



50361  
18  
2eje.

**UNIVERSIDAD  
NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO ONTOGENICO DE LA EXPRESIÓN  
DEL RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD  
LOCOMOTORA EN EL ACOCIL *Procambarus  
clarkii***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA ANIMAL)**

**P R E S E N T A**

**MANUEL MIRANDA ANAYA**

**DIRECTOR: DRA. MARIA LUISA FANJUL MOLES**

MÉXICO, D. F.

1994

**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.



**“EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN  
EL LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA  
COMPARADA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE  
LA UNAM”**

**Mi Agradecimiento Sincero para mi Directora de Tesis Maria Luisa Fanjul y para los Miembros del Jurado por su Valioso Tiempo Que Dedicaron a la Lectura de este Trabajo y por sus Acertadas Sugerencias que Contribuyeron a la Mejor Presentación del mismo.**

**Presidente: Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles.**

**Primer Vocal: Dr. Fructuoso Ayala Guerrero.**

**Segundo Vocal: Dr. Raúl Aguilar Roblero.**

**Tercer Vocal: Dr. Baltazar Barrera Mera.**

**Secretario: Dr. León Cintra Mcglone.**

**Suplente: Dr. Manuel Salas Alvarado.**

**Suplente: M en C. David Elias Viñas.**

*"A la memoria de mi madre"*

*"A mi padre"*

*"A Theresita"*

*"A la Universidad Nacional Autónoma de México"*

## **AGRADECIMIENTOS**

Antes de mencionar al grupo tan grande de gente que ha acaparado mi cariño y apoyo, debo un especial agradecimiento a la Dra. Maria Luisa Fanjul, a quien debo mi formación profesional y que estoy seguro que su apoyo será cada día mejor. De la misma manera debo no sólo mi agradecimiento sino todo lo mejor de mi sentir a Theresita, quien me ha brindado su vida y compartido la mía de la misma forma en cualquier situación. A todos los compañeros del lab. de Neurofisiología Comparada: Julio Prieto (Márgaro Ticher o Guffi, según la generación) quien me ha enseñado que "si lo quieres lo puedes" (aunque todo tiene sus asegunes), además por su apoyo incondicional no solo en el ambiente académico. Aquiles Bernal, quien ha sabido tantear mi paciencia pero no mermar la gran estima que le tengo. A Oscar Castañón . por ser un compañero de trabajo tolerante y con grandes ambiciones compartidas. A Carolina García por soportarme durante mis crisis existenciales (y fuera de ellas). A Elsa Escamilla Chimal por hacerle segunda a Caro. Adriana por continuar con su trabajo en el lab. A Fernando Colchero por esas tardes bohemias de guitarra y buenos propósitos. No menos importantes el "Anfoño" por su valiosa colaboración en la edición de este trabajo y el "Chais" quienes comparten causas y azares, locuras sin nobleza, sin fecha, sin cura, que no valen la pena curar. Y por supuesto a todos aquellos quienes me han brindado su apoyo incondicional.

---

**INDICE**

**INTRODUCCIÓN** . . . . . 2

**I.- GENERALIDADES SOBRE LOS  
RITMOS BIOLÓGICOS** . . . . . 2

**CARACTERÍSTICAS GENERALES  
DE LOS OSCILADORES  
CIRCADIANOS** . . . . . 4

**II.- ONTOGENIA DE LOS RITMOS  
BIOLÓGICOS** . . . . . 6

**III. RITMOS CIRCADIANOS DE  
INVERTEBRADOS DURANTE LA  
ONTOGENIA** . . . . . 7

**IV.- RITMO DE ACTIVIDAD  
LOCOMOTORA** . . . . . 9

**V.- RITMO CIRCADIANO DE  
ACTIVIDAD LOCOMOTORA  
(RALM) EN EL ACOCIL.** . . . . . 10

**VI.- RELACIÓN ENTRE EL RITMO  
ERG Y EL RALM** . . . . . 12

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA** . . . . . 14

---

---

<b>HIPOTESIS</b> . . . . .	14
<b>OBJETIVOS</b> . . . . .	15
<b>MÉTODO</b> . . . . .	16
<b>OBTENCIÓN DE LOS ORGANISMOS</b> <b>Y MANTENIMIENTO</b> . . . . .	16
<b>REGISTRO DE LA ACTIVIDAD</b> <b>LOCOMOTORA.</b> . . . . .	16
<b>ANALISIS DE DATOS</b> . . . . .	19
<b>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> . . . . .	19
<b>RESULTADOS</b> . . . . .	21
<b>I.- EXPRESION DEL RITMO</b> <b>CIRCADIANO DE ACTIVIDAD</b> <b>LOCOMOTORA</b> . . . . .	21
<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b> <b>OBTENIDOS DURANTE OO.</b> . . . . .	28
<b>RESUMEN DE LA ACTIVIDAD</b> <b>LOCOMOTORA BAJO CICLOS LO</b> <b>12:12</b> . . . . .	41
<b>DISCUSION</b> . . . . .	48

---

---

<b>EXPOSICION A CICLOS DE LUZ OSCURIDAD (LO) . . . . .</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>55</b>
<b>GLOSARIO . . . . .</b>	<b>57</b>
<b>LITERATURA . . . . .</b>	<b>59</b>

---

## RESUMEN

1 Se investigó el ritmo de actividad locomotora (RALM) en cinco grupos de acociles juveniles de 1 a 20 semanas de edad post eclosión en condiciones de OO (Oscuridad constante) y LO (Luz-Oscuridad 12:12).

2 El porcentaje de animales que mostró un ritmo circadiano manifiesto, fue menor en los grupos de animales más jóvenes, aumentando hasta un 95 % en los animales de 20 semanas de edad. Los parámetros del ritmo en los cinco grupos observados fueron  $\tau = 24.9$  hs; 23.8 hs; 23.4 hs; 24.5 hs y 23.9 hs. La relación actividad/reposo = 0.65, 0.7, 0.76, 0.75 y 1.0. En los grupos más jóvenes el RALM mostró una fase más inestable, la cual se estabilizó en animales de 20 semanas de edad.

3 Se observaron casos en los que el RALM mostraba una posible coordinación relativa interna durante la oscilación espontánea.

4 La respuesta al fotoperiodo fué variable en los diversos grupos, siendo mayor para el primer intervalo de edad (1 a 5 semanas). Durante la exposición al fotoperiodo en los organismos más jóvenes, parece existir un fenómeno de enmascaramiento. Por otra parte, el pico exógeno de actividad no fue claro en ninguno de los grupos examinados.

- 3
- 5 Debido a los fenómenos observados, se discute la presencia de diversos osciladores responsables de este ritmo.

---

# INTRODUCCIÓN

## I.- GENERALIDADES SOBRE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

En los seres vivos se presentan cambios periódicos en los fenómenos fisiológicos. Estos cambios coinciden tanto con los ciclos luz-oscuridad del medio ambiente (fotoperíodo), que tienen un período de 24 horas y que son una consecuencia de la rotación de la tierra, como con los cambios cíclicos en la longitud de la fase luminosa, que son dependientes de la traslación de la misma o con los cambios cíclicos de los movimientos lunares. Durante la evolución de los seres vivos, estas manifestaciones cíclicas, han llegado a ser una característica endógena de todos los seres vivos que les permite adaptarse a los cambios cíclicos externos.

Así todos los seres vivos presentan una conducta endógena de relación temporal con un período cercano a un evento geodinámico. Lo anterior determina que se encuentren ritmos endógenos con un período cercano a la duración del día -ritmos circadianos-, ritmos con un período menor a las 19 horas -ritmos ultradianos- o bien ritmos con un período mayor a las 29 horas -ritmos infradianos-. Esta clasificación se hizo basándose en la frecuencia de eventos cíclicos, la cual como es sabido, representa la inversa del período (Halberg 1960).

Desde hace muchos años los estudiosos de este tipo de eventos cíclicos se preguntaban si estos fenómenos internos se podrían presentar únicamente cuando los organismos estaban bajo el efecto de cambios cíclicos ambientales. Esta pregunta fue contestada en el siglo XVIII mediante las observaciones hechas por el astrónomo Jacques de Malran en 1729 al observar el movimiento de las hojas de la planta *Mimosa pudica*. Este científico observó que aún bajo condiciones constantes de oscuridad, ocurrían dichos cambios pero con un período independiente y ligeramente diferente al que se presentaba en un ambiente cíclico diario. Sin embargo el estudio formal sobre los cambios periódicos bajo condiciones ambientales constantes no fue retomado sino a principios de nuestro siglo por Augusto Forel, el cual observó y señaló que los organismos presentaban una memoria temporal, es decir, la existencia de una naturaleza endógena

---

---

de los fenómenos periódicos de los seres vivos. Más tarde, de manera independiente, investigadores como Bünning (1935, 1963), Halberg (1959, 1960, 1967), Aschoff (1954, 1969, 1974) y Pittendrigh (1960, 1961), a través de una gran cantidad de experimentos, demostraron la capacidad de los organismos de medir el tiempo (Reinberg, 1974 y Smolensky, 1972).

De esta manera surgió la idea de la existencia de un "reloj biológico endógeno" en todos los seres vivos e inclusive en las bacterias, capaz de ser sincronizado por ciclos ambientales externos. Es decir, un organismo expuesto a condiciones ambientales periódicas presenta cambios fisiológicos y conductuales con un periodo correspondiente al que le impone el ambiente en que se encuentra; sin embargo si estas variaciones externas se suspenden manteniéndose constantes, los organismos seguirán presentando variaciones cíclicas con periodos semejantes, mas no iguales a las que les impone normalmente el ambiente. A esta capacidad de oscilar de manera espontánea se le denomina en inglés "free running", que en adelante será mencionado en este trabajo como oscilación espontánea.

