

103
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE EL
CRECIMIENTO, MADURACION SEXUAL Y GONADAL
DEL ACOCIL *Procambarus clarkii***

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
CARLOS MIGUEL LUGO PEREZ
Y
OSCAR CASTAÑON CERVANTES

CIUDAD UNIVERSITARIA.

OCTUBRE DE 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

PREFACIO

Los seres vivos han manifestado mediante muchos de sus procesos fisiológicos que son capaces de medir el tiempo externo. La floración, diapausa, reproducción, etc., son ejemplos de estos procesos que evidencian la percepción temporal de las especies. Sin embargo, parecía evidente que estos fenómenos no eran sino respuestas claras de los organismos a la periodicidad del ambiente. Esta idea permaneció hasta principios del siglo XVIII cuando Jean Jacques d'Ortuis de Mairan, observó que el movimiento de abertura y cierre de las hojas del heliotropo permanecía independientemente de las condiciones ambientales externas (Reinberg y Smolensky, 1993). Es decir, la planta seguía manifestando este ritmo a pesar de encontrarse aislada de la luz. A partir de entonces, muchas han sido las pruebas aportadas que apoyan la existencia de relojes biológicos como sistemas de medición del tiempo, sin embargo, el conocimiento de estos sistemas dista mucho de ser completo y el entendimiento del desarrollo y organización de los relojes biológicos dará información básica acerca de estos fenómenos, la cual a su vez tiene amplias perspectivas en aplicaciones posteriores debido a los procesos fisiológicos implicados en ello, como lo son el crecimiento y la reproducción.

TABLA DE ABREVIATURAS

ANDEVA	ANALISIS DE VARIANZA DE UNA SOLA VIA
CRF	CURVA DE RESPUESTA DE FASE
ERG	ELECTORRETINOGRAMA
FF	FASE FOTOINDUCIBLE
HA	HORMONA ANDROGENICA
HDP	HORMONA DISPERSORA DE PIGMENTOS
HEG	HORMONA ESTIMULADORA DE LAS GONADAS
HF	HORMONA FEMENINA
HIG	HORMONA INHIBIDORA DE LAS GONADAS
HIM	HORMONA INHIBIDORA DE LA MUDA
HM	HORMONA DE LA MUDA (ECDISONA)
HP	CABALLOS DE FUERZA
LH	HORMONA LÚTEINIZANTE
LO	LUZ-OBSCURIDAD
LT	LONGITUD TOTAL
OX-GS	ORGANO X-GLANDULA SINUSAL
OY	ORGANO Y
P	PESO
P/LT	RELACION PESO/LONGITUD TOTAL
RALM	RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA
SNC	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
T	LONGITUD TOTAL EN HORAS DEL PERIODO EXTERNO

INDICE

DEDICATORIAS.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
PREFACIO.....	VI
TABLA DE ABREVIATURAS.....	VII
INDICE.....	VIII
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	2
1.1 GENERALIDADES SOBRE FOTOPERIODISMO.....	2
1.2 RELOJES BIOLÓGICOS Y RITMOS CIRCADIANOS.....	3
• 1.2.1 RITMOS INFRADIANOS.....	3
• 1.2.2 RITMOS CIRCADIANOS.....	4
• 1.2.3 RITMOS ULTRADIANOS.....	4
• 1.2.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	4
• 1.2.4.1 SINCRONIZACION DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	5
• 1.2.4.2 LONGITUD DEL PERIODO.....	5
• 1.2.4.3 AMPLITUD DE LA OSCILACION.....	5
• 1.2.4.4 REESTABLECIMIENTO DEL RITMO.....	5
• 1.2.4.5 EFECTO DE LA INTENSIDAD LUMINOSA.....	5
• 1.2.4.6 COMPENSACION DE TEMPERATURA.....	6

• 1.2.5 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE LOS	
• RITMOS CIRCADIANOS.....	6
• 1.2.5.1 LOS MARCAPASOS CIRCADIANOS	
• EN LOS CRUSTACEOS.....	6
• 1.2.5.2 VIAS DE SINCRONIZACIÓN.....	7
• 1.2.5.3 ACOPLAMIENTO DE	
• OSCILADORES.....	7
1.3 RELACION ENTRE EL FENÓMENO	
• FOTOPERIÓDICO Y LOS RITMOS	
• CIRCADIANOS.....	8
• 1.4 INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA SOBRE LA	
• FUNCIÓN REPRODUCTORA EN LOS	
• ANIMALES.....	9
• 1.4.1 MODELO DEL RELOJ DE ARENA.....	9
• 1.4.2 MODELO DE COINCIDENCIA EXTERNA.....	10
• 1.4.3 MODELO DE COINCIDENCIA INTERNA.....	10
• 1.4.4 EJEMPLOS DE FOTOINDUCCIÓN.....	10
1.5 ANTECEDENTES SOBRE LA INDUCCIÓN	
• FOTOPERIÓDICA EN LA REPRODUCCIÓN Y	
• CRECIMIENTO DE CRUSTACEOS Y	
• ESPECÍFICAMENTE EN EL ACOCIL.....	12
• 1.5.1 CONTROL ENDOCRINO DE LA MUDA Y LA	
• REPRODUCCIÓN.....	12
• 1.5.1.1 CONTROL HORMONAL DE LA	
• ECDISIS.....	13
• 1.5.1.2 CONTROL HORMONAL DE LA	
• REPRODUCCIÓN.....	13
• 1.5.2 RELACION ENTRE CRECIMIENTO Y	
• REPRODUCCIÓN.....	14
• 1.5.3 CONTROL HORMONAL DE LA	
• DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	15
• 1.5.3.1 HORMONAS Y CARACTERES	
• SEXUALES FEMENINOS.....	15
• 1.5.3.2 HORMONAS Y CARACTERES	
• SEXUALES MASCULINOS.....	16

• 1.5.4 INDUCCION DE LA MUDA Y • REPRODUCCION DEL ACOCIL.....	16
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.....	20
3. HIPOTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
5. MATERIAL Y METODOS.....	24
5.1 MONTAJE DE ACUARIOS.....	24
5.2 ANIMALES.....	24
5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
5.4 ANALISIS DE DATOS.....	31
6. RESULTADOS.....	32
6.1 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE EL CRECIMIENTO.....	32
• 6.1.1 LONGITUD TOTAL.....	32
• 6.1.2 PESO.....	34
• 6.1.3 RELACION PESO/LONGITUD TOTAL.....	34
6.2 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE LA MADUREZ SEXUAL Y GONADAL.....	35
• 6.2.1 HEMBRAS.....	38
• 6.2.2 MACHOS.....	39
7. DISCUSION	50
7.1 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE EL CRECIMIENTO.....	50
7.2 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE LA MADUREZ SEXUAL Y GONADAL.....	52
8. CONCLUSIONES.....	56
9. LITERATURA CITADA.....	57

RESUMEN

Con el fin de investigar si existe una posible relación entre los procesos rítmicos y la inducción fotoperiódica se determinó el efecto de diferentes fotoperíodos sobre el crecimiento, maduración sexual y gonadal del acócil *Procambarus clarkii* (durante su desarrollo) así como la influencia de cambios en el encendido y apagado de la luz sobre estas mismas variables. Los regímenes de luz-obscuridad (LO) utilizados fueron: LO 12:12, 12:12 con pulsos de luz, 16:8 con pulsos de obscuridad, 8:16 con pulsos de luz y obscuridad constante. Se midieron semanalmente la longitud total (LT), peso (P) y la relación P/LT. En el momento en el que tanto la talla como el desarrollo de caracteres sexuales secundarios lo indicaron, se extrajeron las gonadas y se procesaron histológicamente para observar la madurez alcanzada.

Los resultados indican que los pulsos de luz sólo inducen la maduración gonadal. Los animales de las condiciones 12:12 y 12:12 con pulsos de luz manifestaron el mayor crecimiento y maduración gonadal respectivamente. Los resultados se discutieron en función de la posible existencia de una fase fotoinducible hacia el final de la noche subjetiva y la posibilidad de que este fenómeno tenga un sustrato circadiano.

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES SOBRE FOTOPERIODISMO.

Directa o indirectamente los organismos responden a la influencia periódica de los cambios de rotación y traslación de la Tierra y por lo tanto de la luz. Esta influencia se manifiesta en el ambiente natural como ciclos de luz-obscuridad que son siempre aproximadamente de 24 horas y que tienen efectos evidentes sobre los sistemas vivos. Los procesos fisiológicos de virtualmente todos los organismos, con excepción de las bacterias y las cianobacterias muestran oscilaciones periódicas (Pittendrigh y Minis, 1964). El concepto de fotoperiodismo tiene su origen en 1920 en un trabajo de Garner y Allard. Actualmente la literatura sobre fotoperiodismo en animales es amplia y la mayoría de los trabajos se han realizado en aves e insectos. En estos últimos, el fotoperíodo ha sido implicado en la regulación del metabolismo, crecimiento, inducción de la diápauza, diferenciación y gametogénesis (Aiken, 1969).

Tradicionalmente ha existido cierta confusión sobre los conceptos de fotoperíodo y fotoperiodismo. La tendencia actual es a definir al fotoperíodo como la porción luminosa de un ciclo consistente de una fase de luz y otra de obscuridad (escotoperíodo). Por su parte el término de fotoperiodismo se refiere al efecto de los ritmos ambientales periódicos sobre los procesos fisiológicos de los organismos (Aiken, 1969). Es evidente que muchas funciones dependen de la cantidad de luz que reciben los organismos, así como del momento en que ésta les llega (Corona- García, 1993). De las longitudes relativas de las

fases de luz y oscuridad propias de cada día y variantes durante los 365 días del año, los organismos obtienen la información que requieren para ajustar sus funciones a determinada época del año (Binkley, 1991).

1.2 RELOJES BIOLÓGICOS Y RITMOS CIRCADIANOS.

En biología, un ritmo es definido como un fenómeno que se presenta con una frecuencia temporal determinada. Los ritmos son evidentes en la naturaleza en una gama inmensa de formas de vida, desde organismos unicelulares hasta plantas y animales superiores. Estos ritmos se manifiestan de muchas formas, pero en general, como eventos fisiológicos y etológicos que evidencian el funcionamiento de uno o varios sistemas de medición del tiempo.

Así, vemos por ejemplo, como un ser humano manifiesta un ritmo de sueño-vigilia, que se repite aproximadamente cada 24 horas; del mismo modo en que un ave o un insecto presenta anualmente uno o varios desplazamientos migratorios. Este tipo de eventos al igual que otros (reproducción, menstruación, torpor, hibernación, floración, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, etc.), son ritmos biológicos, los cuales están determinados genéticamente, y que a la vez son susceptibles de ser sincronizados o alterados de manera exógena por factores tales como la temperatura, la luminosidad, el estrés, etcétera (Aschoff, 1981).

De manera general, los autores coinciden en clasificar a los ritmos biológicos en tres categorías diferentes en función a su frecuencia (el inverso del período). Estos son: Ritmos infradianos, circadianos y ultradianos (Aschoff, 1984).

1.2.1 RITMOS INFRADIANOS.- Ritmos que tienen un período mayor a 24 horas aproximadamente. Los ejemplos de este tipo de ritmos son amplios tanto en animales como en plantas. P. ej., la floración, diapausa, migración y ciclos reproductivos estacionales o anuales.

1.2.2 RITMOS CIRCADIANOS.- Ritmos con una período de repetición de aproximadamente 24 horas. P. ej., el ritmo de actividad-reposo en los animales. Son precisamente estos ritmos los que mayor interés han despertado ya que se ha tratado de demostrar su endogenidad y su sincronización con aquellos factores externos que también se repiten aproximadamente una vez cada 24 horas (ritmos geofísicos debido a la rotación de la Tierra).

1.2.3 RITMOS ULTRADIANOS.- Ritmos que se repiten con un período menor a 24 horas. P. ej., el ritmo cardíaco y el parpadeo, etc. Se ha sugerido que estos ritmos podrían ser el sustrato de los ritmos circadianos, ya que el acoplamiento de osciladores de alta frecuencia favorecería el surgimiento de un ritmo circádico (Winfree, 1967) por un proceso de desmultiplicación de frecuencia.

Los sistemas biológicos son capaces de mantener su ritmicidad aún en condiciones ambientales constantes, lo cual indica que los mecanismos generadores son de naturaleza endógena. El significado funcional de estos ritmos es variado. En general, ejercen una acción adaptativa de índole anticipatoria, que optimiza la relación temporal entre el nivel de la actividad fisiológica y las condiciones energéticas ambientales (Aréchiga, 1976). El ciclo de 24 horas parece ser la unidad de cómputo para los ritmos biológicos, de ahí la importancia de su estudio.

1.2.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

Como ya se mencionó, una de las características más importantes de estos ritmos es que persisten aún en condiciones ambientales constantes (oscilación espontánea). La demostración de la naturaleza endógena de los ritmos circadianos ha sido un problema de difícil solución dadas las limitaciones técnicas para aislar a los sistemas biológicos de todas las influencias ambientales. Sin embargo ya existen bases para probar la naturaleza endógena de estos ritmos y su acoplamiento con los ciclos ambientales.

1.2.4.1 SINCRONIZACION DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

Los ritmos circádicos presentan la característica de ser endógenos, pero su manifestación puede ser sincronizada por factores exógenos periódicos y constantes como la luz o la temperatura, es decir que hay una fuerte influencia del ambiente en su manifestación. Recientemente se ha propuesto a la alimentación como un efectivo agente sincronizador en el ritmo motor del acocil (Fernández y Aréchiga, 1988).

