

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

170
2ej

"PAPEL DE LA GLANDULA SINUSAL EN LA
SINCRONIZACION POR LUZ DEL RITMO
CIRCADIANO DE AMPLITUD DEL
ELECTORRETINOGRAMA EN EL ACOCIL."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MAYO DE 1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
1. CARACTERISTICAS GENERALES Y ORGANIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS	1
A. Características generales	1
B. Organización del sistema circadiano	2
C. Elementos estructurales de la organización circadiana ...	2
2. SINCRONIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS	4
A. Generalidades	4
B. Curvas de respuesta de fase	6
C. Uso del fotoperiodo como sincronizador	6
3. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DEL OJO DEL ACOCIL Y DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO DEL TALLO OCULAR	7
A. Tallo ocular y lóbulos ópticos	7
i. Descripción general	7
ii. Ojo	7
iii. Estructuras parareceptoras	9
iv. Lóbulos ópticos	9
B. Sistema neuroendocrino del tallo ocular	12
i. Generalidades del sistema OX-GS	12
ii. Morfofisiología	12
4. RITMOS CIRCADIANOS EN EL ACOCIL	13
A. Ritmos celulares y generales del organismo	13
B. Participación del sistema neuroendocrino (OX-GS) en el ritmo del ERG	13
5. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	14
A. Hipotesis	14
B. Objetivos	14
MATERIALES Y METODOS	
1. REGISTRO DEL ERG	15
2. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS	15
3. FOTOPERIODOS	17
4. ANALISIS DE RESULTADOS	17
RESULTADOS	
1. GRUPO 1a	21
2. GRUPO 1b	25
3. GRUPO 2a	29
4. GRUPO 2b	32
DISCUSION	
1. ERG Y RITMO DE AMPLITUD DEL ERG	35
2. SINCRONIZACION	36
A. Sincronización interna	36
B. Sincronización externa	37
CONCLUSIONES	39
PERSPECTIVAS	40
BIBLIOGRAFIA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los ojos en el acocil, de los neuropilos del lóbulo óptico en uno de los tallos oculares y del sistema órgano X-glándula sinusal en el mismo tallo	8
Figura 2. Representación esquemática de una omatidia del ojo compuesto del acocil	10
Figura 3. Componentes del electroretinograma (ERG).....	11
FIGURA 4. Dispositivo experimental	16
FIGURA 5. Parámetros para evaluar el ritmo circadiano	19
FIGURA 6. Grafica de las fases de actividad (α)	20
FIGURA 7. Amplitud del ERG vs tiempo. Grupo 1a	23
FIGURA 8. Fases de actividad (α). Grupo 1a	24
FIGURA 9. Amplitud del ERG vs tiempo. Grupo 1b	27
FIGURA 10. Fases de actividad (α). Grupo 1b	28
FIGURA 11. Amplitud del ERG vs tiempo y Fases de actividad. Grupo 2a	31
FIGURA 12. Amplitud del ERG vs tiempo y Fases de actividad. Grupo 2b	34

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Valores promedio del Grupo 1a	22
TABLA 2. Valores promedio del Grupo 1b	26
TABLA 3. Valores promedio del Grupo 2a	30
TABLA 4. Valores promedio del Grupo 2b	33

RESUMEN

Se ha descrito un ritmo circadiano en la amplitud de la respuesta a la luz del fotorreceptor visual del acocil (electrorretinograma, ERG). Las propiedades del ritmo han sido estudiadas y se sabe que al extirpar las glándulas sinusales del animal el ritmo desaparece. Además, al inyectar un extracto de tallos oculares de acocil, a un animal intacto, se producen desfases en el ritmo circadiano de amplitud del ERG cuya magnitud depende del momento en que tales inyecciones se aplicaron. Con el fin de conocer la participación de las glándulas sinusales en la sincronización por luz del ritmo circadiano de amplitud del ERG, se desarrollaron experimentos en los que a animales intactos y a animales desprovistos de ambas glándulas sinusales, se aplicó un fotoperiodo LO 12:12 (el cual era invertido a OL 12:12 después de tres días) a un ojo. En los animales intactos, el ritmo circadiano del ojo estimulado se sincronizaba tanto con el fotoperiodo LO como con el OL, el ojo contralateral también se sincronizaba después de una pequeña latencia. Los animales desprovistos de glándulas no mostraron ritmo alguno y aunque el ojo estimulado con los fotoperiodos (LO 12:12 tres días y OL 12:12 otros tres días) presentó cambios en la amplitud que correspondían al encendido y apagado de la luz, el ojo contralateral no sufrió ningún cambio ni manifestó ningún ritmo circadiano. El segundo protocolo consistió en aplicar fotoperiodos invertidos 180° a cada ojo con el objeto de poner en evidencia si existe o no alguna jerarquía en los osciladores presentes en el tallo ocular y de qué manera la glándula sinusal podía influir en las interacciones entre ambos ojos. En los animales intactos se observó que las interacciones eran muy semejantes entre ambos ojos y que podían distorsionar la forma del ritmo pero éste aún podía sincronizarse al fotoperiodo aplicado. En los animales desprovistos de glándulas no se detectó interacción alguna entre ambos ojos. De los experimentos realizados se puede decir que ambos ojos están sincronizados entre sí y de hecho los cambios periódicos que son captados por un ojo son suficientes para sincronizar el ritmo del ERG del ojo que no recibe luz. La glándula sinusal parece estar involucrada en la expresión y sincronización por luz del ritmo circadiano de amplitud del ERG así como en la sincronización interna entre ambos ojos. Además, ambos ojos influyen entre sí de manera equivalente y de nuevo la glándula sinusal parece ser necesaria para la manifestación de dichas interacciones.

"Time is really the fourth dimension of living organisms. it enters as a part into the constitution of a tissue."

A. Carrel, 1931

"Hitomaro ya no existe, pero la poesía continúa viviente. Es bueno que el tiempo tenga sus etapas, que las cosas pasen y que la alegría y la tristeza se entrecrucen. Cuando existe el ritmo, ¿cómo podría desaparecer la poesía?"

Ki No Tsurayuki, s. IX D.C.

INTRODUCCION

I. CARACTERISTICAS GENERALES Y ORGANIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS.

A. Características generales.

Desde tiempos remotos al hombre le ha intrigado la naturaleza rítmica de los organismos vivos, lo que le generó la inquietud de conocer los principios del funcionamiento en los que se basan las conductas rítmicas de los sistemas (Aschoff, 1960, 1981a; Moore-Ede y cols., 1982).

En el estudio de estos principios fundamentales se ha reconocido que el constante paso del día y de la noche a través del tiempo ha dejado su huella en los procesos fisiológicos y en el comportamiento de los seres vivos a los que somete, día tras día, a un ritmo altamente predecible de 24 horas (Aschoff, 1981b; Moore-Ede, y cols., 1982).

Sin embargo, la manifestación de la conducta rítmica en los seres vivos no es un fenómeno pasivo, en el sentido de que sólo siga cambios impuestos por fenómenos periódicos externos, ya que cuando un individuo es aislado de toda señal periódica externa por ejemplo en una caja cerrada en la que la luz, la temperatura, etc. son constantes, sigue manifestando sus actividades de manera cíclica con periodos semejantes pero no iguales a 24 horas. A esta manifestación de patrones rítmicos de actividad en condiciones ambientales constantes se le conoce como oscilación libre.

A los sistemas fisiológicos responsables de que las funciones se organicen de acuerdo con un patrón de actividad temporal diaria se les conoce como sistemas circadianos. El término circadiano (Halberg, 1959) proviene de las raíces latinas *circa* que significa alrededor y *diem* que significa día; se aplica a las oscilaciones generadas en forma endógena por los seres vivos que tienen un periodo de aproximadamente 24 horas.

Los ritmos circadianos se presentan en todos los niveles de organización de los seres vivos y en todo tipo de funciones, lo que les da el carácter de ubicuos; son autosostenidos, innatos y heredables; compensan los cambios de temperatura, es decir poseen mecanismos propios que contrarrestan los cambios metabólicos que resultan de los cambios de la temperatura externa lo que les permite mantener relativamente estable la velocidad de la oscilación endógena. De hecho, un organismo que no fuera capaz de compensar los cambios de temperatura mostraría cambios en la velocidad de sus oscilaciones que se traducirían en errores notables en la medición del tiempo (Pittendrigh, 1954, 1960; Aschoff, 1960, 1981b; Moore-Ede, y cols., 1982, De Coursey, 1983; Edmunds, 1988); otra de las características esenciales de los sistemas circadianos es su susceptibilidad para ser sincronizados con señales periódicas externas (principalmente de luz y de temperatura) que se denominan

con la palabra alemana "Zeitgeber" (Aschoff, 1951, 1960). La importancia de esta característica es que de ella depende que el organismo ajuste sus funciones (las sincronice) a las señales periódicas externas con las consiguientes ventajas adaptativas que esto representa.

En 1960, Aschoff planteó otra de las características relevantes de los relojes circadianos, en relación con la dependencia que tienen con respecto a la intensidad de la luz. A la fecha se le conoce como la "Regla de Aschoff" y en ella se establece que los tres parámetros esenciales de las oscilaciones circadianas que son la frecuencia, la relación entre el tiempo de actividad y el tiempo de reposo (relación $\alpha:p$) y el nivel de actividad, dependen de la intensidad luminosa que recibe el individuo de tal manera que al aumentar ésta aumentan los tres parámetros si el organismo es diurno y disminuyen si el organismo es nocturno.

B. Organización del sistema circadiano.

El orden temporal de los seres vivos se hace evidente al observar sus ritmos circadianos. Estos presentan diferencias entre ellos mismos en lo que se refiere a la forma de la onda, la fase de máxima amplitud, la relación actividad reposo, etc., sin embargo, mantienen una relación de fase específica entre sí que puede ser comparada con la relación de fase que presentan los ritmos equivalentes de otras especies.

El que haya un orden temporal interno comparable en distintas especies pone de manifiesto la posibilidad de cierta equivalencia en la(s) estructura(s) interna(s) del sistema circadiano de medición de tiempo en dichas especies (Szabo y cols., 1978; Moore-Ede, y cols., 1982).

Son muchas las preguntas que hay acerca de la organización de los sistemas circadianos: En un organismo ¿existe sólo un reloj con capacidad de producir todas las señales de tiempo o hay que pensar en la existencia de un sistema de osciladores múltiples? Si hay osciladores múltiples, ¿están dispuestos de manera jerárquica? ¿Cómo se acoplan entre sí los osciladores que generan un cierto ritmo y cómo se acoplan con las señales externas de tiempo? A la primera pregunta hay que contestar que hay muchas pruebas que sugieren que la organización circadiana se basa en múltiples osciladores (Aschoff, 1960, 1965a; Pittendrigh, 1960, 1974; Wever, 1975; Moore-Ede y cols., 1976, 1979). Sobre la posible organización jerárquica sólo hay algunos datos que sugieren, aunque no prueban, tal posibilidad (Moore-Ede y cols., 1982). Por lo que respecta a la forma de acoplamiento entre los osciladores no hay información disponible; sólo en algunos modelos teóricos se han sugerido posibles mecanismos que hacen factible que distintos grupos de osciladores actúen en forma sincrónica (Pavlidis, 1973; Winfree, 1971; Lara-Aparicio y cols., 1992).

C. Elementos estructurales de la organización circadiana.

En 1960, Pittendrigh propuso que los sistemas circadianos están compuestos de diferentes sistemas fisiológicos oscilatorios; fenómenos como la desincronización interna, la disociación de distintos ritmos y algunos estudios *in vitro*, han confirmado su idea. En forma resumida se presentan algunas de las proposiciones en apoyo de la idea de Pittendrigh:

1. Los sistemas circadianos tienen 2 ó más osciladores cada uno con capacidad de generar ritmos circadianos autosostenidos, e independientes aun en un ambiente aperiódico.
2. Estos osciladores, potencialmente independientes, están sincronizados.
3. Cada oscilador está sincronizado, normalmente, a determinados cambios ambientales periódicos, esto implica que debe haber transductores que conviertan la señal ambiental en una señal biológica capaz de sincronizar a cada oscilador.

Con base en estas proposiciones en todo sistema circadiano existen los siguientes elementos estructurales: un transductor, un marcapaso, un oscilador secundario, un elemento pasivo, y elementos que relacionan a estas estructuras.

a) Transductor: El transductor de un sistema circadiano es el receptor que detecta los cambios periódicos del ambiente y los transforma en señales con algún significado para los elementos medidores de tiempo. Esto no significa que todos los receptores de un organismo deban detectar las señales temporales externas, y de hecho muchos no desempeñan esta función.

Un ejemplo de transductores circadianos (Horne y Renninger, 1988; Hanna y cols., 1988) es el fotorreceptor extrarretiniano del telson de *Limulus*; ya que representa la entrada de las señales temporales externas importantes para los sistemas circadianos del animal.

b) Marcapaso: Una vez que las señales externas han sido detectadas, la información incide sobre el marcapaso; cada sistema circadiano posee uno o más marcapasos constituidos por osciladores primarios, esto es, con capacidad de medir el tiempo aun en ausencia de señales externas generando las señales de tiempo internas necesarias para mantener sincronizados los sistemas como un todo. Así, el marcapaso cumple dos funciones: recibir día tras día, la información de los cambios que ocurren en el exterior y proveer al organismo de las señales diarias de tiempo (Aschoff, 1981b; Moore-Ede, y cols., 1982). Se ha planteado que los marcapasos pueden ser entidades únicas en los individuos, sin embargo desde hace muchos años también se ha planteado la posibilidad de que cada marcapaso surja de la interacción de una red de elementos, ninguno de los cuales sería capaz de medir intervalos de 24 horas (Pittendrigh, 1981a). Habría que añadir que tampoco se ha aclarado si el periodo fundamental del propio marcapaso tiene 24 horas. Es probable que cada marcapaso esté compuesto de osciladores de alta frecuencia que al interactuar y retroalimentarse produzcan una salida de baja frecuencia (Pavlidis, 1973).

c) Osciladores secundarios: Los osciladores secundarios o periféricos reciben las señales del marcapaso, aunque son capaces de producir oscilaciones independientes. La sincronización con el marcapaso se lleva a cabo a través de mediadores. Así, los osciladores secundarios serán los responsables de que los ritmos de las diferentes variables fisiológicas se manifiesten de manera evidente. Debe aclararse que no todos los tejidos en los que se registran actividades periódicas son osciladores independientes; el hecho de encontrar oscilaciones amortiguadas cuando dichos tejidos son aislados del organismo, sólo dificulta su identificación como posible oscilador independiente. Como los elementos del sistema circadiano de medición temporal están normalmente acoplados, cuando se aíslan del sistema circadiano, pueden mostrar un periodo en oscilación libre (τ) diferente al del marcapaso y con menor estabilidad que éste (Moore-Ede, y cols., 1982).

d) Elementos pasivos: Los osciladores secundarios tienen a su cargo producir ritmos circadianos en tejidos u otros subsistemas fisiológicos que no presentan por sí mismos oscilaciones independientes; debido a ello a estos subsistemas se les considera elementos pasivos. Los elementos pasivos pueden convertirse en elementos arrítmicos si el mediador que los relaciona con los osciladores secundarios mantiene niveles constantes.

e) Mediadores: Los mediadores son los elementos que mantienen sincronizado a todo el sistema circadiano de medición de tiempo mediante la transmisión de información temporal de un lugar del organismo a otro. Los osciladores secundarios se acoplan al marcapaso por medio de los mediadores, y el

marcapaso, a su vez, se acopla con los transductores también por medio de mediadores.