La manera en que ha sido descrito el funcionamiento del "reloj biológico", difiere entre los investigadores que se han dedicado al estudio de estos fenómenos. Algunos como Aschoff (1981) y Pittendrigh (1981), señalan la existencia de sistemas marcapasos jerárquicos o centrales responsables de la coordinación temporal de las diferentes salidas oscilatorias, en tanto que para otros autores como Halberg y Reinberg (1967), el reloj es un resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios acoplados mediante estructuras que solamente se limitan al ajuste de fase entre los diversos osciladores.

Al parecer los factores físicos externos más importantes capaces de sincronizar al "reloj biológico" son la luz y la temperatura. Lo anterior se hace evidente cuando a un organismo que presenta un ritmo circadiano, bajo condiciones ambientales constantes, se le expone a un régimen de luz-oscuridad cíclico de 24 horas (L12:D12) o a un termoperiodo cíclico (T1 12hs:T2 12hs), este individuo tenderá a manifestar un ajuste al ciclo impuesto.

---

---

Las variaciones cíclicas de factores ambientales capaces de influenciar la expresión de los ritmos circadianos, reciben el nombre de "Zeitgeber" (señal de tiempo), término acuñado por Aschoff en 1954, que en este trabajo será en adelante mencionado como sincronizador.

Mientras el ciclo luz-oscuridad y el ciclo de temperatura son las señales de tiempo más importantes en muchas especies de vertebrados e invertebrados, otras señales han mostrado jugar el mismo papel. Por ejemplo, el sonido, señales sociales y ciclos alimentarios, han mostrado ser capaces de sincronizar ritmos circadianos en diferentes especies de vertebrados (Moore-Ede, 1981).

#### **CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS OSCILADORES CIRCADIANOS**

Las principales características de un oscilador de naturaleza endógena deben ser, por una parte la capacidad de presentar oscilación espontánea. Es decir, que aún después de haber interrumpido las variaciones ambientales a las que estuvo sujeto, la manifestación del oscilador permanezca con un periodo cercano pero independiente al del sincronizador. Esta característica debe perdurar durante muchos ciclos. En segundo lugar debe ser sincronizable a un periodo externo impuesto, ya sea a través de luz y/o temperatura, por ser estos los factores físicos con más importancia en el proceso de sincronización.

Un ritmo en oscilación espontánea, ante la aplicación de un sincronizador cíclico fuerte, puede mostrar un período que se acople lentamente al del sincronizador. El acoplamiento puede o no ser inmediato, dependiendo de la fase en que sea aplicado el sincronizador. Si la fase entre el ritmo en oscilación espontánea no coincide con la fase del sincronizador, se observará una tendencia al acoplamiento a lo largo de varios ciclos transitorios (Enright, 1981). Esto permitirá al ritmo acoplarse completamente al sincronizador. El hecho de que la sincronización no se obtenga con un ciclo ambiental dado (sincronizador débil), no significa que dicho ciclo en particular, no sea un agente sincronizador potencial, pues para ello requiere ser explorado en una amplia variación en intensidad y en el régimen en que es presentado. Sin embargo un sincronizador puede sincronizar un ritmo sólo si su período es muy cercano al del ritmo en oscilación

---

---

espontánea (pero no idéntico). Mientras que un sincronizador fuerte, puede ser débil, si la frecuencia en la oscilación está suficientemente reducida, es decir, fuera del rango de sincronización. Por lo anterior, un ritmo se puede manifestar con su periodo semejante al que presentaba en oscilación espontánea cuando es sujeto a un sincronizador débil. La frecuencia, sin embargo, está modulada por las señales del sincronizador a través del cual cruza dicha oscilación. Este fenómeno es conocido como Coordinación Relativa (Van Holst, 1939; Aschoff, 1981).

Para asegurar que el estímulo cíclico aplicado presenta un efecto sincronizador, es indispensable que al interrumpirse el estímulo, la oscilación espontánea continúe a partir de la última fase del ciclo sincronizador, lo que garantiza una completa sincronización.

La manifestación del oscilador durante la oscilación espontánea puede mostrar compensación a la temperatura. Es decir, el periodo de oscilación no variará aún bajo condiciones extremas de temperatura dentro de los límites de tolerancia del organismo. Lo que se verá expresado en un  $Q_{10}$  aproximadamente  $\approx 1$ . Por último debe presentar cambios de fase durante la oscilación espontánea, al someterse a perturbaciones discretas de estímulos externos como lo son la luz, la temperatura, la presión etc. Los cambios de fase representan la sensibilidad diferencial del sistema a través de un ciclo circadiano: (El ciclo circadiano lo podemos definir como tiempo circadiano (TC) en el cual  $TC = \tau/T$ , donde  $\tau$  = periodo del ciclo interno y  $T$  = periodo del sincronizador), cambios de fase que serán de diferente magnitud de acuerdo con la sensibilidad del sistema circadiano. Esta sensibilidad es diferente a lo largo de un ciclo circadiano, presentándose fases del ciclo totalmente insensibles a la perturbación. A la mitad del ciclo desde un  $TC = 0$  a un  $TC \approx 12$  se le conoce como día subjetivo en el programa de oscilación; y al  $TC = 12$  al  $TC = 0$  es conocido como noche subjetiva (Pittendrigh, 1981a). En general la mayor sensibilidad del sistema circadiano se suele encontrar en la noche subjetiva del animal.

Esta sensibilidad diferencial a través del ciclo circadiano, permite construir lo que se conoce como la Curva de Respuesta de Fase, que es la representación gráfica de los cambios de fase que presenta la oscilación espontánea cuando se ha dado un pulso de un factor sincronizador en diferentes horas del tiempo circadiano, ya sea durante el

---

---

día subjetivo o durante la noche subjetiva del organismo en cuestión. (Enright, 1981). Es decir, es una descripción del curso temporal de la sensibilidad del marcapaso a los sincronizadores (Pittendrigh, 1981 a).

## II.- ONTOGENIA DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Se entiende por ontogenia como la historia del ciclo de vida de un individuo desde la fertilización del óvulo hasta la muerte. Esto comprende la edificación anatómo-fisiológica a partir de la fertilización del óvulo. La maduración funcional de sus sistemas conductuales, homeostáticos y reproductores además del decaimiento de estos sistemas a lo largo de la edad hasta la muerte. En un organismo que muestre ritmicidad circadiana, la ontogenia de una función rítmica particular es muy probable que incluya la aparición de estos procesos cíclicos así como los cambios en su control (Davis, 1981).

La ontogenia de los ritmos circadianos debe, sin embargo, ir más allá de catalogar los diferentes ritmos que posee un organismo y sus cambios ontogénicos. Los diferentes sistemas circadianos no son independientes los unos de los otros. Así sean controlados por un solo marcapaso circadiano o por varios. Los ritmos evidentes se encuentran organizados temporalmente uno con respecto a los otros y al medio externo.

Cuando animales adultos son mantenidos en un ambiente con un sincronizador fuerte, como un ciclo luz-oscuridad de 24 horas, cada ritmo circadiano en el organismo asume una relación estable con el sincronizador. Una consecuencia obvia es que varios ritmos circadianos asumen una relación de fase estable con los demás (Moore-Ede 1981). Los marcapasos, las vías al ritmo manifiesto y los mecanismos de sincronización son todos parte del "sistema circadiano" que sustenta no solamente la organización temporal interna de numerosas funciones sino también, la capacidad del organismo para medir de una forma precisa y adaptativa el paso del tiempo astronómico.

Por lo anterior la ontogenia del sistema circadiano debe incluir los mecanismos por medio de los cuales el sistema emerge y se organiza. Los procesos que guían esta emergencia así como las causas y efectos de la pérdida de organización durante el envejecimiento (Davis, 1981). En el estudio del desarrollo de los ritmos circadianos se

---

---

deben tomar en cuenta características importantes como son el periodo, la amplitud, la estabilidad de la fase y la capacidad de sincronización. Durante el desarrollo, las diferentes funciones se llegan a organizar en el tiempo. Los acontecimientos descriptivos de cómo ocurre esto (gradual o abruptamente, en la misma o diferente forma para cada ritmo; mediante cambios en una o en todas las formas del ritmo, cambios de fase, amplitud etc.) constituyen los elementos viables para el estudio de la emergencia de los ritmos circadianos.

Parece ser evidente que la ritmicidad circadiana de los vertebrados es un fenómeno postnatal (Davis, 1980). En muchos ritmos estudiados, se observa falta de la ritmicidad en una edad postnatal temprana para posteriormente presentarse con un carácter circadiano. La ausencia de los ritmos prenatales y postnatales tempranos puede ser debido en parte a la falta de intentos por descubrirlos. El desarrollo del embrión y del feto están sujetos incuestionablemente a un ambiente rítmico intrauterino, no solo debido a los ritmos normales de la madre adulta como la actividad motriz y la temperatura, sino además por una serie de factores hormonales placentarios que se liberan rítmicamente (Selinger y Levitz, 1969).

Aunque la mayoría de los estudios en la ontogenia de los ritmos circadianos han sido realizados en vertebrados (Davis, 1981). Se han llevado a cabo algunos experimentos en modelos de invertebrados tanto en crustáceos como en insectos (Fanjul-Moles, 1987, Fanjul-Moles y col. 1992., Fuentes pardo y col, 1992, Page 1990).