1.2.4.2 LONGITUD DEL PERIODO.

Es bien conocido que el período de un ritmo circadiano se altera al someterse a condiciones de oscilación espontánea, manifestando ligeros adelantos o atrasos (acortamientos o alargamientos) en relación con los cambios ambientales. Resulta evidente la importancia de esta propiedad como argumento para fundamentar la naturaleza endógena de estos ritmos, que de hecho, deben a ella tal denominación. La longitud del período circádico descrita en los distintos sistemas biológicos varía de 20 a 29 horas (Aschoff, 1981).

1.2.4.3 AMPLITUD DE LA OSCILACION.

En condiciones ambientales constantes, los ritmos circádicos se mantienen durante lapsos que van desde unos cuantos ciclos hasta varios meses, para finalmente desaparecer despues de una etapa de amortiguación gradual.

1.2.4.4 REESTABLECIMIENTO DEL RITMO.

Si al cabo de un lapso de oscilación en condiciones constantes, y una vez que el ritmo se ha amortiguado por completo, se aplica un estímulo aperiódico, la fluctuación circádica reaparece, en fase con la aplicación del estímulo (Aréchiga, 1976).

1.2.4.5 EFECTO DE LA INTENSIDAD LUMINOSA.

El período y la velocidad de oscilación de un ritmo circadiano en oscilación espontánea estan directamente relacionados con la intensidad luminosa a la que estén expuestos. Aschoff (1960), demostró que con altas intensidades de luz se acorta el período en organismos diurnos y se alarga en nocturnos. Mientras que el tiempo de actividad en un animal comparado con su tiempo de reposo (relación α/ρ), es mayor en animales diurnos y menor en nocturnos. Así estableció la "Ley de Aschoff".

1.2.4.6 COMPENSACION DE LA TEMPERATURA.

Los ritmos circadianos se manifiestan sin mostrar diferencias notables en un amplio rango de temperaturas. Esto sugiere la existencia de mecanismos compensadores a los cambios en la temperatura que manifiestan la independencia de los relojes circadianos a los cambios térmicos; sin embargo el mecanismo exacto de compensación de temperatura no ha sido muy bien entendido (Sweeney y Hastings, 1960).

1.2.5 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN LOS CRUSTACEOS.

El análisis de los mecanismos fisiológicos que subyacen a los ritmos circadianos de los crustáceos es bastante limitado. Los aspectos más estudiados a este respecto se refieren a la localización de los marcapasos circadianos, la localización de las vías de sincronización y el análisis del mecanismo del posible acoplamiento de osciladores.

1.2.5.1 LOS MARCAPASOS CIRCADIANOS EN LOS CRUSTACEOS.

Dos han sido los órganos principales propuestos como organizadores de la ritmicidad circadiana de los decápodos: el ganglio supraesofágico y el pedúnculo ocular. El pedúnculo ocular fue el primer candidato sugerido como sitio de generación de la ritmicidad circadiana en crustáceos, ya que su lesión o ablación provoca la alteración del Ritmo de Actividad Locomotora (RALM) en el acócil (Page y Larimer, 1975). Otra razón para considerar al pedúnculo ocular como el sitio de generación de los ritmos es el hecho de que los primeros ritmos identificados en los crustáceos fueron los de la posición de los cromatóforos, la actividad metabólica y la locomoción. Estas funciones están influenciadas por las hormonas producidas en el pedúnculo ocular en el cual se aloja el complejo órgano X-glándula sinusal compuesto de aproximadamente entre 100 y 150 neuronas, que sintetizan, almacenan y liberan neurohormonas responsables entre otras funciones de los niveles de glucosa en hemolinfa, la posición del pigmento distal y proximal de la retina que se refleja en la amplitud del electroretinograma (ERG), RALM y en cromatóforos tegumentarios (Aréchiga, *et al.* 1992). Otro criterio utilizado para establecer la existencia de un mar-

capasos en el pedúnculo ocular ha sido la presencia de ritmicidad circadiana en condiciones de aislamiento *in vitro*, aunque esta respuesta difiere un poco de la registrada para el animal intacto (Aréchiga, *et al.*, 1973).

En lo que respecta al ganglio supraesofágico se sabe que se encuentra conectado a través de los nervios ópticos con ambos pedúnculos oculares actuando como un sistema integrador de la ritmicidad de varios procesos. En este caso también se ha observado la alteración del RALM (Aréchiga, *et al.*, 1976) y del ERG (Page y Larimer, 1975A) al lesionar o ablacionar el ganglio supraesofágico.

Los elementos celulares responsables de la generación rítmica en el ganglio supraesofágico aún no han sido localizados.

1.2.5.2 VIAS DE SINCRONIZACION.

Existe escasa información sobre los receptores y vías de sincronización responsables de la ritmicidad circadiana de los crustáceos. Recientemente, Fuentes e Inclán (1987), reportaron que el sexto ganglio abdominal del acocil es capaz de poner en fase el ritmo de amplitud del ERG del acocil. La liberación de la **Hormona Dispersora de Pigmentos (HDP)** a partir del tallo ocular del acocil es disparada por un reflejo neuroendocrino. Este reflejo es iniciado por la acción de la luz sobre el sexto ganglio y así es ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (Aréchiga, *et al.*, 1985).

1.2.5.3 ACOPLAMIENTO DE OSCILADORES.

Este es uno de los aspectos menos conocidos de la fisiología de los ritmos circadianos. Para los crustáceos, la evidencia sugiere que los mecanismos fisiológicos por los cuales se organiza el acoplamiento interno de osciladores es múltiple e indirecto. Los mecanismos que controlan la actividad de las neuronas responsables de la locomoción en los crustáceos se mantienen aún desconocidos. Las motoneuronas involucradas en la locomoción están bajo la influencia de agentes neurohumorales. Estos agentes podrían ser la causa del acoplamiento interno de los ritmos (Aréchiga, *et al.*, 1992). Otros autores (Fanjul-Moles, *et al.*, 1987, 1992) han sugerido el acoplamiento de osciladores mediante mecanismos de regulación neural y endocrina para otros ritmos como el ERG.

1.3. RELACION ENTRE EL FENOMENO FOTOPERIODICO Y LOS RITMOS CIRCADIANOS.

La periodicidad ambiental se manifiesta a través de los fenómenos relacionados con el movimiento de rotación y traslación de la Tierra, los cuales implican la presencia de dos períodos bien marcados, uno de luz y otro de oscuridad que van cambiando a través del año. Asociados a estos, también se manifiestan ciclos de temperatura, y ambos sincronizan los ritmos circadianos endógenos de los organismos. Esta relación entre el fenómeno fotoperiódico y los ritmos circadianos se ha estudiado a distintos niveles, proponiendo explicaciones sobre los procesos implicados en esta interacción.

En este sentido, Pittendrigh (1964), sugirió un doble papel de la luz, no sólo como sincronizador, sino además como un factor inductor de ciertos procesos rítmicos, ya sea alargando su período o no a la fase escotópica. Otra manera de demostrar la estrecha relación entre el fotoperiodismo y los ritmos circadianos, es la capacidad que estos tienen de sincronizarse mediante la aplicación de fotoperíodos esqueleto, en los cuales se aplica un pulso de luz de una duración determinada y horas después se aplica otro, siendo interpretados por el organismo como el amanecer y el anochecer, sincronizándose a ellos (Pittendrigh y Minis, 1964). Esto pone de manifiesto la importancia del momento en el que incide la luz sobre una cierta fase sensible en el marcapasos circadiano. Otra forma de mostrar la influencia de la luz como una señal de tiempo en el sistema circadiano de los organismos es mediante la Curva de Respuesta de Fase (CRF), en la cual se pueden evidenciar atrasos o adelantos en los ritmos de los organismos sometidos a un régimen de luminosidad (luz u oscuridad) constante, dependiendo directamente del tiempo circadiano en el que se aplica un pulso de luz y del hábito nocturno o diurno del animal. Es decir que un ritmo circadiano en condiciones de oscilación espontánea experimenta una corrección entre el período del sincronizador y el del marcapasos, al ser sometido este último a un estímulo determinado. Esta corrección se expresa como un adelanto o atraso en el período del ritmo (Moore-Ede, *et al.* 1982). Adelanto o atraso que es precedido por una perturbación transitoria de mayor o menor duración.

El descubrimiento de las características de la CRF en los sistemas circadianos, ha contribuido significativamente al entendimiento de cómo los ciclos de LO y otras señales de tiempo sincronizan los marcapasos circadianos de un animal, evidenciando así la relación entre el fenómeno fotoperiódico y los ritmos circadianos.

Un ejemplo de lo anterior lo constituye un trabajo de H.S. Greening y R.J. Livingstone (1982) quienes describen los cambios en la comunidad de invertebrados epibentónicos de los pastos marinos durante los períodos de día y noche, argumentando importantes diferencias en los componentes de la comunidad como un cambio adaptativo debido a la presencia o ausencia de depredadores, la cual es consecuencia del hábito de los mismos y que está sincronizada por el ciclo de luz-obscuridad.

1.4 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE LA FUNCION REPRODUCTORA EN LOS ANIMALES.

La inducción fotoperiódica se ha tratado de explicar mediante la propuesta de tres modelos diferentes de relojes biológicos encargados de la medición del tiempo externo e interno. Estos modelos son el del "Reloj de Arena", "Coincidencia Externa" y el de "Coincidencia Interna".

1.4.1 MODELO DEL "RELOJ DE ARENA".

Este modelo trata de explicar la percepción temporal de los animales en relación con la inducción de un cierto proceso mediante un mecanismo de apagado o encendido de determinada función. Basicamente sugiere que el amanecer y el anochecer funcionan como los disparadores o inhibidores de los procesos fisiológicos que regulan (Saunders, 1978), es decir que tienen la particularidad de "voltear el reloj" como si fuera un reloj de arena y provocar el inicio o inhibición de algún proceso en el preciso momento del cambio de fase.

1.4.2 MODELO DE COINCIDENCIA EXTERNA.

Este modelo fue propuesto por Pittendrigh en 1964, es un modelo de reloj fotoperiódico en el cual la luz juega un doble papel. Por un lado sincroniza y por lo tanto pone en fase la oscilación fotoperiódica y por el otro controla la inducción fotoperiódica mediante la coincidencia temporal con una fase inducible fotoperiódicamente (esta fase puede estar en el fotoperíodo o en el escotoperíodo).

1.4.3 MODELO DE COINCIDENCIA INTERNA.

En este caso, la aplicación de un estímulo externo determinado en un tiempo dado, no juega un papel importante en los fenómenos relacionados con la sincronización, entre ellos, la inducción fotoperiódica. Este es un modelo que postula un reloj fotoperiódico en el cual dos o más osciladores internos se sincronizan independientemente por la aurora o el crepúsculo y la inducción fotoperiódica se da en el momento en que se establece un ángulo de fase entre ellos (Saunders, 1978).

1.4.4 EJEMPLOS DE FOTOINDUCCION.

A través de la aplicación de estímulos luminosos tomando como base alguno de los tres modelos previamente señalados se ha comprobado experimentalmente la inducción fotoperiódica sobre la función reproductora en los animales. Son muchos los trabajos en que se ha investigado el fotoperiodismo en insectos (Saunders, 1978 y 1979; Canard y Grimal, 1988; etc.) tendientes a comprobar el efecto del fotoperíodo sobre la función reproductora en estos animales. Así por ejemplo, Canard y Grimal en 1988 comprobaron que en la mantis *Nineta pallida* el desarrollo de las larvas (primer instar) se retrasa si se exponen a fotoperíodos cortos. Por su parte en *Nineta flava* y en *Chrysopa perla* los fotoperíodos largos provocan que las pupas entren inmediatamente en diapausa. Otro ejemplo en los insectos son los trabajos de Saunders (1978, 1978A y 1979), en los cuales se utiliza el ritmo circadiano de eclosión pupal de *Sarcophaga argyrostoma* para analizar la inducción fotoperiódica, particularmente en términos de la sincronización de los sistemas circadianos oscilatorios. De igual manera, se utiliza a la diapausa para analizar este mismo fenómeno en la citada especie y en *Nasonia vitripennis*. Sus resultados sugieren la presencia de una fase fotoinducible en el reloj fotoperiódico que regula la eclosión pupal de *S.*

argyrostoma. Así mismo, este autor encuentra diferencias entre los relojes biológicos de ambas especies clasificándolos como reloj de coincidencia externa (*S. argyrostoma*) y de coincidencia interna (*N. vitripennis*).

Por otra parte, en muchos vertebrados, hay cambios dramáticos en los eventos fisiológicos asociados con la reproducción que están relacionados con la estacionalidad manifestada por el fotoperíodo. Por ejemplo Nakari *et al.* (1987), realizaron un trabajo en el cual indujeron salmones de la especie *Salmo gairdneri* a la reproducción. Los machos fueron inducidos a la maduración de los testículos y las hembras a la maduración ovárica mediante la reducción de la duración relativa del fotoperíodo anual y la temperatura del agua, es decir, que en medio año el organismo fue sometido al ciclo fotoperiódico estacional que correspondería a un año y la temperatura se mantuvo controlada, obteniendo como resultado una maduración gonadal en seis meses en lugar de en un año.

