 nm) sobre procesos enzimáticos, han demostrado que esta longitud de onda favorece el catabolismo de carbohidratos y el anabolismo protéico con un incremento en la tasa metabólica y el consumo de oxígeno en algunos organismos (longitudes de onda mayores no poseen ya dichos efectos; Kowalik, 1987). Recientemente Widell (1987), ha demostrado posibles conexiones entre la luz azul y la morfogénesis. Es importante poder hipotetizar sobre su efecto, sobre los procesos de síntesis relacionados con neurotransmisores como la serotonina que tiene como precursor al triptófano, un aminoácido relacionado con alguno de estos efectos.

Por todo lo anterior creo que no se puede decir que la luz monocromática y en especial la azul, esté actuando exclusivamente a nivel de un grupo de fotorreceptores en el ojo compuesto del acocil. Se han propuesto marcapasos en el protocerebro de éste animal (Barrera-Mera, 1967) que podrían ser "encendidos" por señales procedentes de fotorreceptores extrarretinianos como propone Page y Larimer (1985). En esta tesis, con un animal íntegro en proceso de desarrollo y no en una estructura aislada, la proposición de un posible acoplamiento de osciladores no está excluyendo la acción de un marcapaso primario sobre ellos. El problema es complejo y esta lejos de ser dilucidado, el ritmo ERG en sí mismo es un producto de la acción de la luz sobre un sistema muy sensible a ella.

De estos resultados podemos concluir que, en efecto, durante la ontogenia del acocil se produce un desarrollo asimétrico de fotorreceptores que parecen comportarse como circadianos y que desde la eclosión tiene la posibilidad de expresar un ritmo circadiano evidente, si las características de la luz que actúan sobre ellos son cualitativamente específicas.

Este es un trabajo que debe ser continuado, ya que a pesar de que se ha trabajado por una gran cantidad de autores con la luz en forma cuantitativa, no debe descartarse las propiedades cualitativas de la luz sobre los sistemas circadianos.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 21

Los cambios en la amplitud de la respuesta con diferentes longitudes de onda a través de la ontogenia del acocil, son mostradas aquí. En las primeras cuatro semanas no aparece respuesta a luz roja con intensidad definida.

LITERATURA

- Aréchiga, H. Bañuelos, E. Eugenio, F. Arturo, P. Y Leonardo R. 1990. Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-Hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150:123-143.
- Aréchiga, H. and Fuentes, B. 1970. Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The physiologist.* 13:137.
- Aréchiga, H. and Wiersma, C.A.G. 1969. Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. of Neurobiol.* 1:71-85.
- Aréchiga H. y Huberman, A. 1980. Hormonal modulation of circadian rhythmicity in crustaceans. en: *Frontiers of hormone research.* Vol. 6. Comparative aspects of neuroendocrine Control of Behavior (ed. C Valverde y H. Aréchiga) pp. 16-34. S. Karger AG.
- Aschoff, J. 1967. Adaptive cycles: their significance for defining environmental rhythms. *Intern. J. Biometeor.* 11:288.
- Bennett, R.R. 1983. Circadian rhythm of visual sensitivity in *Manduca sexta* and its development from an ultradian rhythm. *J. Comp. Physiol.* 150:165-174.
- Bunning, E. 1973. *The physiological clock.* 3a ed. Springer Verlag New York Inc. 167 pp.
- Carlisle, D.B. y E.J. Denton . 1959. on the metamorphosis of visual pigments of *Anguilla anguilla*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 38:97-102.
- Carlström, D. 1966. The structure of chitin. en *The functional organization of the compound eye* (C.G. Bernhard ed.), pp. 15-19. Pergamon Oxford.
- Clause, H. 1979. Auslösung der circadianen photosynthese-Rhythmik bei *Acetabularia* durch Blaulicht. *Photoplasma.* 99:341.
- Cuminis, D. y Goldsmith T.H. 1981. Cellular identification in the violet receptor in crayfish eye. *J. Comp. Physiol.* 142:199.
- Davis, F.C. 1981. Ontogeny of circadian rhythms. In *handbook of behavioral neurobiology: Biological Rhythms*, Vol IV, ed. J. Aschoff. New York Plenum, 257-274.
- Deguchi, T. 1975. Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetylcholine A. N acetyl transferase in pineal gland of rat. *Proc. Natn. Acad. Sci.* 72:2814-2818.