La forma en que los mediadores transmiten la información temporal parece involucrar la participación de los sistemas nervioso, endocrino y neuroendocrino. Existen pruebas de la ritmicidad en estos sistemas por ejemplo en la frecuencia de disparo de potenciales de acción en *Aplysia* (Jacklet, 1969), en la sensibilidad del sistema visual en el acocil (Aréchiga y cols., 1973; Aréchiga y Mena, 1975), en la concentración de ciertas neurohormonas del acocil (Hernández-Falcón y cols., 1987; Moreno-Sáenz y cols., 1987). Los mediadores se localizan en diferentes niveles del sistema circadiano y conducen la información temporal de un subsistema a otro; sin embargo, la respuesta de cada subsistema a las manipulaciones de un mediador es diferente; por lo tanto, los mediadores pueden ser usados para diferenciar entre los elementos pasivos, los marcapasos, y los osciladores secundarios.

f) Ritmo evidente: Los ritmos evidentes son las salidas periódicas del sistema circadiano. Estas se pueden presentar en el comportamiento general del organismo, en cambios en la cantidad de hormona circulante en la sangre, etc..

2. SINCRONIZACION DE LOS SISTEMAS CIRCADIANOS.

A. Generalidades.

Una de las funciones más importantes de los sistemas circadianos en los organismos es asegurar un ajuste temporal apropiado entre los procesos metabólicos, fisiológicos y por ende etológicos y los fenómenos ambientales diarios (Pittendrigh, 1981a; Moore-Ede, y cols., 1982; De Coursey, 1983; Edmunds, 1988). El ajuste apropiado entre los ritmos circadianos y las señales externas de tiempo determinan en buena medida la sobrevivencia de cada especie en un mundo donde la actividad de la presa y del depredador es por sí misma, cíclica. Existe la hipótesis de que la capacidad para sobrevivir y procrear descendencia se incrementa por medio de funciones programadas espacial y temporalmente (De Coursey, 1983), aunque debe aclararse que esta hipótesis tiene ciertas dificultades para ser probada (Enright, 1970, citado por De Coursey, 1983).

En el presente trabajo el término sincronización se refiere a la acción que ejerce una señal periódica externa sobre el ritmo circadiano considerado, lo que significa que un ritmo circadiano sincronizado con un zeitgeber tiene un periodo durante la sincronización (τ^*) igual al periodo del zeitgeber (T). Debe hacerse notar que no todos los cambios ambientales pueden sincronizar a los sistemas circadianos, sólo aquellos que tengan una periodicidad que incida dentro de la gama de valores capaz de ser identificada por los organismos con algún significado.

Los criterios para hablar de sincronización son los siguientes: a) Antes de que se aplique la señal externa el ritmo circadiano debe oscilar libremente con un periodo independiente al del zeitgeber; durante la aplicación de éste el periodo circadiano se ajustará al periodo del zeitgeber y al quitar la señal, reaparecerá el periodo circadiano original.

b) Entre el ritmo circadiano y el ritmo ambiental externo debe establecerse una relación de fase (Φ) estable y reproducible.

c) Una vez que la señal de tiempo es retirada, el ritmo oscilará libremente a partir de la fase determinada por el ciclo ambiental, no por el ritmo previo a la sincronización, esto puede llamarse control de fase (Pittendrigh, 1960, 1981a; Moore-Ede, y cols., 1982).

La importancia de estos criterios para identificar la acción de un zeitgeber se hace evidente al considerar que otros ciclos ambientales no sincronizan pero pueden alterar la forma de la onda del ritmo circadiano.

Fenómenos como el enmascaramiento, la coordinación relativa, el límite de sincronización y la sincronización parcial dependen de este tipo de ciclos ambientales.

a) Enmascaramiento: Cuando la respuesta del sistema circadiano, expresada como un ritmo evidente queda opacada de alguna manera por la acción del evento cíclico ambiental impuesto, puede parecer que el ritmo circadiano se sincroniza con dicho ritmo externo; sin embargo, si al regresar a la condición de oscilación libre (en ausencia del estímulo externo) el ritmo mantiene la fase predicha por la oscilación libre antes de la señal externa, entonces no es posible establecer a dicha variable como un zeitgeber y el fenómeno observado se denomina enmascaramiento (Aschoff, 1981b; Pittendrigh, 1981a; Moore-Ede, y cols., 1982).

b) Coordinación relativa: En algunos casos el ciclo ambiental no es lo suficientemente fuerte como para sincronizar un ritmo circadiano pero puede mantener cierta influencia sobre la fase del ritmo. Esto se observa como la interacción entre dos osciladores débilmente acoplados, lo que puede ocasionar que un oscilador se acelere en cierto momento de su ciclo y se desacelere en otro. A este fenómeno se le denomina coordinación relativa.(Aschoff, 1981b)

c) Límites de sincronización: Todos los osciladores endógenos muestran un intervalo limitado de periodos con los cuales pueden sincronizarse: Una señal periódica externa de periodo muy corto o muy largo puede no sincronizar a un ritmo circadiano. En estas ocasiones puede observarse un proceso de coordinación relativa en el que el periodo es diferente al de la oscilación libre pero no es igual al periodo del zeitgeber (Aschoff, 1981b; Moore- Ede, y cols., 1982).

d) Sincronización parcial: Tomando en cuenta la estructura multioscilaria del sistema circadiano, es posible que diferentes ritmos en el organismo difieran en cuanto a su capacidad de ser sincronizados por un determinado zeitgeber. En consecuencia hay una sincronización parcial del sistema, que corresponde a una situación donde, en presencia de un zeitgeber, algunas partes del sistema circadiano oscilan libremente mientras que otras permanecen sincronizadas (Aschoff, 1978 citado por Aschoff, 1981b).

Son pocos los factores ambientales que se han probado y que en forma inequívoca pueden actuar como zeitgeber de diferentes ritmos. Los ciclos luz oscuridad (ciclos LO) se consideran el zeitgeber más importante para los organismos en general; los termoperiodos (oscilaciones de alta y baja temperatura) también tienen importancia sobre todo en los organismos ectotermos (Aschoff, 1981b). Otras señales que pueden actuar como zeitgeber son los ciclos de alimentación y algunas señales sociales (Moore-Ede, y cols., 1982).

Con base en la amplitud de la oscilación, en la calidad y la forma de la onda del zeitgeber, se determina la fuerza del acoplamiento entre el ritmo y este último. El contraste entre la intensidad de la luz y la oscuridad en un ciclo LO, la duración de la fase de luz y de la fase de oscuridad, la transición entre la luz y la oscuridad (gradual, en pasos, o brusca) son factores que influyen también en la fuerza del acoplamiento. La calidad del estímulo como por ejemplo la longitud de onda de la luz empleada en el ciclo LO, puede también hacer que el acoplamiento sea de mayor o menor fuerza (Aschoff, 1981b, Pittendrigh, 1981a, 1981b).

B. Curvas de respuesta de fase.

Para que un zeitgeber sincronice a un sistema circadiano, en cada ciclo se debe modificar la fase del ritmo, es decir el tiempo necesario para corregir la diferencia entre el período del zeitgeber y el período del marcapaso. Esta modificación se lleva a cabo a su vez gracias a cambios circadianos de la sensibilidad a la señal que se aplica. Así, por ejemplo, la luz inducirá un atraso, un adelanto o no provocará ningún cambio en la fase, dependiendo del momento en que se haya aplicado un estímulo luminoso durante la noche o el día subjetivo del animal.

Los mayores atrasos de fase ocurren durante la noche subjetiva temprana, cuando los organismos diurnos inician su fase de reposo y los nocturnos su fase de actividad. Los avances de fase más grandes ocurren en la noche subjetiva tardía. Hay relativamente pocos cambios de fase cuando el estímulo llega durante el día subjetivo.

El tiempo que un ritmo circadiano atrasa o adelanta su fase depende del momento circadiano en el que se aplica la señal externa y se representa en una gráfica llamada curva de respuesta de fase. En ella se muestran los adelantos, los atrasos, o la ausencia de cambios del sistema circadiano a un cierto tipo de estímulo que se aplica durante las 24 horas de un ciclo circadiano. El análisis de las curvas de respuesta de fase de un organismo a diferentes estímulos ha permitido cierta comprensión de los mecanismos que hacen posible que un zeitgeber sincronice los marcapasos circadianos; también ha permitido estudiar las propiedades de los marcapasos en forma independiente del ritmo evidente del animal (De Coursey, 1960; Aschoff, 1965b; Pittendrigh, 1965, 1981a; Moore-Ede y cols., 1982).

C. Uso del fotoperiodo como sincronizador.

Los organismos en su medio natural, están sujetos a cambios periódicos de iluminación. Durante el día la intensidad de la luz es máxima mientras que en la noche es mínima. Estos cambios influyen de manera importante sobre los organismos al grado de que sus actividades están determinadas, al menos en parte, por estos cambios.

En un ciclo de luz-oscuridad la etapa de luz recibe el nombre de fotoperiodo y la de oscuridad el de escotoperiodo (Binkley, 1990); sin embargo para el presente trabajo se utilizará el término de fotoperiodo para referirse a la alternancia de luz y oscuridad. Se ha planteado que la sincronización de los sistemas circadianos al fotoperiodo natural representa una respuesta evolutiva de los organismos por medio de la cual pueden predecir los cambios del medio y ajustar sus funciones a ellos (Pittendrigh, 1981b; De Coursey, 1983).

En la naturaleza, la duración del fotoperiodo es de 24 horas aunque las fracciones de luz y oscuridad dependen de la latitud y de la época del año. En el laboratorio, la duración de la etapa de luz y oscuridad puede variar en forma convencional y además la duración completa del fotoperiodo puede ser diferente de 24 horas.

A pesar de la gran influencia que tienen los fotoperiodos sobre los ritmos circadianos no todas las combinaciones de luz y oscuridad que se pueden hacer con un fotoperiodo son capaces de sincronizar al sistema circadiano, de ahí que en los años 60 y 70, autores como Aschoff (1960, 1965b), Pittendrigh y Daan (1976a, 1976b) entre otros, dedicaran mucho tiempo al estudio de las características que debe tener un fotoperiodo y del efecto que debe producir en el organismo, para que se considere que lo sincroniza. Un fotoperiodo debe producir cambios de fase que a su vez se traduzcan en un cambio del período ($\tau^* = T$) del ritmo circadiano que se mide, para poder afirmar que en efecto lo sincroniza. Además, debe establecer una relación de fase estable (por ejemplo que el pico máximo de actividad se presente siempre a la misma hora respecto

al encendido de la luz). Por último, cuando un ritmo está sincronizado con un fotoperiodo, al terminar la estimulación y dejar al ritmo en oscilación libre, el ritmo debe comenzar a oscilar a partir de la fase que el fotoperiodo le impuso (Pittendrigh, 1960, 1981a; Moore-Ede, y cols., 1982).

Es importante aclarar que en un organismo las diferentes funciones que presentan un ritmo circadiano evidente establecen entre sí relaciones de fase estables. El hecho de que se sincronicen a un fotoperiodo o no, depende tanto de factores propios del estímulo como de la organización del sistema circadiano. De hecho, en ocasiones es posible tener un ritmo sincronizado a un zeitgeber mientras que otro no lo está (Aschoff, 1981b).

El efecto sincronizante del fotoperiodo LO 12:12 sobre el ritmo del ERG fue caracterizado en la primera serie experimental del presente trabajo y de esa base se partió para usarlo como testigo de la respuesta del sistema circadiano ante el fotoperiodo. Así, al manipular alguna parte del sistema (registrar un ritmo circadiano) conocido y evaluar su respuesta ante un fotoperiodo, es posible hacer evidentes las diferencias entre la condición del testigo y la delexperimental; además, se pueden obtener conclusiones relacionadas con el mecanismo de la sincronización.

3. ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DEL OJO DEL ACOCIL Y DEL SISTEMA NEUROENDOCRINO DEL TALLO OCULAR.

A. Tallo ocular y lóbulos ópticos.

i. Descripción general.

El sistema visual del acocil está localizado en el par de tallos oculares pedunculados situados a ambos lados del rostro. Los tallos oculares son móviles y el ojo propiamente dicho se encuentra en el extremo distal del tallo; por abajo del ojo se encuentran diferentes neuropilos que conforman los lóbulos ópticos así como componentes del sistema neuroendocrino (Figura 1)

ii. Ojo.

El ojo del acocil es un ojo compuesto cuya estructura y función general son los de un ojo de superposición. El ojo está formado por unidades visuales u omatidas que se componen a su vez de un sistema dióptrico, un sistema fotorreceptor y un sistema parareceptor adyacente a los dos anteriores.

El sistema dióptrico lo constituyen la córnea, las células corneágenas y el cono cristalino formado por 4 células cuyo extremo proximal se adelgaza dando lugar a una raíz que queda rodeada por las células retinulares.

El sistema receptor está formado por 8 células retinulares alargadas; 7 de ellas se distribuyen de manera circular alrededor del rabdomo (de tipo cerrado) en un patrón ortogonal característico (Figura 2). Las células localizadas frente a frente emiten microvellosidades hasta la parte media del rabdomo las cuales están dispuestas alternadamente a lo largo del mismo (Figura 2). El rabdomo es el lugar donde se localiza el pigmento visual el cual forma parte de las membranas de las microvellosidades. La octava célula retinular es redonda y se encuentra separada de las demás; su tamaño es menor y sus microvellosidades no forman parte propiamente del rabdomo ya que se encuentran por encima de éste. Las células retinulares tienen una unión hermética o desmosoma en banda, en su parte distal lo que las mantiene fuertemente unidas. Aunque no existan pruebas morfológicas de la existencia de uniones comunicantes entre las células, Müller en 1973 dio pruebas fisiológicas de la existencia de acoplamiento eléctrico entre las células retinulares de una misma omatidia.

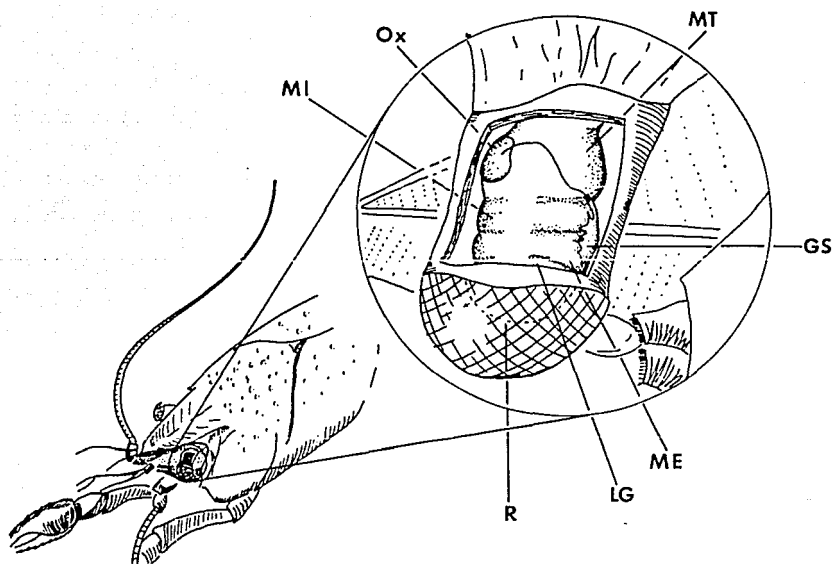


Figura 1. Localización de los ojos en el acocil, de los neuropilos del lóbulo óptico en un tallo ocular y del sistema órgano X-Glándula sinusal. En el dibujo se esquematiza un axón proveniente del órgano X. R, retina (no se observa en el dibujo, pero se encuentra por arriba de la lámina ganglionar aproximadamente en la región señalada con la línea punteada); LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; GS, glándula sinusal; MT, médula terminal; OX, órgano x; MI, Médula interna. Redibujado de Cooke y Sullivan, 1982.