Follet *et al.* (1992), investigaron el ritmo de fotoinducibilidad de la codorniz japonesa *Coturnix coturnix japonica*. En este trabajo se señala que cuando la luz coincide con la Fase FotoInducible (FF) que se encuentra a la mitad de la noche subjetiva del animal este responde como si estuviera sometido a un fotoperíodo largo. Así por ejemplo, el ciclo LO 10:26 ocasionó una clara inducción en los niveles de secreción de Hormona Luteinizante. Sue Binkley (1990), experimentó con hamster dorado bajo diferentes condiciones de iluminación. Los hamsters mantenidos en LO 16:8 tenían testículos de aproximadamente 3 g de peso, mientras que los hamsters mantenidos en LO 8:16 tenían testículos de sólo 0.4 g. El fotoperíodo crítico para el hamster es de aproximadamente 12.5 h. Por lo tanto el hamster es fotosensible a días cortos y bajo estas condiciones evidencia regresión del testículo. La palabra regresión se refiere al proceso por el cual el testículo pierde peso, tamaño y cesa su producción de esperma. Cuando se aproxima la primavera los testículos se vuelven recrudescientes, es decir, incrementan en peso, tamaño y se reinicia la producción de células germinales. Por lo tanto el fotoperíodo y el escotoperíodo son los principales factores para la sincronización entre los ciclos estacionales ambientales y los ciclos reproductores o reproductivos anuales. Además de la reproducción, el crecimiento es otro factor regulado por esta sincronización.

1.5 ANTECEDENTES SOBRE LA INDUCCION FOTOPERIODICA EN LA REPRODUCCION Y CRECIMIEN- TO DE CRUSTACEOS Y

ESPECIFICAMENTE EN EL ACOCIL.

Al igual que el resto de los artrópodos, los crustáceos manifiestan su crecimiento a través del proceso conocido como ecdisis. El cual básicamente consiste en una serie de cambios fisiológicos importantes que tienen como finalidad el sustituir al exoesqueleto antiguo por uno nuevo, con el consecuente incremento de tamaño del animal. Este proceso, al igual que muchos otros en estos invertebrados, está regulado en parte por hormonas, y es el resultado de la coincidencia temporal de una serie de factores endógenos y exógenos.

1.5.1 CONTROL ENDOCRINO DE LA MUDA Y LA REPRODUCCION.

La muda y la reproducción son los eventos metabólicos más importantes involucrados en los ciclos de movilización de reservas orgánicas desde los sitios de almacenamiento hacia la epidermis y las gonadas respectivamente. La integración e interacción de los ciclos de muda y reproducción es particularmente obvia en el caso de las hembras adultas las cuales necesitan reservas orgánicas para la maduración del ovario. Ambos ciclos sugieren acción hormonal pero aún no está bien conocido como está controlada la coordinación de este mecanismo. Los pedúnculos oculares de los acociles contienen una variedad de hormonas o factores que aparentemente determinan procesos tan diversos como el crecimiento, muda, tasa metabólica, frecuencia cardíaca, metabolismo del azúcar y proteínas, balance hídrico, dispersión de pigmentos y actividad sexual (Lockwood, 1968). Los principios activos son elaborados por grupos de células nerviosas especializadas llamadas neurosecretoras cuyos cuerpos celulares están situados en diferentes regiones como el lóbulo óptico del pedúnculo ocular (Órgano X-Glándula Sinusal), el cerebro y posiblemente el ganglio torácico (Órgano Y). Las células neurosecretoras (ganglio cerebroide) en el sistema nervioso central de los crustáceos están agrupadas en varios tipos basadas en diferencias de tamaño, forma, localización y funcionamiento, estas células neurosecretoras son las responsables de la secreción

de las cuatro neurohormonas más importantes en los procesos de crecimiento y reproducción: la **Hormona Inhibidora de la Muda (HIM)**, **Hormona de la Muda (HM)**, **Hormona Inhibidora de las Gonadas (HIG)** y la **Hormona Estimuladora de las Gonadas (HEG)** (Adiyodi y Adiyodi, 1970).

15.1.1 CONTROL HORMONAL DE LA ECDISIS.

En el caso concreto de la muda de los crustáceos, se sabe que existe una estructura muy importante en el tallo ocular que es el punto de secreción y almacenamiento de algunas hormonas que regulan este proceso. Esta estructura se conoce como el complejo **Organo X -Glándula Sinusal (OX-GS)** (Adiyodi y Adiyodi, 1970).

Se ha postulado que el ciclo de la muda está regulado por dos hormonas: la HIM, proveniente del sistema OX-GS y la HM, proveniente de una glándula epitelial, el **Organo Y (OY)**, el cual es el responsable de la iniciación de la ecdisis debido a la liberación de HM. La hormona de la muda está constituida por un grupo de esteroides frecuentemente llamado ecdisonas que en los crustáceos pueden ser diferentes moléculas como la crustecdisona (20-hidroxiectdisona). En un animal intacto, la muda puede ser inhibida por la secreción de un péptido, la HIM, proveniente del complejo OX-GS que se encuentra en el tallo ocular. La extirpación del tallo ocular de un animal en la fase de intermuda da como resultado la liberación de la ecdisona desde el OY lo que inicia la ecdisis en estos organismos y provoca además el incremento en la frecuencia de la muda (Bittner y Kopanda, 1973).

1.5.1.2 CONTROL HORMONAL DE LA REPRODUCCION.

El proceso de reproducción de los crustáceos también concentra mecanismos hormonales importantes para que pueda llevarse a cabo. Prácticamente mucha de la información acerca del control endocrino de la reproducción en los crustáceos, se refiere a los decápodos.

Se sabe que en los tallos oculares (complejo OX-GS) de los crustáceos se encuentran hormonas que inhiben la muda (HIM) y las gonadas (HIG), pero el curso de los eventos que siguen a su lesión o extirpación (crecimiento somático, crecimiento ovárico o espermatogénesis precoz y alargamiento de los conductos deferentes) varía con la especie, tamaño del individuo, estación

y otros factores. Las observaciones de Stephens (1952), indican que la maduración gonadal y por lo tanto, posiblemente la secreción de HIG y de HIM están bajo la influencia de factores tales como la estación, fotoperíodo, termoperíodo, nutrición, salinidad y otros factores ambientales externos que actúan sobre receptores sensoriales. Como cualquier estímulo visual, la influencia para la secreción de HIG y HIM probablemente actúa a través de los ojos. Es interesante especular sobre el posible significado adaptativo acerca de la localización del órgano X cerca del ojo. De las dos fases de crecimiento de los ovocitos, la HIG inhibe únicamente la segunda fase mientras que la primera está bajo el control de la HM.

Por su parte el ganglio supraesofágico, específicamente el protocerebro y el cerebro parecen ser fuentes de hormona estimuladora de las gonadas (HEG). El desarrollo gonadal es aparentemente inducido cuando los niveles de HIM y HEG son altos, mientras que los de HM y HIG son bajos (Adiyodi, 1985).

1.5.2 RELACION ENTRE CRECIMIENTO Y REPRODUCCION.

En animales juveniles se da énfasis al crecimiento somático, las gonadas pueden manifestar un crecimiento positivo si éste se provoca con la ablación del tallo ocular. El crecimiento reproductivo comienza usualmente con la pubertad; en algunas especies las gonadas pueden ser inducidas a la maduración en la pubertad o en la prepubertad. Algunos decápodos continúan creciendo y reproduciéndose en estado adulto. En este caso tanto la HIM como la HIG presentan dos tipos de relación en cuanto a la concentración de dichas hormonas en hemolinfa, en la primera, ambas hormonas presentan un nivel elevado durante el período conocido como postmuda, posteriormente, durante la intermuda se manifiesta una oscilación de los niveles de la HIG mientras se lleva a cabo la recrudescencia de las gonadas, por otro lado, la segunda relación se da como la expresión antagonica entre ambas hormonas que se presenta durante el período de premuda y muda donde la HIM se encuentra baja y la HIG se encuentra alta (Adiyodi y Adiyodi, 1970). Esto se entiende, debido a que cuando un animal se encuentra en un período de ecdisis, sus requerimientos energéticos están encaminados a este proceso, y por lo tanto, fenómenos como la recrudescencia no se verán favorecidos.

1.5.3 CONTROL HORMONAL DE LA DIFERENCIACION SEXUAL.

En los crustáceos se ha determinado un patrón de diferenciación sexual alométrica en machos y hembras (Teissier, 1960) con estados separados en períodos críticos. La sincronía entre la maduración gonadal y la de los caracteres sexuales secundarios sugiere que esta transformación somática se puede dar bajo la influencia de mecanismos hormonales que controlan la actividad y el comportamiento sexual. Los períodos críticos de separación de los estados de maduración alométrica pueden representar señales en los niveles hormonales, cambios en la sensibilidad de los órganos blanco o ambos (Adiyodi y Adiyodi, 1970).

1.5.3.1 HORMONAS Y CARACTERES SEXUALES FEMENINOS.

Existen evidencias de la presencia de una hormona ovárica capaz de controlar la maduración de los caracteres sexuales secundarios en los decápodos; tal como sucede en anfípodos e isópodos. Pero la existencia de una Hormona Femenina (HF) en decápodos se mantiene aún desconocida. En el isópodo *Laloea bathica*, cuando los machos son privados de la glándula androgénica, se manifiestan los caracteres sexuales femeninos simultáneamente (Reidenbach, 1967). Estudios similares en decápodos podrían indicar que los caracteres sexuales femeninos permanentes tienen características neutras inhibidas en los machos por la Hormona Androgénica (HA), pero que las hembras normales pueden ser estimuladas posiblemente por la HF y/u otras hormonas. Esto sugiere que quizá la HF no es necesariamente ovárica. El desarrollo de caracteres sexuales temporales que usualmente hacen su aparición con la maduración del ovario y que probablemente dependen de las hormonas femeninas son sin embargo detenidos o inhibidos cuando se ablucciona el pedúnculo ocular en *Carcinus maenas* y *Pachygrapsus marmoratus* (Cornubert, et al., 1952 y Charniaux-Cotton y Kleinholz, 1964).

Si la HF es estrictamente ovárica en el origen de los decápodos como parece ser en anfípodos e isópodos, esto sugiere que esta hormona no juega algún papel muy importante de estimulación en la ovogénesis, en contraste con la hormona androgénica, la cual promueve la espermatogénesis. La evidencia existente favorece una autodiferenciación ovárica en crustáceos como en otros invertebrados. Sin embargo, nuestro conocimiento actual

sobre el control del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de las hembras en decápodos es fragmentado y muy pobre, pero puede deberse a la posible relación entre estos caracteres y la HEG.

1.5.3.2 HORMONAS Y CARACTERES SEXUALES MASCULINOS.

La glándula androgénica fue descubierta por Charniaux-Cotton en 1954 en los machos del anfípodo *Orchestia gammarellus*. La presencia de esta glándula está ahora bien establecida en la mayoría de los grupos de malacostráceos (Charniaux-Cotton, 1960 y 1962). La glándula se sitúa en la porción subterminal eyaculatoria del espermiducto en medio del músculo de la coxa del último par de apéndices locomotores. La glándula androgénica secreta una hormona u hormonas que determinan no solamente el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y comportamiento sexual, sino también, algunos caracteres primarios como la diferenciación de los testículos, espermiductos primarios y espermatogénesis normal (Charniaux-Cotton, 1960 y 1962). La diferenciación testicular depende de la presencia de la HA y de la HM, mientras que la diferenciación ovárica ocurre en presencia de la HM solamente (Charniaux-Cotton y Kleinholz, 1964). Estudios *in vitro* realizados por Bonnenfant (1964), confirmaron que la HA es necesaria para el mantenimiento de la zona germinativa y para la espermatogénesis normal.

Se cree que para que actúe la HA selectivamente sobre la maduración de los caracteres sexuales masculinos, se necesitan niveles óptimos y continuos de dicha hormona en hemolinfa durante el desarrollo alométrico.

1.5.4 INDUCCION DE LA MUDA Y REPRODUCCION EN EL ACOCIL.

Los antecedentes que se refieren a la inducción de los procesos relacionados con la ecdisis y la reproducción en los acociles, se remontan a 1952, cuando Stephens investigó los mecanismos reguladores del ciclo reproductor en estos crustáceos y experimentó con *Cambanus virilis* mantenidos en LO 20:4, en LO 12:12 y en obscuridad constante. De acuerdo con él, el desarrollo de los ovarios es generalmente inhibido por una substancia hormonal que él llamó substancia-S (HIG) secretada por la glándula sinusal, la cual es inhibida por la luz en cierto grado. Consecuentemente, parece que la luz (en un inicio) actúa en la maduración

favoreciendo el desarrollo gonadal y posteriormente provocando la degeneración de los ovocitos. Por otra parte, el ovario inicia su desarrollo cuando el animal es mantenido en obscuridad durante el período de otoño-invierno, mientras que durante el período posterior al invierno éstos no manifiestan cambios.

En un trabajo posterior, Stephens (1955), demostró la influencia del fotoperíodo en la frecuencia de muda del acocil. Estableciendo tres grupos experimentales, obscuridad constante, ciclo LO 12:12 y LO 20:4. El grupo de obscuridad constante mostró la mortalidad más baja y no se presentó una sola muda en los 130 animales en experimentación. En el grupo con fotoperíodo 12:12 se presentó una mortalidad del 28% y una muda del 40.6%. Finalmente el grupo de 20:4 tuvo una mortalidad del 62% y una muda del 54.4%.

Con base en esto el autor concluye que existe una clara influencia del fotoperíodo sobre la viabilidad de estos animales. Se manifiesta mediante un incremento significativo en la mortandad de los mismos, los cuales no muestran gastrolitos al tiempo de la muerte. Conforme se aumentó el fotoperíodo aumento la mortandad. El hecho de que este incremento ocurra en animales que no muestran gastrolitos puede sugerir que el incremento en la mortalidad esta relacionado con el incremento en la tendencia a mudar.

En 1953, T. Sukó describió el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en los apéndices de estos decápodos, estableciendo claramente una correspondencia alométrica entre el tamaño de los animales y el desarrollo de ciertos caracteres sexuales secundarios.