- Eguchi, E., Waterman, T.H., y Akiyama, J. 1973. Localization of the violet receptor cells in the crayfish retina. J. Gen. Physiol. 62: 355.
- Edmund Leland N. 1966. Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks. "Models and mechanisms for circadian timekeeping" Ed. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg & London. pp. 446 pp.
- Eguchi, E. y Waterman, T.H. 1966. Fine structure patterns in crustacean rhabdoms. en :The junctional organization of the compound eye. (C.G. Bernhard ed.), pp. 105-124. Pergamond Oxford.
- Elofsson R. y Oddeus, R. 1975. The anostracan rhabdom and the basement membrane. An structural study of the artemia compound eye (Crustacea) Acta Zool Stockholm. 56:141-153.
- Engelmann, W. 1981. Photoreception and the clock. en Biological clock in seasonal reproductive cycles. Follet, B.K. y Follet D.E. eds. Wright, Bristol. 37.
- Fanjul-Moles M.L. y Fuentes P. 1968. Spectral sensitivity in the course of the ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 91 A 1:61-66.
- Fanjul-Moles M.L.; Enrique M.S.; Natalia V.H. y Beatriz F.P. 1967. ERG circadian rhythm in the course of the ontogeny in crayfish. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 68 A 2:213-219.
- Fanjul-Moles, M.L.; Prieto S. Julio A. y Fuentes P. Beatriz. 1990. Sinus gland regulates the spectral sensitivity in the crayfish. en prensa.
- Finkelstein J.W., Rotwarg, H.P., Boyar, R.M., Kream, J. and Hellman L. 1972. Age relate changes in the 24 hour spontaneous secretion of growth hormon J. Clin. Endocrinol. Metab. 35:665-670.
- Glantz, R.M. y Kirk, M.D. 1980. Intercellular dye migration and electrotonic coupling within neuronal networks of the crayfish brain. J. Comp. Physiol. 146:121-133.
- Goldsmith, T.H. 1972. The natural history of invertebrate visual pigments. in handbook of sensory physiology (H.J.A Dartnall ed.) Vol 7, part 1, pp. 685-719. Springer Verlag, Berlin and N. Y.
- Goldsmith, T.H. y Fernández H.R. (1968) Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. Z. Vergl. Physiol. 60: 156-175.

- Goldsmith, T.H. y G.D. Bernhard. 1985. Visual pigments of invertebrates. Yearly review. Photochem. and Photobiol. 42:805-809.
- Goldsmith, T.H. 1978 a. The spectral absorption of crayfish Rhodoms. Photoproduct and pH sensitivity. Vision Res. 18:463-473.
- Hafner, G.S. Tokarski, T. y Hammond Soltis G. 1982. Development of the crayfish retina a light and electron microscopic study. J. Morphol 173:101-118.
- Hamdorf, K., Höglund, G. y Juse, A. 1986. Ultraviolet and blue induced migration of the screening pigment in the retina of moth *Deilephyla elpenor*. 159 (3):353.
- Hamm, U. Chandrashekar, M.K. y Engelmann, W. 1975. Temperature sensitive events between photoreceptor and circadian clock. Z. Naturforsch. 30 C:340.
- Heilbrigg, T. 1969. The development of circadian rhythms in infants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 311-323.
- Hoglund, J.G. 1965. Pigment migration and retinular sensitivity. in The Functional Organization of compound eye (ed. C.G.Bernhard) pp.77-78. Stockholm. pergamon Press.
- Inclan Rubio Virginia. 1988. Mecanismos involucrados en la sincronización del ritmo circádico electroretinográfico del acocil (sincronización por luz monocromática). Tesis de doctorado en ciencias biomédicas. Mex. D.F.
- Jahn, T.L. y Crescitelli, J. 1940. Diurnal changes in the electrical responses of compound eye. Biological Bulletin 78:45-52.
- Jahn, T.L. and Wulff V.J. 1943. electrical aspects of diurnal rhythm in the eye of *Pisticus laciventris*. Physiol. Zool. 16:101-109.
- Kenedy, D. y Bruno M.S. 1961. The spectral wnsensitivity of crayfish and lobster vision. J. Gen. Physiol. 44:1089-1102.
- Klemm, E. y Ninnemann, H. 1976. Detailed action spectrum for the delay shift in the pupae emergence of *Drosophyla pseudoobscura*. Photochem. Photobiol. 24:369.
- Kong, K.L. y Goldsmith. 1977. Photosensitivity of retinular cells in white-eyed crayfish *P. clarkii*. J. Comp. Physiol. 122:273-288.
- Konopka, N.J. and Benzers S. 1971. Clock mutants of *Drosophyla melanogaster*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68:2112-2116.