En el interior de las células retinulares se encuentra el pigmento accesorio proximal y adyacente a las células retinulares se localizan las células que contienen al pigmento reflejante. El axón de las células retinulares está localizado en su región basal y atraviesa lo que se conoce como membrana basal. Al cruzar la membrana, los axones de diferentes células retinulares se unen y constituyen al nervio óptico (ver más adelante).

La luz incidente en la córnea es conducida por el sistema dióptrico hasta las células retinulares; parte de ella llega al rabadomo donde se llevan a cabo los fenómenos de fototransducción. La luz desencadena una serie de reacciones que comienzan con la descomposición de la rodopsina (11-cis-retinal) en preluminorrodopsina, luminorrodopsina y por último en metarrodopsina. Si en esta etapa un fotón incide sobre el pigmento, la metarrodopsina, a diferencia de lo que sucede en los vertebrados donde se produciría el blanqueamiento y la liberación del retinal (Shaw y Stowe, 1982; Goldsmith, 1972), vuelve al estado original. La transducción de la luz culmina con la producción de un potencial de receptor el cual consta de una despolarización rápida (fase transitoria) dependiente de la intensidad luminosa y una fase de despolarización lenta (fase estable), dependiente de la duración del estímulo luminoso.

La respuesta eléctrica de grupos de fotorreceptores se puede medir por medio de un electroretinograma (ERG). El ERG se registra en forma extracelular y mide la diferencia de potencial que se desarrolla a través de la resistencia del fluido extracelular que separa al electrodo colocado en la vecindad del ojo de un electrodo indiferente colocado en alguna región cercana. La magnitud y la polaridad del ERG dependen de la intensidad y de la duración del estímulo así como de la posición del electrodo en el ojo (Naka y Kuwabara 1959; Eguchi, 1965). En el ERG se describen las componentes HI y HII, la HI se asocia con el encendido del estímulo y la HII se mantiene todo el tiempo que dure la estimulación luminosa (Figura 3).

iii. Estructuras parareceptoras.

Bajo este rubro se incluyen las estructuras anexas a los fotorreceptores que influyen sobre la llegada de luz a éstos. Las más importantes de estas estructuras son las células del pigmento distal, el pigmento proximal contenido en las células retinulares y el pigmento reflector que se encuentra a la altura de la membrana basal. Los cambios de posición que presentan estos pigmentos (conocidos como pigmentos retinianos accesorios) pueden hacer que la omatidia quede blindada por ellos o bien que quede expuesta a la llegada de luz no sólo por el eje principal sino también por las regiones laterales. En el primer caso se habla de una adaptación a la luz y en el segundo caso de adaptación a la oscuridad; la adaptación a la luz significa una pobre llegada de luz hacia el rabadomo y lo contrario sucede durante la adaptación a la oscuridad. Los mecanismos que regulan la posición de los pigmentos retinianos accesorios parecen ser de carácter neuroendocrino para el pigmento distal (Fuentes-Pardo y García, 1979) y nervioso para el pigmento proximal (Frixione y Hernández, 1990). No hay información disponible respecto al pigmento reflector.

iv. Lóbulos ópticos.

Los lóbulos ópticos los constituyen los axones provenientes de las células retinulares, así como las neuronas que forman parte de los diferentes neuropilos y prolongaciones neuronales propias de la región y de otras regiones del ganglio cerebroide (figura 1).

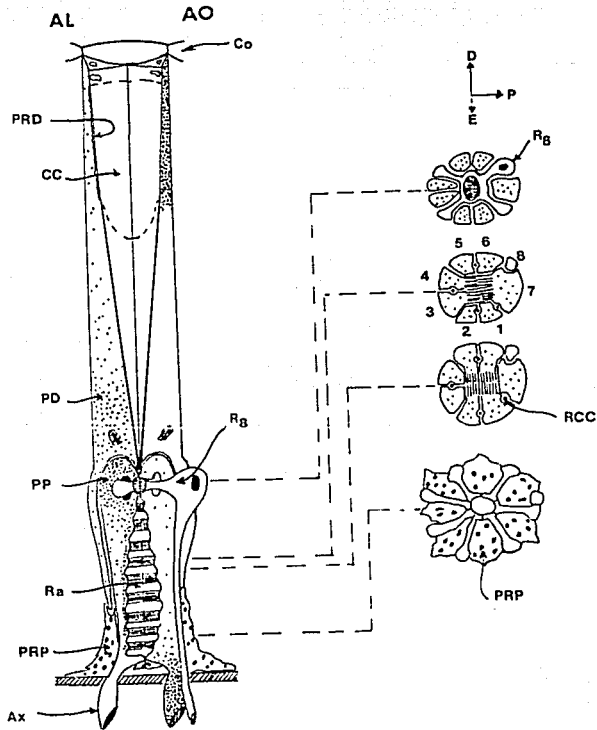


Figura 2. Representación esquemática de una omatidia del ojo compuesto del acocil. El dibujo de la izquierda muestra un corte longitudinal de la omatidia en el que se observa el movimiento de pigmentos tanto en adaptación a la luz (AL) como en adaptación a la oscuridad (AO). Los dibujos de la derecha muestran cortes transversales de la omatidia a diferentes niveles según lo indican las líneas punteadas. Los números en el segundo corte en estos dibujos, señalan las diferentes células de la omatidia en el orden propuesto por Parker, 1897. Las coordenadas de referencia D, P, E, en la parte superior de esta serie de dibujos, indican la dirección dorsal, posterior y equatorial, respectivamente. Co, cornea; PRD, Pigmento reflejante distal; CC, cono cristalino; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; R8, célula retinular 8; Ra, rabdomo; PRP, pigmento retiniano proximal; Ax, axón; RCC, Raíz del cono cristalino. Redibujado de Shaw y Stowe, 1982 y Rao, 1985.

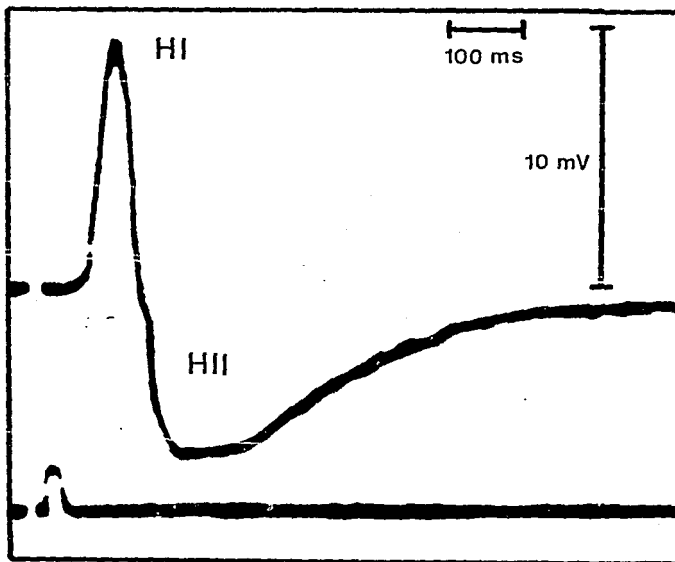


Figura 3. Componentes del electroretinograma (ERG). Este dibujo representa el ERG como se observa en la pantalla del osciloscopio, obtenido en la parte exterior de las células retinulares. Se observan tanto el componente HI como el HII. El trazo inferior muestra un artificio en el momento en que se aplica la estimulación luminosa. El dibujo esta basado en una fotografía de la pantalla del osciloscopio donde se registró originalmente. Las barras señalan los valores de calibración del registro. Redibujado de Naka y Kuwabara, 1959.

El neuropilo que se encuentra exactamente por debajo de la retina se conoce como lámina ganglionar, un segundo ganglio llamado médula externa es separado de la lamina ganglionar por terminales axónicas. Un tercer y cuarto neuropilos, la médula interna y la médula terminal respectivamente, se encuentran por abajo de los dos anteriores.

Los axones que unen la lámina ganglionar con la médula externa y a ésta con la médula interna se decusan y forman dos quiasmas (Sandeman, 1982).

B. Sistema neuroendocrino del tallo ocular.

Las células neurosecretoras pueden ser neuronas con terminales axónicas especializadas en la liberación de sustancias neuroendocrinas a la hemolinfa. Fue en 1953 cuando Carlisle y Knowles (citado por Cooke y Sullivan, 1982) definieron por primera vez un órgano neurohemal como una estructura especializada en la que las terminales nerviosas se ponen en contacto con el sistema circulatorio.

El sistema neuroendocrino de los decápodos está constituido principalmente por tres grupos de órganos: pericárdicos, postcomisurales, y el sistema formado por el órgano X-glándula sinusal (sistema OX-GS). Describiremos éste con mayor detalle ya que se encuentra localizado en el tallo ocular del acocil (Figura 1) y se relaciona directamente con el tema de este trabajo.

i. Generalidades del sistema OX-GS.

La glándula sinusal es un lugar de almacenamiento y liberación de hormonas que median la adaptación de las funciones metabólicas a las condiciones ambientales tales como la regulación del azúcar, las concentraciones iónicas y osmóticas, adaptación a la luz y al color del medio, y quizá, al mantenimiento de la ritmicidad circadiana y circamareal locomotriz (Cooke y Sullivan, 1982).

La evidencia de que la glándula sinusal es un órgano neurohemal fue proporcionada independientemente por Bliss (1951) y Passano (1951) (citado por Cooke y Sullivan, 1982). Estos autores identificaron el tracto nervioso que une a la glándula sinusal con un grupo de neuronas (órgano X) lo cual llevó a reconocerla como parte de un sistema neurohemal. Por otro lado se denominó órgano X a un grupo de neuronas agrupadas de manera compacta en el margen ventral proximal de la médula terminal cuyos axones forman el nervio de la glándula sinusal (Cooke y Sullivan, 1982).

ii. Morfofisiología.

En los decápodos en general, (no necesariamente en el acocil) la glándula sinusal se localiza en la porción dorsal o dorso-lateral del tallo ocular a nivel de la médula externa (Figura 1). La glándula yace por abajo de una capa más o menos abundante de tejido conjuntivo. Las neurosecreciones que almacena se liberan al seno venoso que la rodea y en ocasiones se ha observado que por arriba y abajo existen también espacios con hemolinfa (Cooke y Sullivan, 1982). Se ha demostrado que la mayor parte de los axones que forman el nervio de la glándula sinusal provienen del órgano X (Andrew and Saleuddin, 1978; Andrew y cols., 1978; citados por Cooke y Sullivan, 1982), no obstante existe la posibilidad de que neuronas de otros centros como el ganglio cerebroide o ganglios posteriores participen también en la formación de dicho nervio.

Diversos estudios han identificado procesos de exocitosis en las fibras adyacentes al neurilema y se tienen pruebas de que es a través de este proceso como se lleva a cabo la liberación de las neurosecreciones. Hormonas como la concentradora de eritroforos, la hormona de adaptación a la luz (HAL) u hormona dispersora del pigmento distal (HDPD), la hormona hiperglucemiante

(HHG) y la hormona inhibidora de la muda (HIM) han sido plenamente identificadas como neurosecreciones liberadas desde la glándula sinusal (Cooke y Sullivan, 1982).

La célula neurosecretora se puede considerar como la estructura final de un complejo celular en el que se llevan a cabo fenómenos de integración (Scharrer y Scharrer, 1945; Knowles, 1974). Sin embargo, existe poca evidencia experimental sobre los mecanismos integrales y los elementos que los conforman.

La liberación de neurosecreciones se lleva a cabo por medio de exocitosis fenómeno durante el cual se han registrado potenciales de acción en las fibras neurosecretoras, susceptibles de desaparecer por la acción de la TTX. Otra prueba de que la actividad eléctrica del axón neurosecretor es la señal iniciadora de la liberación, es el hallazgo de actividad eléctrica espontánea en terminales nerviosas de la glándula inusal en *Cardisoma carnifex* (Cooke, 1981).

4. RITMOS CIRCADIANOS EN EL ACOCIL.

A. Ritmos celulares y generales del organismo.

El acocil ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista circadiano. En él se han descrito ritmos circadianos en la actividad motora (Page y Larimer, 1972; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981), En la posición de los pigmentos retinianos accesorios (Welsh, 1930, 1939, 1941; Bennit, 1932; Fingerman y Lowe, 1957; Aréchiga, 1977), en la liberación de neurosecreciones desde la glándula sinusal, en la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales (Aréchiga y Wiersma, 1969; Page y Larimer, 1975), etcétera. La ritmicidad circadiana del acocil ha sido abordada en animales íntegros (Page y Larimer, 1972; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981) y en estructuras aisladas (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977). Se conocen también algunos aspectos referentes al desarrollo ontogénico del ritmo de amplitud del electrorretinograma (Fanjul-Moles y cols., 1987) y por medio de las curvas de respuesta de fase se ha propuesto cómo, en un ciclo de 24 horas, cambia la sensibilidad a la luz de las oscilaciones circadianas (Fuentes-Pardo y Ramos-Carbajal, 1983).

B. Participación del sistema neuroendocrino (OX-GS) en el ritmo del ERG.

En 1987 los trabajos de Hernández-Falcón y cols. demostraron que tanto la posición de los pigmentos retinianos como la secreción de neurohormonas del acocil, presentan un ritmo circadiano y que la glándula sinusal está involucrada en la generación del ritmo de migración de los pigmentos retinianos. Estos autores encontraron que la inyección de extracto de tallo ocular preparado a diferentes horas del día, produce desfasamientos en el ritmo de la pseudopupila cuya magnitud depende de la hora a la que se prepara el extracto.

También hicieron experimentos en los que mostraron que al quitar la glándula sinusal del tallo ocular *in vivo*, el ojo pierde la capacidad de expresar un ritmo circadiano en el área de brillo de la pseudopupila, y al aplicar un estímulo luminoso, hay cierta tendencia de readquirir el ritmo circadiano.

En animales a los que se les quitan de las glándulas sinusales, se pierde también el ritmo de la pseudopupila en el ojo registrado y el estímulo luminoso produce una tendencia a que dicho ojo readquiera sus características circadianas.

Por otro lado, Moreno-Sáenz y cols. (1987). demostraron que la glándula sinusal es un oscilador circadiano que participa en el sistema multioscilariorio que genera y mantiene el ritmo de amplitud del ERG. Encontraron que al inyectar extracto de tallo preparado a diferentes horas del día a tallos oculares aislados, disminuye la amplitud del ERG según la hora del día en que se habia preparado el extracto. Encontraron también que en animales intactos los ritmos del ERG de ambos ojos se encuentran sincronizados y que en animales sin una glándula sinusal suele haber modificaciones tanto en la amplitud como en el periodo del ritmo del ojo operado además de que pierde su sincronía con el ritmo del ojo intacto. En animales sin las dos glándulas sinusales los dos ritmos mostraron variaciones en el periodo y la amplitud del ritmo del ERG, así como una total desincronización entre ellos.

5. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

A. Hipotesis.

Los antecedentes que se han presentado, así como los resultados arriba mencionados, permitieron proponer las siguientes hipótesis de trabajo: Si la glándula sinusal está involucrada en la generación del ritmo del ERG y en el acoplamiento entre ambos ojos, entonces, 1) en animales intactos la aplicación de un fotoperiodo en un ojo resultará en la sincronización del otro ojo con el fotoperiodo aplicado; 2) al aplicar un fotoperiodo en un ojo a animales carentes de las dos glándulas sinusales, no se observará un ritmo circadiano evidente en el ERG de ninguno de los 2 ojos, ni podrá haber sincronización entre ellos. Por otra parte, si no existe ningún tipo de jerarquía entre los osciladores presentes en el tallo ocular, entonces, en animales intactos a los que se les aplique un fotoperiodo en cada ojo desfasado 180 grados uno respecto al otro, habrá interacciones mutuas de igual magnitud y en animales desprovistos de las dos glándulas sinusales será imposible de observar tales interacciones.

B. Objetivos.

Se realizarán experimentos en los que se registre el ritmo circadiano de respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil. Estos experimentos se desarrollarán con animales intactos y animales desprovistos de glándulas sinusales. Una vez registrado el ritmo circadiano se aplicarán, a ambos tipos de animales, fotoperiodos en un ojo pero no en el otro, el cual permanecerá en condiciones de oscilación libre.

Por último se aplicarán, a animales intactos y desprovistos de glándulas sinusales, un fotoperiodo desfasado 180° con respecto al fotoperiodo que se aplicará al ojo contralateral.

"In the development the new citology, as in the development of every science, the conception is more important than the method. Techniques are only the servants of ideas. They have no great power in themselves."

"A method is an instrument which finds only that which is being sought."

A. Carrel, 1931.

MATERIALES Y METODOS

1. REGISTRO DEL ERG.

Se utilizaron acociles adultos de las especies *Procambarus clarki* y *Procambarus digueti*, sin distinción de sexo. Poco antes de que se iniciara el registro se colocaba un corcho en la región dorsal del cefalotórax usando para ello pegamento acrílico. Durante el experimento el acocil se mantenía sujeto por el corcho y parcialmente sumergido en el agua con el fin de que ésta llegara hasta las branquias pero sin mojar los ojos. El recipiente se encontraba en una cámara que mantenía constante la temperatura ($17 \pm 1^\circ\text{C}$), y permitía tener al acocil en oscuridad constante.

En cada ojo se implantó un electrodo de acero inoxidable de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de diámetro en la punta. Por medio de un fotoestimulador Grass PS22 cada 3 minutos se aplicaba un estímulo luminoso de prueba de $15 \mu\text{s}$ de duración y de 1800 lux de intensidad. La respuesta eléctrica a la luz (electrorretinograma, ERG) de los fotorreceptores visuales, llegaba a un preamplificador Tektronix 122 y desde allí a un amplificador Grass 7DA. La inscripción en papel de la respuesta se hacía por medio de un polígrafo Grass modelo 7 (Figura 4). En todos los casos el experimento tenía una duración entre 12 y 16 días. Los registros del ERG se hacían en condiciones de oscilación libre (oscuridad constante) o durante la aplicación de un fotoperiodo. El fotoperiodo se aplicaba por medio de un foco de 4.5 V que daba 20 lux de intensidad, el cual se conectaba a una pipeta de vidrio pintada de negro la que sólo dejaba pasar la luz por la punta; ésta se colocaba aproximadamente a 3 ó 4 mm del ojo estimulado de tal manera que la luz sólo llegaba a un ojo sin iluminar al ojo contralateral. Los fotoperiodos se controlaron con interruptores de tiempo como se aprecia en la figura 4.

2. PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS.

Antes de iniciar cualquier procedimiento quirúrgico, los animales eran anestesiados mediante la aplicación de bajas temperaturas para lo cual eran colocados en el congelador durante 30 a 45 min. Transcurrido este tiempo los tallos oculares se fijaban temporalmente con algodón y cera de campeche, se inmovilizaban y bajo un microscopio de disección se procedía a la extirpación de la glándula sinusal. Para tener acceso a la glándula sinusal en la superficie dorsal del tallo ocular a operar se hacía un corte rectangular de aproximadamente 3 por 4 mm, se quitaba la cutícula y con unas pinzas se extraía la glándula sinusal la que se distingue por su posición dorsolateral y su color blanco iridiscente.

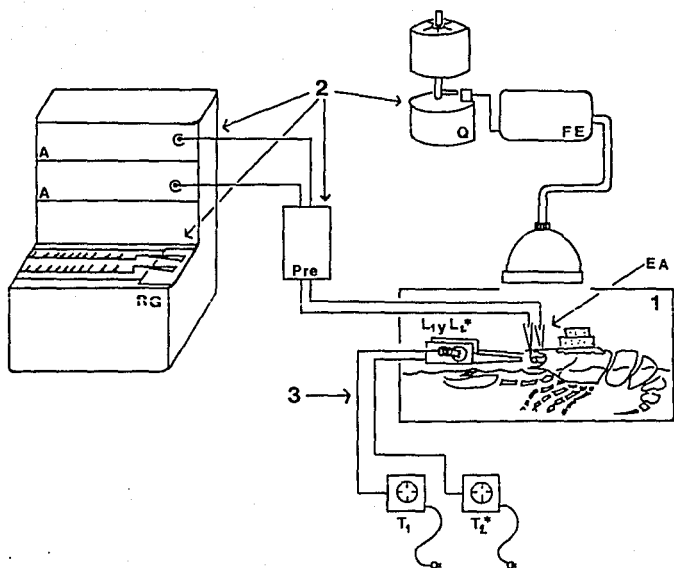


FIGURA 4. Dispositivo experimental: 1) Cámara de registro: EA, electrodos de acero; 2) Sistema de registro: Q, quimógrafo; FE, fotoestimulador; Pre, preamplificadores; A, amplificadores; RG, registrador gráfico, 3) Sistema de estimulación: L₁ y L₂, lámparas para aplicar los fotoperiodos; T₁ y T₂*, interruptores de tiempo; * sólo en los grupos 1b y 2b se usaron 2 lámparas y 2 interruptores de tiempo.

Para contrarrestar la hemorragia provocada por la operación, se mantenía al acocil en agua fría (entre 4 y 7 °C) y se añadía solución de Van Harreld (1936) fría a la herida; inmediatamente después se cerraba la herida con la cutícula que se había quitado.

Una vez terminada la operación, el acocil se dejaba en recuperación durante no menos de 48 horas antes de proceder a la extirpación de la glándula sinusal del ojo contralateral. Hecha esta segunda extirpación se dejaban transcurrir de 2 a 5 días antes de iniciar los registros electrofisiológicos.

3. FOTOPERIODOS.

Se establecieron dos protocolos experimentales (1 y 2). Cada uno se realizó tanto con animales intactos (testigos, grupos 1a y 2a) como con animales desprovistos de ambas glándulas sinusales (experimentales, grupos 1b y 2b). El primer protocolo (aplicado a los grupos 1a y 1b) consistió en dejar a los animales durante 4 días en oscilación libre en oscuridad constante (OO). A partir del 5° y hasta el 8° día de registro, uno de los ojos, escogido al azar, era estimulado con ciclos de luz oscuridad (fotoperiodo LO 12:12) en el que la luz se encendía a las 7 am y se apagaba a las 7 pm; del 9° y hasta el 13° día el fotoperiodo se invertía, es decir que la última fase de oscuridad del ciclo LO anterior se prolongaba 12 horas con el fin de que la oscuridad se iniciara ahora a las 7 am y se prolongara hasta el encendido de la luz a las 7 pm. Durante los 8 días de estimulación con fotoperiodo el otro ojo se había mantenido en oscuridad constante. En la última etapa de registro se suspendía la aplicación del fotoperiodo y se dejaban ambos ojos en oscilación libre en oscuridad constante (del día 13 al 16).

El segundo protocolo (aplicado a los grupos 2a y 2b) consistió en mantener el acocil durante los 4 primeros días de registro simultáneo del ERG en ambos ojos, bajo condiciones de oscilación libre en oscuridad constante. A partir del 5° día de registro se aplicaba un fotoperiodo LO 12:12 a un ojo y un fotoperiodo OL 12:12 al otro ojo, es decir que cada ojo recibía un fotoperiodo desfasado 180° con respecto al fotoperiodo del otro ojo. A partir del 9° día y hasta el término del experimento (12° día) se suspendía la aplicación de los fotoperiodos y el registro del ERG continuaba en condiciones de oscuridad constante.

4. ANALISIS DE RESULTADOS.

De cada registro se media el voltaje del ERG cada 15 minutos y se graficaba contra el tiempo transcurrido. Con la gráfica así obtenida se pusieron de manifiesto los cambios de amplitud que periódicamente muestra el ERG con ellos se calcularon los siguientes parámetros circadianos (Figura 5): a) el periodo de la oscilación, el cual se midió desde el inicio de la fase de actividad de un ciclo hasta el inicio de la fase de actividad del ciclo siguiente; con esta medida se calculó el periodo (circadiano o no) promedio de la oscilación de cada ojo; b) la relación entre los periodos de actividad (α) y de reposo (ρ); se consideró como periodo α el tiempo transcurrido desde que la amplitud del ERG alcanza el 50% del máximo hasta que regresa a ese mismo valor después de haber llegado al momento de máxima amplitud. El periodo de reposo de cada ciclo es, a su vez, el tiempo transcurrido desde que la amplitud del ERG está en el 50% hasta que regresa a ese mismo valor una vez que ha pasado por el valor de amplitud más bajo del ciclo. c) La amplitud relativa de la oscilación; la que se obtuvo como el resultado de dividir, en cada ciclo, el valor del voltaje del ERG más alto alcanzado durante la fase de actividad, entre el valor del voltaje del ERG más bajo alcanzado durante la fase de reposo; d) la diferencia de fase entre los dos ritmos. Para calcular

este parámetro se tomó como fase de referencia el momento de inicio de la fase de actividad de cada ciclo del ritmo de un ojo con respecto a la fase del ritmo del otro ojo; es decir que si los inicios de ambos ojos coincidían, se habla de una diferencia de fase (ϕ) igual a 0.

Con los parámetros que hemos señalado se pudieron caracterizar las oscilaciones circadianas de cada ojo antes, durante y después de la aplicación de los fotoperiodos, así como las relaciones que guardaron tales oscilaciones con las del ojo contralateral. Sin embargo y con el fin de visualizar con mayor claridad la influencia ejercida por los fotoperiodos sobre la oscilación circadiana, se elaboraron gráficas en las que a) se muestra la duración de la fase α (asociada con las horas de inicio y de término de cada ciclo) tanto del ojo que recibe un fotoperiodo como del ojo que se mantuvo en oscuridad constante; b) se muestra la duración de la fase α de cada ciclo cuando un ojo recibe un fotoperiodo LO y el otro recibe un fotoperiodo OL (figura 6).

Por último vale la pena hacer notar que las dos etapas de oscilación libre que hubo en cada experimento permitieron, la primera, establecer el carácter circadiano de la respuesta a la luz, y la segunda, comprobar si después de que se hubieran aplicado el o los fotoperiodos correspondientes, el ojo estimulado y el ojo contralateral, cuando era el caso, mostraban alguna característica en oscilación libre que pusiera de manifiesto la capacidad sincronizadora de los fotoperiodos aplicados. De hecho, se estableció como criterio de sincronización el que al regresar a oscilación libre hubiera cambios en el ritmo circadiano que se pudieran asociar con el fotoperiodo previamente aplicado.

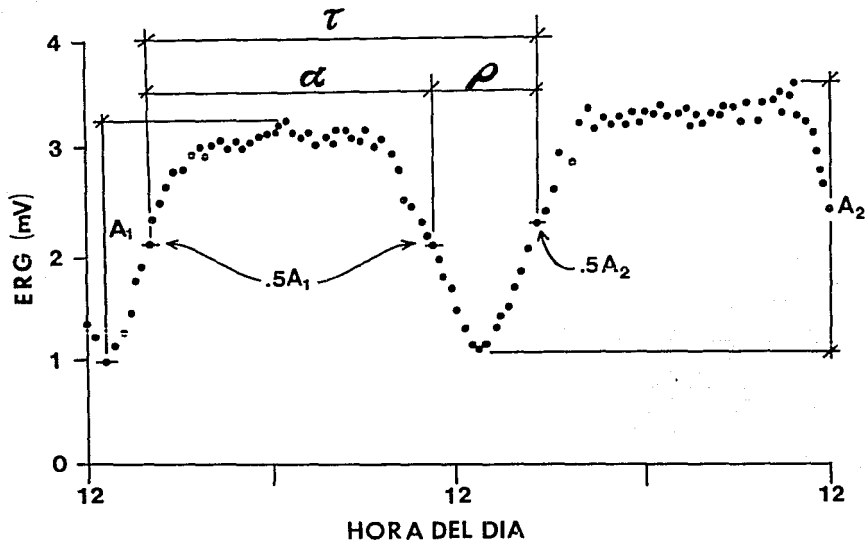


FIGURA 5. Parámetros para evaluar el ritmo circadiano que se utilizan en este trabajo: Fase de actividad (α), Fase de reposo (ρ), Periodo (τ) y Amplitud Relativa de cada ciclo (A_1 y A_2). El 50% de la AR de cada ciclo ($.5A_1$ y $.5A_2$) se tomó como la fase de referencia para señalar el inicio y fin de la fase de actividad; el periodo se midió del inicio de actividad de un ciclo al inicio de actividad del siguiente ciclo.

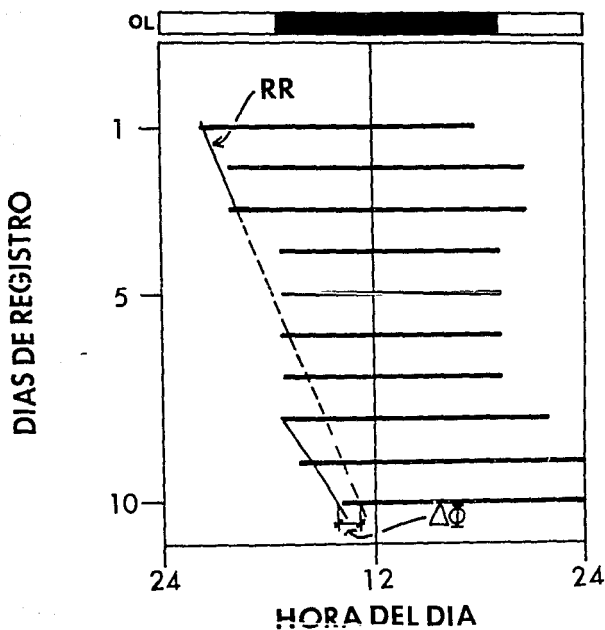


FIGURA 6. Gráfica del periodo de actividad (α) con respecto al tiempo externo. En el eje de las abscisas representa el tiempo externo de 0 a 24 horas, y el eje de las ordenadas representa los días de registro. La barra superior corresponde al momento en que se aplica el fotoperiodo, la región blanca es la fase de iluminación y la negra es la de oscuridad; en éste ejemplo el animal se mantuvo en OO del día 1 al 3, después se mantuvo en OL 12:12 del día 4 al 7 y finalmente se regresó a OO del día 8 al 10. Las líneas horizontales negras representan el tiempo de actividad del animal en cada ciclo, asociando el inicio y el término de la actividad con la hora externa en que ocurrieron. La recta de regresión (RR) es la recta que mejor se ajusta por mínimos cuadrados a los puntos de inicio de actividad. Extrapolando la recta del primer al segundo periodo en oscuridad constante, se puede medir el desfase producido por el fotoperiodo.