Posteriormente, este mismo autor (1956), investigó la influencia de la temperatura y el movimiento de los pleópodos maternos como factores que modifican el tiempo de desarrollo de los huevecillos. Estableció una relación inversamente proporcional entre la temperatura, el tiempo de desarrollo de los huevecillos y el movimiento de los pleópodos maternos. Cuando aumenta la temperatura, aumenta la tasa de movimiento de los pleópodos y por lo tanto, disminuye el tiempo de desarrollo de los huevecillos. Posteriormente (1958A), Sukó llevó cabo un estudio acerca de los cambios histológicos en el desarrollo de los ovarios influenciados por las condiciones de obscuridad constante y comprobó la inhibición de la HIG por determinada cantidad de luz.

Los diferentes factores que influyen en la muda en el acocil *Procambarus clarkii* fueron investigados por Bittner y Kopanda (1973), quienes experimentaron con diferentes factores que podrían inducir o inhibir la muda, principalmente ablación de pedúnculo ocular, hacinamiento, diferentes grados de lesión de miembros, extracción y perfusión de hemolinfa y corte de ambos nervios ópticos. En términos generales, lograron incrementar la frecuencia de muda (excepto con la extracción de hemolinfa) conforme se perdía masa corporal, mientras que el hacinamiento, fue un factor que disminuyó notablemente este proceso. El hecho de que la muda, y por lo tanto el crecimiento estén controlados por ecdisonas ha ocasionado que muchos trabajos hayan tratado de inducir la muda por medio de la ablación del pedúnculo ocular o por la inyección de varias formas de la hormona ecdisona la cual es secretada desde el órgano Y en su forma alfa y convertida a su forma beta en los órganos blanco. La inyección de extractos del OY o de preparaciones purificadas de algunas formas de ecdisona se ha llevado a cabo para promover los eventos del ciclo de muda. Por ejemplo, enseguida de la infiltración con la forma beta de la ecdisona disuelta en etanol y solución salina, el acocil *Procambarus clarkii* entra en estado de premuda e inicia la formación de gastrolitos (Lowery, 1988). Un trabajo reciente, es el de Corona-García (1993), en donde señala la influencia que ejerce el fotoperíodo sobre la ecdisis de acociles juveniles de la especie *Procambarus digueti*. Este autor reporta que el incremento del fotoperíodo desde cuatro hasta 12 de las 24 horas del día, favorece la frecuencia de la muda y que los fotoperíodos mayores de las 12 horas, es decir con duraciones comprendidas desde 14 hasta 20 de las 24 horas del día, reducen la probabilidad de vida del animal.

Durante el desarrollo del acocil *Procambarus clarkii*, se han reportado correlaciones entre la longitud del cuerpo, el número de mudas, la diferenciación y maduración sexual (Sukó, T., 1953, 1954; 1955, 1956, 1958 y 1958 A). Este tipo de correlaciones parece ser diferente en los machos que en las hembras. La maduración sexual del testículo es más temprana (aproximadamente 10 meses después de la eclosión), lo que permite que aproximadamente a los doce meses de edad se produzca en los organismos juveniles, la primera muda de reproducción cuando el animal tiene un tamaño de 55 a 60 mm. En la hembra, el

período de desarrollo dura alrededor de 12 meses después de la eclosión y alcanzan de 65 a 66 mm de longitud, no es sino hasta después de la muda de reproducción que los ovocitos alcanzan su desarrollo y se lleva a cabo la deposición de vitelo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El efecto que tiene la luz sobre el sistema neuroendocrino de los crustáceos es bien conocido, aunque hay aspectos de la regulación neuroendocrina de la reproducción de estos animales que todavía no están claros. En un ritmo circadiano sometido a un régimen LO de 24 horas, existe una fase especialmente sensible a la luz conocida como fase fotoinducible (Follet *et al.*, 1991), durante la cual pueden promoverse los eventos fisiológicos antes mencionados y/u otros. Esta fase fotoinducible ha sido establecida en algunos insectos (Pittendrigh 1966; Saunders 1978 y 1979), en aves (Follet y Sharp 1969), y en otros organismos. En el acócil *Procambarus clarkii*, esta fase fotoinducible no se ha determinado. El conocimiento de este fenómeno para dicho organismo es importante pues puede utilizarse en biología aplicada (acuicultura), para poder optimizar los mecanismos de reproducción con bases fisiológicas sólidas. Esto permitirá establecer condiciones de cultivo más adecuadas en base a la incidencia del fotoperíodo que promuevan procesos como el desarrollo corporal y la maduración gonadal.

Por otra parte es importante señalar que el estudio del fotoperiodismo en estos crustáceos es escaso, siendo éste de vital interés para el entendimiento general de los sistemas de medición del tiempo en estos invertebrados. Actualmente, se conocen ya algunas características particulares de los ritmos de sensibilidad a la luz y de locomoción durante la ontogenia de estos animales, sin embargo, el ritmo de fotoinducibilidad o fase

fotoinducible no se ha investigado. Por lo tanto, la aportación más importante de este trabajo es el comenzar a dilucidar la interacción entre los procesos rítmicos y la inducción fotoperiódica en la ontogenia.

El fotoperiodismo ha sido ampliamente estudiado en aves, insectos, plantas y mamíferos. Con todos estos estudios se ha manifestado la importancia de la luz como un sincronizador exógeno a diferentes ritmos endógenos, además de su función como agente inductor de fenómenos como la reproducción y el desarrollo. Sin embargo, en este sentido los crustáceos representan un grupo poco estudiado. En trabajos previos (Castañón-Cervantes, *et al.*, 1992; Fanjul-Moles *et al.*, 1992) se ha comprobado la importancia de la luz sobre diversas funciones en *P. clarkii*. Por lo tanto, es importante analizar y entender el papel de la luminosidad como un factor inductor de procesos tales como el crecimiento, la maduración sexual y gonadal en estos invertebrados.

3. HIPOTESIS

El acocil es un animal de comportamiento nocturno con una noche subjetiva en la cual aumenta su actividad. Si este animal presenta durante el desarrollo una fase fotoinducible en relación con el crecimiento y la maduración gonadal, esta fase fotoinducible debe de encontrarse en la noche subjetiva. No sólo la duración, sino el cambio en el fotoperíodo pueden incidir sobre esta fase acelerando y/o frenando este desarrollo.

4. OBJETIVOS

1. Tratar de dilucidar la interacción entre los procesos rítmicos y la inducción fotoperiódica en la ontogenia.
2. Estudiar el efecto de la duración de diferentes fotoperíodos sobre el crecimiento, maduración sexual y gonadal en formas juveniles de acocil.
3. Estudiar si cambios en el encendido y apagado de la luz sobre una posible fase fotoinducible que se encontraría en la noche subjetiva inciden en el crecimiento y el desarrollo del acocil.
4. Estudiar si existe una correlación entre la duración del fotoperíodo, los cambios de encendido y apagado de la luz, el crecimiento y la maduración sexual y gonadal.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 MONTAJE DE ACUARIOS.

Los acuarios en los que se llevó a cabo este trabajo contenían un filtro biológico (fig. 1) elaborado mediante una placa de acrílico con 2 orificios de media pulgada cada uno en esquinas opuestas y orificios hechos con broca de 1/8 a cada 2.5 cm de distancia entre sí. Sobre esta placa se colocó una capa de grava previamente lavada; encima de la cual se colocó una capa de sustrato como fuente de carbonato de calcio (conchas de bivalvo trituradas y/o coral triturado) el cual es indispensable para que el proceso de muda se lleve a cabo satisfactoriamente. Finalmente sobre la capa anterior se adicionó otra de arena fina perfectamente lavada y tamizada para eliminar el contenido excesivo de sales.

La aireación de los acuarios estuvo a cargo de una compresora de 2 HP durante las tardes y del aire de la compresora de la Facultad de Ciencias durante las mañanas.

5.2 ANIMALES.

En este trabajo se utilizaron 100 organismos juveniles de dos meses de edad (fig. 2). Desde el momento en que se detectaron las hembras ovígeras hasta cumplir los dos meses de edad, los animales se mantuvieron en un régimen luz-obscuridad (LO) 12:12. Cabe mencionar que los animales recién eclosionados, aparentemente presentan una respuesta rítmica evidente a la luz (ERG) de tipo ultradiana (Fanjul-Moles, *et al.*, 1987). Posteriormente (a partir de las cuatro semanas) los acociles presentan un ritmo circadiano de sensibilidad a la luz con manifestación diurna, el cual paulatinamente se va modificando hacia una respuesta

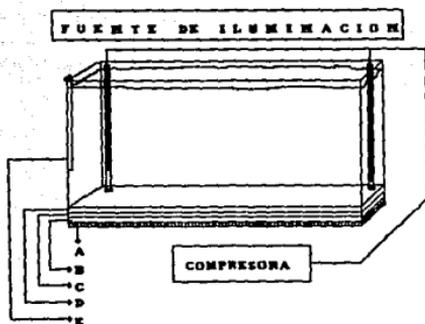


Fig.1. Esquema de los acuarios con filtro biológico utilizados para albergar a los acociles empleados durante la fase experimental, cada uno de ellos contenía cinco organismos y se mantuvieron aireados por una compresora de 2 HP. El filtro biológico se elaboró con a) Una placa de acrílico perforada con dos tubos de aireación, b) Una capa de grava, c) una capa de concha de bivalvo y coral triturado, d) una capa de arena fina y, finalmente e) la temperatura fue mantenida constante a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ por un calentador con termostato de 100 watts.

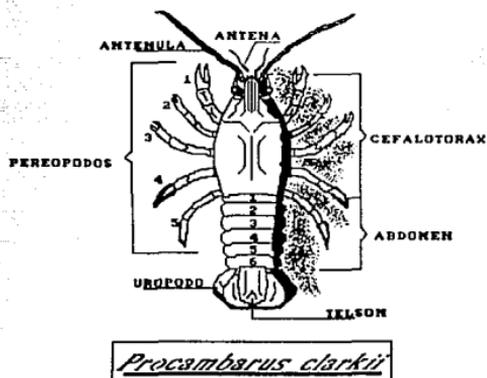


Fig.2. Esquema de un acocil juvenil *Procambarus clarkii* con la tagmosis general en este grupo de cambáridos.

nocturna (Fanjul-Moles, *et al. op. cit.*). Por esta razón cada experimento no se inició hasta que los organismos cumplieron los dos meses de edad y por lo tanto presentan ritmos claros con una noche subjetiva igual a la del adulto.

Estos animales se sometieron a diferentes ciclos LO hasta que se pudieron evidenciar en ellos caracteres sexuales secundarios de acuerdo con Sukò en 1953. En la fase experimental estos 100 individuos se separaron en cinco grupos, un grupo control y cuatro grupos experimentales, cada uno de los cuales tenía tres réplicas. Cada uno de los grupos estaba conformado por cinco organismos colocados en acuarios de aproximadamente 70 X 40 cm con el objeto de suprimir el canibalismo y el estrés por falta de espacio. Los animales eran alimentados *ad libitum* dos veces por semana con zanahoria, chayote, calabaza y papa cocidos y picados y filete de pescado desmenuzado y crudo una vez por semana. Los acuarios se mantuvieron en condiciones de temperatura constante $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en la cámara de ambiente controlado No. 4 de la Facultad de Ciencias.

5.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

El grupo CONTROL estuvo sometido a condiciones LO 12:12 y los cuatro grupos experimentales fueron: UNO) LO 12:12, con dos pulsos de luz de 30 minutos 4 y 2 horas antes de iniciarse la fase luminosa; DOS) LO 16:8 con dos pulsos de oscuridad de 30 minutos cada uno 4 y 2 horas antes de iniciarse la fase oscura; TRES) LO 8:16 interrumpido con dos pulsos de luz de 30 minutos 4 y 2 horas antes de iniciarse el fotoperíodo y CUATRO) oscuridad constante; en la figura 3 se resume claramente todo el protocolo experimental.

Para todas las condiciones, la luz se encendía a las 07:00 hrs. Es importante señalar que el grupo de luz constante no se tomó en cuenta pues el estrés provocado por esta condición causa la muerte en los primeros días de experimentación.

El tipo de protocolos utilizados en estos experimentos puede parecer poco convencional, sin embargo es una combinación de la metodología de Adkisson (1964) en la cual se interrumpen ciclos de T 24 con un pulso suplementario de luz de una hora durante la fase nocturna y los experimentos de doble pulso de Pittendrigh (1965).

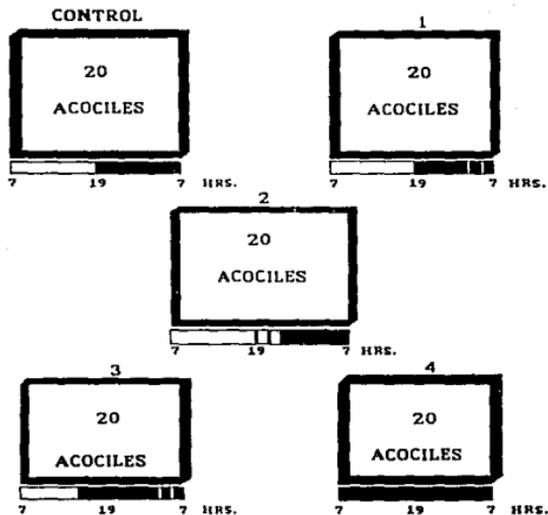


Fig. 3. Esquema de los protocolos experimentales utilizados en el presente trabajo (En blanco se representa la fase luminosa y en negro la fase oscura).

CONTROL. Grupo de organismos sometidos a un fotoperíodo 12:12 (LO).

1. Grupo experimental con un fotoperíodo 12:12 (LO) con dos pulsos de luz de 30 minutos de duración, 4 y 2 horas antes de que se inicie la fase luminosa.

2. Grupo experimental con un fotoperíodo 16:8 (LO) con dos pulsos de oscuridad de 30 minutos de duración, 4 y 2 horas antes de que se inicie la fase oscura.