### III. RITMOS CIRCADIANOS DE INVERTEBRADOS DURANTE LA ONTOGENIA

Page (1990), en investigaciones realizadas sobre el ritmo de actividad locomotora en ninfas de la cucaracha *Leucophaea maderae*, encontró que las propiedades del sistema circadiano parecen estar moduladas por el ambiente fótico al cual están expuestos durante su desarrollo post-embriionario. Según este autor, lo anterior parece demostrar que las investigaciones sobre el desarrollo post-embriionario de la organización circadiana, pueden ser útiles para entender la ontogenia en los sistemas neurales involucrados en los relojes biológicos.

---

---

En los estudios sobre la ontogenia de la actividad locomotora en ninfas de *Leucophaea*, se ha demostrado que una cierta cantidad de organismos en estadios larvales exhiben un ritmo de actividad locomotora similar al adulto, al ser registrados durante varios días bajo condiciones constantes de oscuridad y temperatura (Page y Block, 1980). Sin embargo una gran cantidad de estos organismos muestran arritmia, reflejando la posibilidad de la ausencia de un sistema marcapaso funcional o bien simplemente que la salida del marcapaso hacia el ritmo manifiesto esta desacoplada. Además, es frecuente encontrar periodos de inactividad intercalados con periodos de actividad, que al reanudarse muestran la fase esperada desde el momento en que se interrumpió el ritmo (Page, 1990 a; Page y Block, 1980).

Al someterlos a experimentos con fotoperiodo 12:12, estos organismos mostraron sincronización. Esto indica que el marcapaso de la cucaracha puede ser sincronizado por luz desde etapas postembrionarias tempranas. Sin embargo, el ritmo motor de este animal no parece estar influido por la sincronización materna ni por la temperatura.

El estudio de ritmos controlados por el sistema circadiano, como son los ritmos de actividad locomotora, ha permitido seguir un desarrollo a través de toda la ontogenia de algunos invertebrados (Page y Block, 1980; Yagi y Loher, 1986) así como de algunos vertebrados (Davis, 1981). Por lo que se han podido hacer manifiestas las modificaciones del sistema circadiano hasta mostrar las características de la organización anatómica y fisiológica del sistema marcapaso en adultos. Lo anterior proporciona un fundamento en el que se puede basar la exploración de la fisiología del desarrollo (Page, 1990).

Las características de la organización temporal de diferentes ritmos locomotores, han sido observadas en insectos hemimetabolos. Algunos ejemplos son el grillo *Tellegrillus commodus* (Yagi y Loher, 1986; Wiedenmann, 1988), el grillo *Grillus bimaculatus* (Tomiooka y Chiba, 1988) y *Acheta domestica* (Nowosielski y Patton, 1963; Woodring y Clifford, 1986). Estos estudios se han enfocado a conocer si los estadios larvales de estos insectos exhiben un ritmo circadiano de actividad que puede ser sincronizado por luz, y si poseen un sistema marcapaso diferenciado. A pesar de que el ritmo en los que lo presentan, no sea tan robusto como el expresado por los adultos y

---

---

sus características de fase y periodo sean diferentes. Una posible explicación a los resultados obtenidos por los autores mencionados, es que el sistema marcapaso está presente en todos los individuos. Pero la expresión del ritmo varía entre los organismos en tiempos distintos como consecuencia de un acoplamiento variable en el sistema marcapaso y la actividad locomotora. Esto podría indicar un posible acoplamiento humoral o neurohumoral que requiera de tiempos postembrionarios para la maduración, (Page, 1990).

Fanjul-Moles y col. (1987), mediante estudios en la ontogenia del ritmo electroretinográfico (ERG) de diversas especies de acocil (*Procambarus clarkii*, *P. digueti* y *Cambarellus montezumae*), demostraron que en los primeros estadios (0 a 8 días posteclosión) se podía observar un ritmo de amplitud de ERG de frecuencia ultradiana con periodos que oscilan entre 15 minutos a 4 horas. En tanto que en animales mayores se observaba un incremento progresivo en el periodo de los ciclos, hasta mostrar alrededor de los 30 días posteclosión un ritmo con características circadianas, aunque muy diferente aún al mostrado por organismos adultos (Las principales diferencias se notaban en la fase, el periodo, la amplitud y la relación noche-día). Los resultados de estos autores sugieren que la emergencia del ritmo ERG resulta del acoplamiento de osciladores de alta frecuencia (ultradianos), particularmente aquellos con periodos de 4 horas. Este acoplamiento podría depender de la acción de neurosecreciones liberadas por el complejo Órgano X-Glándula sinusal que a su vez se encuentra controlado por estructuras centrales, estructuras que requieren un cierto tiempo de maduración postnatal para manifestar su funcionalidad.

#### IV.- RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA

Debido a la facilidad relativa de su detección, una gran cantidad de estudios conductuales se han llevado a cabo en registros de actividad locomotora (Brady, 1974) generalmente durante la caminata, la carrera, la natación o el vuelo. La importancia que presenta este tipo de conducta en la cronobiología, es que en la organización temporal puede ser estudiada en un solo individuo, sin la complejidad de interacciones que conlleva

---

---

un ritmo poblacional, como sucede por ejemplo en los ritmos de emergencia de pupas en algunos insectos. Por otra parte, los registros individuales reflejan cambios circadianos fundamentales que tienen lugar en el sistema nervioso central (SNC), (Brady, 1981).

Se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre actividad locomotora en diversos Phyla de invertebrados. Esta conducta implica que además de su origen neural, los distintos animales efectúan esta actividad locomotora rítmicamente con diferentes propósitos adaptativos. En la naturaleza, esta respuesta está determinada como una manifestación directa a la estimulación externa, como es la disminución o el aumento en la intensidad de la luz (Buck, 1937; Tychsen y Fletcher, 1971), el cambio de la temperatura ambiental (Hawking, Gammage y Worms, 1965), los olores y los movimientos visuales entre otros (Brady, 1972b).

Por otra parte, en estudios de laboratorio, bajo condiciones de estímulos a una intensidad constante (p. ej. iluminación u oscuridad etc.), cualquier actividad locomotora debe ocurrir bien, como un resultado interno de cambios "motivacionales" en los umbrales para estos estímulos en particular, como consecuencia de la expresión del ritmo endógeno, o como el resultado de la excitación nerviosa o la desinhibición que libera la mencionada actividad espontánea (Brady, 1981).

#### **V.- RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA (RALM) EN EL ACOCIL.**

El ritmo de actividad locomotora en el acocil adulto, obtenido en condiciones de LO, muestra una forma bimodal, donde una corta cantidad de movimiento se expresa en el momento del encendido de la luz (pico de encendido) y generalmente un período más largo de actividad que sucede un poco después del apagado de la luz (Page y Larimer, 1975), esto representa la actividad rítmica de los diferentes apéndices ambulatorios del animal. El pico de actividad correspondiente al apagado, parece que es de carácter endógeno y exhibe las propiedades y características de los ritmos circadianos, mientras que el pico de encendido es provocado por el inicio del fotoperíodo, su carácter es exógeno y la activación del mismo parece llevarse a cabo por vía retinal (Page y Larimer, 1972; Chapple, 1960).

---

---

Existen reportes donde se demuestra que la ablación de los pedúnculos oculares inhibe el RALM en la oscilación espontánea en diversos crustáceos (Hans y Kalmus, 1938). Se ha propuesto que el sistema neuroendócrino del pedúnculo ocular (Órgano X-Glándula sinusal), normalmente controla el RALM. Sin embargo se sugiere que el oscilador que controla dicho ritmo no se encuentra necesariamente en el pedúnculo ocular, o bien, que un oscilador secundario puede asumir el control una vez que el oscilador primario ha sido removido (Page y Larimer, 1975): ya que algunos cangrejos del género *Gecarcinus* continúan presentando ritmo aún después de la ablación (Bliss, 1962). Por otra parte se ha reportado que la sección de los conectivos circumesofágicos de animales con un ritmo normal, provoca la arritmia, sugiriendo que el control locomotor está mediado por vías neurales y no hormonales (Page y Larimer, 1975).

Page y Larimer (1975), al registrar en el acocil la actividad motora de cada pereopodo (apéndice locomotor), encontraron que al cortar el nervio ventral a nivel del tercer y cuarto ganglio torácico, no se afecta el movimiento normal de los primeros tres pereopodos, en tanto que el cuarto apéndice llega a ser completamente arritmico. Lo anterior parece reforzar el carácter regulador del SNC sobre el ritmo locomotor más que una influencia exclusivamente humoral. Se ha considerado una posible influencia de los pedúnculos oculares en el ritmo de actividad locomotora, pues algunos autores han propuesto la presencia de una hormona concentrada en estos pedúnculos que inhibe la locomoción (Roberts, 1941, 1944; Naylor y Williams, 1968), lo que sugiere que la concentración rítmica de esta hormona (aún desconocida) podría ser el factor que controla en parte la génesis del ritmo de actividad locomotora.