"La experimentación es una forma de pensar así como una expresión práctica del pensamiento."

P. B. Medawar, 1979.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados.

1. GRUPO 1a.

El grupo 1a quedó formado por 7 animales intactos de los que se obtenía el ERG de un ojo colocado en condiciones de OO durante los primeros 4 días del experimento; en LO 12:12 desde el 5o y hasta el 8o día de registro; en OL 12:12 desde el 9o hasta el 12o día y en OO de nueva cuenta desde el 13o día hasta el final del experimento. El ERG del ojo contralateral se obtenía durante todo este tiempo sólo que en condiciones de OO. Las características del ritmo de amplitud del ERG durante los primeros 4 días en OO, y la relación de fase que muestran los ritmos de ambos ojos corresponden a lo que han descrito otros autores (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981; Moreno Sáenz y col., 1987) y se muestran en la primera parte de la figura 7. Esto es, ambos ritmos muestran su fase de actividad durante la noche, tienen periodos cercanos a 24 horas, su relación entre el tiempo de actividad (α) y el tiempo de reposo (ρ) (relación α/ρ) es mayor de 1 y la relación de fase entre ellos es muy cercana a 0. Al aplicarse el fotoperiodo (segunda parte de la figura 7) LO 12:12 (con la fase luminosa de las 7 am a las 7 pm), sólo a un ojo, éste mostró cambios muy evidentes en los parámetros del ritmo circadiano del ERG. Así, el periodo tuvo un valor de 24 horas exactas, la relación α/ρ se ajustó a 1 y hubo una caída del ERG tan notable cada vez que se iniciaba la fase de iluminación, que la relación entre la amplitud de cada ciclo durante la noche con respecto a la amplitud durante el día (amplitud relativa del ciclo) se vio claramente incrementada (ver Tabla 1).

La inversión del fotoperiodo a OL 12:12 (el encendido a las 7 pm y el apagado a las 7am) fue seguido por el ERG después de un pequeño ajuste que se tradujo en un incremento del periodo de actividad (α) durante el primer ciclo. En lo que respecta al ritmo del ERG del ojo colocado en OO, mantuvo un nivel de actividad similar al que mostraba desde el principio del registro. Sin embargo su periodo se ajustó, casi de inmediato, al del ritmo del ojo contralateral con el que retuvo la estrecha relación de fase que mostraba durante la oscilación libre; la relación de fase se mantuvo todo el tiempo en el que se aplicó el fotoperiodo normal o el invertido. En la segunda parte de la figura 7 (trazo superior) se muestran los 8 días que duraba el registro de un ojo en fotoperiodo de un animal del grupo 1a. El trazo superior corresponde al voltaje del ERG del ojo que recibe el FP y el trazo inferior muestra la amplitud del ERG del ojo que se mantuvo en OO. Puede notarse que durante la transición del FP LO 12:12 a OL 12:12, ambos ritmos prolongan su fase de actividad. También se observa que en el primer ciclo del fotoperiodo OL, el ERG del ojo que lo recibe muestra, hacia las 7 am, una reducción de voltaje que sugiere que el animal "recuerda" el momento en el que la luz se encendía durante el fotoperiodo LO 12:12. En el ojo contralateral se observa, a la misma hora, una caída en el ERG que pone de manifiesto un seguimiento de la señal generada en el otro ojo.

Al regresar el ojo estimulado con LO y OL a la condición de OO (trazo superior de la última parte de la figura 7) la fase del ciclo circadiano volvió a cambiar ligeramente durante el primer día; a partir del segundo día y hasta el término del experimento el ritmo mostró su actividad máxima durante el día lo que sugiere que el acocil "recordó" el fotoperiodo OL al que estuvo sometido los días anteriores. Por su parte el ojo contralateral (el cual no recibió fotoperiodo en ningún momento)(trazo inferior de la última parte de la figura 7) mantuvo su ritmo circadiano ajustado al del ojo previamente estimulado, lo que sugiere la posibilidad de que la sincronización se ejerza desde el ojo que recibió el fotoperiodo hacia el que se mantuvo en OO y no al contrario.

En la figura 8 se muestran los periodos de actividad (α) del ritmo del ERG durante los días que se aplicó el fotoperiodo, tanto el LO como su inversión a OL 12:12 (trazos de la parte superior, A) así como el α del ritmo del ERG del ojo que se mantenía en OO (trazos de la parte inferior, B). El ajuste de la fase del ritmo en OO con respecto a la que le impone el ojo en FP se lleva a cabo a partir del segundo ciclo en LO; al cambiar el fotoperiodo a OL hubo un segundo alargamiento en el periodo de actividad del ojo no estimulado, lo que significó un ajuste al ojo contralateral a partir del 2o día en que éste recibió el fotoperiodo OL.

TABLA 1. Valores promedio del Grupo Ia: Periodo: τ , relación α/ρ , amplitud relativa: AR; \pm el error estándar de cada uno. Condición del ojo estimulado: COND (el ojo no estimulado permanece siempre en OO); ojo estimulado con luz: OE; ojo no estimulado: O no E; primera oscilación libre: OO₁; fotoperiodo: FP; inversión del fotoperiodo: FPi; segunda oscilación libre: OO₂.

	τ		α/ρ	
	OE	O no E	OE	O no E
OO ₁	24.5 \pm 0.83	24.91 \pm 0.65	2.22 \pm 0.18	2.59 \pm 1.53
FP	24.23 \pm 0.16	24.3 \pm 0.33	0.97 \pm 0.02	2.30 \pm 0.18
FPi	23.73 \pm 0.39	23.93 \pm 0.9	1.05 \pm 0.15	1.95 \pm 0.15
OO ₂ *	22.98 \pm 0.63	23.75 \pm 0.50	2.81 \pm 0.33	3.86 \pm 0.24
	COND		AR	
	OE	O no E		
OO ₁	1.53 \pm .09	1.59 \pm 0.19		
FP	3.56 \pm 0.37	1.67 \pm 0.06		
FPi	3.02 \pm 0.30	1.76 \pm 0.06		
OO ₂ *	1.44 \pm 0.03	1.57 \pm 0.04		

* N = 3

FIGURA 7. Gráfica de la amplitud del ERG contra el tiempo. El eje vertical representa la amplitud del ERG en mV y el eje horizontal el tiempo externo en horas. La barra superior indica los periodos de oscuridad (negro) y de iluminación (blanco). El trazo superior corresponde al ojo estimulado con fotoperiodos y el trazo inferior al ojo no estimulado. (Detalles en el texto).

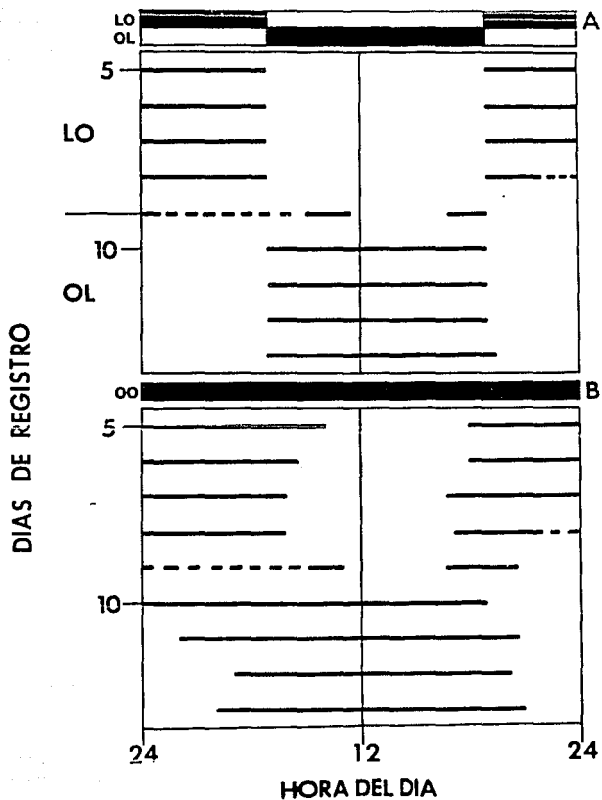


Figura 8. Gráfica que muestra las fases de actividad (α) de un animal del grupo Ia. En el eje vertical se grafican los días de registro y en el horizontal el tiempo externo de 0 a 24 horas. Las barras que se encuentran en la parte superior de cada trazo representan la condición en la que se encuentra el animal, oscuridad en negro, iluminación en blanco. El trazo A corresponde al ojo estimulado con fotoperíodos LO y OL de la figura 7, el trazo B, corresponde al ojo que se mantuvo en OO durante todo el experimento en la misma figura (ver detalles en el texto).

2. GRUPO 1b.

Los animales de este grupo experimental fueron desprovistos de las dos glándulas sinusales siguiendo el procedimiento que se describió en la sección de material y métodos. La secuencia experimental que se siguió con estos animales fue la misma que se aplicó a los animales intactos del grupo 1a y por medio de ella se puso de manifiesto la posible participación de la glándula sinusal en: a) la presencia de un ritmo circadiano; b) el seguimiento del fotoperiodo por parte del ojo estimulado y c) el seguimiento de la actividad del ojo estimulado por parte del ojo que se mantiene todo el tiempo en oscilación libre. Los resultados de esta sección experimental fueron los siguientes: Durante la fase de oscilación libre (OO), ninguno de los dos ojos mostró una clara actividad circadiana (ver Tabla 2). Esta se vio sustituida por la presencia de ciclos de alta frecuencia y de frecuencias más bajas pero sumamente irregulares. La aplicación del régimen fotoperiódico LO 12:12 a uno de los dos ojos dio como resultado que durante la fase de iluminación la amplitud de la respuesta se redujera ostensiblemente, y que en la fase de oscuridad se presentara el incremento esperado. Evidentemente esto significa la aparición de una oscilación de 24 horas que se presentó todo el tiempo que la preparación recibió el fotoperiodo, fuera éste LO o de OL Sin embargo al regresar el ojo a condiciones constantes fue notable la ausencia de oscilación circadiana quedando en su lugar una actividad básicamente ultradiana. (figura 9).

Por lo que respecta al ojo contralateral el cual permaneció todo el tiempo en OO, mantuvo el mismo tipo de respuesta que tuvo desde el principio del experimento (es decir, con oscilaciones muy irregulares), evidenciando la ausencia de un ritmo circadiano bien definido tanto cuando el ojo contralateral está en OO como cuando está bajo la influencia de los fotoperiodos LO u OL.

En la figura 9 se incluye el registro del ERG de los dos ojos de un animal del grupo 1b durante dos de los días en que ambos ojos permanecieron en oscilación libre (primera parte de la figura 9). En la parte media de la figura y en el trazo superior, se muestra el ERG del ojo que recibió el fotoperiodo LO u OL, en el trazo inferior se muestra el ERG del ojo que se mantuvo en OO todo el registro; la última parte de la figura corresponde, en la parte superior, al ERG del ojo previamente estimulado con LO y OL, una vez que fue regresado a la condición de OO y por último, muestra el ERG del ojo contralateral. Es claro que durante las dos fases de LO y OL, el ojo estimulado ajusta la amplitud del ERG a la entrada y la salida del estímulo luminoso y que al regresar a OO, la amplitud vuelve a presentar una frecuencia irregular semejante a la que mostró durante los primeros ciclos en oscilación libre. Por lo que respecta al ojo que se mantuvo todo el tiempo en OO, no tuvo, en ningún momento del registro, alguna modificación en su patrón de actividad (la cual mostró ciclos muy irregulares) que sugiera alguna influencia proveniente del ojo contralateral, ya que además a este patrón irregular en la amplitud del ERG se puso de manifiesto una ausencia completa de relación de fase con el ojo estimulado tanto durante la estimulación como durante la oscilación libre.

En la figura 10 se presenta una gráfica en la que en la parte superior se muestra la duración del periodo de actividad (α) de cada ciclo transcurrido bajo el régimen fotoperiódico (sea LO u OL) del ojo que recibió la estimulación (A). En la parte inferior de la misma figura (B) se incluye la duración del periodo de actividad del ojo colocado en oscilación libre durante

el mismo tiempo que el otro ojo recibió el fotoperiodo. Vuelve a comprobarse que ni la duración ni el inicio ni el término de la fase de actividad se ajustan a los que tiene el ojo sometido a fotoperiodo.

TABLA 2. Valores promedio del Grupo 1b: Periodo: τ , relación α/ρ , amplitud relativa: AR; \pm el error normal de cada uno. Condición del ojo estimulado: COND (el ojo no estimulado permanece siempre en OO); ojo estimulado con luz: OE; ojo no estimulado: O no E; primera oscilación libre: OO₁; fotoperiodo: FP; inversión del fotoperiodo: FPI; segunda oscilación libre: OO₂.

COND	τ		α/ρ	
	OE	O no E	OE	O no E
OO ₁	No hubo ritmo medible		No hubo ritmo medible	
FP	23.98 \pm 0.10	20.22 \pm 1.17	0.97 \pm 0.01	2.82 \pm 1.02
FPI	24.13 \pm 0.18	----	0.97 \pm 0.28	----
OO ₂	No hubo ritmo medible		No hubo ritmo medible	
	COND		AR	
	OE		O no E	
	OO ₁	No hubo ritmo medible		
	FP	2.59 \pm 0.36	1.26 \pm 0.04	
	FPI	2.19 \pm 0.28	----	
	OO ₂	No hubo ritmo medible		

FIGURA 9. Gráfica de la amplitud del ERG contra el tiempo de un animal del grupo Ib al que se le extrajeron ambas glándulas sinusales. El eje vertical representa la amplitud del ERG en mV y el eje horizontal el tiempo externo en horas. La barra superior indica los periodos de oscuridad (negro) y de iluminación (blanco). El trazo superior corresponde al ojo estimulado con fotoperiodos y el trazo inferior al ojo que se mantuvo en OO (ver detalles en el texto).

