

24
2e;



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS DE FASE INDUCIDOS POR LUZ
MONOCROMATICA AL RITMO ERG
DEL ACOCIL EN ESTADIOS JUVENILES.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE AQUILES BERNAL MORENO



CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.,

SEPTIEMBRE, 1967



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fué elaborado en el
Laboratorio de Neurofisiología Comparada de
la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección
de la Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles.

INDICE:

INTRODUCCION:

1.1.-Tiempo, Cronobiología, Reloj Biológico y Ritmos Circadianos	1
1.2.-Origen, evolución y base genética de los ritmos biológicos.	2
1.3.-Capacidad de los ritmos de ser sincronizados.	6
1.4.-Sincronizabilidad y relaciones de fase.	7
1.5.-Curva de Respuesta de Fase.	7
1.6.-Generalidades de la luz y sus efectos sobre los ritmos.	9
1.7.-Efectos de la luz monocromática sobre los ritmos circadianos.	10
1.8.-El Sistema Visual y Circadiano de los Crustáceos.	10
1.9.-El Ritmo Circadiano de Amplitud Electrorretinográfica	13
1.10.-Sensibilidad Espectral del Ritmo ERG durante la ontogenia.	14

HIPOTESIS:

2.1.-Justificación, Hipótesis y Objetivos.	16
--	----

METODO:

3.1.-Modelo biológico.	17
3.2.-Registro Eléctrico.	17
3.3.-Análisis de Resultados.	17

RESULTADOS:

4.1.-Descripción de las Curvas de Respuesta de Fase.	23
--	----

DISCUSION:

5.1.-Análisis y Discusión de los resultados obtenidos.	29
--	----

PERSPECTIVAS:

6.1.-Posibilidades a explorar.	35
--------------------------------	----

BIBLIOGRAFIA:

	36
--	----

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1.- Posible origen de la ritmicidad circádica.	4
Fig. 2.- Osciladores e imposición de fase.	4
Fig. 3.- Osciladores como asa de retroalimentación.	5
Fig. 4.- Estructura multioscilaria jerárquica.	5
Fig. 5.- Relaciones de fase.	8
Fig. 6.- Curva de Respuesta de Fase.	8
Fig. 7.- Sistema Visual del acocil.	11
Fig. 8.- Electrorretinograma.	15
Fig. 9.- Dispositivo de Registro.	18
Fig.10.- Ritmo en oscilación espontánea.	19
Fig.11.- Parámetros del ritmo.	20
Fig.12.- Método de Enright para determinar cambios de fase.	22
Fig.13.- CRF para pulsos de luz azul.	24
Fig.14.- CRF para pulsos de luz roja.	25
Fig.15.- CRF's para luz azul y roja sobrepuestas.	27
Fig.16.- CRF para pulsos de luz blanca.	28
Fig.17.- Comparación de las CRF's para luz blanca, azul y roja.	33

RESUMEN

La luz monocromática con distintas longitudes de onda influye diferencialmente sobre las características del ritmo circadiano del electroretinograma (ERG) a lo largo de la ontogenia del acocil *Procambarus clarkii*, y tal circunstancia sugiere la existencia de dos grupos de fotorreceptores circadianos, relacionados a dos posibles sistemas osciladores involucrados en la sincronización del ritmo ERG durante la ontogenia; para probarlo, se registró ERG en 48 organismos de 2 a 4 meses de edad mantenidos en obscuridad y temperatura constantes, de manera que tras 4 días en oscilación espontánea se aplicaba un pulso de luz roja (650 nm) o azul (440 nm) con duración de 30 minutos, se dejaba otros 3 días en oscilación espontánea y se cuantificaban los cambios de fase sufridos; graficando dichos cambios de fase (adelantos o retrasos) con respecto al tiempo circadiano en el cual se aplicó el pulso, se construyeron curvas de respuesta de fase (CRF) para los pulsos de luz roja y azul, encontrándose en la CRF para luz azul retrasos en el día subjetivo y primeras horas de la noche subjetiva, con picos de adelantos a las 14 y 22 horas, y de retrasos a las 18 horas tc (tiempo circadiano); la relación D/A (retrasos/adelantos) es de 4. En la CRF para luz roja se encontraron fuertes retrasos en el día subjetivo, pero predominan los adelantos durante toda la noche subjetiva, con una relación D/A = 0.4285. Estos resultados parecen implicar la existencia de dos sistemas osciladores que responden con retrasos a luz del atardecer (azul) y con adelantos a la luz de la mañana (roja).

INTRODUCCION:

"En el principio era el ritmo...
y el ritmo evolucionó hasta ser música"
Kurt Sachs.

TIEMPO, CRONOBIOLOGIA, RELOJ BIOLÓGICO Y RITMOS.

Nacemos, crecemos, vivimos y morimos en un marco tetradimensional definido por las tres dimensiones espaciales y la cuarta, temporal; pero, sin que hasta el momento la humanidad haya podido darle una definición satisfactoria, (según S. Hawking, 1988, podría tratarse de un concepto no absoluto), la idea del tiempo se nos presenta simultáneamente como enigmática y cotidiana; sabemos que cada uno de nuestros actos tiene sentido sólo dentro de un marco espacio-temporal concreto, a grado tal que se ha llegado a definir el cosmos como "Todo aquello que ha sido, es o será", (dentro de lo cual está implícito el concepto de tiempo; Sagan, 1986), pero quizá no alcanzamos a explicar aquella cuarta dimensión si no es mencionando su unidireccionalidad (dentro de la concepción Aristotélica o Newtoniana de un tiempo absoluto), que permite ordenar los acontecimientos merced a simultaneidad y/o sucesión, causa y efecto.

Se ha llamado Cronobiología al estudio de cómo los organismos regulan sus funciones con respecto a la hora del día u otros cambios cíclicos ambientales (Smith, 1977); también se le ha definido como el estudio de los mecanismos y alteraciones que puede sufrir la estructura temporal de cada organismo bajo condiciones particulares (Halberg et al, 1977); aunque dicha idea data de tiempos griegos, o al menos bíblicos ("para cada cosa hay una estación y hay un tiempo para cada propósito bajo el cielo: Un tiempo para nacer y un tiempo para morir; un tiempo para sembrar y otro para cosechar"), su estudio formal inicia en 1729 con las observaciones del astrónomo francés Jean Jaques d'Ortous De Mairan acerca del comportamiento periódico de las plantas; se sabía desde mucho tiempo atrás que numerosos vegetales cierran sus hojas de noche, para abrirlas nuevamente durante el día; De Mairan se vio sorprendido al descubrir que plantas colocadas en obscuridad constante por varios días seguían abriendo y cerrando sus hojas sin necesidad de un estímulo luminoso externo, deduciendo así la existencia de algún mecanismo temporal independiente que controlaba el movimiento de las hojas. Posteriormente, Pfeffer (1875, 1915) propuso que en realidad era la alternancia Luz-Obscuridad (LD, por Light-Dark) lo que ocasionaba el movimiento de hojas y ramas; dado que sus experimentos no pudieron confirmar su hipótesis, demostró, sin quererlo, el origen endógeno de dichos movimientos. La persistencia de oscilaciones periódicas en organismos mantenidos bajo condiciones ambientales constantes ha sido demostrada en numerosas especies eucariontes (Reinberg y Smolensky, 1983), y aún en la fijación de nitrógeno por cianobacterias (Grobbelaar et al, 1986; Mitsui et al, 1986; Sweeney and Borgese, 1989; en Hastings, Rusak and Boulos, 1991).

Este mecanismo temporal llamado "Reloj Biológico", ha sido definido como "Un sistema fisiológico innato capaz de medir el transcurso del tiempo en un organismo viviente" (Coleman, 1986; en Binkley, 1990); esta definición describe un simple "medidor de intervalos", que -a manera de un reloj de arena- se limita a marcar lapsos temporales constantes; sin embargo, para ser más específicos, debemos considerar que la idea central de un reloj biológico ha sido desarrollada alrededor de los Ritmos Circadianos, (del latín *circa*, cercano a y *diem*, día); es decir, eventos cíclicos cuyo periodo se aproxima al de 24 horas, que poseen 4 características fundamentales (Binkley, 1959):

a) Persistencia en oscilación espontánea: Su condición endógena, que permite al organismo generar ciclos recurrentes con periodo cercano a 24 horas independientemente de que se le aisle de estímulos periódicos externos.

b) Compensación de la temperatura: Un reloj biológico debe ser prácticamente independiente de la temperatura, o al menos debe ser capaz de compensar los efectos de la variación térmica en el metabolismo; dado que la mayoría de las condiciones vitales involucran reacciones químicas, cuya velocidad generalmente depende de la temperatura a que se realicen, y que los procesos biológicos son acelerados al doble o triple con un incremento de 10°C (dentro del rango permisivo vital), un ritmo regular debe ser capaz de compensar la duración de su periodo mas allá de las variaciones de temperatura, dada la mermada utilidad que representaría un reloj cuya marcha es alterada por las cambiantes condiciones ambientales. El modelo bioquímico propuesto para dicha regulación propone 2 reacciones, $A \rightarrow B$ y $C \rightarrow D$, donde B controla el periodo y la reacción $A \rightarrow B$ es inhibida por D, producto de la reacción $C \rightarrow D$: Ambas reacciones son inherentemente dependientes de la temperatura, pero la velocidad de $A \rightarrow B$ se mantiene constante dado que es inhibida proporcionalmente a los cambios de temperatura.

c) Se ha llegado a considerar al reloj biológico como "un cronómetro continuamente consultado"; es decir, se piensa que los organismos pueden utilizarlo para ubicarse temporalmente del mismo modo en que los humanos consultamos continuamente el reloj; un ejemplo de esta idea viene de la "memoria temporal" de las abejas (Zeitgedächtnis; Frisch, K. von, 1950, en Aschoff, 1982); al encontrar una fuente de néctar, las abejas regresan a ella a la misma hora del día a la que fué originalmente descubierta.

d) Por último, se considera que un reloj biológico debe ser capaz de sufrir una puesta a tiempo que lo sincronice con la fase de los eventos periódicos ambientales.

A diferencia de Binkley, Hastings (en Prosser, 1991) considera como las 4 características clave de los ritmos circadianos, la persistencia, la compensación de la temperatura, la capacidad de sincronización y la Arritmia Condicional (Njus, 1977); este último postulado se basa en el hecho de que -bajo determinadas condiciones ambientales, como luz brillante, baja temperatura o anoxia- en ciertos organismos deja de expresarse la ritmicidad; se ha pensado que los osciladores individuales pueden desincronizarse y por ello el organismo aparentar arritmia; alternativamente, dicha arritmia puede revelar la disminución (o inclusive ausencia) de la misma oscilación.

ORIGEN, EVOLUCION Y BASE GENETICA DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS.

Podemos suponer un origen evolutivo de los relojes biológicos partiendo de la rotación terrestre, que completándose cada 24 horas, determina la variación cíclica de numerosas condiciones ambientales; luz, oscuridad, temperatura, concentración de oxígeno, salinidad, etc. Dado que estas condiciones necesariamente afectan a los organismos, es lógico intuir que los organismos vivos habrán organizado su fisiología sobre las bases temporales (diarias, estacionales) que correspondan a los ciclos ambientales; de aquí la importancia adaptativa que significaría para un organismo el poder predecir la recurrencia en la variación de condiciones y tomar ventaja de una selección natural que actuaría en favor de aquellos individuos capaces de prepararse a tales variaciones e inclusive, beneficiarse de las mismas (Binkley, 1959).