Sin embargo, aún después de lesionar los conectivos circumesofágicos, la ablación peduncular aumenta la cantidad de locomoción arritmica. Se sugiere que algún factor humoral producido en el pedúnculo podría inhibir tónicamente la actividad de las patas ambulatorias. Page y Larimer (1975), sugieren que esta hormona probablemente no controlaría directamente el ritmo, sino que la liberación rítmica de la hormona se encontraría a su vez controlada por el conectivo circumesofágico, pero podría sin embargo, estar mediada por fotorreceptores extrarretinianos independientes del sexto ganglio; puesto que la transección del conectivo entre el quinto y sexto ganglio no altera las características del ritmo según estos autores. Se ha demostrado que el acocil sin tallo

---

---

ocular, con el conectivo circumesofágico intacto, muestra un ritmo circadiano de actividad que persiste en condiciones de oscuridad y pueda ser sincronizado por ciclos de luz. Aunque este tipo de sincronización no presenta características normales, puesto que el ángulo de fase entre el sincronizador y el ritmo se ve alterado. Para determinar una posible sincronización de la luz vía fotorreceptores caudales extrarretinianos, estos autores cortaron el conectivo entre el quinto y sexto ganglio abdominal demostrando que al menos en ciertas condiciones los animales sin pedúnculos oculares pueden sincronizarse al ciclo luminoso. Esta respuesta no está mediada por el fotorreceptor caudal del sexto ganglio.

Recientemente Sandeman y col. (1990) demostraron la presencia de fotorreceptores extrarretinianos en el margen exterior del ganglio cerebroide del acocil *Cherax destructor*, lo que apoya la suposición de Page y Larimer (1975) que el centro responsable de la sincronización del ritmo se encuentra en el cerebro de este animal. Los axones de estas células terminan en el puente protocerebral proyectando caudalmente a neuropilos en el proto y deutero cerebro, en donde pudieran hacer sinápsis con fibras descendentes a los centros locomotores correspondientes.

Lo anterior sugiere que el sistema marcapaso que controla el ritmo de actividad locomotora se encuentra en el ganglio supraesofágico y conduce la señal del ritmo vía conectivos circumesofágicos hacia los centros locomotores torácicos.

## VI.- RELACIÓN ENTRE EL RITMO ERG Y EL RALM

### (ACOPLAMIENTO DE OSCILADORES)

La posible relación del control circadiano de la amplitud del ERG y el ritmo de actividad locomotora (RALM) en condiciones restringidas, fue estudiado por Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981). Se observó un RALM bimodal en condiciones de oscuridad constante, solo interrumpido por un destello de prueba a cada 3 minutos al mismo tiempo que obtenían el ritmo ERG. Estas investigadoras observaron una relación de fase de 4 horas en organismos sin lesiones en el ganglio supraesofágico y con pérdida del ángulo de fase de los dos ritmos estudiados en organismos sin ganglio

---

supraesofágico. Lo anterior sugiere la presencia de dos osciladores diferentes pero estrechamente acoplados que perderían la capacidad de estar sincronizados por la ausencia de mecanismos ganglionares.

Diferentes observaciones en una variedad de ritmos circadianos que presentan los crustáceos, sugieren la existencia de más de un marcapaso circadiano en el sistema nervioso de estos animales. Es posible pensar en el acoplamiento entre marcapasos circadianos independientes. Se ha propuesto que la salida del o de los marcapasos hacia las estructuras responsables de los diferentes ritmos manifiestos, por ejemplo el ritmo de sensibilidad visual (ERG) movimiento de cromatóforos, RALM; podría ser de naturaleza neuroendócrina (Aréchiga y col. 1992).

---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los resultados de los diferentes investigadores que han estudiado el ritmo motor en el animal adulto son contradictorios. Page y Larimer (1975) consideran que el oscilador circadiano responsable del ritmo de actividad locomotora se debe ubicar en el gánglio cerebroide, acoplándose en los centros locomotores torácicos vía axones de conectivos circumesofágicos. Según estos autores, los tallos oculares de estos animales no se requieren para la ritmicidad locomotora, sino que solo serían estructuras que participarían en la sincronización. Sin embargo, Fuentes Pardo e Incián Rubio en 1981, reportaron ritmos circadianos de actividad locomotora en *P. digueti* al cual se le había llevado a cabo la sección del gánglio cerebroide, proponiendo estas estructuras como no necesarias para la génesis del ritmo y adjudican únicamente un papel acoplador de 2 grupos de osciladores extraganglionares, uno responsable del ritmo de actividad locomotora y otro del ritmo de amplitud electroretinográfica. Estos autores proponen que el acoplamiento sería quizá a través de señales neurohormonales.

## HIPOTESIS

Las discrepancias entre los dos grupos de autores, tanto en el tipo de los resultados obtenidos así como en su interpretación, nos hicieron pensar que el estudio de la ontogenia del RALM del acocli podría dar elementos para el esclarecimiento de este problema. El estudio de la organización de un sistema a través del desarrollo puede dar tanta información o más, que el estudio de la desorganización del mismo sistema en un organismo adulto, pues tiene la ventaja de que no se van a alterar mecanismos fisiológicos normales.

Por otra parte, estudios previos en la ontogenia del ritmo ERG (Fanjul-Moles *et. al.*, 1987; Fuentes-Pardo *et. al.*, 1992.) dan una idea acerca del desarrollo temporal de este ritmo, así como de sus mecanismos de sincronización. El presente trabajo puede aportar elementos para estudiar el curso temporal de los mismos mecanismos en el RALM y a través de correlaciones posteriores, tratar de establecer los fundamentos de la génesis y la sincronización del mismo.

---

## OBJETIVOS

- 1) Caracterizar el curso temporal del desarrollo del RALM obtenido en registro "no restringido", bajo condiciones de oscilación espontánea en diferentes estadios postembrionarios del acocil *Procambarus clarkii*.
  - 2) Dilucidar el curso temporal de los mecanismos de sincronización del RALM durante el desarrollo, mediante experimentos de sincronización a fotoperiodo 12:12.
-

---

## MÉTODO

### OBTENCIÓN DE LOS ORGANISMOS Y MANTENIMIENTO

Todos los experimentos fueron realizados con acociles juveniles nacidos en el laboratorio de Neurofisiología de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. Los organismos adultos fueron colectados en el campo y mantenidos en acuarios de plástico con capacidad de 50 l cada uno. Se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas para permitir la reproducción de los acociles (fotoperíodo 12:12 L/O y  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Los acuarios presentaban filtros biológicos de piso para mantener la limpieza del agua y la oxigenación adecuada. Cada acuario tenía una serie de guaridas de plástico PBC, además de estar bajo un régimen cíclico de luz-oscuridad de 12:12 horas, proporcionados por lámparas de luz de neón (General Electric, mod f48-12) para acuario con una intensidad de 500 lux. Los acociles fueron alimentados dos veces por semana con una dieta basada principalmente en verduras y pescado. En cada acuario se colocaron dos acociles hembras y uno macho.

En el momento de aparecer una hembra ovígera, ésta era aislada en un acuario individual bajo las condiciones antes señaladas. Se observó cuidadosamente la fecha en que los acociles eclosionaban y a partir de la primera manifestación de eclosión, se consideró el tiempo cero de edad para los organismos juveniles. Los acociles recién eclosionados se mantienen de manera natural protegidos bajo el pieón (abdomen) de la madre, hasta que manifiestan una independencia locomotora que sucede entre la primera y segunda semana posteclosión. Los animales para experimentación procedentes de distintas hembras se dividieron en edades de acuerdo con la fecha de eclosión.

### REGISTRO DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

Los organismos juveniles se colocaron de forma individual en acuarios de registro (Figura 1a). Cada acuario estaba hecho de material acrílico negro, medía 25 X 10 X 15 cm. y en la región basal de la pared lateral izquierda estaba provisto con sensores infrarojos colocados a una distancia de 5 cm. cada uno. En la región basal de

---

---

la pared lateral derecha, una serie de fotodiodos con un pico de emisión de 900 nm emitían un haz de rayos infrarrojos hacia los sensores respectivos. El libre movimiento ambulatorio del animal a lo largo de la base del acuario interrumpía el haz de luz, lo que determinaba que el sensor enviara una señal a una serie de circuitos analógicos que emiten una señal de voltaje. Esta última era capturada por una PC, provista con una base de adquisición de datos que acumulaba la señal desde bloques de 10 minutos hasta 1 hora.

En el fondo del acuario había una estructura semicilíndrica de plástico negro que servía de resguardo a los organismos en registro durante la iluminación. Esta estructura estaba colocada fuera del campo de los sensores por lo que no interfería con el registro. En el extremo opuesto del fondo del acuario, se colocó una cantidad de alimento fijado en el fondo mediante un dispositivo que permitía al animal alimentarse "*ad libitum*". El acocil se mantenía libre en movimiento bajo estas condiciones.

Cada acuario, además, estaba provisto de una manguera de látex que proporcionaba aereación constante al agua las 24 horas del día, mediante bombas para acuario (Optima air pump). El fotoperíodo fue proporcionado por lámparas de luz fría Philips PL\*9 de 9 watts colocadas a 30 cm de altura. La intensidad luminosa fue determinada mediante un fotómetro LI-Cor (modelo LI-189) a una intensidad de 500 lux. Una lámpara proporcionaba luz para cada dos acuarios y se encontraba a una distancia de 30 cm de la base de cada dispositivo. Se registraron simultáneamente 8 acuarios en un estante aislado con láminas de unicel y cubierto exteriormente por láminas de papel aluminio. El estante presentaba una serie de cubículos, cada uno para un par de acuarios (Fig 1b). El fotoperíodo fue controlado con un reloj interruptor programable (Micronta modelo E10694) con encendido a las 7.00 am y apagado a las 19.00 pm. El estante se mantuvo en una habitación en oscuridad constante, con temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C).