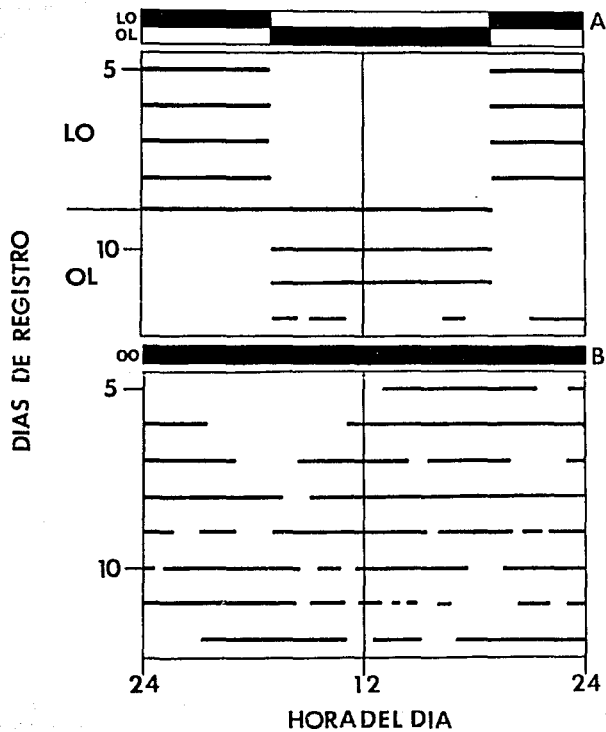


Figura 10. Grafica de las fases de actividad (α). En el eje vertical se grafican los días de registro y en el horizontal el tiempo externo de 0 a 24 horas. Las barras que se encuentran en la parte superior de cada trazo representan la condición en la que se encuentra el animal, oscuridad en negro, iluminación en blanco. El trazo superior (A) corresponde al ojo estimulado con fotoperiodo de la figura 9 y el trazo inferior (B) al ojo no estimulado de la misma figura.

3. GRUPO 2a.

El registro simultáneo del ERG de los dos ojos de una animal intacto cuando a un ojo se le aplicó un fotoperiodo LO 12:12 y al otro, un fotoperiodo desfasado 180° (OL 12:12), puso de manifiesto la gran influencia que ejerce la luz sobre la oscilación circadiana (Figura 11 y Tabla 3). En efecto, durante los primeros días del registro los dos ojos estuvieron en oscilación libre, lo que significó el mantenimiento de una estrecha relación de fase entre los dos ritmos. A partir del momento el que cada ojo recibió su correspondiente fotoperiodo mantuvo con el una estrecha relación de fase, relación que se puso de manifiesto por un ajuste completo del ritmo circadiano a las 24 horas de duración del fotoperiodo, con la máxima actividad durante la oscuridad y la mínima durante la iluminación, lo que determinó que cada ojo se desfasara 180° con respecto al contralateral. Al regresar ambos ojos a la condición de oscuridad constante se requirió un tiempo considerablemente grande para que se restableciera una relación de fase semejante a la que mostraron durante la primera etapa en OO. A pesar de la fuerza que tiene la luz para determinar la duración del periodo circadiano, es decir para hacer que tenga un valor igual a 24 horas, los ritmos de los dos ojos que como se dijo, están desfasados 180° durante la aplicación de los fotoperiodos muestra interacciones muy evidentes. Así, en el trazo de la figura 11 se puede ver que la amplitud de la respuesta del ojo que se muestra en la parte superior aumenta cuando la luz se apaga, pero disminuye inmediatamente después a pesar de que la luz sigue apagada concidiendo esta disminución con el que el ojo contralateral tiene una respuesta muy baja debido a que en ese momento la luz está encendida. Por otra parte, y continuando con el análisis del mismo trazo superior, puede comprobarse que cuando la luz se enciende, el ERG se reduce como es de esperarse pero la amplitud de la respuesta empieza a crecer a pesar de que la luz continúa encendida. Este incremento coincide a su vez con el que la respuesta del ojo contralateral es máxima ya que este ojo está en la fase de oscuridad del fotoperiodo con el que es estimulado. Un hecho interesante que debe hacerse notar es que la influencia descrita parece ser mayor de un ojo a otro (del ojo representado en el trazo inferior al representado en el trazo superior en el ejemplo del que hablamos) es decir parece haber una influencia asimétrica entre los dos ojos, lo que sugiere la dominación de uno con respecto al otro.

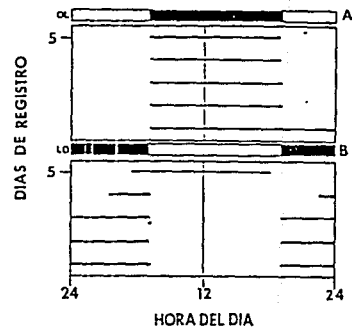
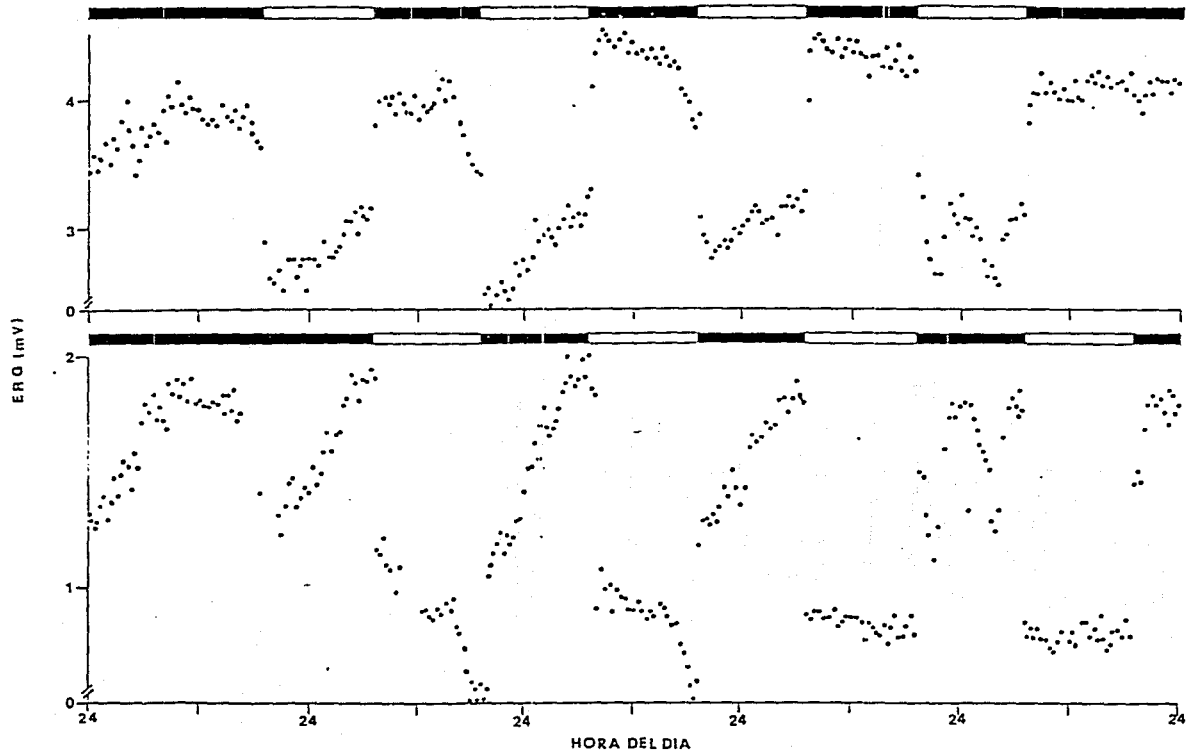
La figura 11 (gráfica de la derecha) muestra los resultados de la parte de este experimento en la que cada ojo recibe un fotoperiodo desfasado 180° con respecto al fotoperiodo que recibe el otro ojo. Se comprueba lo dicho en párrafos anteriores acerca del desfasamiento de 180° entre la actividad de cada ojo inducido por la estimulación fotoperiódica. La parte de la derecha de la figura 11 expresa en esencia los mismos resultados sólo que el ritmo circadiano de cada ojo queda ahora representado por la duración de la fase de actividad (α). Dada la gran fuerza que tiene la luz como sincronizadora del ritmo del ERG, no es de extrañar que, a pesar de la influencia que hay entre los dos ojos, el inicio y el término de la fase de actividad de cada uno de ellos están determinados por la salida y la entrada de la luz, respectivamente.

TABLA 3. Valores promedio del Grupo 2a: Periodo: τ , relación α/ρ , amplitud relativa (AR); \pm el error normal de cada uno. Condición en la que se encuentra el animal: COND; ojo derecho: OD; ojo izquierdo: OI; primera oscilación libre: OO1; fotoperiodo: FP (LO en un ojo y OL en el otro); segunda oscilación libre: OO2.

COND	τ		α/ρ	
	OD	OI	OD	OI
OO1	22.08 \pm 1.15	20.28 \pm 1.36	1.79 \pm 0.26	1.72 \pm 0.26
FP	24.07 \pm 0.14	24.05 \pm 0.37	0.99 \pm 0.07	1.32 \pm 0.38
OO2	19.00 \pm 0.26	18.19 \pm 1.95	4.84 \pm 2.07	1.81 \pm 0.37
	COND		AR	
	OE		O no E	
	OO1	1.34 \pm 0.08	1.48 \pm 0.04	
	FP	1.76 \pm 0.06	2.31 \pm 0.29	
	OO2*	1.18 \pm 0.01	1.52 \pm 0.03	

* Sólo un registro.

FIGURA 11. Gráfica de la amplitud del ERG contra el tiempo, generada con los datos de un animal del grupo 2A al que se aplicaron fotoperiodos desfasados 180° en ambos ojos. El eje vertical representa la amplitud del ERG en mV y el eje horizontal el tiempo externo en horas. La barra superior indica los periodos de oscuridad (negro) y de iluminación (blanco). En la parte derecha se muestran los trazos correspondientes a las fases de actividad (α) de cada ojo durante la estimulación con fotoperiodos desfasados 180° . (ver detalles en el texto).



4. GRUPO 2b.

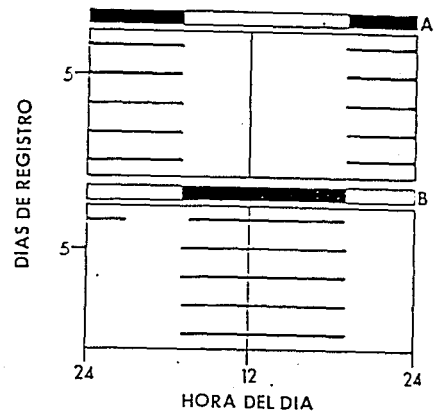
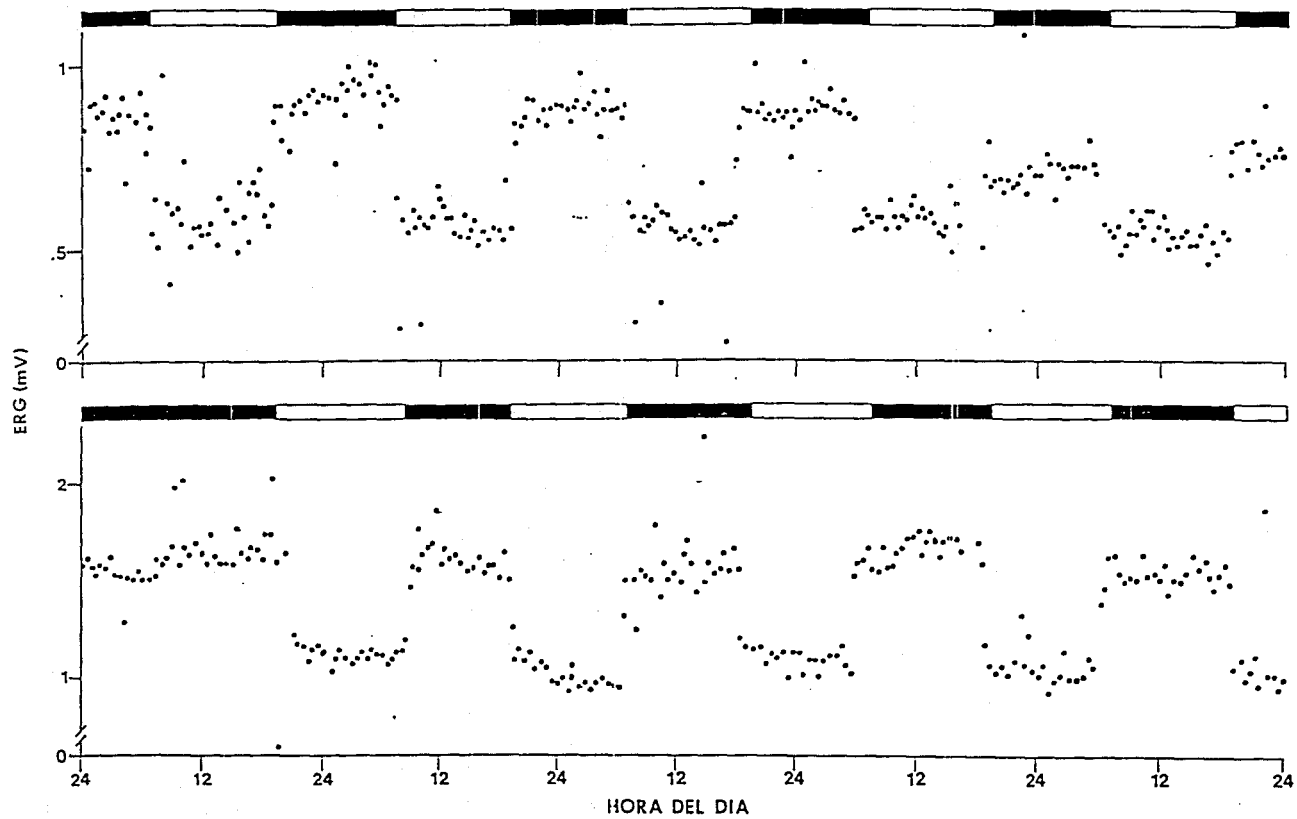
La figura 12 muestra a la izquierda, parte de los resultados de haber aplicado a animales desprovistos de las glándulas sinusales, la maniobra experimental que se detalla en la sección anterior consistente en hacerles llegar, después de haber registrado simultáneamente los dos ojos en OO, un fotoperiodo LO 12:12 a un ojo y un fotoperiodo OL 12:12 al otro ojo, siendo reintegrados después a oscuridad constante. Sólo se incluyen los 4 días de registro simultáneo bajo los regímenes luminosos desfasados. Este tiempo fue suficiente para comprobar que cada uno de los ojos sigue en forma total las correspondientes fases de oscuridad e iluminación del fotoperiodo aplicado. Durante los dos periodos en los que los animales estuvieron en oscuridad constante (al inicio y al término del experimento) no hubo oscilación circadiana en ninguno de los dos ojos por lo que no hubo ninguna posibilidad de enfasamiento entre ellos. Debido a que estos resultados son semejantes a los que se tuvieron en los experimentos 1b, durante la fase de oscuridad constante, no los mostramos en esta sección. Es, sin embargo, un hecho que en animales desprovistos de glándulas sinusales el ritmo de amplitud del ERG no mantiene características circadianas evidentes durante la oscuridad constante, por lo tanto, no es sincronizable por la aplicación de señales fotoperiódicas. En la parte derecha de la misma figura se incluyen los incisos y términos de la fase de actividad de los dos ojos durante la estimulación fotoperiódica, comprobándose que en ningún momento la actividad de un ojo influye sobre la del otro.

TABLA 4. Valores promedio del Grupo 2b: Periodo (τ), relación α/ρ , amplitud relativa (AR); \pm el error normal de cada uno. Condición en la que se encuentra el animal: COND; ojo derecho: OD; ojo izquierdo: OI; primera oscilación libre: OO₁; fotoperiodo: FP (LO en un ojo y OL en el otro); segunda oscilación libre: OO₂.