La evolución de los ritmos biológicos es manejada por Pittendrigh (1993), al señalar la diferencia entre el orden y la organización temporal, donde el orden es referido como ausencia de azar, mientras que la organización son los fenómenos dependientes del manejo de información por el organismo, de tal manera que, en sus orígenes, los seres vivos se someterían al orden temporal impuesto por el ambiente, y conforme estos evolucionaron, dicho orden sería asimilado dando forma a su propia organización temporal (FIG.1). Desde esta perspectiva, las semejanzas entre los ciclos ambientales y los biológicos se explican por la dependencia original de los primeros por los segundos, mientras que las diferencias se deben a las características particulares de los organismos para adaptarse al ambiente. De este modo, si la presión del ambiente indujo la presencia de ritmicidad en los parámetros orgánicos, y estos determinaron el desarrollo de relojes biológicos en respuesta a dicha presión ambiental, el concepto de reloj biológico como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con período regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna (FIG 2). Dicho sistema permite la adecuada interacción, en el dominio temporal, entre el organismo y su ambiente. Aunque las características anteriores son aceptadas por la mayoría de los cronobiólogos, existe cierta controversia sobre el concepto de reloj biológico, pues mientras que para algunos autores (como Pittendrigh o Aschoff, 1984) éste se refiere a estructuras orgánicas que funcionarían como marcapasos capaces de imponer período y fase a los procesos orgánicos, para otros (como Halberg o Reinberg, 1983) las propiedades que definen al reloj biológico son el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos. Cumpliendo los requisitos del primer modelo se encuentran, a nivel molecular, el gene *per* de *Drosophilla*, cuyo producto controla el período de la ritmicidad biológica, mientras que a nivel de sistemas se han identificado estructuras como el ganglio cerebral en la polilla, los ojos en *Aplysia*, la glándula pineal en aves o el núcleo supraquiasmático en mamíferos. Por otra parte, el metabolismo y la fisiología general presentan numerosos ejemplos de sistemas organizados a partir de asas de retroalimentación negativa que, al llevar implícito el orden temporal de los eventos que regulan, pueden ser consideradas como osciladores potenciales (FIG 3). Así, reconociendo la existencia de al menos dos tipos de osciladores, los físicamente discretos y los que emergen de la interacción funcional de sistemas de retroalimentación, encontraremos que la interferencia en el funcionamiento de diversos sistemas fisiológicos no es capaz de alterar la organización temporal global del organismo, salvo en aquellas estructuras consideradas marcapaso, mientras que la lesión de estas últimas no es capaz de producir organismos totalmente arrítmicos, lo cual sugiere fuertemente una estructura multioscillatoria jerárquica del sistema, cuya jerarquización pudiera depender del hecho de que, mientras la oscilación de asas de retroalimentación negativa ocurre en sistemas orientados a mantener constante la salida de éste, la oscilación en los llamados marcapaso parece ser en sí misma la salida regulada del sistema; en el primer caso, las oscilaciones son atenuadas y fácilmente perturbables en su período y fase, mientras que en el segundo las oscilaciones son autosostenidas y las perturbaciones de período y fase son compensadas por mecanismos aparentemente homeostáticos (FIG 4). La interacción de ambos sistemas oscilatorios resulta en la adaptación de los organismos a las presiones ambientales cíclicas, que determinan a fin de cuentas el nicho temporal del organismo (Aguilar, 1993).

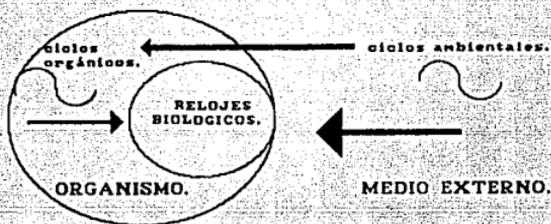


Fig.1

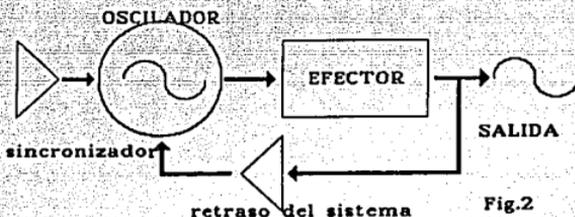


Fig.2

Fig. 1.- Posible origen de la ritmicidad circádica.

La presión del ambiente indujo la presencia de la ritmicidad en los parámetros orgánicos, los cuales a su vez determinaron el desarrollo de relojes biológicos como respuesta a la presión ambiental.

Fig. 2.- Osciladores e imposición de fase.

Un tipo de reloj biológico consistiría en un oscilador autosostenido, que impondría periodo y fase a la salida de los sistemas efectores. Dicho oscilador sería igualmente responsable del ajuste de fase del organismo con respecto a los ciclos ambientales.

(modificadas de Aguilar, 1993).



Fig.3

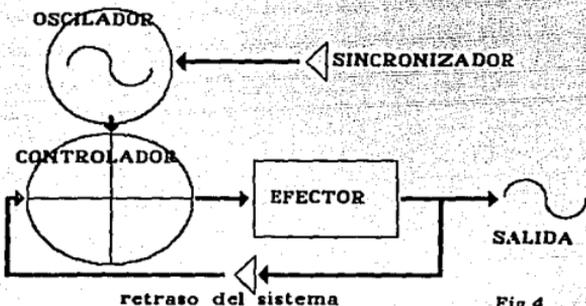


Fig.4

Fig. 3.- Osciladores como asa de retroalimentación.

Un sistema con retroalimentación negativa, en el cual exista un retraso en la señal de retroalimentación, puede comportarse como un oscilador, dependiendo el periodo de oscilación de las características cinéticas del sistema.

Fig. 4.- Estructura multioscilaria jerárquica.

La interacción de sistemas homeostáticos clásicos con sistemas cronométricos especializados conduce a un sistema multioscilaria jerárquico.

(modificadas de Aguilar, 1993).

La base genética de los ritmos circadianos fué demostrada por vez primera en las investigaciones de Bünning (1935); estudiando los movimientos circadianos de hojas y tallos de frijol (*Phaseolus*), encontró dos poblaciones con periodos (τ) de 23 y 27 horas; asombrado observó que plantas híbridas tenían un periodo de 25 horas, transmitido de una generación a otra de acuerdo a las leyes tradicionales de la genética. Estudios similares se han llevado a cabo en mutantes de *Drosophila* (Konopka and Benzer, 1971). Pero fué el mismo Bünning (1963) quien marcó un hito en la Cronobiología al descubrir que un organismo es capaz de "medir" tiempo; mediante una sofisticada manipulación del régimen luminoso pudo inducir floración al aplicar brevemente luz, por varios días, a una misma hora crítica; viendo que luz de idéntica magnitud y calidad era incapaz de inducir floración si se aplicaba a distintas horas, llegó a la conclusión de que la luz estaba actuando no como una fuente de energía, sino como una señal, a la cual respondía diferencialmente el organismo dependiendo de la hora. Aunque el concepto de medida del tiempo por los sistemas vivientes ha aumentado en su complejidad, aún se reconoce que la alternancia de horas de luz (fotofase) y oscuridad (escotofase) son la referencia más precisa para los organismos; de su variación a lo largo del año dependen fenómenos como reproducción, migración, diapausa, dormancia; en términos de Bünning, existe una coincidencia externa entre la alternancia externa de luz y oscuridad y la alternancia de fases en que la planta es sensible o no a la luz con respecto a la floración: paralelamente, se habla de una coincidencia interna entre patrones temporales del ambiente interno con respecto al externo, tomando en cuenta la existencia de distintos osciladores circadianos, controlados por señales como el amanecer (encendido de la luz) o atardecer (apagado). De este modo, dependiendo de la fotofase, el intervalo de tiempo entre dos señales (la relación de fase entre amanecer y atardecer), determina si la floración se induce o no.

CAPACIDAD DE LOS RITMOS DE SER SINCRONIZADOS:

El concepto de reloj biológico como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna. Dicho sistema permite la adecuada interacción en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente.

Como se mencionó anteriormente, una de las funciones más importantes de los sistemas circadianos es asegurar el ajuste temporal apropiado entre los procesos cíclicos del organismo y los fenómenos cíclicos ambientales; dicho ajuste es referido como puesta a tiempo o sincronización; se utiliza el término *zeitgeber* si nos referimos al estímulo que produce dicha sincronización (como podría ser la luz o la temperatura); es importante recalcar que dicho estímulo no crea el ritmo, solamente tiene efectos sobre su expresión alterando la longitud del periodo y/o relacionando la fase del ritmo con la hora externa (establecimiento de relación de fase).

a) Sincronización interna.

Si un organismo es mantenido en condiciones constantes de luz y temperatura, lejos de cualquier otro estímulo que pudiera representar un sincronizador externo, sus ritmos circadianos tenderán a mantener una

relación de fase estable entre ellos, ya sea porque coinciden sus máximos y mínimos o porque exista cierta constante de tiempo transcurrido entre ellos.

b) Sincronización externa.

Cuando el ritmo de un organismo al que se le aplican estímulos periódicos cambia su periodo de oscilación libre y lo hace igual al de la señal externa, estableciendo con ella una relación de fase, se considera que dicho estímulo es un sincronizador externo. Generalmente existen periodos llamados transitorios a través de los cuales el ritmo se acopla al estímulo externo, sufriendo una perturbación temporal antes de mostrar una relación de fase estable.

SINCRONIZABILIDAD Y RELACIONES DE FASE.

Los ritmos circadianos tienen una "oscilación libre" al ser mantenidos en condiciones constantes; careciendo de estímulos externos, τ dependerá de la especie, el estado fisiológico e historia del individuo. Se denomina ϕ al ángulo de la fase de oscilación biológica (considerando los 360° posibles de un ciclo). Al recibir un estímulo externo (zeitgeber, cuyo ángulo de fase es denominado Φ), el ritmo adquirirá determinada relación de fase con respecto a éste, la cual es llamada ψ (es decir, la diferencia entre los ángulos de fase de la oscilación biológica y el zeitgeber); la magnitud de ψ (que revelará que tan fuerte fué la sincronización) dependerá de dos factores; las propiedades intrínsecas del zeitgeber y la responsividad particular del sistema a dicho estímulo (fig. 5). De tal manera, la mejor cuantificación de ψ es la relación τ/T (longitud del periodo de oscilación biológica con respecto a la longitud del periodo del zeitgeber; Aschoff, 1979).

CURVA DE RESPUESTA DE FASE.

Dependiendo de la fase que presente un ritmo circadiano, un pulso sencillo de luz, que puede ser tan breve como 0.5 milisegundos (Joshi, 1985), tiene capacidad de adelantar la fase, retrasarla o no alterar el ritmo. La relación entre la fase de exposición a la luz y la magnitud y dirección del cambio de fase se representa gráficamente en forma de una CURVA DE RESPUESTA DE FASE (Hastings, 1958). En general, los pulsos de luz practicados en oscuridad continua, alrededor del inicio de la noche subjetiva (cerca del arranque de la fase de actividad diaria en un organismo nocturno, o del reposo en uno diurno), ocasionan retrasos de fase, mientras que los pulsos presentados cerca del final de la noche subjetiva originan adelantos. Los pulsos de luz presentados en la mayor parte del día subjetivo tienen efectos reducidos o nulos (fig. 6).

En algunas especies, después de exponer al organismo a un pulso de luz, el ritmo se establece gradualmente, a través de uno o más ciclos transitorios (Pittendrigh, 1958). Se han observado transitorios adelantándose o retrasándose, según en la fase del ritmo en que haya recibido la luz. Tanto en *Drosophila* como en hamster los avances de fase requieren más transitorios (3-4 ciclos en *Drosophila*, y hasta 10 en hamsters) de los que necesitan los retrasos, que son completados en 1 o 2 ciclos. La existencia de ciclos transitorios puede revelar el acompañamiento de un oscilador esclavo para alcanzar a un marcapasos que fué sincronizado inmediatamente con el pulso (Pittendrigh, 1958 y 1981).

Fig.5

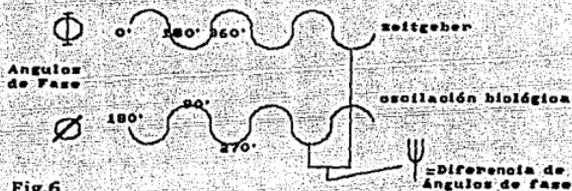


Fig.6

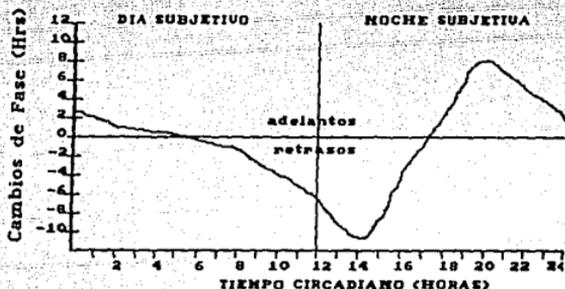


Fig. 5.- Relaciones de fase.