- Kowallik Wolfgang, 1987. Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism. en :Blue light responses, phenomena and occurrence in plants and microorganisms. Vol1.7-17.CRC Press.
- Krebs . W. 1974. Area and Volume relationship in the crayfish retina. Vision Res. 14:441-442.
- Mellon D. 1977. The anatomy and motor nerve distribution of the eye muscles in crayfish. J Comp. Physiol. 121:349-366.
- Mellon, D. Tufty, R.H. y Larton, E.D. 1976. Analysis of spatial constancy of oculomotor neurons in crayfish. Brain Res. 109:587-596.
- Miyata, M., Wada, M., y Furuya, M., 1979. Effects of phytochrome and blue near ultraviolet light- absorbing pigment on duration of component phases of the cell cycle in Adiantum gametophytes. Dev. Growth differ. , 21:557.
- Moore-Ede M.W. Schmelzer, I. Passa, and J. Herd. 1976. Internal organization of the circadian timing system in multicellular animals. Fred Proc. 35: 2933-38.
- Moore-Ede, C. Martin. Sulzman, F.M. and Charles A. Fuller. 1982. The Clocks that Time us. Ed. Harvard University Press, Cambridge U.S.A. 448 pp.
- Nakashima H. y Feldman, J.F. 1980. Temperature sensitivity of light induced phase shifting of the circadian clock of Neurospora. Photochem. Photobiol 32:247.
- Ninnemann, H. 1979. Photoreceptors for circadian rhythms. Photo Chem. Photo Biol. Rev. Vol 4. Smith, K.C. ed. Plenum Press. New York. 207.
- Njus, D. Mc Murry, L. y Hastings, J.W. 1979. Conditionality of circadian rhythmicity : Cinergistic action of light and temperature. J. Comp. Physiol. 117:334-335.
- Njus, D. Sulzman, F.M. y Hastings, J.W. 1974. Membrane model for the circadian clock. Nature (London), 58:116.
- Nosaki, H. 1969. Electrophysiological study of color encoding of compound eye of crayfish Procambarus clarkii. Z. Vergl. Physiologie. 64:318-323.
- Page T.L. y Larimer J.L., 1976. Extraretinal photoreceptors in entrainment of crustacean rhythms. Photochem. Photobiol. 23:245-261.
- Parker, G.H. 1987. The retina and optic ganglia in decapods, especially in Astacus. Mitt. Zool. Stat. Neapol. 12:1-73.