COND	τ		α/ρ	
	OD	OI	OD	OI
OO ₁ *	33.81 \pm 3.32		3.80 \pm 1.08	
FP	23.37 \pm 0.49	23.06 \pm 0.37	1.02 \pm 0.03	1.02 \pm 0.05
OO ₂ #	No hubo ritmo medible		No hubo ritmo medible	
	COND		AR	
	OE		O no E	
	OO ₁	1.53 \pm 0.28		
	FP	1.68 \pm 0.07	1.88 \pm 0.11	
	OO ₂	No hubo ritmo medible		

* N = 4 # Sólo 2 oscilaciones en un registro.

FIGURA 12. Gráfica de la amplitud del ERG contra el tiempo de un animal desprovisto de ambas glándulas sinusales (grupo 2b) al que se aplicaron fotoperiodos desfasados 180° en ambos ojos. El eje vertical representa la amplitud del ERG en mV y el eje horizontal el tiempo externo en horas. La barra superior indica los periodos de oscuridad (negro) y de iluminación (blanco). En la parte derecha de la figura se muestra la gráfica correspondiente a los periodos de actividad (α) de cada ojo que recibió un fotoperiodo desfasado 180° con respecto al contralateral (ver detalles en el texto)



"Die 24-Stündige Periodik... Sie ist gleichsam die Einheit unserer Natürlichen Chronologie."

W. Hüfeland, 1798.

"Why this absurd concern with clocks, my friend?"

W. de la Mare, The winged chariot.

DISCUSION

1. ERG Y RITMO DE AMPLITUD DEL ERG.

La técnica empleada para registrar el ERG fue en esencia la misma utilizada por Naka y Kuwabara en 1959, así como otros autores posteriores (e. g., Aréchiga y Wiersma, 1969; Page y Larimer, 1975; Barrera-Mera, 1976; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981; Moreno-Sáenz y cols., 1987). Básicamente, el ERG manifiesta el cambio de voltaje que presentan grupos de fotorreceptores visuales ante la llegada de un estímulo luminoso, cambio que es recogido por un electrodo colocado extracelularmente. A diferencia de lo que sucede en muchas otras especies animales, el electroretinograma del acocil sólo depende de la actividad eléctrica de los fotorreceptores visuales (Naka y Kuwabara, 1959) hecho que resulta sumamente importante en la interpretación de registros del ERG a largo plazo (ver más adelante).

Los registros a largo plazo del ERG que aquí se muestran se hicieron en condiciones ambientales constantes con el fin de corroborar la presencia del ritmo circadiano de amplitud del ERG del acocil que ha sido propuesta por muchos autores (Aréchiga y cols., 1973; Barrera-Mera, 1976, 1978; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1980; Fuentes-Pardo y cols., 1984; Moreno-Sáenz y cols., 1987). No está por demás insistir que tal constancia ambiental no excluye de ninguna manera la presencia de las señales luminosas que se requieren para la generación del ERG. Una vez que se hubieron establecido las características esenciales del ritmo circadiano del ERG en condiciones ambientales constantes también conocidas como las condiciones de oscilación libre, se procedió a estudiar el efecto que ejerce la alternancia de periodos de luz y oscuridad (fotoperiodos) sobre esas características. En el caso de los registros en oscilación libre, los parámetros medidos (periodo, amplitud relativa, relación α/ρ , fase), dieron valores coincidentes en todo con los que han sido propuestos por otros autores (Page y Larimer, 1975; Barrera-Mera, 1976; Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1980; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981; Moreno-Sáenz y cols., 1987) lo que equivale a decir que fueron los esperados de un sistema endógeno perteneciente a un organismo con hábitos nocturnos (tabla 1, figura 7). En cuanto al registro simultáneo del ERG desde ambos ojos, debe hacerse notar que, por una parte, puso de manifiesto la estrecha relación de fase que mantienen entre sí los ritmos de ambos ojos; esto corrobora lo que otros autores han propuesto acerca de la existencia de relaciones anatomofuncionales entre ambos tallos oculares.

En lo que respecta a la llegada de señales luminosas periódicas (LO 12:12 u OL 12:12), debe hacerse notar que la intensidad empleada siempre fue lo suficientemente baja para que el ojo pudiera captar la presencia de la señal luminosa de prueba. Este hecho aseguró el registro del ERG en forma sostenida durante los 4 u 8 días que duraba esta fase de los experimentos. En realidad la aplicación del régimen fotoperiódico tuvo por objeto establecer hasta qué punto el ritmo de amplitud del ERG puede ser sincronizado por las señales

luminosas periódicas. Como la fase de iluminación del fotoperiodo siempre indujo una disminución en la amplitud del ERG fue necesario establecer algún criterio que permitiera discriminar entre la reducción del ERG asociada con la fase de iluminación del fotoperiodo y los cambios en el ritmo resultantes del posible efecto sincronizador del régimen fotoperiódico. Así el criterio empleado fue la persistencia de los efectos producidos por la luz durante la aplicación del régimen LO ú OL, una vez que el organismo hubiera regresado a las condiciones de oscuridad constante, lo cual se llevaba a cabo durante los últimos cuatro días del experimento; esta fue la razón por la que todos los experimentos terminaron con el regreso de los animales a las condiciones ambientales constantes.

2. SINCRONIZACION.

A. Sincronización interna.

Si un animal se mantiene en condiciones constantes de luz, de temperatura o de cualquier otro estímulo que potencialmente pueda representar un sincronizador externo, sus ritmos circadianos tienden a mantener una relación de fase estable entre ellos, sea porque coinciden sus máximos y mínimos o porque entre ellos transcurre un cierto tiempo relativamente constante. En algunos casos los ritmos mantienen sus relaciones de fase por mucho tiempo. Así, por ejemplo, Aschoff (1965a, 1981b) observó que los ritmos de sueño-vigilia y de temperatura en humanos, se pueden mantener en fase durante varias semanas lo que significa que existe un fuerte acoplamiento interno entre los diferentes osciladores que componen el sistema circadiano.

En otros casos, los sistemas oscilantes responsables de dos o más ritmos circadianos evidentes pueden perder su relación de fase y hacer que los ritmos se disocien. Aschoff (1965a) observó en humanos que alrededor de un 10% de los sujetos experimentales mostraba disociación entre los ritmos de sueño-vigilia y de temperatura. En algunos roedores particularmente en cricetos, en condiciones de luz constante se ha descrito que puede presentarse una disociación ("splitting") de su ritmo de actividad en dos componentes (Pittendrigh, 1967, 1974; Pittendrigh y Daan, 1976a). Otra forma de desincronización interna ha sido descrita como resultado de la aplicación de señales periódicas contradictorias a monos. Estos fueron colocados bajo un fotoperiodo 12:12 y al mismo tiempo se les aplicó un régimen que consistió en 1 hora de alimento y 23 de ayuno, los estímulos alimenticios estaban desfasados con respecto al régimen LO lo que provocó que los ritmos de los animales se separaran en 2 grupos. Por un lado el ritmo de temperatura, se sincronizó con el fotoperiodo y, por otro el ritmo de excreción urinaria de potasio se sincronizó con el ritmo de alimentación (Sulzman y cols., 1978). Así pues, en algunos casos la sincronización interna se puede perder con relativa facilidad lo que implica que los osciladores correspondientes están débilmente acoplados.

Con nuestros resultados estamos en condiciones de asegurar que en el acocil existe una sincronización interna entre los osciladores responsables del ritmo del ERG en cada tallo ocular y que en este proceso es determinante la participación de la glándula sinusal ya que en los animales intactos (figura 7 y 8) la relación de fase entre los ritmos de ambos ojos es muy grande (Tabla 1) lo mismo en oscilación libre que durante los días de aplicación del régimen fotoperiódico o cuando el animal ha sido regresado a la condición de oscuridad constante. De hecho, es en esta etapa en la que el enfasamiento entre ambos ojos es más evidente. Mientras que cuando el animal

ha sido desprovisto de sus glándulas sinusales (figura 9 y 10) desaparece la constancia en la relación de fase y lo que queda del ritmo circadiano en cada ojo es una actividad básicamente ultradiana e irregular en la que no es posible establecer ni siquiera un claro patrón circadiano.

La participación de la glándula sinusal en los procesos de sincronización interna parece implicar la activación de un reflejo neuroendocrino. En efecto, si se observa con cuidado los resultados obtenidos de someter a un ojo a un régimen fotoperiódico mientras que el otro se mantiene en oscilación libre (figura 7) se comprueba que éste ajusta la fase de su ritmo a la que se presenta en el ojo estimulado con el fotoperiodo y que para que se lleve a cabo este ajuste transcurre un tiempo relativamente largo (del orden de minutos) lo que coincide con el tiempo que requieren los reflejos neuroendocrinos para manifestarse (Fuentes-Pardo y García, 1979). En este mismo orden de ideas, se propone que la hormona dispersora del pigmento distal (HDPD) es la principal responsable de que se lleve a cabo el ajuste de fase entre los osciladores de ambos tallos oculares. Es decir que habría una liberación de HDPD durante la fase de iluminación del fotoperiodo (12 horas) la cual afectaría no sólo al ojo que recibe la iluminación sino también al ojo que se mantiene en oscuridad constante el cual sólo dispone de la producción circadiana de HDPD. Como es bien sabido la HDPD induce cambios del pigmento distal hacia la posición de adaptación a la luz (Kleinholz 1961) y reduce la sensibilidad a la luz del receptor mismo. Si a estos hechos se añade el que la liberación de esta hormona sigue un patrón circadiano (Moreno-Sáenz y cols., 1987; Hernández-Falcón y cols., 1987) resulta tentador proponerla como un elemento básico en el acoplamiento de los ritmos circadianos del ERG del tallo ocular.

En apoyo de esta interpretación está el hecho establecido en isópodos (Chiang y Steel, 1985) de un acoplamiento de la actividad eléctrica entre las dos glándulas sinusales.

En los trabajos presentados en esta tesis, las señales contradictorias corresponden a los fotoperiodos aplicados en los experimentos de los grupos 2a y 2b en los que cada ojo recibió un fotoperiodo LD 12:12 desfasado 180° uno de otro. En dos casos del grupo 2A se observó una disociación expresada como una pérdida del ritmo en ambos ojos, en un tercer caso, (figura 11) no hubo pérdida del ritmo pero las interacciones entre ambos ojos fueron tales que hicieron que la forma de la onda de cada ritmo se distorsionara, y que al regresar a la condición de oscilación libre, pasaran varios ciclos antes de recuperar su periodo original.

Otra evidencia de los procesos de sincronización interna que ocurren en el acocil, son los experimentos con los protocolos 1a y 2a ya que en ellos el fotoperiodo aplicado a un ojo es capaz de poner en fase al ojo que no es estimulado (grupo 1a) o bien produce interacciones entre los dos ojos o un desacoplamiento interno (grupo 2a), esto implica, necesariamente, la existencia de un sistema de acoplamiento entre los osciladores responsables del ERG en ambos ojos.

B. Sincronización externa.

Como se mencionó en la introducción, la sincronización externa se realiza cuando el ritmo de un organismo al que se le aplican estímulos periódicos cambia su periodo de oscilación libre y lo hace igual al de la señal externa y establece con ella una relación estable de fase. Se ha descrito que durante el proceso de sincronización con la señal periódica externa el ritmo puede presentar un periodo transitorio antes de mostrar una relación de fase estable con ella (Pittendrigh, 1981b, Moore-Ede y cols., 1982), el periodo transitorio no siempre aparece como se infiere de la observación de Horne y Renninger (1988) en el ritmo circadiano del ERG de *Limulus*.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la gran fuerza de sincronización que ejerce la luz, aplicada en ciclos de 12 horas que se alternan con 12 horas de oscuridad, sobre el ritmo circadiano del ERG. De hecho en las figuras 7 y 9 correspondientes a los animales intactos y desprovistos de glándulas sinusales, respectivamente, se comprueba como un resultado inmediato al inicio de la fase de iluminación que el ERG disminuye abruptamente para mostrar un brusco incremento en la amplitud en cuanto se inicia la fase de oscuridad del régimen aplicado. Estos hechos hacen que el ritmo del ERG muestre una forma casi cuadrada durante la aplicación de los ciclos de luz y oscuridad. Sin embargo una comparación cuidadosa entre las figuras 7 y 9, pone de manifiesto que en los animales intactos la fase máxima de actividad (pico) del ritmo circadiano coincide con la etapa de oscuridad de ambos regímenes LO y OL y que aun después que éste se ha quitado y el animal regresa a oscuridad constante, la fase de actividad máxima es la misma que le había impuesto el régimen OL, lo que implica que el animal se comportó en esos días como si fuera diurno. En los animales sin glándulas sinusales, en cambio, la aplicación de LO y OL sólo significó que el ERG siguiera la fase de luz y de oscuridad de los ciclos con aumento y disminución de amplitud, respectivamente, pero que al regresar al acocil a las condiciones de oscuridad constante, no hubiera ningún indicio del régimen OL al que habían sido sometidos los acociles en el tiempo inmediato anterior y a que, como lo mencionamos en párrafos anteriores, en ausencia de algún régimen fotoperiódico, los animales desprovistos de glándulas sinusales muestran ciclos ultradianos bien establecidos y sólo rastros de ciclos circadianos. Es evidente que en estas condiciones no se puede hablar de sincronización.

El protocolo que se empleo en la segunda parte de nuestros experimentos, nos llevó a corroborar algunas de las proposiciones que han quedado establecidas durante la discusión de nuestros resultados. Así, la fuerza de la luz como potencial sincronizador fue corroborada con estos experimentos ya que, lo mismo en animales intactos (figura 11) que en animales desprovistos de glándulas (figura 12) el inicio y el término de las etapas de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo significó que la amplitud del ERG se redujera o se incrementara bruscamente según el caso lo que generó una imagen de ciclos de amplitud de ERG en cada ojo que tiene exactamente 24 horas y que están desfasados 180° uno de otro. Sin embargo el ajuste al régimen fotoperiódico no fue el mismo en los animales intactos y en los desprovistos de glándulas sinusales, ya que mientras éstos mostraron un ajuste total al régimen de iluminación, el que sin embargo desaparecía sin dejar rastro alguno en cuanto los animales eran reintegrados a las condiciones de oscuridad constante, los animales intactos mostraron en un ojo, una brusca caída en la amplitud del ERG al momento en que se iniciaba la fase de iluminación del fotoperiodo y una segunda caída más lenta durante la fase de permanencia de la luz. Al momento en que se apagaba la luz y se iniciaba la fase de oscuridad, la amplitud del ERG aumentaba bruscamente y mostraba un segundo incremento en la amplitud todo el tiempo que permaneciera la fase de oscuridad. El comportamiento del ojo contralateral era distinto ya que ante el inicio de la fase de iluminación mostraba una reducción en la amplitud del ERG pero durante el resto de esta fase la amplitud del ERG se incrementaba. Lo contrario sucedía en la fase de oscuridad, es decir que si bien es cierto al iniciarse esta fase el ERG aumentaba, durante el resto del tiempo de oscuridad había una caída de amplitud del ERG. Al reintegrarse al acocil a las condiciones de oscuridad constante cada ojo mostró actividad circadiana inicialmente fuera de fase con respecto a la del ojo contralateral, aunque después de algunos días mostraron tendencias a sincronizarse uno con respecto al otro. Estos hechos apuntan hacia una relación asimétrica entre los ritmos de los dos ojos, es decir que un ojo parece ejercer una influencia más poderosa sobre el ojo contralateral

que el otro, influencia que se ejerce durante los estímulos LO y se mantiene algún tiempo después de que son reintegrados a OO . En el ejemplo que utilizamos el ojo cuyo registro aparece en el trazo inferior de la figura 11 parece ser el dominante. Hasta este momento no tenemos ninguna explicación satisfactoria sobre este hecho ya que el que un ojo recibiera inicialmente un régimen LO u OL quedaba establecido al azar.