ϕ = ángulo de la fase de oscilación biológica.

ϕ = ángulo de fase del zeitgeber.

ψ = diferencia entre los ángulos de fase de la oscilación biológica y el zeitgeber.

Fig. 6.- Curva de Respuesta de Fase típica.

Se muestra graficada en abscisa la hora circadiana en que se presentó el estímulo y en ordenada la magnitud del cambio de fase observado en el ritmo una vez alcanzado el estado estable. Se puede apreciar poca sensibilidad en el día subjetivo, retrasos al inicio de la noche subjetiva y adelantos en los dos últimos tercios de la noche subjetiva.

(modificadas de Hastings et al, 1991).

Existen dos tipos diferentes de Curvas de Respuesta de Fase (CRF); las tenues o tipo I, en las que los máximos cambios de fase son típicamente del orden de unas pocas horas, y existe una transición más o menos gradual entre las regiones de avance o adelanto en la curva. Además, cuando la fase del ritmo cambiado (la nueva fase) es graficada como función de la fase expuesta a la luz (fase original), la derivada promedio de la curva de transición de fase resultante es igual a 1. Sin embargo, en algunas especies, el aumento en la fuerza del pulso de luz (incrementando su intensidad o duración), puede producir cambios de fase de más de 12 horas, y hay una aparente discontinuidad en la CRF, con un sorpresivo salto entre máximos retrasos y máximos adelantos de fase. La dirección de estos amplios cambios es a menudo ambigua, puesto que un cambio de fase de alrededor de 12 horas puede interpretarse tanto como un retraso o como un avance. Estas CRF's son conocidas como fuertes o de tipo 0, dado que la pendiente promedio de la curva de transición de fase es igual a 0.

Los cambios de fase dependientes de la fase en que se administre el pulso ocurren tanto en respuesta a pulsos de obscuridad aplicados en LL (luz continua), y en etapas de transición de LL a DD (obscuridad continua) y viceversa. Las CRF's con pulso de obscuridad tienden a ser imágenes especulares de las CRF's con pulso de luz, aunque a menudo existe un desplazamiento medible entre la regiones de avance de una y las de atraso de otra. La duración efectiva mínima puede tanto ser mayor para pulsos de obscuridad que de luz. Los cambios de fase ocasionados en etapas de transición son generalmente más variables (intra o interespecificamente) que aquellos causados por pulsos únicos, y la dependencia de fase de la respuesta no queda siempre clara, aunque existe cierta tendencia a una relación de imagen especular entre las CRF's para transiciones LL-DD y DD-LL. (Aschoff, J., 1965; en Prosser, 1991).

GENERALIDADES DE LA LUZ Y SUS EFECTOS SOBRE LOS RITMOS:

Dada su dualidad partícula-onda, el espectro electromagnético nos ofrece distintas regiones dependiendo de la longitud de onda (λ), que puede ir desde 0.0001Å en el caso de los rayos cósmicos, hasta kilómetros, en las ondas de radio. Aunque la luz visible para el ojo humano se circunscribe solamente de los 380 a los 700 nanómetros de λ , se ha descrito que la energía radiante aprovechable por los sistemas biológicos puede ir desde 300 hasta 900 nm de λ ; prácticamente todo fenómeno biológico que utilice luz emplea este rango de energía radiante.

Dentro de la gama de ciclos geofísicos ocasionados por la rotación terrestre, la alternancia luz-obscuridad es quizá la que menor variación sufre entre un día y otro, y constituye el más notable indicador del tiempo local (Pittendrigh, 1981). De ahí que no resulte sorprendente que el ciclo LD sea el más universal, y que el zeitgeber fundamental en la mayoría de los ritmos circadianos sea la luz.

Se pueden distinguir dos efectos conceptualmente diferentes de la luz sobre los ritmos circadianos: Efectos discretos o fásicos, como los que pueden ser ejercidos por breves pulsos de luz u obscuridad, y efectos continuos o tónicos, mejor ilustrados por la influencia sistemática de la intensidad LL sobre τ (Daan, 1976, en Prosser, 1991). Como analogía, tocar un péndulo en movimiento sería un efecto discreto, mientras que alterar la resistencia del aire en el que se mueve sería un efecto tónico.

La iluminación ambiental ejerce distintos efectos sobre el periodo (τ) de organismos diurnos y nocturnos; dichos efectos se resumen en las Reglas de Aschoff; según la primera de ellas, las especies diurnas observarán un acortamiento de τ conforme se incremente la intensidad lumínica, al contrario de lo que ocurriría en especies nocturnas. Excepción a lo anterior resulta el caso de los mamíferos, puesto que tanto especies diurnas como nocturnas alargan su τ al aumentar la iluminación. Paralelamente, mientras que las especies diurnas incrementarán su índice a/p (relación entre las horas de actividad y reposo) al intensificarse la luz, las especies nocturnas harán lo contrario, disminuyendo su nivel de actividad. La tercera regla postula que en oscuridad continua, el periodo de oscilación espontánea será mayor de 24 horas en especies diurnas, y menor de 24 horas en especies nocturnas. Finalmente, la exposición a luz continua hace mayor el periodo de oscilación espontánea en especies nocturnas, o bien conduce a la desorganización progresiva de la ritmicidad, que puede llevar, tanto a patrones de conducta arrítmicos, como a la descomposición de la ritmicidad circádica en elementos ultradianos (es decir, con periodo menor a 24 horas). Estos efectos se han interpretado como el desacoplamiento entre múltiples osciladores; alternativamente, se ha propuesto que la luz continua podría inducir la detención del reloj biológico (Aschoff, 1960).

EFFECTOS DE LA LUZ MONOCROMÁTICA EN LOS RITMOS CIRCADIANOS.

Mientras que la importancia de la luz blanca como agente sincronizador de los ritmos circadianos está perfectamente establecida en organismos desde unicelulares hasta vertebrados superiores, el papel de la luz monocromática está apenas explorándose, relacionando su efecto con la modulación y sincronización de las actividades rítmicas: En 1971, Gordon y Brown lograron alterar la fase del ritmo circadiano de temperatura corporal en el ratón *Perognathus*, estimulando con luz verde-azul; algo similar encontró McGuire en la rata común (1973). Por otra parte, Krüml, en 1976, descubrió que los cambios de color e intensidad del régimen lumínico sincronizaba el inicio de la actividad de vuelo en aves diurnas; Mote y Black (1981) encontraron que el mecanismo sincronizador del ritmo circadiano de actividad locomotora en la cucaracha *Periplaneta americana* está controlado por un grupo de fotorreceptores sensibles a λ mayores de 590 nm. Finalmente, mientras que Joshi y Chandrashekarán (1985) reportan que el ritmo circadiano de vuelo del murciélago *Hipposideros speotis* acelera su velocidad de oscilación al ser estimulado por luz de 520 nm y la disminuye con luz de 430 nm, algunos autores mencionan que la luz monocromática tiene efectos en los sistemas reproductivos del ratón y el hámster, modificando tanto el ritmo circadiano de melatonina o los niveles plasmáticos de testosterona, como directamente los órganos reproductivos (Brainard *et al.*, 1986; Benschhoff, 1987).

EL SISTEMA VISUAL Y CIRCADIANO DEL ACOCIL.

El acocil *Procambarus clarkii* presenta un sistema visual típico dentro del grupo de los crustáceos, existiendo un par de tallos oculares situados a ambos lados del *rostrum*, en la parte anterior del cefalotórax; en la porción distal de cada tallo se encuentra un ojo compuesto, constituido por 2000 a 3000 unidades repetitivas u omatidias; cada una puede dividirse en tres subsistemas, a saber, dióptrico, fotorreceptor y parareceptor (Fig. 7).

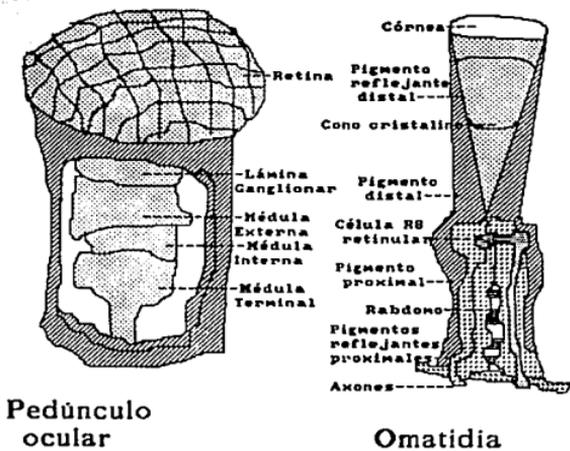


Fig. 7.- Sistema Visual del acocil.
 Pedúnculo ocular y omatidia del acocil. (Explicación en el texto).

(modificado de Aréchiga, 1992).

El sistema dióptrico está formado por la córnea (una cutícula de 60 μ m de grosor), las células corneáneas y el cono cristalino, formado por 4 células cuyos extremos proximales se adelgazan originando una raíz que es rodeada por las células retinulares; la agregación de las corneas contiguas dan a la superficie del ojo el típico aspecto facetado de los ojos artrópodos.

Al sistema fotorreceptor lo constituyen 8 células retinulares, de las cuales 7 (denominadas R1 a R7) son alargadas y se distribuyen verticalmente como lo harían las tablas que forman el cilindro de un barril de madera; las caras internas de dichas células poseen microvelosidades en cuyas membranas se localiza el pigmento visual; a esta región central se le conoce como rabdomo. En su porción distal, las células retinulares poseen una unión hermética con desmosomas en banda, análogamente a los aros de metal que mantienen unidas a las tablas del barril que hemos utilizado para describir las posiciones de las células. La octava célula retinular o R8 es mas pequeña, redonda y se encuentra mas diferenciada que las otras (Cummins y Goldsmith, 1981), formando un pequeño rabdomo separado, por encima (es decir, distalmente) del otro rabdomo, como lo haría la tapa de nuestro hipotético barril. Los axones de las 8 células retinulares atraviesan la membrana basal (el fondo del barril) y se unen para formar el nervio óptico.

El sistema parareceptor está integrado por los pigmentos anexos a los fotorreceptores, que regulan la llegada de luz a estos; primeramente, el pigmento distal, localizado en las células del cono cristalino; en obscuridad se repliega distalmente (hacia la córnea) dejando libre paso a la luz, mientras que con iluminación intensa se distribuye a lo largo de la célula, blindándola; en segundo término, el pigmento proximal, que dentro de las células retinulares puede replegarse proximalmente (por debajo de la membrana basal) permitiendo el paso de la luz, o distribuirse en ellas, cerrándolo. Por último, tenemos el pigmento reflector, que a diferencia de los otros pigmentos no migra, y se le encuentra todo el tiempo a nivel de la membrana basal. Los efectos sumados de los tres pigmentos pueden blindar casi totalmente a la omatidia o bien permitir el paso de luz no solamente por el eje principal, sino también por los lados.

Por debajo de las células retinulares se encuentra la lámina ganglionar, seguida de la médula externa (en cuya región dorsal está la glándula sinusal) la médula interna y la médula terminal (donde se encuentra el órgano X). El flujo de información visual hacia zonas centrales de integración se lleva a cabo por axones que, habiendo atravesado la lámina ganglionar, la unen con la médula externa, con la interna y se decusan, formando dos quiasmas; habiendo ya cruzado la médula terminal forman el nervio óptico, que se une con las neuronas y prolongaciones neuronales propias de la región para llegar al ganglio cerebroides o supraesofágico.