- Piaget, Jean. 1979. Tratado de lógica y conocimiento científico. tomo IV "epistemología de la física". Ed. Paidós, Buenos Aires. pp. 19-21.
- Pittendrigh C.S. 1974. Circadian oscillations in cells and circadian organization of multicellular systems. in The Neurosciences : Third estudy program (ed. Schmitt O.y Warden F.G.) pp. 437-458 MIT Press Cambridge, Massachusetts.
- Pittendrigh W.C. 1981. Circadian systems: Entrainment, in "Biological Rhythms , ed, J. Aschoff(N.Y. Public Corp., pp. 57-80.
- Prosser, C. Ladd..1973. Endocrine mechanisms in crustaceans. en Comparative Animal physiology. (ed. Prosser, C.L.) Saunders Co. pp 691-695.
- Reiner Schmid, 1987. Blue light effects in endogenous rhythm. en: Blue light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms. Horst Senger ed. Vol 1. pp.67-101. CRC Press.
- Rensing, L. 1965. Circadian rhythms in the course of the ontogeny. in Circadian clocks (ed. Aschoff J.). pp 399-405. North Holland Amsterdam.
- Roach, J.L.M. 1976. Junctionals structures on the cristaline cone of the crayfish compound eye. Cell tissue Res. 173:309-314.
- Sandeman, R. y Sandeman, D. 1990. Development and identified neural systems in the crayfish brain. en Frontiers in crustacean neurobiology. Advances in life sciences. Birkhäuser Verlag Basel, pp 498-508.
- Sandemann, D.C. 1982. Organization of the central nervous sistem. en The biology of crustacea . Neurobiology structure and runction. Vol 3 ed. Bliss D.E. y H.L. Atwood. Acad. Press. Inc.
- Sanchez, J.A., and Fuentes-Pardo, B. 1977. Circadian rhythm in the amplitude of the electrorretinogram in the isolated eyestalkof the crayfish. Comp. Biochem. and Fisiol, 56A:601-605.
- Sargent, M.L. y Briggs, W.R. 1967. The effects of light on a circadian rhythm of conidation in Neurospora. Plant. Physiol. 42:1504.
- Schmid, R. (en prensa). Twofold effect of blue lighth on a circadian rhythm in Acetabularia. J. Interdic. Cycle. Res.

- Schmid, R. 1984. Blue light effects on morphogenesis and metabolism in Acetabularia. en Blue light effects in biological systems. Senger, H. Ed. Springer Verlag. Berlin. 419.
- Schmid, R. 1987. Blue light effects in endogenous rhythms. en Blue light responses : responses and occurrence in plants and microorganisms. Horst, Senger ed. CRC Press. 1:87.
- Schweiger, H.G. y Schweiger, M. 1977. Circadian rhythms in unicellular organisms an endeavour to explain the molecular mechanism. Int. Rev. Cytol. 51:315.
- Stephen, R. Shaw and Sally Stowe. 1982. Photoreception. in: The biology of crustacea vol 3 Ed by Bliss E. Dorothy and Mantel H. Linda Acad. Press Inc. pp. 336-339.
- Suzuki, T., M. Makino-Tasaka y E. Eguchi. 1984. 3-Dehydroretinal (Vitamin A₂ aldehyde) in crayfish eye. Vision Res. 24:783-887.
- Suzuki, T., Airakawa, K., y Eguchi, E. 1985. The effects of light and temperature on the rodopsin-porphirodopsin visual system of the crayfish Procambarus clarkii. Zool. Scienc. 2:455.
- Sweeney, B.M. and Hastings, J.W. 1960. Effect of temperature upon diurnal rhythms. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25:87-104.
- Sweeney, B.M. 1960. The photosintetic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 25:145-158.
- Treviño, D.L. y Larimer, J.L. 1970. The response of one class of neurons in optic tract of crayfish Procambarus to monochromatic light. Z. Vergl. Physiol. 69: 139.
- Wald, G. 1960. Visual pigments of the fresh water crayfish. Fred. Proc. 21:234.
- Ward, R. Ritchie, 1972. The living clocks. Ed. William Collins Sons and Coldt. London, pp. 48-50.
- Waterman, T.H. y Fernández H.R. 1970. E-Vector and wavelength discrimination by reticular cells of the crayfish Procambarus. Z. Vergl. physiol. 52:415.
- Widell, Susanne. 1987. Membrane-Bound blue light receptors- possible connection to blue light photomorphogenesis. en Blue Light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms. Vol 2, ed. Horst Senger. CRC Press.