A pesar de que durante la etapa experimental no se hicieron operaciones simuladas para comprobar que los cambios que se observan en el comportamiento de los animales desprovistos de glándulas se deben a la diferencia de éstas y no a posibles lesiones relacionadas con la cirugía, se está en condiciones de afirmar que las glándulas sinusales son elementos indispensables en la expresión de las oscilaciones circadianas del ERG y en los procesos de sincronización interna y de sincronización externa ya que en el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo experimental se habían trabajado previamente operaciones simuladas, es decir en operaciones en las que se seguía el mismo procedimiento descrito para la extracción de las glándulas, pero sin que ésta se llevara a cabo. En estos casos, las características del ERG se mantuvieron equivalentes a las de un animal intacto.

CONCLUSIONES

1. El registro simultáneo del ritmo circadiano de amplitud del electroretinograma obtenido de cada tallo ocular permite estimar y estudiar las interacciones que ocurren entre dos oscilaciones circadianas.
2. En condiciones de oscilación libre en OO los ritmos circadianos del ERG de ambos ojos están sincronizados entre sí.
3. Cualesquiera que sean los mecanismos fisiológicos mediante los cuales se lleva a cabo la sincronización, requieren para manifestarse, de la integridad del sistema neuroendocrino. Parece factible que existan mecanismos neuroendocrinos tanto para mantener el acoplamiento interno como para mantener la sincronización del ritmo del ERG con las señales periódicas externas.
4. Los zeitgebers contradictorios aplicados al sistema circadiano del acocil pueden causar diferente grado de desincronización .
5. La aplicación de ciclos de 24 horas en los que se alternan la luz y la oscuridad (LO 12:12 ú OL 12:12), induce un ajuste inmediato al periodo de oscuridad de la fase de actividad (α) y de la fase de reposo (ρ) al periodo de iluminación del ciclo. Este ajuste se mantiene en los animales intactos aún después de que han sido reintegrados a las condiciones de oscilación libre.
6. En animales desprovistos de glándulas sinusales sólo se produce el ajuste de la amplitud del ERG a las señales luminosas durante la aplicación del régimen LO u OL ya que en OO no hay ritmo circadiano evidente en ninguno de los dos ojos.
7. La aplicación de señales contradictorias (LO a un ojo y OL al ojo contralateral) provocan la pérdida de la sincronización entre los ritmos de los dos ojos. Cuando el animal tiene intacto su sistema neuroendocrino y es regresado a OO los dos ojos se mantienen fuera de fase durante un cierto tiempo, pero fácilmente recuperan su capacidad de sincronización interna. Si el acocil ha sido desprovisto de las glándulas sinusales no se lleva a efecto tal recuperación.

8. Todos estos resultados llevan a proponer que la liberación periódica de hormonas desde la glándula sinusal es un requisito indispensable para que el acocil muestre sincronización entre los ritmos de los dos ojos (sincronización interna) y sincronización con las señales periódicas externas (sincronización externa).

PERSPECTIVAS

"...These general mechanisms inhere in the principles whereby constituent oscillatory subsystems are coupled and mutually entrain each other; how in so doing temporal organization is maintained within the organism; how the system as a whole is coupled to the multiple periodicities of the environment; and how critical phase-angle conflicts in the action of the latter can be exploited at least for interval-timing. In brief the prospect of a common mechanism to incite us is slim *only* if we are too preoccupied with the concrete and neglect our real business of elucidating organizational features of living system."

Colin S. Pittendrigh, 1960.

Los futuros experimentos en el área que tocó este trabajo deberán estar encaminados a distinguir las posibles vías de comunicación que permiten al sistema mantenerse sincronizado así como la forma de hacerlo. Las respuestas a algunas preguntas que surgieron durante el desarrollo de este trabajo nos llevarán a entender como se organiza el sistema circadiano del acocil: ¿Qué vías neurales y neuroendocrinas participan en el mantenimiento de la sincronización interna del sistema circadiano? ¿En qué proporción participa cada una y cómo lo hace? ¿Qué otros factores neurales o humorales están involucrados? ¿Cómo varía la sensibilidad del sistema a lo largo del tiempo? ¿Qué significado tienen las respuestas plásticas del sistema circadiano? ¿Qué representa toda esta organización para el animal en términos adaptativos y evolutivos?

BIBLIOGRAFIA

- Andrew, R. D., and Saleudin A. S. (1978). Structure and innervation of crustacean neurosecretory cell. *Can. J. Zool.* 56: 423-430.
- Andrew, R. D., Orchard I., and Saleudin A. S. (1978). Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell Tissue Res.* 190: 235-246.
- Aréchiga, H., and Mena, F. (1975). Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A: 581-584.
- Aréchiga, H., and Wiersma, C. A. G., (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71-85.
- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B., and Barrera-Mera, B. (1973). Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. In: *Neurobiology of invertebrates*. Salánky, J. (ed.). Tihany, Hungary. pp. 463-421.
- Aréchiga, H. (1977). Circadian rhythmicity in the nervous system of crustaceans. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 36: 2036-2041.
- Aschoff, J. (1951). Die 24-stunden periodik der maus unter Konstanten umgebungs bedingungen. *Naturwissenschaften* 38: 506-507.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. In: *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 25: 11-28.
- Aschoff, J. (1965a). Circadian rhythms in man. *Science* 148: 1427-1432.
- Aschoff, J. (1965b). Response curves in circadian periodicity. In: *Circadian Clocks*. Aschoff, J. (ed.). North-Holland Publishing Co.. Amsterdam. pp. 95-111.
- Aschoff, J. (1978). Features of circadian rhythms relevant for the design of shift schedules. *Ergonomics* 39: 739-754.
- Aschoff, J. (1981a). Introduccion. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, V. 4: Biological rhythms. J. Aschoff (ed.)
- Aschoff, J. (1981b). Free running and entrained rhythms. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, V.4: Biological rhythms. J. Aschoff (ed.)
- Barrera-Mera, B. (1976). Effect of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. behav.* 17: 59-64.
- Barrera-Mera, B. (1978). Neural coupling between left and right electroretinographic circadian oscillations in the crayfish P. bouvieri. *Comp. biochem. Physiol. A* 61A: 427-432.
- Bennit, R. (1932). Physiological interrelationship in the eyes of decapod Crustacea: *Physiol. Zool.* 5: 49-64.
- Binkley, S. (1990). *The clockwork sparrow*. Prentice Hall, Inc. pp. 55- 57.

- Bliss, D.E. (1951). Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Anat. Rec.* 111: 502- 503.
- Bünning, E. (1973). *The physiological clock*. 3rd ed., Springer Verlag, New York Inc., New York.
- Carlisle, D. B., and Knowles F. G. W. (1953). Neurohaemal organs in crustaceans. *Nature (London)* 172: 404.
- Chiang and Steel (1985). Coupling of electrical activity from contralateral sinus gland. *Brain Res.* 331:142-144.
- Cooke, I. M., (1981). Electrical activity in relation to hormone secretion in the crab X organ-sinus gland system. In: *Neurosecretion: Molecules, cells systems*. Farner, D. S., and Lederis, K. (eds.) Plenum, New York, pp. 237-249.
- Cooke, I.M., and Sullivan R. E. (1982). Hormones and Neurosecretion. In: *Biology of Crustacea V. 3. Neurobiology: Structure and function*. Bliss, D. E., Atwood, H. L., Sandeman, D. C. eds. Academic Press, New York. pp. 205-290.
- De Coursey, P. (1960). Phase control of activity in a rodent. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 25: 49-55.
- De Coursey, P. (1983). Biological timing. In: *Biology of crustacea V.7: Behavior and Ecology*. Bliss, D. E., Vernberg, F. J., Vernberg, W.B. (eds.). Academic Press, New York. pp. 107-162.
- Enright, J. T. (1970). Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1: 221-238.
- Eguchi, E. (1965). Rhabdome structure and receptor potentials in single crayfish reticular cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60: 411-430.
- Edmunds, L. N. (1988). *Cellular and Molecular bases of biological clocks*. Springer-Verlag, New York, U.S.A.
- Fanjul-Moles, M. L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N., and Fuentes-Pardo, B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A:213-219.
- Fingerman, M., and Lowe, M. (1957). Twenty four hour rhythm of distal pigment migration in the dwarf crayfish. *J. Cell. Comp. Physiol.* 50: 371-329.
- Frixione, E. and Hernández, J. (1989). Modulation of screening-pigment position in crayfish photoreceptors by serotonin: possible involvement of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *J. exp. Biol.* 143:459-473.
- Fuentes-Pardo, B. and García, M. C. (1979). Effect of light deprivation on the neurohumoral activity of the visual system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A:549-555.
- Fuentes-Pardo, B. and Ramos-Carbajal, J. (1983). The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74A(3):711-714.

Fuentes-Pardo, B., Hernández-Falcón, J., and Noguero, I. (1984). Effect of external level of calcium upon the photoreceptor potential of crayfish along the twenty-four hour cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 723-727.

Fuentes-Pardo, B., and Inclán-Rubio, V. (1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* 68A: 477-485.

Goldsmith, T. H. (1972). The natural history of invertebrate visual pigments. In: *Handbook of Sensory Physiology*. V. 7, part 1. H. J. A. Darnall ed. Springer-Verlag, Berlin. pp. 685-719.

Halberg, F. (1959). Physiological 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. Withrow, R.B. (ed.). American Association for the Advancement of Science, Washington, U.S.A. pp. 803-878.

Hernández-Falcón, J., Moreno-Sáenz, E., Farás, J. M., and Fuentes-Pardo, B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity - I. Pseudopupil circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 111-118.

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

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

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

Kleinholz, L. H. (1961). Pigmentary effectors. In: *The physiology of crustacea* V. II. Waterman, T. H. (ed.). Academic Press, New York. pp. 133-169

Knowles, F. G. W. (1974). Twenty years of neurosecretion. In: *Neurosecretion - The final neuroendocrine pathway*. F. Knowles and L. Vollrath (eds.). Springer, New York, pp. 3-11.

Lara-Aparicio, M., López de Medrano, S., Fuentes-Pardo, B. and Moreno-Sáenz, E. (1992). A qualitative mathematical model of the ontogeny of a circadian rhythm in crayfish. *Bull. Math. Biol.* (en prensa).

Larimer, J. L., and Smith, J. T. F. (1980). Circadian rhythm of retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* A 136A: 313-326.

Moreno-Sáenz, E., Hernández-Falcón, J., and Fuentes-Pardo, B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity - II. ERG circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 119-125.

Moore-Ede, M. C., Schmelzer, W. S., Kass, D. A., and Herd, J. A. (1976). Internal organization of the circadian timing system in multicellular animals. *Fed. Proc.* 35: 2335-2338

Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., and Fuller, C. A. (1979). Uncoupling of circadian oscillators at the limits of light-dark cycle entrainment in the

squirrel monkey. Fed. Proc. 38: 1318.

Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., and Fuller, C. A. (1982). The clock that time us. HARvard University Press. Cambridge, U.S.A.

Müller, K. J. (1973). Photoreceptors in the crayfish compound eye: Electrical interactions between cells as related to polarized-light sensitivity. J. Physiol. 232: 573-595.

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

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

Page, T. L., and Larimer, J. L. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. J. Comp. Physiol. 97: 81-86.

Parker, G. H. (1897). The retina and the optic ganglia in decapods, especially in *Astacus*. Mitt. Zool. Stn. Neapel 12:1-73.

Passano, L. M. (1951). The X organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. Anat. Rec. 111: 502.

Pavlidis, T. (1973). Biological oscillators: Their mathematical Analysis. Academic Press, New York.

Pittendrigh, C. S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergency time in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 40: 1018-1029.

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

Pittendrigh, C. S. (1965). On the mechanism of entrainment of a circadian rhythm by light pulses. In: Circadian Clocks. Aschoff, J. (ed.). North-Holland Publishing Co., Amsterdam. pp. 277-297.

Pittendrigh, C. S. (1967). Circadian rhythms, space research and manned space flights. Life Sci. Space Res. 5: 122-134.

Pittendrigh, C.S. (1974). Circadian oscillations in cells and the circadian organization of multicellular systems. In: The Neurosciences, Third study program. Schmitt, F. O. and Worden, F. G. (eds.). Cambridge Mass.: MIT Press. 437-458.

Pittendrigh, C. S. (1980). Functional aspects of circadian pacemakers. In: Biological rhythms, their central mechanism. Suda, M., Hayaishi, O., and Nakagawa, H. (eds.). Elsevier, New York.

Pittendrigh, C. S. (1981a). General perspective. In: Handbook of Behavioral Neurobiology, V.4: Biological rhythms. J. Aschoff ed.

Pittendrigh, C. S. (1981b). Entrainment. In: Handbook of Behavioral Neurobiology, V.4: Biological rhythms. J. Aschoff ed.

Pittendrigh, C. S., and Daan, S. (1976a). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. Stability and lability of spontaneous frequency. J. Comp. Physiol. 106: 233-252.

Pittendrigh, C.S. and Daan, S. (1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemaker as a clock. J. Comp. Physiol. 106: 291-331.

Rao, R. K. (1985). Pigmentary effectors. In: Biology of Crustacea V. 9. Integument, pigments and hormonal processes. Bliss, D. E., and Mantel, L. H. (eds.) Academic Press, Orlando, Florida. pp. 395-463.

Sánchez, J. A., and Fuentes-Pardo, B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 56A: 601-605.

Sandeman, D. C. (1982). Organization of the central nervous system. In: Biology of Crustacea V. 3. Neurobiology: Structure and function. Bliss, D. E., Atwood, H. L., Sandeman, D. C. eds. Academic Press, New York. pp. 1-103.

Scharrer, E., and Scharrer, B. (1945). Neurosecretion. Physiol. Rev. 25: 171-181.

Shaw, S. R., and Stowe S. (1982). Photoreception. In: Biology of Crustacea V. 3. Neurobiology: Structure and function. Bliss, D. E., Atwood, H. L., Sandeman, D. C. eds. Academic Press, New York. pp. 291- 367.

Sulzman, F. M., Fuller, C. A., Hiles, L. G., and Moore-Ede, M.C. (1978). Circadian rhythm dissociation in an environment with conflicting temporal information. Am. J. Physiol. 235: R175-R180.

Szabo, I., Kovats, T. G., and Halberg, F. (1978). Circadian rhythm in murine reticuloendothelial function. Chronobiologia 5: 137-143.

Van Harrevelt, A. (1936). A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. exp. Med. 34:428-432.

Welsh, J. H. (1930). Diurnal rythms of the distal pigment cells in the eyes of certain crustaceans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 16: 386-395.

Welsh, J. H. (1939). The action of eyestalks extracts on retinal pigment migration in the crayfish *Cambarus bartoni*. Biol. Bull. 77: 119-125.

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

Wever, R. (1975). The circadian multioscillator system of man. Int. J. Chronobiol. 3: 19-55.

Winfree, A. T. (1971). Corkscrews and singularities in fruitflies: resetting behavior of the circadian eclosion rhythm. In: Biochronometry. M. Menaker (ed.). Academy of Sciences, Washington D. C. pp. 81-109.