El principal pigmento visual del rabdomo del acocil es la rodopsina, cuyo cromóforo es el 11-cis-retinal; posee una amplia banda de absorción espectral, pues con λ desde aproximadamente 300 nm (luz ultravioleta) hasta 570 (Kong and Goldsmith, 1977), la rodopsina se descompone en prelumino-rodopsina, posteriormente en lumino-rodopsina y finalmente en metarrodopsina; si en este estado otro fotón incide en el pigmento, la metarrodopsina regresará a rodopsina (a diferencia de lo que ocurriría en vertebrados, donde se produciría el blanqueamiento y la liberación del retinal; Shaw and Stowe, 1982a, Goldsmith, 1972). Por otra parte, al igual

que otros organismos de agua dulce, algunos crustáceos poseen un pigmento visual cuyo cromóforo es 3-dehidro-retinal (porfiropsina), el cual tiene la capacidad de absorber luz con λ mayor (lo cual ha sido interpretado evolutivamente como una adaptación al ambiente fluvial y/o lacustre, donde la turbidez puede impedir la llegada de λ menores; Bridges, 1972).

El acócil *Procambarus clarkii* posee un sistema visual a base de rodopsina-porfiropsina (Susuki et al, 1984), donde la concentración de rodopsina en las células retinulares es mas constante, mientras que la de porfiropsina varia a lo largo del año. Estos pigmentos desaparecen rápidamente cuando la temperatura se mantiene a 25°C en condiciones de fotoperiodo o de iluminación constante, mientras que no se modifican en obscuridad constante o cuando la temperatura ronda los 10°C, sin importar el patrón de iluminación (Susuki et al, 1985).

Al igual que numerosos invertebrados, los crustáceos exhiben conspicuos ritmos circadianos. Las observaciones realizadas en animales intactos sugieren la existencia de mas de un marcapasos circadiano en el sistema nervioso, pero los experimentos de ablación no han sido conclusivos en señalar su ubicación. Sin embargo, varias estructuras (particularmente el pedúnculo ocular) han mostrado mantener actividad circadiana rítmica *in vitro*; tanto la sensibilidad retiniana como la actividad neurosecretoria despliegan ritmos circadianos en el pedúnculo ocular aislado, pero también son responsivas a las influencias sincronizadoras de otras regiones del sistema nervioso, particularmente del ganglio supraesofágico. De tal manera, el modelo que mejor respalda las observaciones experimentales hasta la fecha es el basado en varios marcapasos distribuidos en el sistema nervioso, cuyo acoplamiento parece ocurrir, dentro de un nivel neuroendócrino de integración (Aréchiga, 1992). A tal respecto, consideremos el ritmo circadiano de sensibilidad retiniana: Contando con que el ritmo en la amplitud de la respuesta del receptor a la luz depende de tres variables (la ganancia de los propios fotorreceptores, la migración de los pigmentos proximales en las células retinulares y en las del cono cristalino para los pigmentos distales), se observó que el umbral de los pigmentos proximales es mucho menor que el de los distales al comparar la oscilación bajo luz tenue (4 luxes) e intensa (270 luxes); la oscilación en la sensibilidad del receptor encontrada a 4 luxes era debida al desplazamiento rítmico de los pigmentos proximales, mientras que la encontrada a 270 luxes se debía al desplazamiento de los pigmentos distales. Podría pensarse que el marcapasos que dictaminaba ambas oscilaciones se encontraba en el ojo si extirpándolo se mantenían ambos ritmos, pero los resultados del experimento indicaron que, mientras la migración de los pigmentos proximales depende del marcapasos del pedúnculo ocular, la migración de los pigmentos distales requiere de neurosecreciones provenientes del ganglio supraesofágico (Aréchiga, 1992).

EL RITMO CIRCADIANO DE AMPLITUD ELECTORRETINOGRÁFICA.

Se denomina Electrorretinograma (ERG) al registro extracelular de los cambios de voltaje que se llevan a cabo en el ojo como respuesta a un estímulo luminoso, midiendo la diferencia de potencial que se desarrolla a través de la resistencia del fluido extracelular que separa al electrodo activo (que se coloca dentro o en la cercanía del ojo) del electrodo indiferente (colocado en alguna región inactiva cercana), reflejando la suma de actividad que se produce en el sistema visual (reveladas por la magnitud y

polaridad del ERG) dependiendo de la intensidad y duración del estímulo (Shaw and Stowe, 1982b). El ERG posee dos componentes principales, HI y HII, (fig 8) correspondiendo el primero al encendido del estímulo luminoso, mientras que el segundo se mantiene todo el tiempo que dure la estimulación luminosa (Naka y Kuwabara, 1959).

Implantando microelectrodos en diferentes elementos de la vía visual del acocil *Procambarus clarkii*, Aréchiga y Wiersma (1969) demostraron la existencia de cambios periódicos en la amplitud del electroretinograma y en la frecuencia de disparo de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa, revelando mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día; caracterizando las propiedades del ERG en *Procambarus bouvieri*, Aréchiga et al (1973) comprobaron que los cambios de amplitud del ERG correspondían a un ritmo circádico típico de un animal nocturno, donde la longitud del periodo dependía de la cantidad de luz recibida por el acocil.

SENSIBILIDAD ESPECTRAL DEL RITMO ERG DEL ACOCIL DURANTE LA ONTOGENIA.

Ontogenia es la historia de vida del organismo individual, incluyendo su construcción física desde el huevo fertilizado, la maduración funcional de sus sistemas conductual, homeostático y reproductivo, hasta el declinamiento de los mismos con la edad (Davis, 1984). Dado que muchas funciones conductuales, fisiológicas y bioquímicas presentan ritmicidad circadiana, la ontogenia de cualquier función particular podría incluir la aparición y modificación de controles rítmicos. Ritmos circadianos diferentes son a fin de cuentas dependientes entre sí; tanto si son controlados por un marcapasos circadiano único o por varios, los ritmos que llegan a manifestarse estarán organizados temporalmente entre sí y con el ambiente, puesto que los marcapasos, las vías de expresión de los ritmos y los mecanismos de sincronización son todos parte del sistema circadiano. Así, la ontogenia de los sistemas circadianos debe incluir los intermediarios constitutivos y fisiológicos requeridos para que las partes del sistema aparezcan y se organicen, modificando la forma del ritmo, su fase y su amplitud.

Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo (1988), encontraron cambios a lo largo de la ontogenia del acocil, de tal manera que los mas jóvenes (formas postembrionarias) poseían mayor sensibilidad a las λ cortas (uv, azul), la cual va disminuyendo (sobre todo para el uv) hasta un mínimo en estado adulto; la respuesta a las λ mayores (verde y rojo) aparece en las etapas posteriores del desarrollo, incrementándose progresivamente (particularmente en el caso del verde) hasta alcanzar un máximo en el adulto. Aunque se maneja la hipótesis de que durante el desarrollo pueda existir un cambio en la capacidad de los pigmentos retinulares para responder diferencialmente a distintas λ , estos resultados parecen indicar un desarrollo asimétrico de las poblaciones de fotorreceptores sensibles a λ cortas y λ largas; dicho desarrollo asimétrico parece depender del sistema neuroendocrino, posiblemente a través de la síntesis de la opsina relacionada con el 3-dehidro-retinal (Fanjul-Moles et al, 1991). Para probarlo, Fanjul-Moles et al (1992) estudiaron los parámetros del ritmo ERG de *Procambarus clarkii* de 2 a 12 semanas y adultos, en oscilación espontánea, bajo pulsos de prueba azules, rojos o blancos, encontrando una sensibilidad máxima del sistema circadiano a luz monocromática en organismos de 8 a 12 semanas de edad, la cual se desvía a través del desarrollo del azul al rojo entre las 8 y 16 semanas, estabilizándose en el adulto

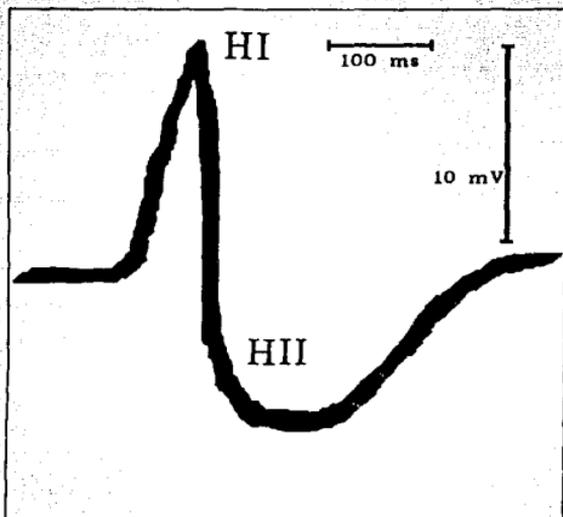


Fig. 8.- Electroretinograma.

El ERG posee dos componentes principales, HI y HII, correspondiendo el primero al encendido del estímulo luminoso, mientras que el segundo se mantiene todo el tiempo que dure la estimulación luminosa (Naka y Kuwabara, 1959).

HIPOTESIS:

"Es debido al asombro, que el hombre empieza a filosofar, y el asombro está, en el comenzo del conocimiento".
Aristóteles.

JUSTIFICACION:

Durante el desarrollo del acocil el ritmo ERG muestra una sensibilidad diferencial a luz monocromática; lo anterior se manifiesta por diferencias en los parámetros del ritmo (periodo, amplitud relativa y relación α/ρ) durante el desarrollo, las cuales se hacen menores en el animal adulto. Existe un periodo en la ontogenia del animal (entre las semanas 8^a a 16^a) en el cual estas diferencias son muy evidentes (Fanjul-Moles *et al*, 1992). Dicho periodo parece representar una fase del desarrollo en la que los posibles osciladores que subyacen al ritmo son muy sensibles a longitudes de onda particulares, lo cual sugiere la presencia de al menos dos grupos de osciladores circadianos, uno sensible a luz roja y otro a luz azul.

HIPOTESIS:

Si las características de ritmo ERG a la luz de alta frecuencia (azul) y de baja frecuencia (roja) están significando la presencia de osciladores circadianos distintos, entonces esperamos que las curvas de respuesta de fase (que representan la sensibilidad del sistema circadiano a la luz) obtenidas bajo condiciones de luz azul o luz roja presenten una sensibilidad diferente en estas edades (8 a 16 semanas).

OBJETIVOS:

Construir curvas de respuesta de fase para pulsos de luz monocromática, azul o roja, con 30 minutos de duración, y determinar si existen diferencias entre la sensibilidad del sistema circadiano del acocil durante este periodo para las dos λ utilizadas.

METODO:

The aspiration of truth,
is more precious than its assured possession.
Lessing, 1778.

MODELO BIOLÓGICO:

Se emplearon 48 acociles de la especie *Procambarus clarkii*, sin distinción de sexo, cuya edad oscilaba entre 2 y 4 meses post-eclosión (ocurrida en el laboratorio). Previamente al experimento, los organismos fueron mantenidos en condiciones de fotoperiodo 12:12, es decir, 12 horas de luz y 12 de obscuridad, en acuarios forrados con papel aluminio para evitar la entrada de luz entre las 18:30 hrs y las 6:30 hrs. Se les alimentaba cada tercer día con verdura cocida, manteniendo aereación constante del agua.

REGISTRO ELECTRICO:

Para el registro de ERG, se inmovilizaba al organismo sobre una malla de plástico y se introducía en una cámara húmeda, mantenida en obscuridad y temperatura ($16 \pm 1^\circ\text{C}$) constante, de tal manera que el agua de la misma pudiera llegar hasta las branquias, pero sin mojar los ojos. Habiendo inmovilizado los pedículos oculares con una pequeña pieza de algodón, se implantaba en la zona de la córnea un electrodo de acero con punta de 5 a 10 μm . de diámetro, el cual se conectaba al polígrafo (Grass mod. 79E) a través de un preamplificador (Grass mod. 7P122E); el electrodo indiferente se sumergía en el agua de la cámara. Cada 15 minutos se aplicaba un destello luminoso de 15 μs . a 5.1 $\mu\text{Einsteins M}^{-2} \text{s}^{-2}$ (fotoestimulador Grass PS22), y se registraba la amplitud electroretinográfica tanto en papel como a través de una tarjeta PC-LabCard modelo-PC-812, que permitía la captura de la señal en una PC (programa CapERG) (FIG. 9). Los datos obtenidos en diskette se vaciaban directamente a hoja de cálculo, graficándose las variaciones de la amplitud ERG con respecto al tiempo, de tal manera que pudieran determinarse los parámetros del ritmo. Tras al menos 4 días en oscilación espontánea, se aplicaba un pulso de 30 minutos de luz monocromática (azul, $\lambda=400-500\text{nm}$ o rojo, $\lambda=600-700\text{nm}$) de $200 \times 10^{-4} \text{ watts /m}^2 \text{seg}^2$, de modo que tras otros 4 días de oscilación espontánea pudieran determinarse los cambios de fase (adelantos o retrasos) sufridos por el ritmo ERG.

ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la figura 10 se muestra un registro de ERG con los datos en crudo, graficándose la variación de la amplitud en milivoltios (mV) del ritmo ERG a lo largo de los días de registro; puede apreciarse claramente la oscilación espontánea en los 5 primeros ciclos, y tras la aplicación del pulso (en este caso de luz roja) se observa la perturbación sufrida por el ritmo durante los periodos transitorios, para finalmente estabilizarse. En la figura 11 se presenta un detalle de la figura 10, mostrando los parámetros circadianos a determinar: el periodo (τ , que se obtuvo midiendo la longitud de dicho periodo, considerada desde el inicio de actividad de un ciclo hasta el inicio de actividad del siguiente), la fase de actividad (α , considerada desde el momento del ciclo en el cual la amplitud equivale a un 50% del máximo, hasta el momento en que regresa a tal magnitud tras haber alcanzado el punto más alto de la oscilación) y el Tiempo Circadiano (CT, que se calculó

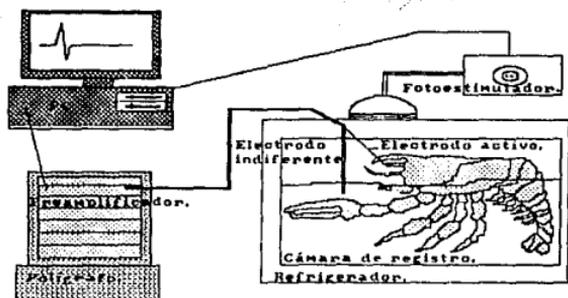


Fig. 9.- Dispositivo de Registro.

Se esquematiza el sistema de registro, constituido por la cámara húmeda en la cual se registra el ERG, el preamplificador, el polígrafo y la PC, la cual recibe y almacena las variaciones en la amplitud del ERG y al mismo tiempo gobierna el fotoestimulador para aplicar los destellos luminosos cada 15 minutos.

Ritmo en oscilación espontánea.

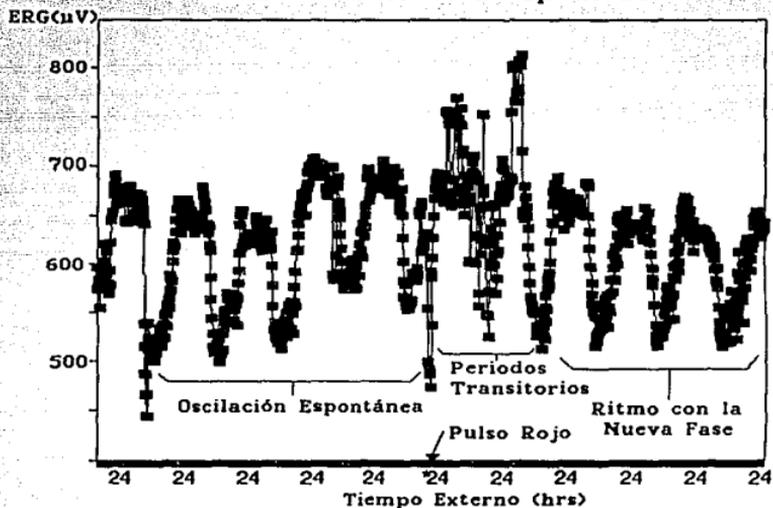


Fig.10.- Ritmo en oscilación espontánea.

Se muestran los datos en crudo obtenidos de un registro de ERG; la primera parte corresponde a las variaciones de amplitud del ritmo ERG en oscilación espontánea, que es seguida tras 5 días de registro por la aplicación de un pulso de luz monocromática; tras la perturbación observada en el ritmo durante los ciclos transitorios, se reestablece la oscilación, con una nueva fase en la mayoría de los casos como efecto directo del pulso de luz aplicado.

Parámetros Circadianos del ERG.

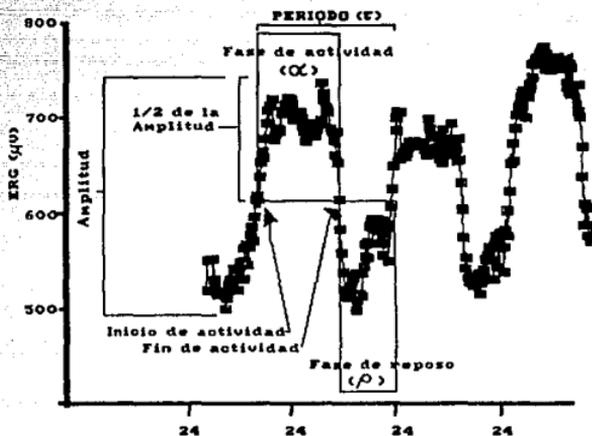


Fig.11.- Parámetros del Circadianos del ritmo ERG.

Los parámetros circadianos del ritmo ERG a determinar son: Duración del periodo (τ , obtenido midiendo la longitud desde el inicio de actividad de un ciclo hasta el inicio de actividad del siguiente); la fase de actividad (α , considerada desde el momento del ciclo en el cual la amplitud equivale a un 50% del máximo, hasta el momento en que regresa a tal magnitud tras haber alcanzado el punto mas alto de la oscilación); la fase de reposo (ρ , considerada desde el momento del ciclo en el cual la amplitud equivale a un 50% del mínimo, hasta el momento en que regresa a tal magnitud tras haber alcanzado el punto mas bajo de la oscilación); y el Tiempo Circadiano (CT, que se calculó normalizando cada ciclo con respecto al periodo de 24 hrs, es decir, cada hora circadiana equivalla al cociente τ/T , donde τ corresponde al periodo del ritmo y T al periodo del ciclo externo, considerado como 24 horas al estar aislado de oscilaciones externas).

normalizando cada ciclo con respecto al periodo de 24 hrs, es decir, cada hora circadiana equivale al cociente τ/T , donde τ corresponde al periodo del ritmo y T al periodo del ciclo externo, considerado como 24 horas al estar aislado de oscilaciones externas).

Para determinar la magnitud de los cambios de fase ocurridos tras la perturbación provocada por el estímulo luminoso, y con ellos construir la Curva de Respuesta de Fase, se siguió el método de Enright (1981), que consiste en graficar las fases de actividad de cada periodo como barras horizontales paralelas, una abajo de la otra a lo largo del eje de las ordenadas, a manera de los peldaños de una escalera, donde la longitud corresponde a la duración del periodo de actividad, medida con respecto al eje de las abscisas, que representa el tiempo externo (Fig 12); en dicha figura 12 se muestra este método, tomado de uno de los experimentos realizados en esta tesis (particularmente, el mostrado en la figura 10); puede observarse claramente que el inicio de actividad (apreciable en la gráfica como el punto donde inicia cada una de las barras que representan los periodos de actividad del organismo) va corriéndose hacia la derecha desde el día 1 hasta el 5, lo cual indica que en este caso el ritmo es mayor a 24 horas al ser mantenido en oscilación espontánea; en el día 5 se aplica un pulso de luz roja, en la hora circadiana 16, notándose cierta perturbación en ese mismo día, pues disminuye la longitud correspondiente a la fase de actividad; dicha perturbación sufrida por el ritmo puede observarse muy claramente en el día 6, pues atrasa su inicio de actividad hasta las 24 horas de tiempo externo y adelanta su término de actividad con respecto a los días anteriores. Para el día 7 el ritmo ha empezado a estabilizarse, y en el día 8, tras los 3 periodos transitorios el ritmo se ha estabilizado: Es en este momento que se procede a cuantificar el cambio de fase producido por la aplicación del pulso, de tal manera que se traza una regresión lineal entre los inicios de actividad de los 4 primeros días, y se extrapola en qué punto debería iniciar la actividad del octavo día, tras los 3 transitorios anteriormente mencionados. Como podemos apreciar en dicha figura, el inicio de actividad se presenta 3 horas antes de lo esperado, lo cual corresponde a graficar en nuestra CRF para luz roja un punto de 3 horas de adelanto en la hora circadiana 16, que fué a la cual se aplicó el pulso. Resulta pertinente hacer notar que a partir del momento de aplicación del pulso, los inicios de actividad dejan de correrse a la derecha, y empiezan a hacerlo hacia la izquierda; esto se debe a que el ritmo, independientemente del cambio de fase provocado por el pulso de luz monocromática (que se revela como la diferencia entre la hora a la cual se esperaba el inicio de actividad y la hora a la que realmente ocurre tras la aplicación del pulso), sufrió un cambio de periodo; cuando se corría hacia la derecha, el ritmo tenía un periodo (τ) mayor de 24 horas, mientras que al correrse hacia la izquierda revela que τ se ha hecho menor de 24 horas.

Para la construcción de las CRF's se repite el anterior procedimiento para cada punto que se desea obtener; se deja al organismo en oscilación espontánea, se aplica un pulso, se mide el cambio de fase producido por el mismo, se grafica y así sucesivamente hasta obtener dos puntos cada dos horas circadianas. Tras la construcción de las CRF's, se procedió a calcular el área total bajo la curva, tanto para atrasos como para adelantos, con la finalidad de obtener la relación D/A (área total de retrasos entre área total de adelantos), lo cual es un parámetro que permite describir y analizar las características de las curvas.

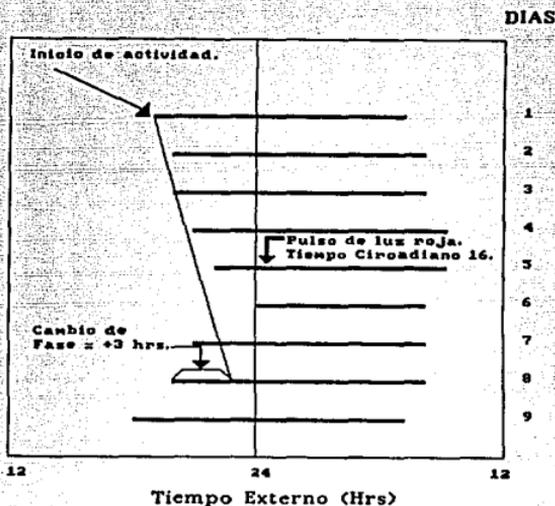


Fig.12.- Método de Enright para determinación de los cambios de fase.

Se han graficado las fases de actividad de cada período como las barras horizontales que secuencialmente representan en ordenadas los días transcurridos, mientras que la longitud de cada una de ellas corresponde a la duración del período de actividad, medida con respecto al eje de las abscisas, que muestra el tiempo externo; el inicio de actividad va corriéndose hacia la derecha desde el día 1 hasta el 5, indicando que el ritmo es mayor a 24 horas; en el día 5 se aplica un pulso de luz roja, en la hora circadiana 16, notándose cierta perturbación en ese mismo día, pues disminuye la longitud correspondiente a la fase de actividad; dicha perturbación sufrida por el ritmo puede observarse muy claramente en el día 6, pues atrasa su inicio de actividad hasta las 24 horas de tiempo externo y adelanta su término de actividad con respecto a los días anteriores. Para el día 7 el ritmo ha empezado a estabilizarse, y en el día 8, tras los 3 períodos transitorios el ritmo se ha estabilizado: Es en este momento que se procede a cuantificar el cambio de fase producido por la aplicación del pulso, de tal manera que se traza una regresión lineal entre los inicios de actividad de los 4 primeros días, y se extrapola en qué punto debería iniciar la actividad del octavo día, tras los 3 transitorios anteriormente mencionados. Como podemos apreciar, el inicio de actividad se presenta 3 horas antes de lo esperado, lo cual corresponde a graficar en nuestra CRF para luz roja un punto de 3 horas de adelanto en la hora circadiana 16.