3. Grupo experimental con un fotoperíodo 8:16 con dos pulsos de luz de 30 minutos de duración, 4 y 2 horas antes de que se inicie la fase luminosa.

4. Grupo experimental en oscuridad constante.

Para todas las condiciones se realizó semanalmente la medición del tamaño de los organismos, registrando Longitud Total (LT) expresada en milímetros. También una vez a la semana se midió el peso en gramos (P) de todos los animales, así como la relación peso/talla (P/LT) y se investigó al microscopio estereoscópico el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios.

En el momento en el que tanto la talla como los caracteres sexuales secundarios lo indicaron, todos los animales fueron sacrificados y se extrajeron las gonadas. Para determinar el grado de madurez de los caracteres sexuales secundarios, así como la talla a la cual se realizaron las disecciones, se tomaron como referencia los trabajos realizados por Sukò (1953), en los cuales se reportan correlaciones entre la longitud del cuerpo, el número de mudas, la diferenciación y maduración sexual. Este tipo de correlaciones parecen ser diferentes entre los machos y las hembras. En cuanto al desarrollo de caracteres sexuales secundarios se tomó en cuenta para los machos las características del primer par de apéndices abdominales y del tercer par de pereópodos (fig. 4) y para las hembras, las características del segundo par de apéndices abdominales (fig. 5). Por lo tanto, se determinó extraer las gonadas cuando los animales alcanzaron los 65 mm de longitud y sus caracteres sexuales secundarios eran evidentes. Las gonadas se fijaron en Bouin o Formalina (Formaldehído al 10%), obteniéndose los mejores resultados en este último fijador; los órganos se deshidrataron con alcoholes graduales de la siguiente manera: 30%, 50%, 60%, 70%, 96%, 100% y xileno, posteriormente los órganos fueron incluidos en paraplast (Oxford Labware, St. Louis, Mo. U.S.A.) a una temperatura de 59°C durante dos horas. A continuación se hicieron cortes de 8 micras de espesor con un microtomo (American Optical modelo 820). Estos cortes se sometieron a rehidratación y a tres diferentes técnicas de tinción: Hematoxilina-Eosina, Azul de Toluidina y Tricrómica de Masson (Rivas, 1981), finalmente se deshidrataron los cortes y se montaron con bálsamo de Canadá. Las laminillas obtenidas fueron revisadas bajo microscopio compuesto y de ellas se seleccionaron las más representativas para ser fotografiadas y posteriormente analizadas con más detalle.

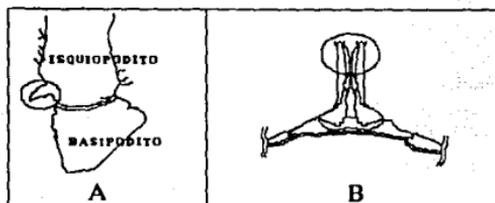


Fig. 4. Estos son los caracteres sexuales secundarios señalados por Sukô en 1953, los cuales indican la madurez sexual en los machos de *P. clarkii*, en A se muestra la espícula del tercer par de pereópodos (encerrada en un círculo) y en B, se muestra el primero y segundo par de pleópodos modificados para la manipulación de espermátóforo

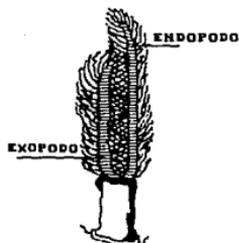


Fig. 5. Caracteres sexuales secundarios de la hembra madura señalados por Sukô (1953), primer par de pleópodos.

5.4 ANALISIS DE DATOS.

Para el análisis de los resultados de talla, peso y relación peso/talla, se construyó una base de datos con la ayuda del programa de cómputo "Quattro pro". Para ello se obtuvieron los registros promedio semanales de cada uno de los parámetros antes señalados. Además de este procedimiento, todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía y también a un análisis de rangos múltiples utilizando el programa "Statgraphics" el cual proporcionó información sobre los grupos de datos más parecidos entre sí, y sobre aquellos que presentaron diferencias estadísticamente significativas como resultado del proceso experimental al que los animales fueron sometidos.

Para el análisis gonadal de las hembras se construyeron gráficas de tipo pastel, en las cuales se mostró el grado de madurez del ovario por medio de su color de acuerdo con Adiyodi (1985), donde indica que conforme avanza el desarrollo, el ovario presenta una coloración más oscura. En este caso se tomaron cinco parámetros de madurez: a) ovario sin desarrollar, b) ovario indiferenciado (color blanco), c) ovario poco desarrollado (amarillo), d) ovario desarrollado (naranja) y e) ovario maduro (café). El análisis fotográfico de los cortes histológicos sirvió de apoyo para evaluar la madurez gonadal alcanzada por los animales durante el proceso experimental y correlacionar estos resultados con los obtenidos mediante el análisis estadístico.

6. RESULTADOS

La fase experimental de este trabajo se concluyó a las 13 semanas de iniciada (aproximadamente 5 meses de edad en los acociles), debido a que fue en esta etapa en la que se encontraron a los primeros organismos que evidenciaron el desarrollo de caracteres sexuales secundarios maduros (ver figs. 4 y 5) y de talla superior a los 65 mm de longitud total.

6.1 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE EL CRECIMIENTO.

Para todos los parámetros evaluados (LT, P y P/LT) los animales de la condición control, es decir, sometida a un ciclo LO 12:12 mostraron un crecimiento mayor que en el resto de las condiciones, seguida de la 12:12 con pulsos de luz (condición uno).

6.1.1 LONGITUD TOTAL.

En la figura 6, se observa el incremento temporal en la longitud total de los animales expresada en mm. Al finalizar las trece semanas de experimentación, es evidente que los animales sometidos a las condiciones control y 12:12 con pulsos de luz, alcanzaron el mayor tamaño en promedio (56.92 y 51.07 mm respectivamente). Por otra parte, los animales de las condiciones tres y cuatro (8:16 con pulsos de luz y oscuridad constante) presentaron un crecimiento parecido entre sí. Los organismos de la condición cuatro presentaron durante las primeras cuatro semanas un crecimiento muy pronunciado y posteriormente éste se ve amortiguado notablemente finalizando en una longitud total promedio de 49.09 mm. Los acociles de la condición tres por su parte, presentaron un crecimiento más o menos constante

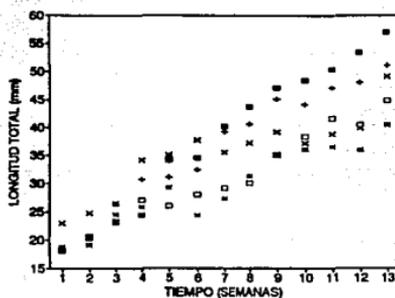


Fig. 6.- En esta gráfica se observa un mayor crecimiento en la condición control y el menor en la condición experimental dos. Al final del experimento (trece semanas), los animales tienen aproximadamente 21 semanas de edad.

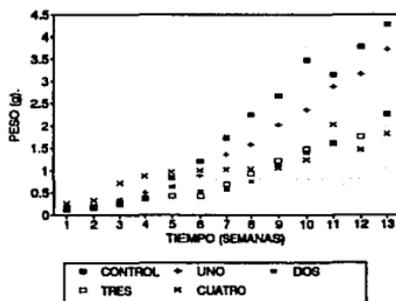


Fig. 7.- Cambio de peso semanal durante el experimento. La condición control mostró diferencias significativas con las condiciones dos, tres y cuatro (ver detalles en el texto). La condición experimental uno evidencia un mayor crecimiento.

durante todo el experimento, sin embargo, éste siempre se mantuvo por debajo de las condiciones control y uno, alcanzando finalmente un longitud total promedio de 44.85 mm. Finalmente, los juveniles de la condición dos (16:8 con pulsos de oscuridad) presentaron el menor crecimiento durante la fase experimental alcanzando una longitud total de 40.45 mm.

Al someter los resultados al análisis de varianza de una vía (ANDEVA) no se encontraron diferencias significativas (ANDEVA = 1.886 $P > 0.05$). Sin embargo el análisis de rangos múltiples para buscar diferencias entre los grupos mostró que los animales de las condiciones control y experimental 2 son estadísticamente diferentes $P < 0.05$.

6.1.2 PESO.

En lo que se refiere al peso de los acociles juveniles, se encontró un comportamiento algo similar a lo observado para longitud total. En este caso, los animales de las condiciones control y 12:12 con pulsos de luz, manifestaron el mayor incremento en peso. A la semana trece, el peso promedio de los animales fue de 4.26 y 3.72 g., respectivamente. En la figura 7, se observa este comportamiento y además, se evidencia más claramente que en la figura anterior, una diferencia entre las condiciones control y uno con el resto de las condiciones experimentales. Así, puede verse que las condiciones dos (16:8 con pulsos de oscuridad), tres (8:16 con pulsos de luz) y cuatro (oscuridad constante) alcanzaron al final del experimento un peso promedio de 2.24, 2.27 y 1.82 g., respectivamente.

En este caso, se practicó también el análisis de varianza de una sola vía (ANDEVA) el cual arrojó los siguientes resultados: ANDEVA = 2.535 $P < 0.05$. Por su parte, el análisis de rangos múltiples manifestó que el grupo control y los grupos dos, tres y cuatro son significativamente diferentes $P < 0.05$, el resto de las condiciones no arrojó diferencias significativas.

6.1.3 RELACION PESO/LONGITUD TOTAL.

Con el objeto de correlacionar las variables analizadas, se investigó la relación alométrica entre el peso y la longitud total de los acociles a lo largo del tiempo, encontrando que los organismos siguen manifestando un comportamiento muy similar a los anteriores. Los organismos de la condición control alcanzaron un tamaño promedio de 0.075 g/mm, en la condición experimental uno 0.073 g/mm, en la condición experimental dos 0.055 g/mm,

en la condición tres 0.051 g/mm y finalmente 0.037 g/mm en la condición experimental cuatro (Fig. 8). Para esta relación, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas AN-DEVA = 1.562 $P > 0.05$, mientras que el análisis para encontrar diferencias entre los grupos mostró que existen diferencias significativas entre el grupo control y los grupos dos y tres $P < 0.05$.

6.2 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE LA MADUREZ SEXUAL Y GONADAL.

El análisis histológico de las gonadas de los animales en experimentación, mostró resultados muy interesantes en lo que respecta al grado de madurez alcanzado en las diferentes condiciones. De manera general, puede decirse que los animales de mayor talla (condiciones control y uno), mostraron también una mayor diferenciación gonadal y que fueron los primeros en evidenciar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios previamente señalados.

Para facilitar la presentación y comprensión de los resultados de esta investigación, se han incluido las fotografías más representativas de los ovocitos y testículos de los animales de cada condición analizada. Las gráficas elaboradas para mostrar la diferencia de madurez ovárica (fig. 9) señalan que la mayor madurez alcanzada se muestra en la condición experimental uno en la que se encontró un 20% de organismos con ovarios color café, un 40%, 10% y 30% con ovarios color naranja, amarillo y blanco respectivamente. Cabe señalar, que la fotografía de los ovocitos de las hembras de la condición de 24 horas obscuridad no se incluye, debido a que en esta condición el grado de desarrollo gonadal fue tan pequeño, que fue imposible obtener la gonada durante la disección. A continuación se presenta una breve descripción de los resultados histológicos para cada condición.

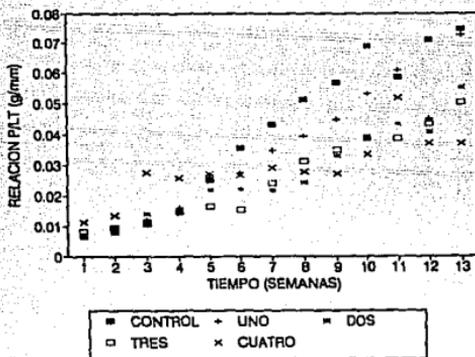


Fig. 8.- En la presente gráfica se ilustra el crecimiento alométrico de los animales sometidos a experimentación. Una vez más, los organismos de la condición control (LO 12:12) son los de mayor incremento. CONTROL=LO 12:12, UNO = 12:12 CON PULSOS DE LUZ, DOS = 16:8 CON PULSOS DE OBSCURIDAD, TRES = 8:16 CON PULSOS DE LUZ Y CUATRO = OBSCURIDAD CONSTANTE.

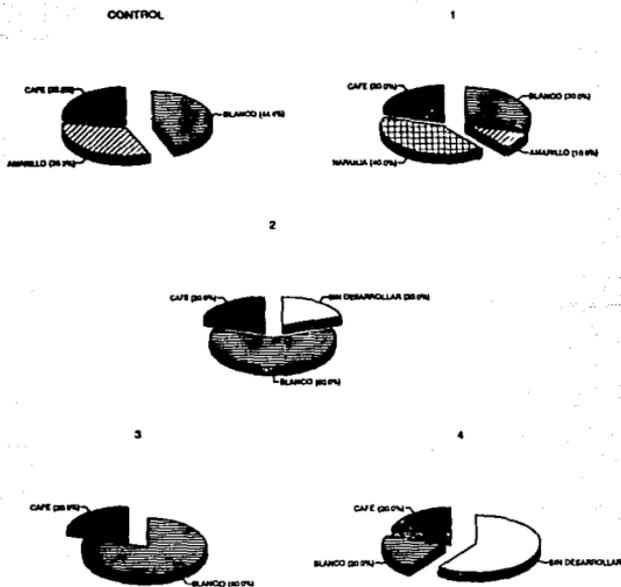


Fig. 9.- Comparación de la madurez ovárica alcanzada por las hembras tras trece semanas de experimentación. El grado de madurez es directamente proporcional al color del ovario. Los ovarios más oscuros son los más maduros. CONTROL) LO 12:12; 1) LO 12:12 CON PULSOS DE LUZ; 2) LO 16:8 CON PULSOS DE OSCURIDAD; 3) LO 8:16 CON PULSOS DE LUZ Y 4) OSCURIDAD CONSTANTE.