---

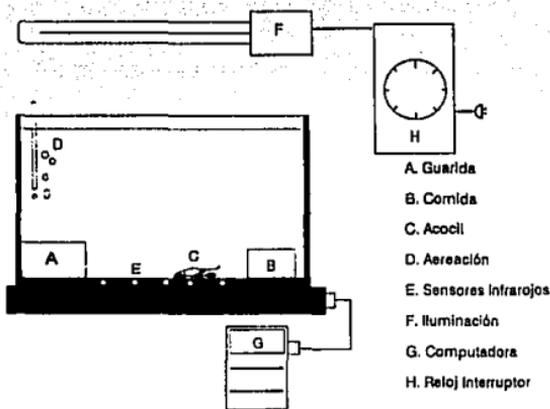


Fig. 1A. Dispositivo individual para el registro del RALM de acocles juveniles. En la parte superior se muestra el sistema de iluminación. En la parte central se presenta el acuario de registro y los dispositivos que contiene. En la parte inferior se representa una microcomputadora usada para capturar la actividad registrada en lapsos de 10 min.

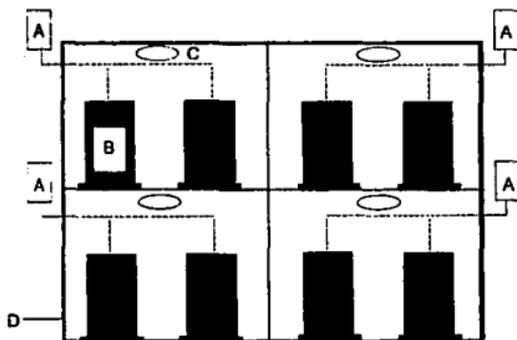


Fig. 1b. Sistema general de agrupación de acuarios de registro mostrados en la figura anterior. El estante de aislamiento estaba forrado de unicel y papel aluminio con el fin de reducir los cambios de temperatura ambiental.

---

## ANÁLISIS DE DATOS

El programa utilizado en el análisis de los datos obtenidos fue TAU (Mini-Mitter Co., Inc.), el cual elabora actogramas de doble gráfica y analiza los datos mediante el periodograma de  $X^2$  (Sokolov, 1978) en el que se consideraron solo los periodos comprendidos entre 10 a 30 horas con el fin de tener una mayor resolución de los posibles ritmos circadianos. Para el análisis de actividad circadiana se consideraron los resultados que mostraron valores picos significativos al 0.05% entre las 20 y 30 horas. Además se utilizó la curva promedio proporcionada por el mismo programa para el cálculo manual de la relación alfa-rho, así como para indicar el inicio de actividad como fase de referencia. Esta curva es elaborada por la media estadística de los datos ordenados con base en el periodo calculado por el periodograma.

El análisis por periodograma es un procedimiento lineal (aditivo) y fue diseñado para señalar situaciones en las cuales la fase es estable y por lo tanto predecible. En el periodograma una medición dada en las series de datos es añadida a los valores subsecuentes seleccionados (p. ej. promedios por hora) (Enright, 1990). El hecho de que los ritmos circadianos sean fenómenos en donde la fase es estable en la mayoría de los casos, nos hace apegarnos a la idea de que el análisis por periodograma ha sido el método mejor considerado en la interpretación de los resultados de este trabajo.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Una vez que los acociles eran depositados en el acuario de registro, cada lote se mantuvo bajo oscuridad constante por lo menos durante 10 días hasta 20 días de registro. Esto con la finalidad de observar de que manera era expresado el ritmo de actividad locomotora en oscuridad constante. Posteriormente se pasó a una condición de ciclos luz-oscuridad de por lo menos 10 días de registro. Los acociles fueron divididos en diferentes intervalos de edad ( $n$  total = 75 org), cada grupo se conformó con un total de 15 organismos; el grupo I, incluyó a organismos de 1 a 5 semanas de edad ( $n = 15$ ), el grupo II de 5 a 8 semanas de edad ( $n = 15$ ), el grupo III de 8 a 12 semanas de edad

---

---

(n = 15), el grupo IV de 12 a 16 semanas (n = 15) y el último grupo de 16 a 20 semanas (n = 15). Una vez que los acociles cubrían el tiempo de experimentación, eran depositados en un acuario con filtro biológico bajo fotoperíodo 12:12 L/D.

---

---

## RESULTADOS

### I.- EXPRESION DEL RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA

#### "OSCILACION ESPONTANEA"

##### GRUPO I.

La actividad que presentan los organismos más pequeños incluidos en un periodo de 1 a 5 semanas posteclosión ( $n = 15$ ) mostró en su mayoría una oscilación de alta frecuencia, al parecer ritmos ultradianos de gran variabilidad. Esta actividad no fue analizada. El 26% de estos registros ( $n = 4$ ) presentaron una actividad circadiana con un periodo promedio de  $24.92 \pm 1.83$  horas. La Figura 2 muestra el ritmo de actividad locomotora de un organismo típico para esta edad representante del 26 %, en condición de oscuridad constante a lo largo de 23 días de registro. La gráfica esta presentada en forma de un actograma doble en donde la actividad del primero y segundo día representan el segundo renglón de la gráfica. El tercer renglón representa el segundo y tercer día de registro y así sucesivamente hasta el final de la gráfica (Moore-Ede, 1982).

Se puede observar que la actividad locomotora esta representada en barras de acuerdo a su magnitud durante cada hora del día. En este registro en particular, parece observarse un corrimiento de fase durante la oscilación espontánea como es propio de un ritmo circadiano ( $\tau = 24.1$ ). Sin embargo la frecuencia de oscilación parece cambiar entre los primeros seis y los subsecuentes días de registro (aparentemente un fenómeno de coordinación relativa interna, que suele presentarse en otros registros no mostrados en este trabajo). Es notable en los registros de animales de esta edad, la presencia de varios días con una expresión de actividad rítmica, alternada con pérdida aparente de actividad. Esta característica no esta presente en todos los registros pero si en todas las edades consideradas. Algunos casos muestran al inicio, actividad locomotora evidente, para que al tercer o cuarto día de registro disminuya o inclusive desaparezca por algunos días. En el extremo superior derecho se muestra el periodograma de  $X^2$  para periodos entre 10 y 30 horas. Se observa claramente de que manera son aparentes al menos dos

---

---

picos estadísticamente significativos, el más agudo corresponde al de 24.1 hrs. y el segundo alrededor de las 22 hrs. (la línea recta que cruza los picos más altos representa el nivel de significancia al 0.05%). Este análisis refuerza la interpretación de datos crudos en relación con una posible coordinación relativa interna.

El recuadro mostrado en la parte inferior derecha de la figura, presenta la curva promedio obtenida de los 23 días de registro y computada por TAU a partir del actograma, la línea central de esta curva, representa la media estadística de los datos. En esta figura se muestra además al periodo correspondiente al día y a la noche subjetiva (DS, NS) para este registro.

Por otra parte, durante la oscilación espontánea, el 74% de los registros de este lote mostraron diversas formas de actividad que podría ser difícil caracterizar como una conducta circadiana, ya que se presenta desde una gran actividad sin carácter cíclico aparente, una manifestación muy discreta de actividad circadiana, hasta la pérdida de actividad sin organización circadiana aparente y a través del análisis estadístico una significancia 0.05, lo cual denota la falta de un ritmo evidente.

## GRUPO II

El segundo Grupo está formado por acociles de 5 a 8 semanas de edad ( $n = 15$ ). Se observó un incremento en la cantidad de registros (40%  $n = 6$ ) que mostraron cierta actividad locomotora circadiana significativa durante la fase de oscilación espontánea. Estos registros mostraron un periodo circadiano de  $23.8 \pm 0.8$  horas. La media fue computada por el análisis de valores obtenidos de periodograma de  $X^2$ . La actividad aparentemente ultradiana se sigue manifestando en estos registros aunque es evidente la tendencia de manifestar actividad circadiana superpuesta.

La Figura 3, muestra un actograma de doble gráfica de un acocil típico para esta edad. En la gráfica se observa una actividad locomotora circadiana evidente con un periodo de 22.8 horas. El periodograma de  $X^2$  correspondiente es mostrado en la gráfica superior derecha. La actividad locomotora está graficada en forma de barras que representan la magnitud de dicha actividad durante cada hora del día. El periodograma

---

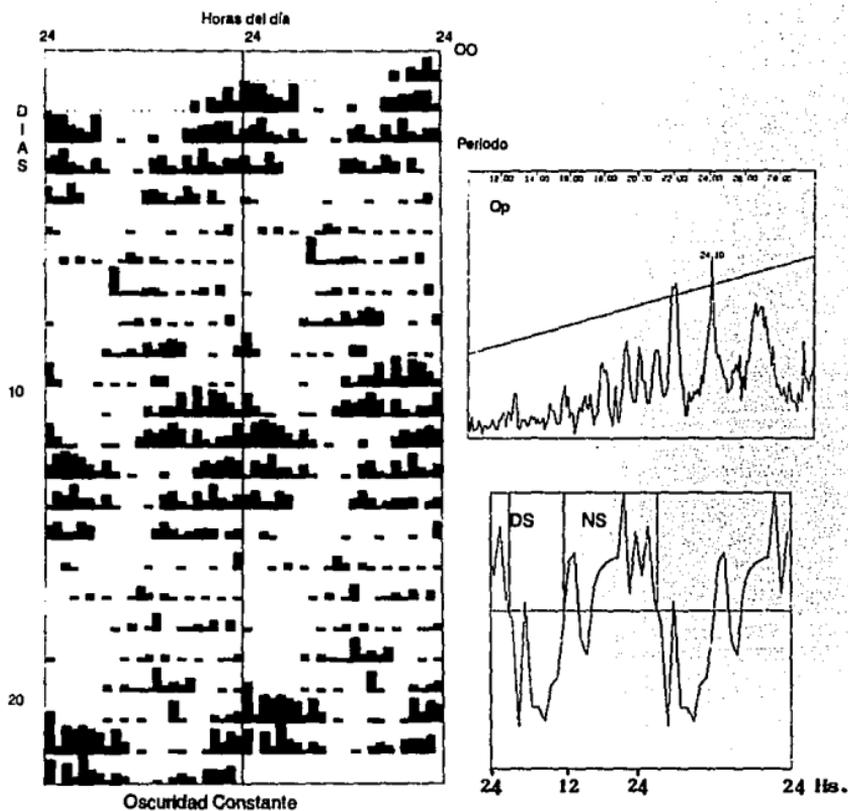


Fig. 2. Ritmo de actividad locomotora de un acocil correspondiente al Grupo I (1 a 5 semanas de edad), el registro fue llevado a cabo bajo condiciones constantes de oscuridad (OO)

---

muestra un evidente pico el cual rebasa con mucho el nivel de significancia si lo comparamos con la Figura anterior. Es importante señalar que al no ser conspicuo el ritmo en la mayoría de los registros de este trabajo, el pico considerado por periodograma pocas veces rebasa claramente el nivel de significancia.