RESULTADOS:

"Meted la mano en plena vida humana;
todos la viven, pero pocos la conocen,
y dondequiera que la cojáis,
allí ofrece interés:
En pintarrajeados cuadros, poca luz,
mucho error y una chispita de verdad".
Goethe.

DESCRIPCION DE LAS CURVAS DE RESPUESTA DE FASE:

En la abscisa está representado el tiempo circadiano (tc) del animal y en la ordenada la magnitud de los cambios de fase obtenidos al aplicar el pulso de luz (azul o roja) en las diferentes horas circadianas. Los adelantos de fase se representan con el signo + y los retrasos con el signo -. La noche subjetiva del animal se considera desde las 12 hrs. tc, que corresponde al comienzo de la máxima sensibilidad visual representada por el ERG (momento que coincide con el inicio de actividad del organismo, en el cual la amplitud del ritmo equivale a un 50% de la amplitud máxima del ciclo circadiano), finalizando a las 24 horas tc (que marcan el fin de actividad del organismo al alcanzar el 50% de la amplitud mínima de un ciclo circadiano: De tal manera, un día circadiano estaría representado de las 0 a las 24 horas tc.

a) CURVA DE RESPUESTA DE FASE PARA LUZ AZUL:

En la figura 13 se encuentra representada la curva de respuesta de fase del ERG obtenida para pulsos de luz azul en 24 experimentos (cada punto representa el promedio de 2 registros). Todas las horas del día subjetivo, es decir, desde las 0 hasta las 12 horas de tiempo circadiano (tc) presentan moderados retrasos (hasta de 4 horas máximo, en el tc 2), pero en el tiempo circadiano 12 (inicio de la noche subjetiva) inicia una zona de adelantos que llega a un máximo de 6 horas en el tiempo circadiano 14; posteriormente, en el tiempo circadiano 16 la curva se invierte para iniciar una zona de retrasos, alcanzando un máximo de 7 horas en el tc 18; a partir de este punto la curva vuelve a desplazarse hacia la zona de adelantos, mostrando una pequeña región de hasta 2 horas de adelanto en el tc 22, para descender a 0 en el tc 24. El área total de retrasos es 4 veces mayor que la de adelantos, con una relación D/A (retrasos/adelantos) $16/4=4$. Tanto en los tc 0 y 12, no ocurren cambios de fase.

b) CURVA DE RESPUESTA DE FASE PARA LUZ ROJA.

En la figura 14 se encuentra representada la curva de respuesta de fase del ERG obtenida para pulsos de luz roja en 24 experimentos (cada punto representa el promedio de 2 registros). En ella puede observarse que en el tc 0 la curva muestra adelantos de 4 horas, que se continúan con una región de adelantos moderados, los cuales van reduciéndose para llegar a 0 en el tc 3; posteriormente la curva continúa descendiendo para formar un área grande de retrasos, que encuentran su máximo en el tc 9, con retrasos de 11 horas. A partir de este punto, la curva asciende hacia la zona de adelantos, cruzando por 0 en el tc 10, y manteniéndose en este lado de la curva hasta el tc 24 (toda la noche subjetiva), con un máximo en los tc 18 y 20 de 10 horas. De esta manera, la región de máximos avances se encuentra en la noche subjetiva, mientras que en el día subjetivo predominan los retrasos, salvo el pequeño pico de adelantos al inicio del mismo. Los estímulos aplicados en los tc 10 y tc 14 no producen cambios de fase. El área total de avances es mayor que la de retrasos, con una relación D/A = $6/14=0.4285$.

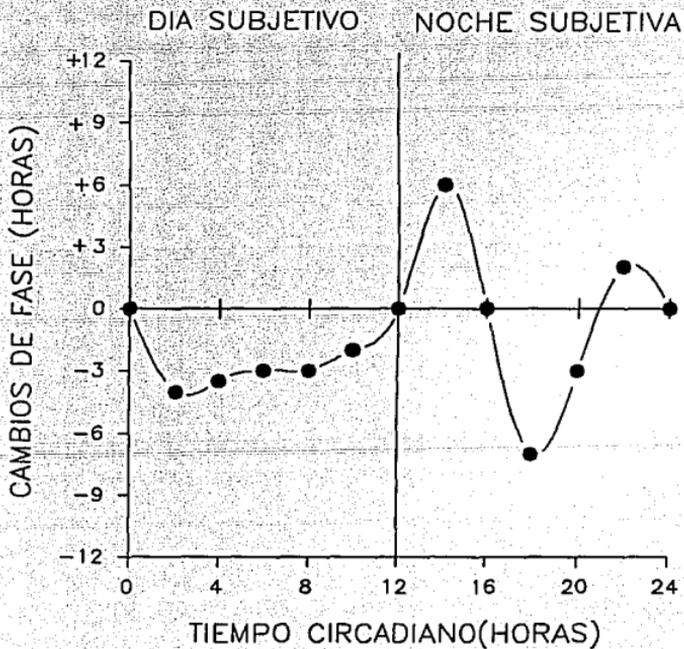


Fig.13.- CRF para pulsos de luz azul.

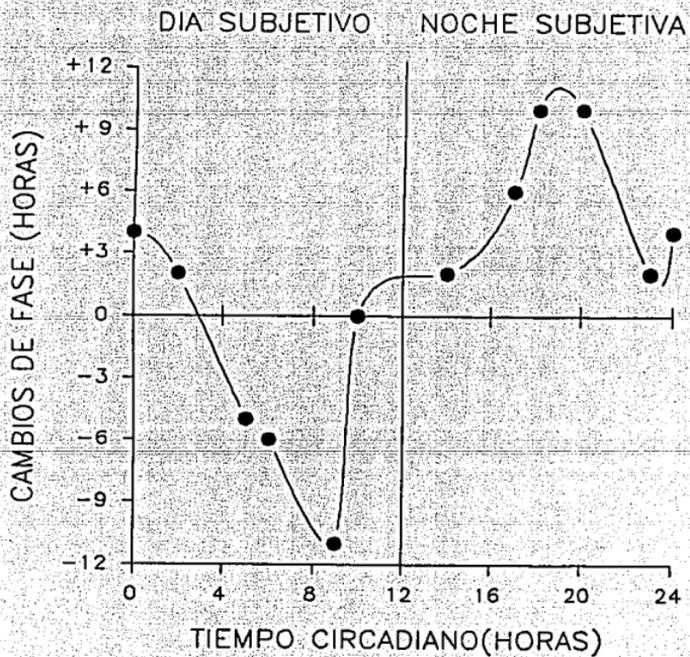


Fig.14.- CRF para pulsos de luz roja.

En la figura 15 se comparan las diferencias encontradas entre las curvas de respuesta de fase para pulsos de luz roja y azul, observándose una clara relación en espejo durante la noche subjetiva tardía (de las 16 a las 24 horas circadianas), de tal forma que cuando la luz azul produce los máximos retrasos que puede inducir, la luz roja provoca los máximos avances de fase.

En la figura 16 se muestra una curva de respuesta de fase obtenida para luz blanca con animales de la edad utilizada en este trabajo (modificada de Fuentes-Pardo, Fanjul-Moles y Moreno-Sáenz, 1992). En dicha figura se pueden observar retrasos en gran parte del día subjetivo y en la noche subjetiva temprana, mientras que en la noche subjetiva tardía predominan los retrasos; resulta interesante observar que existe una hora en la noche subjetiva (aproximadamente las 17 horas tc) en la cual se presentan tanto adelantos como retrasos de considerable magnitud, correspondiendo dicha hora con la zona de adelantos y retrasos en espejo, anteriormente mencionada, de nuestras CRF's para luz azul y roja; igualmente, puede apreciarse una zona de insensibilidad entre las 22 y las 2 horas tc.

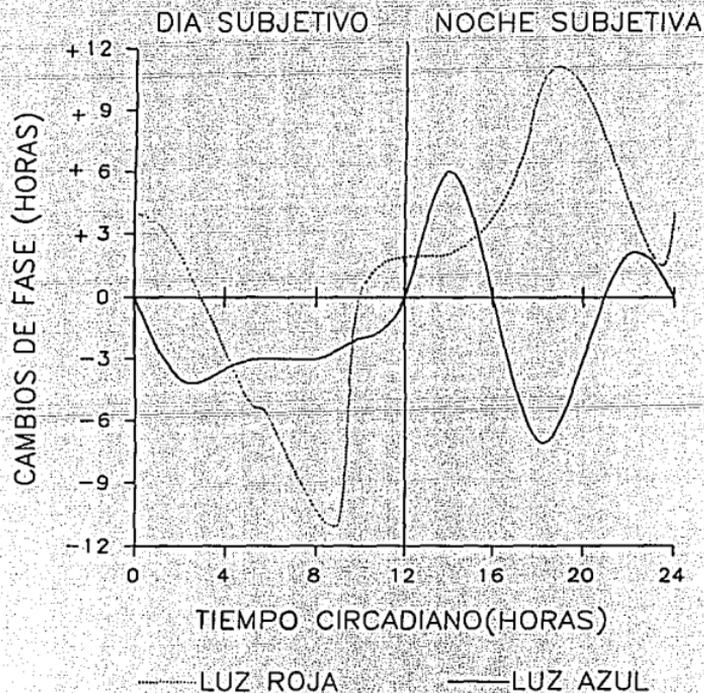


Fig.15.- CRF's para luz azul y roja: Nótese la relación en espejo en el tc 17

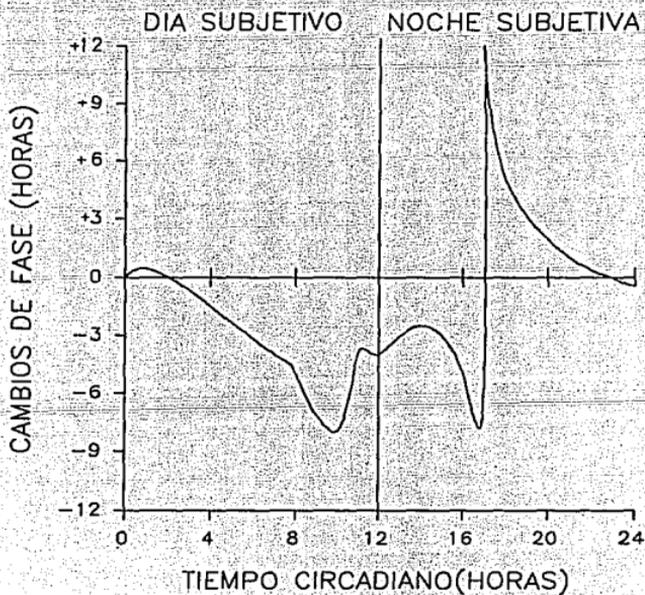


Fig.16.-CRF para pulsos de luz blanca. (modificada de Fuentes-Pardo, Fanjul-Moles y Moreno-Sáenz, 1992).

DISCUSION:

"Es imposible meditar sobre el tiempo,
y sobre el misterio de la transición
creativa de la naturaleza sin sentirse
agobiado por las abrumadoras limitaciones
de la inteligencia humana."
Alfred North Whitehead.
The Concept of Nature.

Los resultados de esta tesis parecen confirmar la proposición de Fanjul-Moles *et al* (1992) y por lo tanto la hipótesis presentada; aunque en este trabajo no se estudió la diferenciación de los dos sistemas propuestos como osciladores circadianos sensibles a longitudes de onda corta y larga a través del desarrollo, si se hizo el estudio de dichos sistemas a partir de la edad en la que el ritmo de amplitud de ERG obtenido para luz blanca ha desarrollado mecanismos de sincronización (desde las 8 a las 20 semanas) y la noche subjetiva del animal es coincidente con la máxima actividad, como es propio de un animal nocturno (Fuentes-Pardo *et al*, 1992). Antes de esta edad la actividad máxima del animal se encuentra en el día subjetivo (Fanjul-Moles *et al*, 1987) quizá debido a que a que el acoplamiento entre el sistema marcapaso y la salida del ritmo no están bien desarrollados. Lo anterior se debe probablemente a que los procesos postembrionarios de maduración neuroendócrina parecen ser lentos en este tipo de crustáceos (Novales, 1973).