6.2.1 HEMBRAS.

CONDICION CONTROL: La mayoría de los ovocitos de esta condición presentaron un aspecto similar al que se muestra como ejemplo en la figura 10. La imagen corresponde a un ovocito procedente de un ovario de 18 mm de longitud, perteneciente a un animal de 66 mm de longitud total. El ovocito carece de vitelo, aunque presenta un citoplasma granuloso y un halo que empieza a formarse alrededor del núcleo, el cual se encuentra en posición central como corresponde a un ovocito inmaduro.

CONDICION EXPERIMENTAL UNO: En la figura 11 se observa la imagen de un ovocito correspondiente a esta condición. A pesar de tratarse de un animal menor que la hembra de la condición anterior (59 mm), este organismo presentó un ovario mayor, 21 mm y con un grado de madurez más avanzado. Se puede observar un ovocito más o menos esférico y lleno de vitelo. El núcleo se encuentra en posición excéntrica, es esférico y con numerosos nucleolos. Las células foliculares que rodean al ovocito adquieren una forma alargada.

CONDICION EXPERIMENTAL DOS: Esta fue una de las condiciones con menor grado de madurez gonadal. En este caso, la figura 12 muestra un ovario completo con ovocitos claramente indiferenciados. Corresponde a un ovario color blanco de 6 mm de longitud y de un animal de 42 mm de longitud total. Hacia la derecha, puede observarse un ovocito inmaduro con el citoplasma granuloso y el núcleo central, en el cual, los nucleolos se encuentran dispersos a diferencia de los ovocitos maduros en los cuales éstos se acomodan en la periferia.

CONDICION EXPERIMENTAL TRES: Esta condición, se caracterizó por presentar hembras con ovarios de color blanco y ovocitos inmaduros, uno de los cuales se muestra en la figura 13. Corresponde a un animal de 42 mm de longitud total y puede observarse un ovocito claramente inmaduro, carente de vitelo y con el citoplasma granuloso. En este caso, en el núcleo central se observan pocos nucleolos hacia la periferia y lo que parece ser cromatina granulosa en el interior. Rodeando al ovocito pueden observarse células foliculares alargadas.

6.2.2 MACHOS.

CONDICION CONTROL: Los testículos de los animales de esta condición muestran como característica particular aproximadamente un 50% de los cistes repletos de espermatozoides y el otro 50% de los cistes llenos de espermatoцитos secundarios. En la figura 14 puede diferenciarse a los espermatozoides como las células acomodadas aproximadamente al centro del corte en la luz de los cistes de los espermatoцитos secundarios localizados en los cistes periféricos. En la parte inferior izquierda se observa el corte transversal de un conducto espermático lleno de espermatozoides. Cabe destacar el gran tamaño de las células intermedias, lo que es signo de madurez. La imagen corresponde a un animal de 55 mm de longitud total.

CONDICION EXPERIMENTAL UNO: En la figura 15 se observan numerosos cistes con espermatogonias, las cuales se encuentran aproximadamente en la parte inferior del corte y se observan como células basófilas con núcleo muy grande y central. Al centro se observan dos cistes con algunos espermatozoides, que son células hexagonales pequeñas y algunos otros vacíos. Finalmente en la parte superior del corte pueden distinguirse algunos espermatoцитos primarios y células acompañantes. Debido a la LT del animal (44 mm) se considera que este testículo está relativamente desarrollado.

CONDICION EXPERIMENTAL DOS: En esta fase experimental se pudieron observar una gran cantidad de espermatogonias en división (metafase), encontrándose la mayoría de los cistes bajo esta condición que se ilustra en la figura 16 tomada de un organismo de 18.5 mm de LT.

CONDICION EXPERIMENTAL TRES: Los animales sometidos a este experimento, muestran en los cortes histológicos una composición bastante heterogénea en los cistes, pues como se puede observar en la figura 17, hay una gran cantidad de cistes con espermatogonias, los cuales se pueden observar hacia la zona central del corte y teñidos en un tono más claro. En los extremos de los cortes podemos observar células esféricas más pequeñas con los núcleos en color oscuro y circulares, los cuales se pueden identificar como espermatoцитos primarios. En la parte inferior derecha del corte y cerca el conducto espermático, se puede

observar un buen número de cistes con células pequeñas de núcleos alargados y muy oscuros, los cuales son espermatoцитos secundarios y finalmente podemos observar algunos cistes vacíos, esta figura fue tomada de un animal con 58.5 mm de LT.

CONDICION EXPERIMENTAL CUATRO: En la figura 18 se observa un corte de testículo de un animal de 44 mm de LT. Puede distinguirse que la mayoría de los cistes presentan una gran cantidad de espermatoгонias, las cuales no se observan en división. En este caso, sólo se observan algunos espermatoцитos secundarios y en la luz del tubo espermático se ven algunos espermatozoides. Algunos cistes presentan espermatoгонias y espermatoцитos primarios en degeneración. Por lo tanto, se considera que el grado de desarrollo es este testículo no es muy avanzado.

En resumen, los resultados de este trabajo indican que los animales sometidos a condiciones de iluminación 12:12 (CONTROL) y 12:12 con pulsos de luz (EXPERIMENTAL UNO) tienden hacia un mayor desarrollo corporal y una maduración sexual y gonadal más temprana. Por su parte, los organismos de las condiciones 16:8 con pulsos de oscuridad (EXPERIMENTAL DOS) y oscuridad constante (EXPERIMENTAL CUATRO), manifestaron el crecimiento más lento y la menor madurez gonadal respectivamente. La condición 8:16 con pulsos de luz (EXPERIMENTAL TRES) mantiene valores más o menos intermedios tanto en LT como en peso y madurez gonadal con respecto a lo observado en los demás lotes. Aunque no se cuantificó estrictamente la sobrevida de los animales en cada condición, de acuerdo con lo observado, puede decirse que los animales de la condición experimental cuatro, fueron los de mayor sobrevida, mientras que el caso contrario fue el de los organismos de las condiciones experimentales uno y dos.

Aún así, es pertinente aclarar, que con el fin de aumentar la representatividad para todas las mediciones, el número mínimo tomado en cuenta fue de 10 animales por condición; es decir, el 50% de los que inicialmente fueron colocados en cada lote.

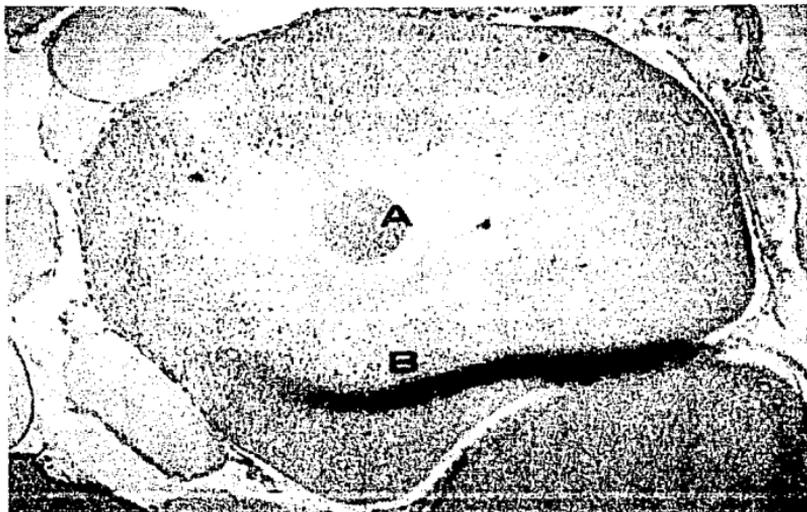


Fig. 10. Ovocito de un organismo sometido a fotoperíodo LO 12:12.

Se observa un ovocito parcialmente inmaduro con A) núcleo central y B) citoplasma granuloso.

LT del animal: 66 mm.

Aumento: 3 2.5X.

Hematoxilina-Eosina.



Fig. 11. Ovocito de un animal procedente de la condición experimental UNO (LO 12:12 con pulsos de luz). Se puede observar un ovocito totalmente maduro con A) núcleo excéntrico y B) abundante vitelo.
LT del animal = 59 mm.
Aumento = 25.2X.
Hematoxilina-Eosina.



Fig. 12. Corte transversal de ovario en el que se observan O) seis ovocitos inmaduros, cada ovocito presenta A) un difuso núcleo central (debido al nivel del corte), B) citoplasma muy granuloso. Ovario de un acocil sujeto a la condición experimental DOS (16:8 con pulsos de oscuridad).
LT del animal: 42 mm.
Aumento : 32.5X.
Hematoxilina-Eosina.



Fig. 13. Ovocito de un ejemplar de la condición experimental TRES (LO 8:16 con pulsos de luz).

Puede verse un ovocito en proceso de maduración, con A) núcleo central, B) citoplasma granuloso y C) aparente cromatina granulosa.

LT del animal: 42 mm.

Aumento: 51.2X.

Hematoxilina-Eosina.

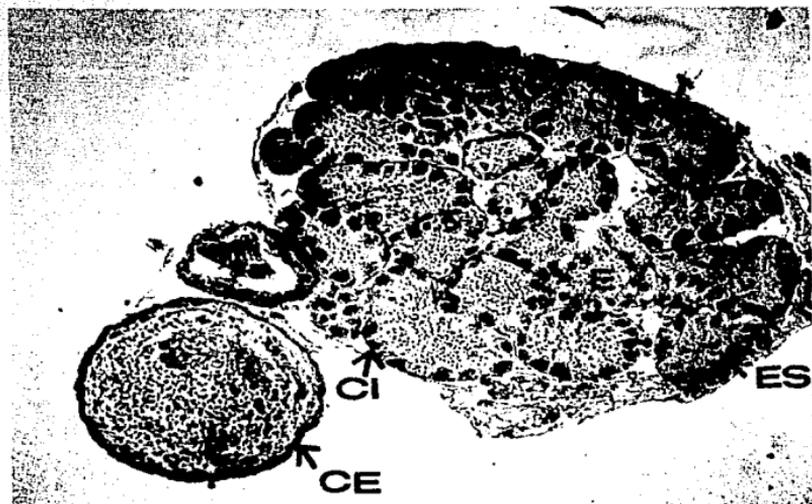


Fig. 14. Testículo de un macho sometido a un fotoperíodo LO 12:12 (CONDICION CONTROL).

Cistes de testículo con espermatozoides al centro (E) y espermatoцитos secundarios a la periferia (ES). En la esquina inferior izquierda puede observarse un conducto espermático (CE) lleno de espermatozoides y grandes células intermedias (CI).

LT del animal: 55 mm.

Aumento: 32.5X

Azúl de Toluidina.

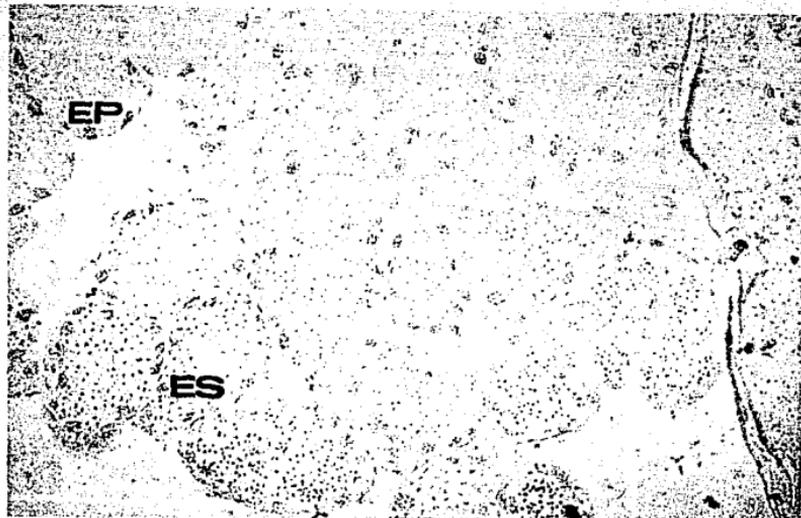


Fig. 15. Corte de testículo de un acocil proveniente de la condición experimental UNO.

Se observan principalmente espermatoцитos primarios (EP) y secundarios (ES), (ver detalles en el texto).

LT: 44 mm

Aumento: 40X.

Azúl de Tóluídina.

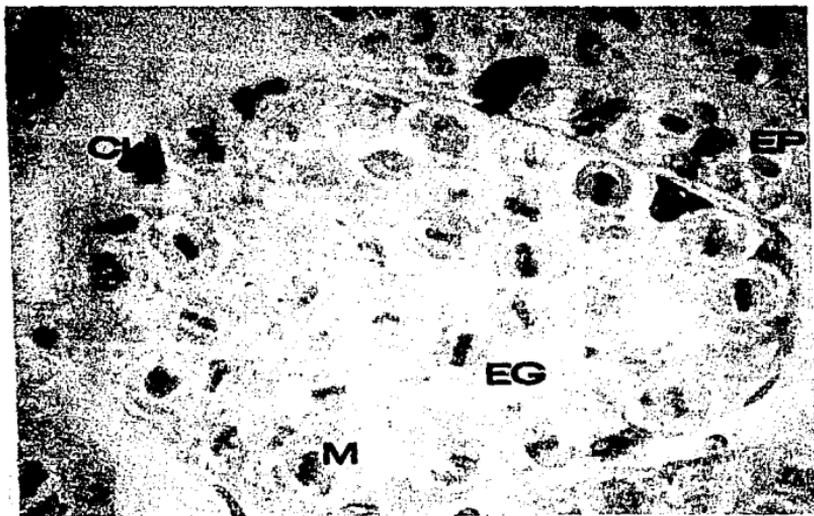


Fig. 16. Cistes de un testículo disectado de un animal de la condición experimental DOS.