Los datos del actograma no muestran el fenómeno de correlación relativa que se observa en la figura 2. En la parte inferior del actograma, se presenta la curva promedio correspondiente, donde se observa una mayor amplitud de la oscilación.

En otros registros que están comprendidos dentro de este Grupo (60%), se observó, al igual que en el Grupo anterior una variedad de manifestación de actividad de carácter aparentemente ultradiano, así como regiones de ausencia de actividad y regiones de actividad intensa sin un carácter circadiano evidente (arrítmicos).

### GRUPO III

Los acociles de este Grupo, incluyen edades de 8 a 11 semanas de edad ( $n = 15$ ). Prácticamente no existen diferencias respecto al Grupo anterior ya que el mismo porcentaje (40%,  $n = 6$ ) mostró actividad circadiana con un promedio de  $23.4 \pm 0.21$  horas en condiciones de oscilación espontánea. Se nota que la desviación estándar obtenida para este periodo promedio es menor, lo que aparenta una mayor estabilidad en el ritmo (Pittendrigh, 1981b). En este Grupo, es variable la forma en que se presenta el RALM bajo condiciones de oscuridad constante, ya que en algunos registros se presenta desde el primer día mientras que en otros, se requiere de al menos cinco días de actividad arrítmica antes de que aparezca una actividad circadiana.

La Figura 4 es un ejemplo característico de un ritmo circadiano de actividad locomotora en un acocil de esta edad. Se muestra en el actograma de doble gráfica que la actividad circadiana es clara a partir del cuarto día de registro, manifestando un periodo de 21.4 horas. Este resultado es mostrado por el periodograma  $X^2$  que se presenta a la derecha superior del actograma. La actividad, al igual que en las figuras anteriores, esta representada en barras cuya magnitud equivale a la cantidad de actividad exhibida durante una hora.

---

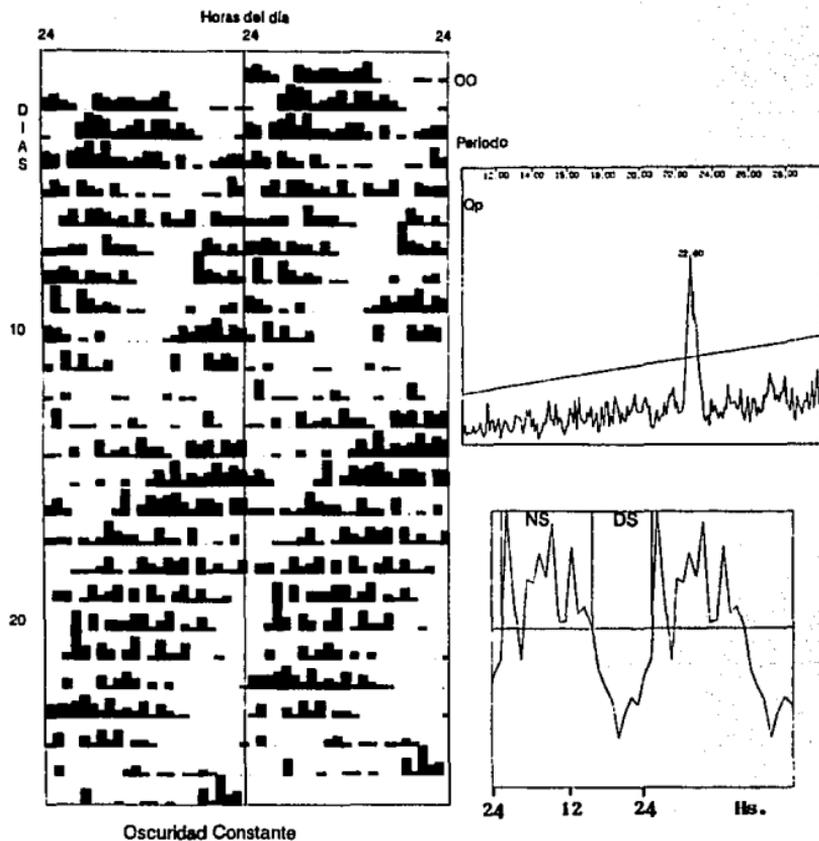


Fig. 3. Actividad locomotora de un acocil juvenil correspondiente al Grupo II (5 a 8 semanas de edad) en condición de oscuridad constante. Es notable que el análisis por periodograma arroja un pico claro de 22.8 horas correspondiente a la oscilación espontánea.

---

Es notable que se presente una interrupción de 3 días y el ritmo retoma la fase esperada, probablemente en este período pudo suceder un fenómeno de ecdisis (muda), donde el animal presenta muy baja actividad locomotora. No se observa correlación relativa interna y la significancia apenas llega a ser alcanzada. En la parte inferior del actograma se muestra la curva promedio ajustada al período obtenido por periodograma durante la oscilación espontánea.

Por lo general, los registros de este Grupo III que muestran actividad locomotora circadiana presentan una tendencia a reducir la actividad después del tercer día de registro en oscuridad constante.

#### GRUPO IV

Para este cuarto Grupo que incluye acociles juveniles de 11 a 15 semanas de edad ( $n = 15$ ) se observó un cambio distinguible con respecto a los anteriores. El 80% de los registros en oscilación espontánea presentaron actividad circadiana ( $n = 12$ ) con un período promedio de  $24.5 \pm 1.6$  horas. Una característica importante de los registros observados para esta edad es que, aunque la actividad circadiana es manifiesta no es muy robusta. La actividad ultradiana se mantiene, dando la apariencia en los registros de picos de menor magnitud que interfiere con los análisis estadísticos;

La Figura 5. muestra la actividad locomotora de un acocil correspondiente a este grupo. Se observa con mayor claridad que desde el primer día de registro se muestra un ritmo de actividad evidentemente circadiano. Los tres primeros días muestran más actividad que los 4 días subsecuentes, sin perder la manifestación circadiana clara. A partir de esta figura la magnitud de cada una de las barras de actividad representan 20 minutos de registro. El periodograma correspondiente muestra un pico de 23.7 horas con mayor amplitud que el resto que alcanzan el nivel de significancia. Se aprecia también un par de picos de menor magnitud entre las 26 y las 26.5 horas lo que podría señalar un fenómeno de coordinación relativa. Esto último no es claro en el actograma presentado. La curva promedio calculada a partir del período con mayor amplitud, muestra claramente una oscilación en la actividad locomotora de este animal durante la oscuridad constante.

---

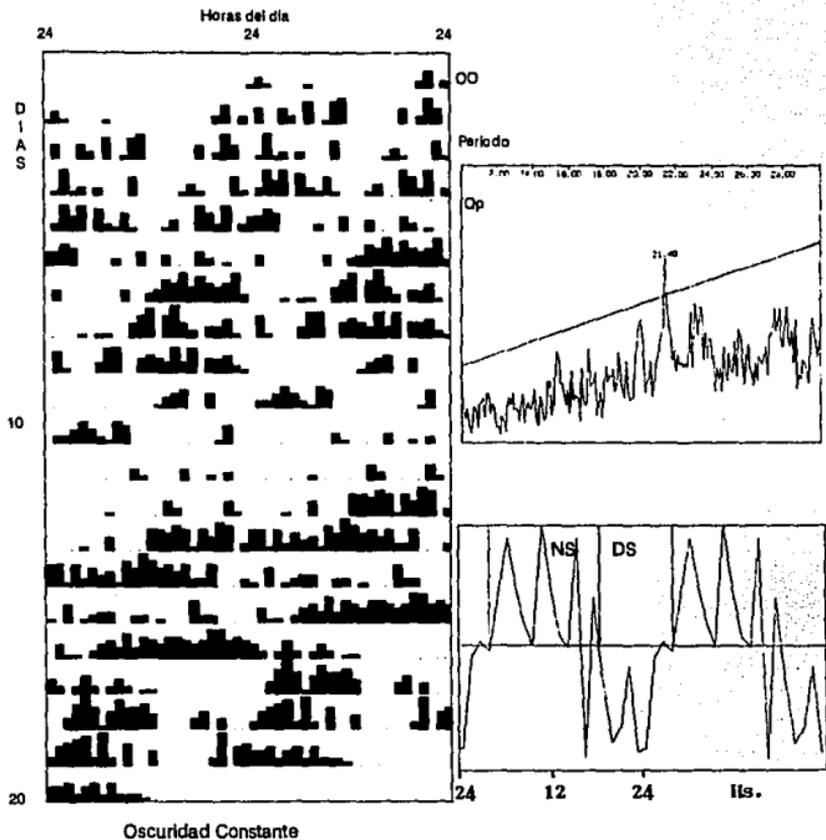


Fig. 4. Actividad locomotora de un acocil juvenil correspondiente al Grupo III en condiciones de oscuridad constante. Cada barra representa la actividad presentada durante una hora.