Las curvas de respuesta de fase se han utilizado como una herramienta para evaluar la sensibilidad diferencial a la luz de los ritmos circadianos (Pittendrigh, 1981), lo cual es fundamental para que se lleve a cabo la fotosincronización. En trabajos anteriores se demostró que la curva de sensibilidad a los pulsos de luz blanca madura relativamente tarde en el acocil (Fanjul-Moles *et al*, 1987; Fuentes-Pardo *et al*, 1992). En estos trabajos se encontró que la CRF a la luz blanca de los animales menores a dos meses de edad muestra dos picos de sensibilidad fótica durante el ciclo circadiano, en tanto que la curva de los animales mayores a 2 meses presenta sendos picos de adelantos y retrasos en la noche subjetiva del animal y retrasos relativamente importantes en el día subjetivo. Lo anterior diferencia esta curva de la del animal adulto, la cual presenta un solo pico de sensibilidad en la noche subjetiva y es muy poco sensible en el día subjetivo (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983).

La sensibilidad del ojo del acocil a diferentes longitudes de onda (λ), muestra durante la ontogenia una diferencia importante en cuanto a la sensibilidad de los fotorreceptores a las 2 λ estudiadas en esta tesis (Fanjul-Moles y Fuentes-Pardo, 1988). En los animales mas jóvenes aparece tempranamente una respuesta a la luz azul, igual o de mayor intensidad que a la luz blanca. Sin embargo la sensibilidad a luces de la misma intensidad es mas tardía y su respuesta se hace muy evidente a los 2 meses de edad aunque en el animal adulto siempre va a ser comparativamente menor que la respuesta al azul o al verde. Lo anterior evidencia que los fotorreceptores involucrados en la detección de las longitudes de onda larga (600-700 nm.) presentan un desarrollo tardío y siempre tienen una menor sensibilidad, la cual aparentemente depende de factores importantes como es la temperatura (Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 1991). Sin embargo al estudiar la luz roja como destello de prueba para obtener el ERG y compararla con la luz de prueba

azul se encontró que aunque la amplitud del ERG obtenido con luz roja siempre es menor, el ritmo que aparece bajo este tipo de destellos se caracteriza por poseer parámetros circadianos más conspicuos, sobre todo entre las 8 y 12 semanas de edad (Fanjul-Moles *et al.*, 1992). Lo anterior parece indicar una mayor ganancia del sistema circadiano que del sistema fotorreceptor, y por otra parte una marcada sensibilidad del sistema circadiano a dicha longitud de onda en esta etapa de la vida del animal; puesto que la respuesta del sistema circadiano tanto a la longitud de onda corta como a la larga parecen estabilizarse durante el desarrollo. En el animal adulto nunca se observan diferencias tan notables en los parámetros circadianos a las diferentes longitudes de onda como en la etapa señalada anteriormente.

Las CRF obtenidas en esta tesis parecen reflejar esta sensibilidad diferencial, los cambios de fase obtenidos para la luz roja son de una magnitud mayor que los de la luz azul, lo que refleja una mayor sensibilidad del sistema circadiano a esta longitud de onda. La CRF obtenida para luz azul se caracteriza por presentar cambios de fase de una magnitud menor en el día subjetivo, y estos cambios siempre son moderados (-3 hrs.) al principio del día subjetivo y tienden a hacerse menores (-1 hora) al final del día subjetivo. En cambio, en la noche subjetiva del animal se puede observar una zona de retrasos y adelantos entre las 14 y 18 horas tc, cuyo valor máximo es de -7 horas a las 18 horas tc, lo que parece coincidir con el pico de sensibilidad a la luz encontrada por Fuentes Pardo *et al.* (1992) en la CRF obtenida bajo luz blanca (ver fig. 16), aunque en esta curva los cambios de fase son mucho mayores para los adelantos (hasta +12) que para los retrasos (hasta -8 horas). En general la CRF obtenida para luz azul parece ajustarse al patrón básico de respuesta propuesto por Pittendrigh (1981), aunque parece estar retrasada con respecto a este patrón (retardos al final del día subjetivo y noche subjetiva temprana y avances de fase en la noche subjetiva tardía y día subjetivo temprano). En la curva para luz azul se presenta un pequeño avance al final de la noche (+2 horas tc), lo que hace tomar a la curva un aspecto bimodal. Sin embargo hay que tener en cuenta que cada punto mostrado en esta curva es únicamente el promedio de dos puntos, y requiere un reforzamiento de toda la casuística. En la curva obtenida con pulsos de luz roja se encontró una sensibilidad exagerada a la luz durante el día subjetivo, con retrasos muy grandes al final de éste (-11 horas). En general son raras las CRF's que presentan una sensibilidad tan grande en el día subjetivo, durante el cual, aún en los animales diurnos se observa una relativa insensibilidad. Sin embargo, se han reportado cambios de fase relativamente grandes en el día subjetivo del murciélago *Hipposideros sports* (Joshi y Chandrashekar, 1984). En este animal, la longitud de onda de 520 nm evocó avances de fase máximos en el día subjetivo, mientras que la longitud de onda corta provocó avances de menor magnitud (más evidentes al inicio de la noche subjetiva). Sin embargo, en el TC 18, la magnitud producida por las dos λ es de igual magnitud pero en espejo, es decir, en λ corta produce retrasos mientras que la larga produce adelantos; las λ mayores a 520 nm no producen cambios de fase.

En un trabajo sobre la sensibilidad espectral del ERG en formas adultas del acocil *Procambarus bouvieri* Inclán-Rubio (1991) reportó resultados similares a los de esta tesis, aunque la CRF obtenida para luz azul en su trabajo es muy similar a la de rojo reportada en esta tesis, con una amplia zona de avances en la noche subjetiva y de retrasos en el día subjetivo, en tanto que la CRF reportada por esta investigadora para 632 nm es muy similar

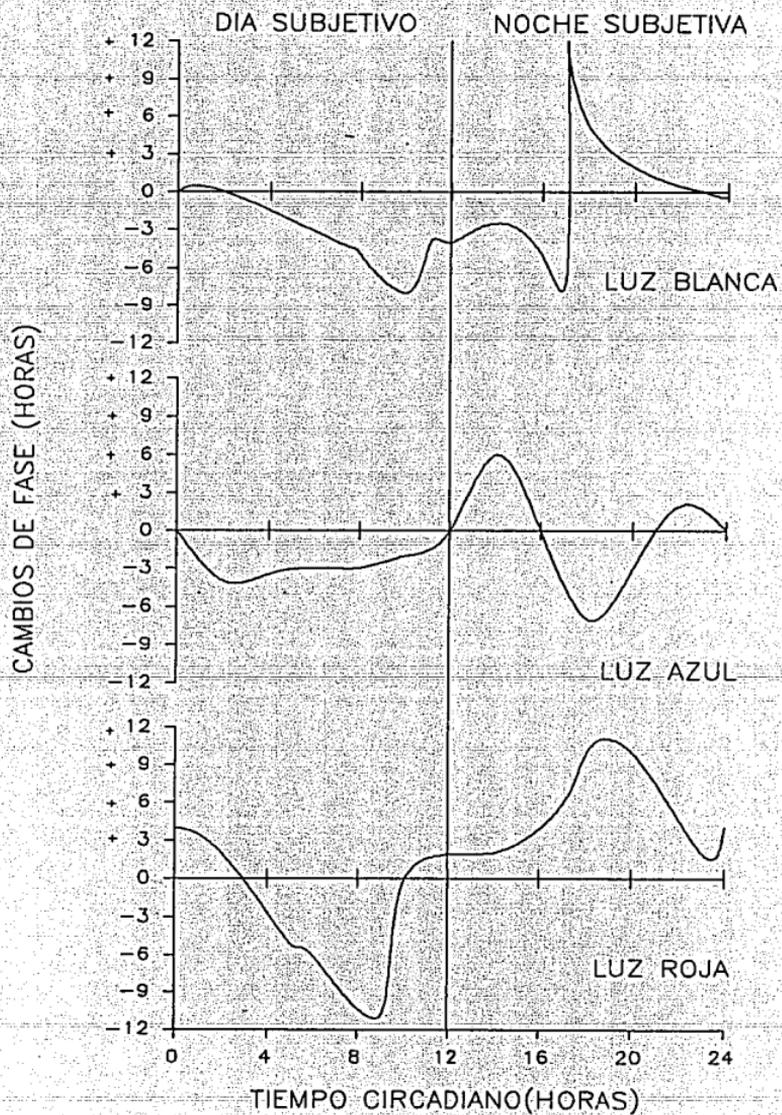
a la reportada en esta tesis para λ corta, con retrasos en el día subjetivo y adelantos y retrasos en la noche subjetiva. Esta curva, al igual que la reportada en esta tesis, tiene una forma bimodal; sin embargo hay que hacer notar que tanto la duración como la intensidad de la luz utilizada por Incián-Rubio fueron mucho mayores.

A pesar de la complejidad de las curvas obtenidas en este trabajo de tesis, los componentes de adelantos y retrasos obtenido para ambas curvas de luz monocromática parecen superponerse para dar lugar a la curva obtenida por Fuentes-Pardo et al en 1992 para luz blanca en animales de la misma edad (ver fig 17). Los retrasos del azul y adelantos del rojo a las 17 TC corresponderían a la zona de transición con avances y retrasos máximos a esta hora circadiana en la curva de luz blanca, mientras que los retrasos a las 10 horas tc, en el día subjetivo tardío, parecen poseer el componente de atrasos de la curva obtenida para luz roja a la misma hora. Los efectos de adelantos y retrasos entre la 0 y las 4 tc que se encuentran en las curvas para roja y azul parecen cancelarse en la curva obtenida para blanco, en la cual se muestra una sensibilidad mínima para la luz entre las 24 y 4 horas tc.

Los resultados de esta tesis son complejos, y aunque parece cumplirse la hipótesis de que la luz monocromática incide sobre un sistema formado al menos por 2 lotes de osciladores, dichos osciladores muestran un comportamiento más complejo de lo esperado; la luz monocromática incide no solamente en los pigmentos proximales y distales involucrados en el ritmo, sino también en el pigmento reflector y aún en las propias células retinulares, que presentan una sensibilidad espectral diferencial (Nasaki, 1969); Aunado a la existencia de un fotorreceptor extrarretiniano a nivel del ganglio supraesofágico (que parece estar involucrado en la sincronización del ritmo; Sandeman, 1990), todos los elementos involucrados en la oscilación de la amplitud del ERG poseen sensibilidades espectrales distintas.