Se observa un ciste con numerosas espermatogonias (EG) en metafase (M), y células intermedias (CI).

LT: 44 mm

Aumento: 160X.

Hematoxilina-Eosina.



Fig. 17. Corte de testículo en un animal sometido a la condición experimental TRES.

En este caso, se pueden observar una gran cantidad de formas celulares en el corte, principalmente espermatocitos primarios (EP), espermatocitos secundarios (ES) y espermatogonias (EG).
LT: 56 mm.

Aumento: 25.2X.
Hematoxilina-Eosina.

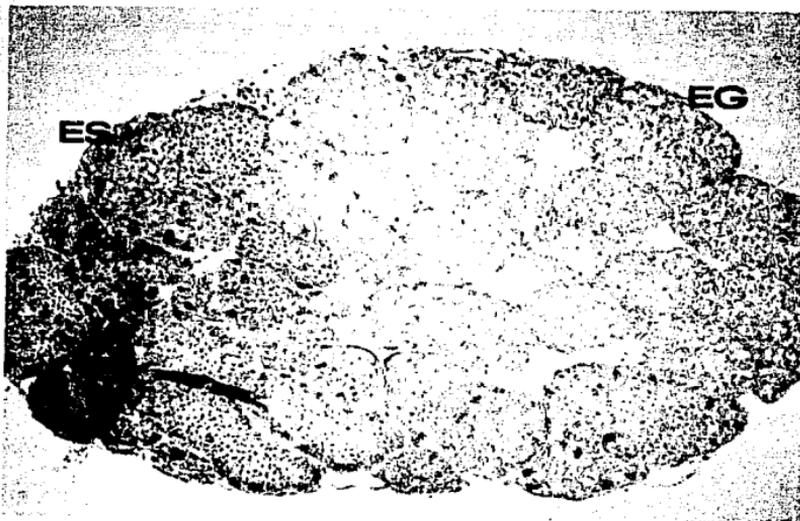


Fig. 18. Corte de testículo de un animal mantenido en condiciones de obscuridad constante (condición experimental CUATRO).

Corte del testículo completo con gran cantidad de espermatogonias (EG) y algunos espermatoцитos secundarios (ES), (ver detalles en el texto).

LT = 44 mm.

Aumento: 32.5X.

Azul de Toluidina.

7. DISCUSION

Los resultados de este trabajo parecen indicar que existe un fotoperfodo crítico (12 horas) en el cual se alcanza un mayor crecimiento y desarrollo de estos cambáridos. Como lo reportó Stephens (1955), la situación de obscuridad constante parece inhibir en cierto momento el desarrollo corporal, también el desarrollo gonadal parece verse retrasado en esta condición, siendo aparentemente más afectadas las hembras que los machos. Parece ser que la fase fotoinducible se encontraría en la noche subjetiva del animal, y los pulsos de luz estarían incidiendo sobre la madurez sexual y gonadal, mientras que el desarrollo corporal parece verse afectado por la duración del fotoperfodo.

7.1 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE EL CRECIMIENTO.

Como se mencionó anteriormente el crecimiento de los acociles está sujeto al fenómeno conocido como ecdisis, el cual según la especie se lleva a cabo una vez cada 14 días en los estadios juveniles y se va espaciando poco a poco conforme el animal crece hasta establecerse en dos mudas por año, una de las cuales se dará antes de la reproducción y la otra, enseguida de ésta. El proceso de muda además de ser regido por procesos hormonales, está principalmente influenciado por la alimentación, la temperatura y la luz (Lowery, 1988).

Los trabajos que investigan la influencia de la luz sobre el crecimiento en diferentes especies han comprobado la importancia de este factor como un inductor directo de éste y otros procesos además de realizar el papel de sincronizador de diferentes funciones rítmicas.

Los resultados de la presente investigación muestran que aparentemente la longitud del fotoperíodo juega un papel muy importante en el proceso de muda de estos animales. Independientemente de la aplicación de pulsos de luz u oscuridad, fotoperíodos de 12 horas causan un mayor incremento en el crecimiento de los organismos, lo cual se ve reflejado también en su peso y en su relación P/I.T. Algunos autores (Stephens, 1955; Aiken, 1969; Corona-García, 1993) han señalado que al aumentar las horas de luz, se tiende a incrementar la frecuencia de la muda. Stephens (*op. cit.*) observó que en poblaciones de *Cambarus virilis* existe una tendencia clara al aumento en la formación de gastrolitos conforme aumenta el período de iluminación. El autor discute que el incremento de la muda está también relacionado con el aumento en la mortandad. Por su parte Aiken (*op. cit.*) propuso que la actividad del OY (secretor de la HM) está regulada por la luz. En un trabajo reciente, Corona-García (*op. cit.*) señala como evidente el efecto negativo de la exposición prolongada a la iluminación en los acociles juveniles, a mayor cantidad de luz hay una tendencia de la población a incrementar su número de mudas con el consiguiente aumento en la probabilidad de muerte. Wassmer y Page en 1993 determinaron que en la cucaracha *Parcoblatta pennsylvanica* también se manifiesta un mayor incremento (en peso para este caso) conforme aumentan la fase luminosa en un ciclo de 24 horas las ninfas crecen hasta 15 veces más que las del régimen LO 12:12. Por lo tanto los animales que se ven sometidos a regímenes luz-oscuridad con fotoperíodos largos deben manifestar un mayor crecimiento.

De acuerdo con lo anterior los resultados no parecen ir en el mismo sentido, puesto que las situaciones experimentales en las que se obtuvo un mayor crecimiento fueron las que tuvieron un fotoperíodo de 12 horas, seguidos por el de ocho horas, con crecimiento menor en situaciones de extrema luminosidad (16 horas) y de oscuridad constante. Hay que admitir que el presente protocolo experimental no contempló tanto la duración del fotoperíodo como la posibilidad de una fase fotoinducible. Por lo que, a pesar de que se utilizaron pocos fotoperíodos, las evidencias ya señaladas parecen apuntar a que en el caso del crecimiento podría existir una duración de fotoperíodo umbral (entre ocho y doce horas), similar al que señala Stephens (1955) en *Cambarus*.

En los animales sometidos a la condición de obscuridad constante, es muy notoria la inhibición de la muda, pues aunque al principio presentaron un rápido crecimiento, a partir de la cuarta semana se observa una clara inhibición de la muda (figs. 6, 7 y 8). Esto apoya el hecho de que la HIM es inhibida por la luz de acuerdo con lo reportado por Aiken (1969).

7.2 INDUCCION FOTOPERIODICA SOBRE LA MADUREZ SEXUAL Y GONADAL.

La función reproductora se encuentra íntimamente ligada al crecimiento corporal y de la misma manera está modulada en gran medida por hormonas y por la luz (Stephens, 1952; Sukó, 1953, 1956, 1958 y 1958A; Adiyodi y Adiyodi, 1970; Adiyodi, 1985).

Los resultados de este trabajo muestran una inducción fotoperiódica sobre la madurez sexual y gonadal en los animales expuestos a fotoperíodos de 12 horas. Los cambios en el encendido y apagado de la luz parecen influir en esta inducción. Así, los animales de la condición 12:12 con pulsos de luz alcanzan una mayor madurez gonadal, lo que es evidente al observar las fotograffas de las hembras y machos de esta condición.

En 1952, G.J. Stephens realizó un trabajo comparativo en el cual determinó la influencia del fotoperíodo sobre las hormonas involucradas en la reproducción de *Cambarus virilis*. El encontró que la luz es el factor más importante que promueve la síntesis por parte del Sistema Nervioso Central (SNC) de la HEG y es un inhibidor de la HIG sintetizada en el complejo OX-GS. Posteriormente, T. Sukó (1958) investigó los cambios histológicos en el desarrollo de los ovarios influenciados por condiciones de obscuridad, llegando a la misma conclusión, es decir, que la luz es el principal promotor de la maduración gonadal.

En trabajos posteriores (Adiyodi y Adiyodi, 1970; y Adiyodi, 1985), se ha establecido la correlación existente entre los procesos de crecimiento y reproducción. Las hormonas involucradas en ambos procesos mantienen relación entre sí. Por ejemplo, la hormona de la muda es necesaria para la mitosis de los tejidos gonádicos en los estados prepúberes, aunque en algunos casos inhibe el desarrollo de la vitelogénesis y la espermiogénesis. La muda se presenta cuando los niveles de HIM y HEG son bajos mientras que los de HM y HIG son altos; la

reproducción se da en el caso contrario. Para que se lleve a cabo la muda de reproducción las hormonas encargadas de ésta deben tener los niveles adecuados en función de las hormonas encargadas de la muda. Si la luz es el principal factor que regula estos procesos, debe esperarse que la exposición prolongada a la misma (siempre y cuando se respete la noche subjetiva mínima del animal) producirá una mayor madurez gonadal.

Sin embargo, cambios en el encendido y apagado de la luz pueden modificar estos resultados en base a la incidencia de ésta sobre lo que pareciera ser una fase especialmente sensible a la luz o fase fotoinducible (FF).

En los resultados de esta investigación se presenta una menor madurez sexual y gonadal en los acociles sometidos a oscuridad constante, esto se puede explicar claramente con los elementos presentados anteriormente, es decir, que la ausencia de luz provoca un mantenimiento constante de niveles altos de HIG y una escasa síntesis de HEG.

Los cambios en el comportamiento de las demás condiciones, se pueden explicar debido a los pulsos de luz u oscuridad aplicados a las diferentes fases experimentales. Como ya se mencionó anteriormente se ha propuesto (Bünning, 1936) que la luz tiene un doble papel: como sincronizador de procesos rítmicos y como inductor de determinadas funciones. En este caso el papel inductor de la luz ha sido investigado por diferentes autores (Pittendrigh y Minis, 1964; Saunders, 1978, 1978A y 1979; Follet y Pearce-Kelly, 1991) proponiendo la presencia de la FF en la noche subjetiva del animal. En este sentido Pittendrigh y Minis (*op. cit.*) propusieron que esta fase fotoinducible tiene un sustrato circadiano. Por ejemplo, D.S. Saunders (1978), sugirió la presencia de un reloj fotoperiódico de coincidencia externa en la mosca *Surcophaga argyrostoma* fotoinduciendo el ritmo de eclosión pupal. Posteriormente (1978A) comprobó la aparente diversidad en los relojes fotoperiódicos de los insectos y a través de la aplicación de pulsos de luz logró inducir la diapausa en esta misma especie comprobando así la existencia de un reloj biológico de coincidencia externa. Finalmente (1979), intentó localizar la FF a través de un fotoperíodo esqueleto y aplicando un pulso suplementario de luz de una hora recorrido durante la noche. Los experimentos demostraron que la FF se encuentra casi al final de la noche subjetiva (tiempo circadiano 21.5). En un

trabajo más reciente se determinó la existencia de una fase fotoinducible (a la secreción de LH) en la codorniz, la cual parece encontrarse 20 horas después de ser aplicado el estímulo luminoso.

Las evidencias anteriores sugieren que el reloj fotoperiódico de *Procambarus clarkii* pudiera ser del tipo de coincidencia externa; que la fase fotoinducible podría tener un sustrato circadiano y que ésta se encuentra en la noche subjetiva del animal, cercana a lo que sería el amanecer (encendido de la luz). Podría ser por ello, que los animales sujetos a la condición 12:12 con pulsos de luz presentan una respuesta positiva a la inducción de la luz, siendo evidente un avanzado desarrollo sexual y gonadal en comparación con las otras condiciones. En la condición LO 8:16 se adelantó el apagado de la luz, lo cual podría alterar la señal que el animal utiliza para medir el momento de la fase fotoinducible. En esta condición, los resultados histológicos evidenciaron una ligera madurez gonadal, lo cual se interpreta como la parte final de esta fase. Por su parte el comportamiento observado en los animales de la condición LO 16:8 con pulsos de oscuridad, contrariamente a todos los trabajos anteriormente descritos presentó la menor madurez gonadal, esto se puede atribuir básicamente a dos factores: primero, a que los individuos de esta condición experimental alcanzaron un tamaño corporal pequeño, el cual está íntimamente relacionado con la expresión de desarrollo sexual y gonadal (Sukó, 1953) y segundo, que aquí no se aplicaron pulsos de luz en la supuesta fase fotoinducible que estimularan directamente estos eventos.

Finalmente, parece ser que la fase fotoinducible que actúa sobre la madurez gonadal de estos cambáridos se encontraría aproximadamente entre 8 y 10 horas después del apagado de la luz (Fig. 19). Evidencia de esto sería el grado de madurez alcanzado por los animales de la condición experimental uno y tres, los cuales recibieron pulsos de luz en diferentes horas de la noche subjetiva. La siguiente fase experimental consistiría en buscar la FF en la noche subjetiva, y una vez localizada determinar si hay o no un ritmo circadiano subyacente a este posible fenómeno fotoperiódico.