## GRUPO V

Los organismos comprendidos en este Grupo ( $n = 15$ ) fueron acociles de 16 a 20 semanas de edad, el porcentaje de registros que presentaron actividad circadiana fue del 93% ( $n = 14$ ). El periodo promedio mostrado por estos registros fue de  $23.9 \pm 2.01$  horas. La Figura 6 muestra un registro del ritmo de actividad locomotora de un acocil correspondiente a este grupo, el actograma de doble gráfica, muestra que la actividad se concentra en bloques bien definidos con un corrimiento de fase constante después de 3 días del inicio del registro. Sin embargo se hace evidente la presencia de pequeños grupos de actividad distribuida aleatoriamente fuera del bloque principal.

El actograma muestra la magnitud de la intensidad proporcional al tamaño de las barras que forman la gráfica, cada barra representa la suma de actividad obtenida durante 20 minutos. El análisis mostrado presenta un pico conspicuo significativo en el periodograma con un periodo de 23.0 horas. Por otra parte, se muestra en la región inferior del actograma la curva promedio calculada con base en el periodograma de  $X^2$ , la línea central representa la media de los datos y define de manera clara las zonas consideradas como inicio y fin de la actividad locomotora.

## RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE OO.

La manera en que se presenta el ritmo circadiano de actividad locomotora durante la ontogenia es variable de organismo a organismo, lo que es evidente es que al menos un bajo porcentaje de organismos experimentados en la primer semana post-eclosión, muestran actividad circadiana.

La Figura 7 muestra claramente de que manera varía el porcentaje de acociles que presentan actividad circadiana. Cada grupo está denotado por un intervalo de edad. Se observa que en un inicio los organismos con actividad circadiana representan un 26% del lote I ( $n = 15$  edad de 1 a 5 semanas). Este porcentaje se incrementa en el Grupo II (5 a 8 semanas), manteniéndose en el III (8 a 11 semanas) con un 40%. Mientras que en la serie IV (11 a 15 semanas) y V (15 a 20 semanas) aparenta haber un incremento

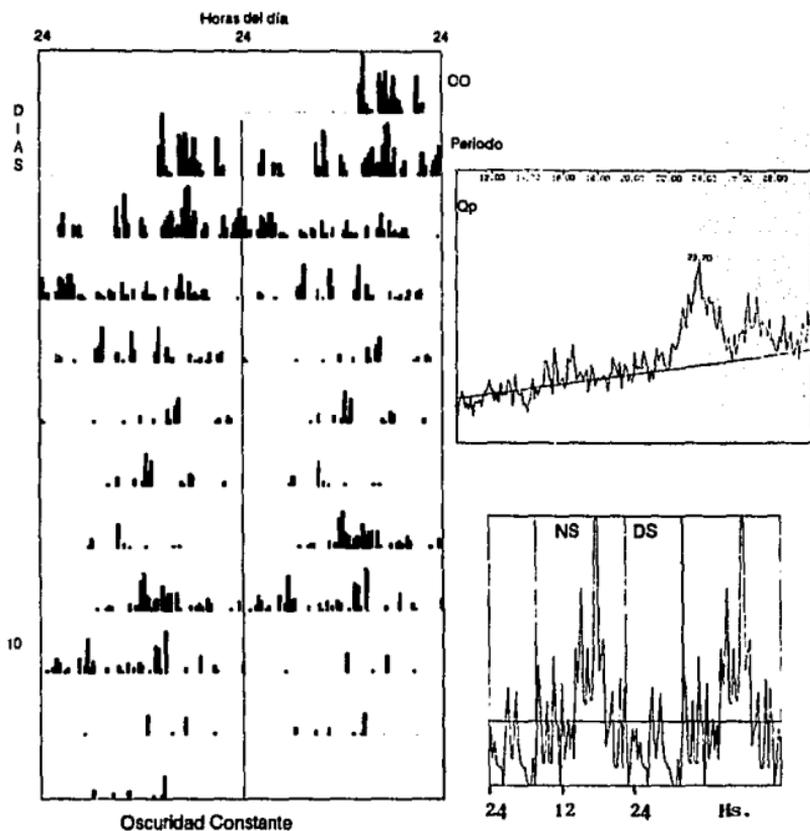


Fig. 5. Ritmo de actividad locomotora de un acocil juvenil correspondiente al Grupo V, bajo condición de oscuridad constante. Se observa claramente el ritmo de actividad y el análisis confirma en ambos casos un período ligeramente menor a las 24 horas.

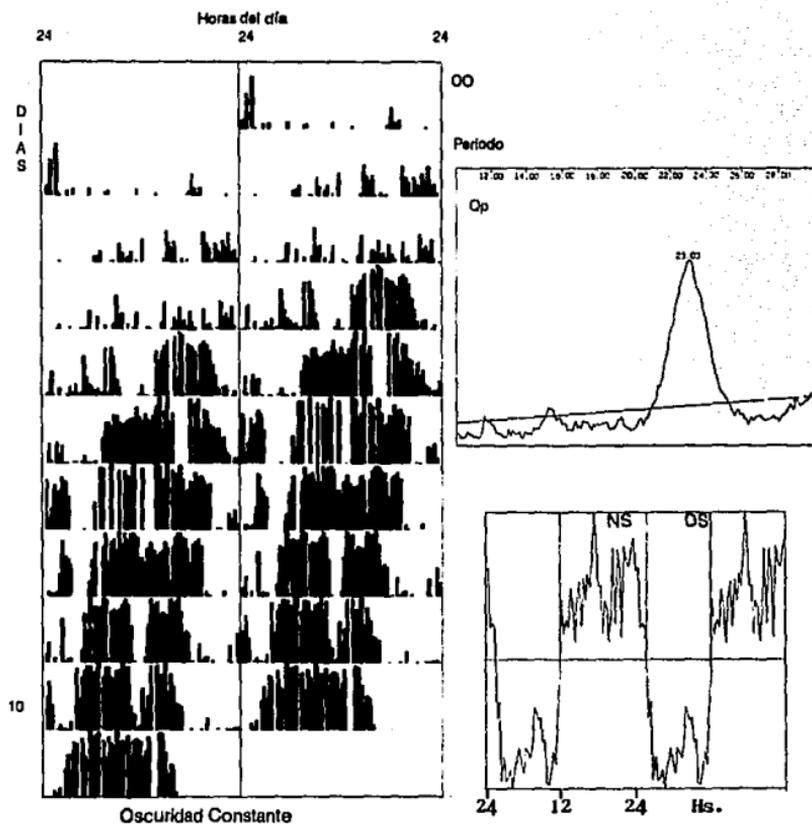


Fig. 6. Ritmo de actividad locomotora de un acocil correspondiente al grupo IV (11 a 15 semanas de edad). Se observa una clara oscilación espontánea con un periodo ligeramente menor a las 24 horas. La actividad se presenta en barras cuya magnitud es de 20 minutos cada una.

---

considerable en los casos de actividad circadiana durante la oscuridad constante con un 80 % y 93 % respectivamente. Las barras oscuras representan el promedio obtenido mediante el periodograma de  $X^2$ . Es notable que el incremento de los casos circadianos presentados en el Grupo III no muestra avance respecto al grupo anterior.

De los organismos que mostraron actividad circadiana durante la oscilación espontánea se obtuvo el promedio del periodo para cada serie. La Figura 8, muestra el promedio de los periodos obtenidos mediante periodograma de  $X^2$ . Se observa que hay un acortamiento en el periodo del Grupo I al Grupo III de 24.9 a 23.7 hs. con una disminución en la desviación estándar y un nuevo aumento en el Grupo IV y V. La desviación estándar obtenida para éstos últimos grupos asciende notablemente con respecto a la de los primeros grupos. Esto puede estar relacionado con el crecimiento en el periodo cuando se presenta una inversión de fase como sucede en la ontogenia del ritmo electroretinográfico ERG, (Fanjul-Moles y col. 1987). Esta supuesta inversión de fase se presenta a partir de la edad correspondiente al Grupo IV.

---

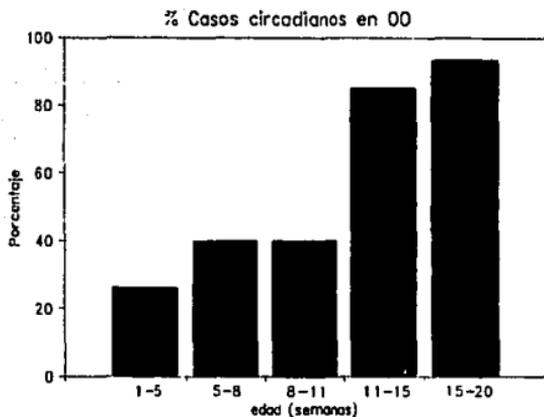


Fig. 7. Porcentaje de organismos que presentaron actividad circadiana en cada grupo examinado. Las barras representan los datos obtenidos por periodograma de  $\chi^2$ .