Por otra parte, no debemos olvidar que aunque se utilizaron animales de 8 a 20 semanas, que deben presentar un ritmo bien establecido, existe cierta labilidad del ritmo durante el crecimiento del animal, la cual se refleja en la duración del período (τ). Daan y Pittendrigh (1976c) sugieren relaciones interesantes entre el período y la forma de la CRF, en especial con la forma de la CRF; en especies con τ corto, es mayor la relación D/A que en especies con τ mayores. Esta tendencia interespecífica también se presenta en individuos de la misma especie. Cuando τ es acortado, debido a un postefecto causado por la sincronización previa, la relación D/A aumenta. En la curva para luz azul reportada en esta tesis, la relación D/A es mayor que en la curva para luz roja; lo anterior podría indicar que la luz azul tiende a atrasar el sistema, mientras que la luz roja tendería a acortar el período, retrasándolo, indicando la presencia de dos sistemas osciladores que podrían corregir el período del ritmo de acuerdo con los requerimientos adaptativos del mismo, es decir, acortándolo y por lo tanto adelantando el sistema o bien alargándolo y por lo tanto atrasando el sistema de acuerdo con las condiciones estacionales que lleven implícito el crecimiento del día geofísico; considerando el caso de un organismo nocturno, el cual solamente estaría expuesto a la luz (y por ende, sería responsivo a la misma) cuando sale de su guarida (al caer el sol e iniciar su período de actividad, lo cual corresponde a las primeras horas de la noche subjetiva) y cuando regresa a ella (al despuntar el alba, terminando así su período de actividad durante las últimas horas de la noche subjetiva), Colin Pittendrigh y Serge Daan

**Fig.17.- Comparación de las CRF's para luz blanca, azul y roja.
(siguiente página).**



(1976) han modelado teóricamente, que el inicio y el final de la oscilación circádica en animales nocturnos se controla mediante la interacción de dos osciladores acoplados entre sí; el oscilador ATA (que determinaría la sincronización del ritmo en base a las características de la luz existente en el atardecer) y el oscilador AMA (que sincronizaría el ritmo detectando la luz de las primeras horas del día); observando las diferencias entre las curvas de respuesta de fase obtenidas para luz azul y roja, y su relación con la descrita para luz blanca, resulta muy atractivo el considerar confirmada la existencia de al menos dos sistemas osciladores involucrados durante la ontogenia en el ritmo ERG del acocil, los cuales muestran una respuesta acoplada cuando se obtiene ERG con luz blanca. De acuerdo con lo propuesto por Pittendrigh y Daan (1976), las características de las curvas de respuesta de fase descritas implicarían el acoplamiento, a lo largo de la ontogenia, de 2 sistemas, uno con capacidad de responder con retrasos a la luz del atardecer (el de luz azul, por su capacidad de provocar ligeros atrasos en las últimas horas del día subjetivo y las primeras horas de la noche subjetiva, con una relación $D/A = 4$) y otro con capacidad de responder con adelantos a la luz de la mañana (el de luz roja, puesto que produjo los mayores adelantos en las últimas horas de la noche subjetiva y primeras del día subjetivo, con una relación $D/A = 0.4285$): Por otra parte, en el trabajo reportado por Inclán-Rubio (1991), se postulan dos grupos de fotorreceptores, a saber V y R; pero mientras que V es responsivo a λ corta y causa los máximos adelantos de fase, R es responsivo a λ larga y provoca los máximos atrasos; esta autora propone para los fotorreceptores V y R una mayor influencia sobre los osciladores ATA y AMA, respectivamente; aunque tal propuesta parecería diametralmente opuesta a la aquí presentada, debemos considerar que sus resultados fueron obtenidos en individuos adultos de *Procambarus bouvieri*, mientras que los nuestros se refieren a juveniles de *Procambarus clarkii*, en los cuales aparentemente apenas se está dando el acoplamiento de los osciladores; otro factor a considerar sería que los pulsos de luz monocromática aplicados en este trabajo fueron de intensidad y duración mucho menores a los utilizados por Inclán-Rubio, lo cual podría originar diferencias por el mero agotamiento de los fotopigmentos en condiciones de iluminación intensa.

PERSPECTIVAS:

"La satisfacción
de observarla y comprenderla,
es el mas maravilloso don
de la naturaleza".
Albert Einstein.

Puesto que la idea central de este trabajo fué aportar al campo de conocimiento básico de los ritmos circadianos, al describir la capacidad de la luz monocromática para producir cambios de fase en el ritmo ERG, durante la ontogenia del acocil, existen variadas perspectivas para continuar la presente investigación, que se pueden desprender en varias líneas de trabajo: Primeramente, profundizar el estudio de las CRF's para luz azul y roja durante la ontogenia, aumentando la casística y procurando cubrir cada una de las horas circadianas con al menos tres puntos; en segundo lugar, podría explorarse el papel sincronizador de la luz monocromática durante la ontogenia de otros ritmos (como el locomotor, por ejemplo). En tercer lugar, resultaría sumamente interesante un protocolo paralelo al aquí presentado, en el cual se registrara el ritmo ERG con pulsos de luz monocromática y se aplicaran pulsos de luz blanca para en base a ellos construir la CRF. Finalmente, quedaria pendiente elucidar las vias neurales y neuroendócrinas que permiten la sincronización del ritmo ERG por luz monocromática, los mecanismos y etapas de maduración que se deben atravesar para dar el pleno acoplamiento de los osciladores aquí propuestos, así como describir la ubicación y funcionamiento de dichos osciladores.

BIBLIOGRAFIA:

- Aguilar, R. (1993): **TEORIAS DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS**. En "Bibliografía para el Primer Curso Latinoamericano de Cronobiología", UNAM, México.
- Aréchiga, H. y C.A.G. Wiersma. (1969): Circadian Rhythms of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71.
- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. y B. Barrera-Mera. (1973): Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latín Am.* 24: 601.
- Aréchiga, H., Fernández-Ouiz, F., Fernández de Miguel, F. and L. Rodríguez-Sosa. (1992): The Circadian System of Crustaceans. *Chronobiology International*, v9, n6.
- Aschoff, J. (1979): Circadian Rhythms, general features and endocrinological aspects. In "Endocrine Rhythm; D. Krieger, ed." Raven Press, New York.
- Aschoff, J. (1984): Freerunning and entrained Circadian Rhythms. In "Handbook of Behavioral Neurobiology; Volume 4, Biological Rhythms" ed. Jürgen Aschoff, Plenum Press. New York-London.
- Benshoff, H.M., Brainard, G.C., Rollag, M.D. and G. R. Lynch (1987): Suppression of pineal melatonin in *Peromyscus leucopus* by different monochromatic wavelengths of visible and near ultraviolet light (UV-A) *Brain Res.* 420, 397-402.
- Brainard, G.C., Vaughan, M.K. and J.R. Russel (1986): Effect of light irradiance and wavelength on the Syrian Hamster reproductive system. *Endocrinol.* 119, 648-654.
- Binkley, S. (1990): **THE CLOCKWORK SPARROW**. Prentice Hall, New Jersey.
- Bridges, C.D. (1972): The rhodopsin-porphyrin visual system. In "Handbook of sensory Physiology. V. VII/1. Photochemistry of vision. ed. H. Dartnail. Springer Verlag, Berlin. pp.417-480.
- Bünning, E. (1935): Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primärbältern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrb wiss Botan* 81: 411-418.
- Bünning, E. (1963): *Die physiologische Uhr*. Berlin: Springer-Verlag (2nd ed).
- Konopka, R.J. and S. Beuzer (1971): Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci* 58: 2112-2116.
- Coleman, R. (1986): **WIDE AWAKE AT 3:00 A.M.** W.H. Freeman. N.Y.
- Cummins, D. and T. H. Goldsmith (1981): Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. *J. comp. Physiol.* 142, 199-202.
- Daan, S. (1977): **TONIC AND PHASIC EFFECTS OF LIGHT**. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 290: 51-59.
- Davis, Fred C. (1984): Ontogeny of Circadian Rhythms. In "Handbook of Behavioral Neurobiology; Volume 4, Biological Rhythms" ed. Jürgen Aschoff, Plenum Press. New York-London.

Enright, J. T. (1981): Data analysis. In "Handbook of Behavioral Neurobiology; Volume 4, Biological Rhythms" ed. Jürgen Aschoff, Plenum Press. New York-London.

Fanjul-Moles M. L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, N. B. Fuentes-Pardo (1987): ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 88a, No. 2, pp. 213-219.

Fanjul-Moles M. L. and B. Fuentes-Pardo (1989): Spectral sensitivity in the course of ontogeny of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A, 61-66.

Fanjul-Moles M. L., Prieto-Sagredo, J. and B. Fuentes-Pardo (1991): Sinus Gland regulates the spectral sensitivity in the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 98a, No. 2, pp. 317-322.

Fanjul-Moles M. L., Miranda-Anaya, M and B. Fuentes-Pardo (1992): Effect of monochromatic light upon de ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii* *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 102a, No. 1, pp. 99-106.

Fuentes-Pardo, B., Fanjul-Moles M. L., and E. Moreno-Sáenz (1992): Synchronization by light of the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish. *J. Interdiscipl. Cycle Res.*, vol 23, No 2, pp81-91.

Fuentes-Pardo, B. and J. Ramos-Carvajal. (1983): The Phase Response Curve of Electroretinographic Circadian Rhythm of Crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 74a, No. 3, pp. 711-714.

Goldsmith, T.H. (1972): The Natural history of Invertebrate visual pigments. In "Handbook of sensory Physiology. V. VII/1. Photochemistry of vision, ed. H. Dartnall. Springer Verlag, Berlin. pp. 685-719.

Gordon, S.A., and Brown, G.A. (1971): Observations on spectral sensitivities of the phasing of circadian temperature rhythms in *Peroignatus penicillatus*. In *Biochronometry Natl. Acad. Sci. U.S. M. Menaker* ed.

Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. and Katinas, GS. (1977): GLOSSARY OF CHRONOBIOLOGY. *Chronobiologia* 4, Suppl. 1.

Hastings, J.W. and B.M.Sweeney. *Biol. Bull.*115:440-458, (1958): LIGHT PULSE PRC IN *Gonyaulax*.

Hastings, J. W., Rusak, B. and Z. Boulos. (1991): Circadian Rhythms: The Physiology of Biological Timing; in NEURAL AND INTEGRATIVE ANIMAL PHYSIOLOGY. (C. Ladd Prosser, Editor). *Comparative Animal Physiology*, Fourth Edition, Wiley-Liss, New York.

Hawking, S. (1988): HISTORIA DEL TIEMPO. Grijalbo, México.

Inclán-Rubio, V. (1991): Shifting Phase of Electroretinogram Circadian Rhythm induced by Monochromatic Light stimulus in crayfish *Procambarus bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 99A, No 3, pp 301-306.

Joshi, D. and M.K. Chandrashekar. J. Exp. Zool. 230:325-328, (1984):
FLASHES OF 0.5 msec RESET THE CIRCADIAN CLOCK OF A BAT.

Kong, K.L. and Goldsmith. (1977): Fotosensitivity of reticular cells in
white-eyed crayfish *Procambarus clarkii*. J. Comp. Physiol. 122:273-288.

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

Novalés, R., L. Gilbert and F. Brown (1973): Endocrine Mechanism. In Prosser,
Comparative Animal Physiology. Saunders, New York, pp 856-902.

Njus, D. et al. J. Comp. Physiol. 117:335-344, (1977): Conditionality of
circadian rhythmicity.

Pittendrigh, C.S., V. Bruce, and P. Kaus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44:965-973,
(1958): Coupled oscillator interpretation of transient cycles in *Drosophila*.

Pittendrigh, C.S. (1981): In HANDBOOK OF BEHAVIORAL NEUROBIOLOGY (J. Aschoff,
ed.) Vol. 4, pp. 57-80. Plenum, New York. Circadian Systems.

Pittendrigh, C.S. (1993): Temporal Organization: Reflections of a Darwinian
Clock-Watcher. Ann. Rev. Physiol 55, 17-54.

Prosser, C. L. (1991): NEURAL AND INTEGRATIVE ANIMAL PHYSIOLOGY. Comparative
Animal Physiology, Fourth Edition, Wiley-Liss, New York.

Reinberg, A. and M. H. Smolensky. (1983): Introduction to Chronobiology; In
BIOLOGICAL RHYTHMS AND MEDICINE. (Alain Reinberg and Michael Smolensky, Eds.)
Springer-Verlag, New York.

Sagan, C. (1988): COSMOS. Planeta. México.

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

Shaw, S. and S. Stowe. (1982b): Photoreception. In "Biology of Crustacea,
V.3., ed. Bliss E. D. and L. H. Mantel Academic Press, New York. pp. 338-339.

Smith, K. (1977): THE SCIENCE OF PHOTOBIOLOGY. Plenum Publishing Corp. N.Y.

Susuki, T., Makino-Tasaka, M. and E. Eguchi. (1984): 3-Dehydro-retinal
(vitamin A2 aldehyde) in crayfish eye. Vis. Res. 24: 783.

Susuki, T., Airakawa, K. and E. Eguchi. (1985): The effects of light and
temperature on the rodopsin-porphyrin visual system of the crayfish
Procambarus clarkii. Zool. Scienc. 2:455.

Waterman, T.H. (1961): Light sensitivity and vision. In "The Physiology of
Crustacean. Vol. II. Waterman, T.H., ed. Academic Press, New York. pp 1-64.