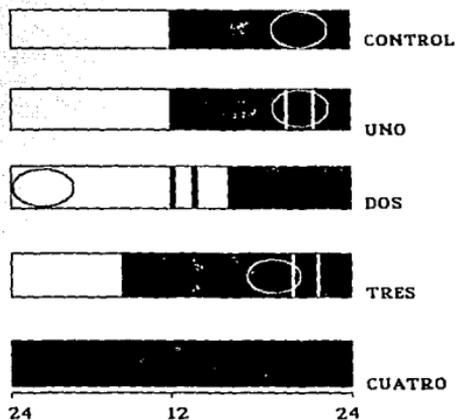


Fig. 19. La figura representa los diferentes ciclos de luz-obscuridad utilizados en los protocolos experimentales. La elipse encierra la zona en la cual se presume se puede localizar la fase fotoinducible.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Los animales sometidos a fotoperíodos de 12 horas, evidenciaron el mayor desarrollo corporal independientemente de la aplicación de pulsos de luz.
- 2.- Los organismos expuestos a fotoperíodos mayores a 12 horas son los animales de menor talla.
- 3.- Los pulsos de luz u oscuridad aplicados en estos experimentos no tienen un efecto inductor sobre el crecimiento.
- 4.- Los acóciles de las condiciones control y experimental uno, muestran una madurez sexual y gonadal más temprana que el resto de los lotes, lo que se relaciona directamente con su mayor talla.
- 5.- Los pulsos de luz inciden sobre la madurez gonadal en una fase fotoinducible que posiblemente se encuentra cerca del final de la noche subjetiva, aproximadamente entre 8 y 10 horas después del apagado de la luz.
- 6.- Las evidencias encontradas en este trabajo sugieren que el reloj fotoperiódico de *P. clarkii* es del tipo de Coincidencia Externa.
- 7.- Se propone la realización de un diseño experimental que explore mediante pulsos de luz en la noche subjetiva con el fin de determinar en el tiempo la fase fotoinducible de esta especie y si se presenta o no como un ritmo circadiano.

9. LITERATURA CITADA

1. Adiyodi, R.G., (1985).
●En: The Biology of Crustacea Vol 9, Integument, Pigments and Hrmonal Processes. Cap. 3. Reproduction and its control. Ed. Bliss, D.E., Academic Press, New York. 147-205 pp.
2. Adiyodi, K.G. y R.G. Adiyodi., (1970).
●Endocrine Control of Reproduction in Decapod Crustacea. Bio. Rev. 45:121-165.
3. Adkisson, P. L., (1964).
●Action of the photoperiod in controlling insect diapause. American Naturalist, Vol. 98. 357-374 pp.
4. Aiken, D.E. (1969).
●Photoperiod, Endocrinology and the Crustacean Molt Cycle. Science, 164:149-156
5. Aréchiga, H. (1976).
●La Problemática de los Ritmos Circadianos. Biol. Estud. Méd. Biol., Méx. 29:1-17.
6. -----, B. Fuentes y B. Barrera., (1973).
●Circadian Rhythm of Responsiveness in the Visual Systems of the Crayfish. En: J. Slanki, Ed. Neurobiology of Invertebrates. Budapest: Publishing House of the Hungarian Academy of Science. 403-426 pp.

7. Aréchiga, H., y E. Naylor., (1976).
 - Endogenous Factors in the Control of Rhythmicity in Decapod Crustaceans. En: De Coursey P.J. Ed. Biological Rhythms in the Marine Environment. Columbia, South Carolina: Univ. of South Carolina Press.: 1-16 pp.
8. -----, J.L. Cortés, U. García y L. Rodríguez-Sosa.,
 - (1985).
 - Neuroendocrine Correlate of Circadian Rhythmicity in Crustaceans.
 - Amer. Zool. 25:265-274.
9. -----, F. Fernández-Quiróz, F. Fernández de Miguel y
 - L. Rodríguez-Sosa., (1992).
 - The Circadian System of Crustaceans.
 - Cronobiol. Int. 9(6):001-019.
10. Aschoff, J. (1960).
 - Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms.
 - En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:11-28.
11. -----, J. (1981).
 - A survey on Biological Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology Vol 4.- Biological Rhythms 3-79 pp.
 - Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press New York.
12. -----, J. (1984).
 - Free-running and Entrained Circadian Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press, N.Y. and London. 81-92 pp.
13. Bittner, G.B., y R. Kopanda., (1973).
 - Factors Influencing Molting in the Crayfish *Procambarus clarkii*.
 - J. Exp. Zool. 186(1):7-16.
14. Bonnenfant, B. J., (1964).
 - La Culture *in vitro* des Gonades de Crustacés et son intérêt pour l'étude endocrinologique.
 - Annales Endocr. 25(5 suppl.):14-18.

15. Büning, E., (1936).
 - Die endogen tagesrhythmik als grundlage der photoperiodischem reaction. Berichte der deutsche. Botanische Gessellschaft. Vol. 54 590-607 pp.
16. Canard, M y A. Grimal., (1988).
 - Insect photoperiodism: Various Ways of Regulating Univoltinism in Lacewings (Planipennia: Chrysopidae. ● *Experientia* 44:523-525.
17. Castañón-Cervantes, O., Lugo-Pérez, C.M., Aguilar-Morales, M., y Fanjul-Moles, M.L. (1992).
 - Inducción Fotoperiódica sobre el crecimiento, maduración sexual y gonadal del acocil *Procambarus clarkii*.
 - Memorias del XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.
 - Cartel C61; Puerto de Veracruz, 2-6 Agosto (1992).
18. Charniaux-Cotton, H., (1960).
 - Sex Determination in the Physiology of Crustacea, Vol I. (Ed. T.H. Waterman). N.Y.: Academic Press. 411-447 pp.
19. -----, (1962).
 - Androgenic Gland of Crustaceans.
 - *Gen. Comp. Endocr.* (suppl.) 1:241-247.
20. -----, y L.H. Kleinholz., (1964).
 - Hormones in Invertebrates other than Insects. En: *The Hormones*. Vol. 4(Ed. G. Pincus, K.B. Thimann y E.B. Astwood).
 - N.Y. Acad. Press. 135-198 pp.
21. Cornubert, G., N. Démeusi y A. Veillet., (1952).
 - Effects de l'ablation des Pedoncules Oculaires sur le développement des Caractères Sexuales Externes des Décapodes Brachyours *Carcinus maenas* pennant et *Pachygrapsus marmoratus* Fabricius. C.R. HEB. Séanc. Acad. Sci., Paris 234:1405-1407.

22. Corona-García, S., (1993).
 - Inducción de la ecdisis en el acocil *Procambarus digueti* bajo distintos fotoperíodos en condiciones de laboratorio.
 - Tesis de Maestría en Ciencias del Mar., ICMyL, UNAM y Facultad de Medicina, UNAM. 64 pp.
23. Fanjul-Moles, M.L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. B. Fuentes-Pardo, B. (1987).
 - Circadian Rhythm in the course of the ontogeny in crayfish.
 - Comp. Biochem. Physiol. 88 A, 213-219 pp.
24. -----, Miranda-Anaya, M., and Fuentes-Pardo, B. (1992).
 - Effects of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*).
 - Comp. Biochem. Physiol. Vol. 102 A. No. 1. 99-106 pp.
25. Fernández de Miguel, F, y H. Aréchiga., (1988).
 - Entrainment by Food of Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Crayfish.
 - Soc. Neurosci. Abstr. 14:1299.
26. Follet, B.K., (1978).
 - Photoperiodism and seasonal breeding in birds and mammals.
 - In Control of ovulation, ed. D.D. Crighton, N.B. Haynes, G.R. Foxcroft & G.E. Lamming. 267-294 pp. London: Butterworths.
27. ----- and P.J. Sharp. (1969).
 - Circadian Rhythmicity in photoperiodically induced gonadotrophin release and gonadal growth in the quail.
 - Nature Vol. 223. August 30th. 968-971 pp.
28. -----, and Alison S. Pearce-Kelly., (1991).
 - Photoperiodic induction in quail as a function of the period of the Light-Dark cycle: implications for models of time measurement.
 - Journal of Biological Rhythms Vol. 6 No. 4. 331-341 pp.

29. Follet, B. K., V. Kumar y T.S. Juss., (1992).
 - Circadian Nature of the Photoperiodic Clock in Japanese Quail.
 - J. Comp. Physiol. A. 171:533-540.
30. Fuentes-Pardo, B., y V. Inclán-Rubio., (1987).
 - Caudal Photoreceptors Synchronize Circadian Rhythms in Crayfish I. Synchronization of ERG and Locomotor Circadian Rhythm.
 - Comp. Biochem. Physiol. 86A:523-527.
31. Greening, H.S., y R.J. Livingstone., (1982).
 - Diel Variation in the Structure of Seagrass-Associated Epibenthic Macroinvertebrates Communities.
 - Mar. Ecol. Prog. Ser. 7:147-156.
32. Lockwood, A.P.M., (1968).
 - Aspects of the Physiology of Crustacea.
 - London, Oliver and Boyd.
33. Lowery, R. S., (1988).
 - Growth, Moulting and Reproduction. En: Holdich, M.D. y R.S. Lowery. Freshwater Crayfish: Biology, Managment and Explotation. Timber, Press. 481 pp.
34. Miranda-Anaya, M. (1991).
 - Efecto de la Luz Monocromática en la Ontogenia del Ritmo Circadiano de la Amplitud Electrorretinográfica del Acocil.
 - Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 76 pp.
35. Moore-Ede, M.C., F.M. Sulzman y C.A. Fuller., (1982).
 - The Clocks that Time Us. Physiology of the Circadian Timing System.
 - Harvard, Univ. Press. Cambridge. 448 pp.
36. Nakari, T., A. Soivio y S. Pesonen., (1987).
 - Effects of an Advanced Photoperiod Cycle on the Gonadal Development and Spawning Time of Two Years Old *Salmo gaidneri*. R. Reared in Earth Ponds Under Extreme Annual Water Temperatures.
 - Aquaculture, 67:369-384.

37. Page, T.L. y J.L. Larimer., (1975).
●Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish
I. The Locomotor Activity Rhythm.
●J. Comp. Physiol. 97:59-80.
38. -----, (1975A).
●Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish
II. The ERG amplitude rhythm.
●J. Comp. Physiol. 97:81-96.
39. Pittendrigh, C.S., y D.H. Minis., (1964).
●The Entrainment of Circadian Oscillations by Light and
Their Role as Photoperiodic Clocks.
●Am. Nat. 98(902):261-294.
40. -----, (1965).
●On the mechanisms of entrainment of a circadian rhythm
by light cycles. In circadian clocks, en J. Aschoff, 277-297.
Amsterdam North Holland.
41. -----, (1966).
●The circadian oscillation in *Drosophila pseudoscura*
pupae: a model for the photoperiodic clock.
●Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 54, 275-307 pp.
42. Reidenbach, J.M., (1967).
●Démonstration expérimentale de la neutralité des
caractères sexuels externes de la femelle chez le crustacé,
isopode *Idotea balthica blasteri* Audouin.
●C.R. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris 265:1321-1323.
43. Reinberg, A. y M.H. Smolensky., (1993).
●Biological Rhythms and Medicine. Cellular, Metabolic,
Physiopathologic and Pharmacologic Aspects.
Introduction to Chronobiology. En: I Curso
Latinoamericano de Cronobiología.
●Facultad de Medicina, UNAM. 2-21 pp.
44. Rivas-Manzano, P., (1981).
●Técnicas Histológicas en la Práctica de la Biología.
●Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 155
pp.

45. Saunders, D.S., (1978).
 - An experimental and theoretical analysis of photoperiodic induction in the flesh-fly *Sarcophaga argrastoma*.
 - Journal of Comparative Physiology. Vol.124. 75-95 pp.
46. -----, (1978A).
 - Internal and External Coincidence and the Apparent Diversity of Photoperiodic Clocks in the Insects.
 - J. Comp. Physiol A. 127:197-207.
47. -----, (1979).
 - External coincidence and the photoinducible phase in the *Sarcophaga* photoperiodic clock.
 - Journal of Comparative Physiology. Vol. 132. No. 1. 179-189 pp.
48. Stephens, G.J., (1952).
 - Mechanisms Regulating the Reproductive Cycle in the Crayfish, *Cambarus* I. The Female Cycle.
 - Physiol. Zool. 25:187-190.
49. Stephens, G.D., (1955).
 - Induction of Molting in the Crayfish, *Cambarus* by Modification of Daily Photoperiod.
 - Biol. Bull. 108:235-241.
50. Sue Binkley., (1990).
 - The Clockwork Sparrow. Time, Clocks and Calendars in Biological Organisms.
 - Printence Hall. Inc. New Jersey, U.S.A.
51. Sukō, T., (1953).

Studies on the development of the crayfish.

 - I. The development of secondary sex characters in appendages. Sci. Rep. Saitama Univ., 1(2):77-96.
52. -----, (1954).
 - Studies on the development of the crayfish.
 - I. The development of egg-cell before fertilization.
 - Sci. Rep. Saitama Univ., Vol 1(3).

53. Sukó, T., (1955).
● Studies on the development of the crayfish.
● III. The development of testis before fertilization.
● Sci. Rep. Saitama Univ., 2(1):39-46.
54. -----, (1956).
● Studies on the development of the crayfish.
● V. The development of winter eggs.
● Sci. Rep. Saitama Univ., 2(2):213-219.
55. -----, (1958 A).
● Studies on the development of the crayfish.
● V. The histological changes of the developmental ovaries influenced by the condition of darkness.
● Sci. Rep. Saitama Univ., 3(1):67-87.
56. -----, (1958).
● Studies on the development of the crayfish.
● VI. The reproductive cycle.
● Sci. Rep. Saitama Univ. 3(2):79-91.
57. Sweeney, B.M. y J.W. Hastings., (1960).
● Effect of Temperature Upon Diurnal Rhythms.
● Cold. Springs. Harbor. Symposia Cuan. Biol. 25:87-104
58. Teissier, G. (1960).
● Relative Growth. En: The Physiology of Crustacea. Vol. I.
● Ed. T.H. Waterman, N.Y. Academic Press. 537-560 pp.
59. Wassner, G.T. y T.L. Page. (1993).
● Photoperiodic Time Measurement and a Graded Response in a Cockroach.
● Biol. Rhythms. 8(1):47-56.