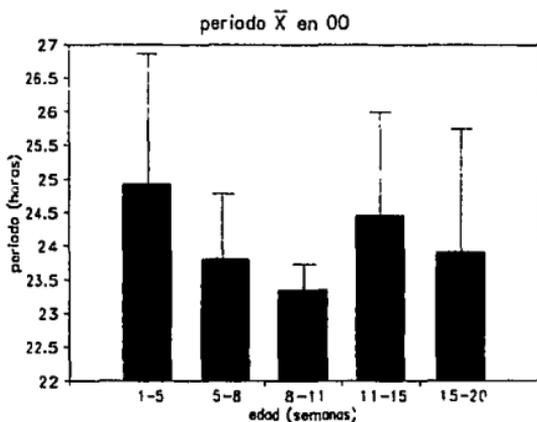


Fig. 8. Promedio del periodo obtenido en los casos que presentaron ritmicidad circadiana durante la oscilación espontánea.

---

## II.- EL RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA BAJO CICLOS LUZ-OSCURIDAD 12:12.

### GRUPO I

Los organismos que fueron sometidos inicialmente a una serie de ciclos en oscuridad constante, fueron expuestos a ciclos luminicos (L/O) cuyas características fueron señaladas ya en el método. Para los acociles que se encuentran en el Grupo I (1 a 5 semanas), se observó en la mayoría de los casos, que a pesar de una marcada ausencia de actividad circadiana durante la condición de oscuridad constante, cuando fueron sometidos a fotoperiodo, se expresaba una tendencia a la sincronización apareciendo una oscilación circadiana no muy robusta. Algunos registros que mostraban oscilación circadiana durante la oscuridad constante, así como algunos que no, mostraron una aparente sincronización, que en algunos casos fue súbita al inicio del fotoperiodo, mientras que en otros tomaban más de 7 ciclos para aparentemente ajustarse a un periodo muy cercano a las 24 horas.

La Figura 9 muestra un actograma de doble registro de la actividad manifestada por un acocil correspondiente a este grupo (1 a 5 semanas). Se puede observar de que no se presenta actividad durante la condición de oscuridad constante, con días de intensa actividad arritmica así como días de actividad apenas notable.

El periodograma de  $X^2$  no muestra un periodo significativo conspicuo durante esta condición, existen muchos picos dentro del análisis entre ellos el de 27.1 horas. Sin embargo, en el momento de iniciar el fotoperiodo se aprecia una organización débil de la actividad locomotora particularmente durante la fase de oscuridad e inicio de la fase luminosa. Esta característica nocturna no es constante en todos los registros que presentan una sincronización aparente. El período arrojado por periodograma de  $X^2$  muestra una serie de picos donde el máximo señala un periodo de 23.7 horas. La curva de actividad locomotora promedio muestra respecto a los 4 últimos días, de que manera se presenta un pico prominente alrededor de las 6 de la mañana.

---

---

Dentro de los acociles de este grupo encontramos que un alto porcentaje, muestran respuesta rítmica de la actividad locomotora durante el fotoperiodo (60%,  $n=9$ ) con un período promedio de  $24.6 \pm 1.6$  horas. Esto podría ser debido a un posible efecto de enmascaramiento como se discutirá más adelante. Las barras mostradas en el actograma representan la suma de actividad a cada 20 minutos. Es importante señalar que la respuesta al encendido de la luz señalada por Page y Larimer (1975) para acociles adultos, no es clara en la mayoría de los registros de acociles de este grupo sometidos a un fotoperiodo. Sin embargo el análisis por periodograma muestra picos significativos de baja amplitud alrededor de las 12 horas. Sin embargo, la actividad en la fase de encendido de la luz no es clara en el actograma.

## GRUPO II

Los animales correspondientes al Grupo II ( $n=15$ ) cuya edad es de 5 a 8 semanas, presentan como ya mencionó, un mayor porcentaje en la expresión del ritmo circadiano durante la oscilación espontánea. La capacidad de responder ante el fotoperiodo es menor a la del primer Grupo (53%  $n=8$ ), sin embargo, la forma en que se presenta la actividad así como la tendencia a la sincronización se muestra con mayor claridad. El período promedio encontrado en este Grupo durante el fotoperiodo fue de  $23.2 \pm 0.83$  horas.

La Figura 10, muestra un ejemplo típico de un organismo correspondiente a este Grupo, se observa en la parte de oscuridad constante (OO) que en un inicio existe una gran actividad durante los primeros 6 días de registro, disminuyendo progresivamente pero manteniendo la oscilación espontánea del ritmo de actividad. El periodograma que se encuentra a la derecha, muestra un pico evidente de 23.7 horas,

En la parte en que es aplicado el fotoperiodo (LO) se observa una tendencia a acercar el período del ritmo a las 24 horas, ubicando la actividad en el período de oscuridad. El periodograma que se localiza a la derecha correspondiente a los cuatro últimos días de la condición LO, muestra un período de 23.4 horas. El registro parece indicar que existe sincronización en los cuatro últimos días del registro, por lo que se requirió de seis días de ciclos transitorios para una aparente sincronización.

---

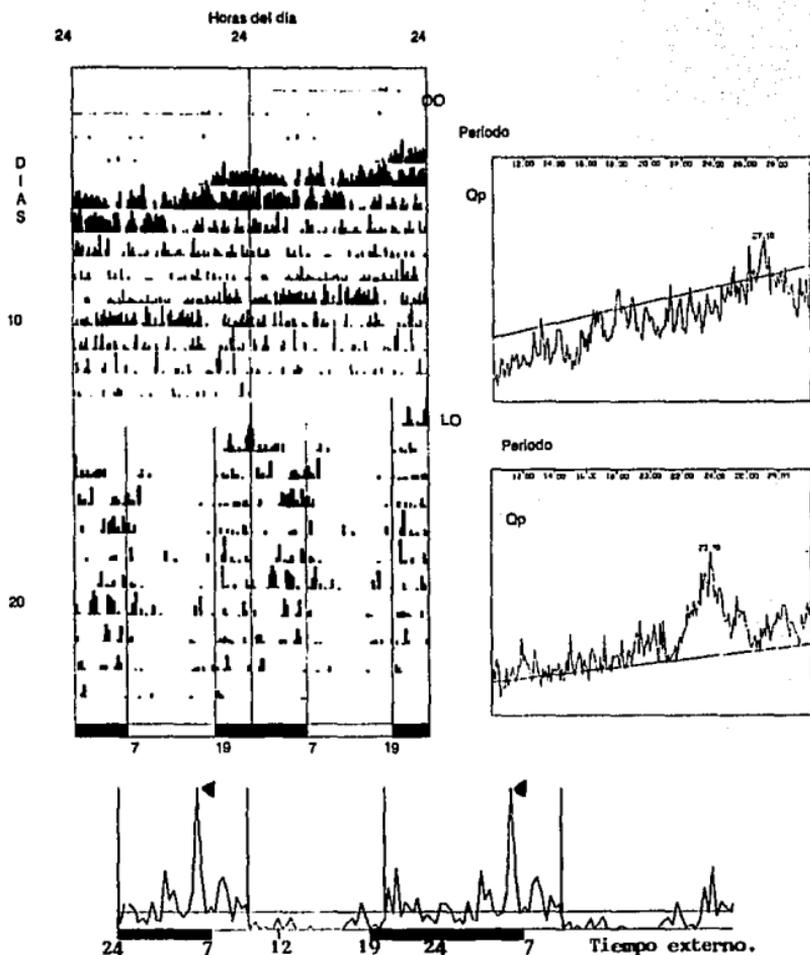


Fig. 9. Registro de actividad locomotora de un acocil del Grupo I (1 a 5 semanas de edad) en condición de oscuridad constante (OO) y de fotoperiodo (LO). Se nota que durante los ciclos LD la actividad se concentra en la fase de oscuridad.

---

La curva que se presenta debajo del actograma corresponde solamente a los valores promedio para la oscilación durante el fotoperiodo en los cuatro últimos días de registro.

### GRUPO III

La Figura 11 muestra un registro característico de este grupo, se observa, al igual que en casos anteriores, que los primeros cuatro días de registro manifiestan una constante actividad locomotora para posteriormente mantenerse atenuada o en algunos casos ausente. No es evidente en esta parte del registro una tendencia circadiana clara, pero existe en los 6 últimos días en OO que la escasa actividad presenta un ritmo con periodo mayor a las 24 horas. Sin embargo, el periodograma que se muestra en la parte superior derecha correspondiente a la oscilación espontánea, muestra entre otros, un pico significativo con un valor de 24.9 horas.

Al aplicar el fotoperiodo, se muestra una organización clara del bloque de actividad para cada día, con una sincronización hacia el inicio de la fase luminosa. El periodograma correspondiente señala un pico significativo de 23.2 horas. Es evidente que, al menos en este registro, no se muestra actividad inmediatamente después de aplicar el fotoperiodo (en el encendido de la luz) sino hasta el tercer día. No aparenta haber en el registro una segunda fase de actividad que correspondería a la endógena señalada por Page y Larimer (1975) en los organismos adultos. No obstante el periodograma correspondiente a los cuatro últimos días bajo fotoperiodo muestra un pico alrededor de las 12 horas. El cual no es reflejado en la gráfica promedio de actividad durante LO.

En general los organismos de este grupo, mostraron respuesta a una supuesta sincronización por ciclo LO en un 66% (n=10), casi siempre con actividad en la fase luminosa, con un periodo promedio durante la sincronización de  $24.7 \pm 1.3$ . En los registros, la parte correspondiente al ciclo LO en que mostraron actividad circadiana clara presenta en su mayoría, características semejantes al registro mostrado en esta Figura.

---

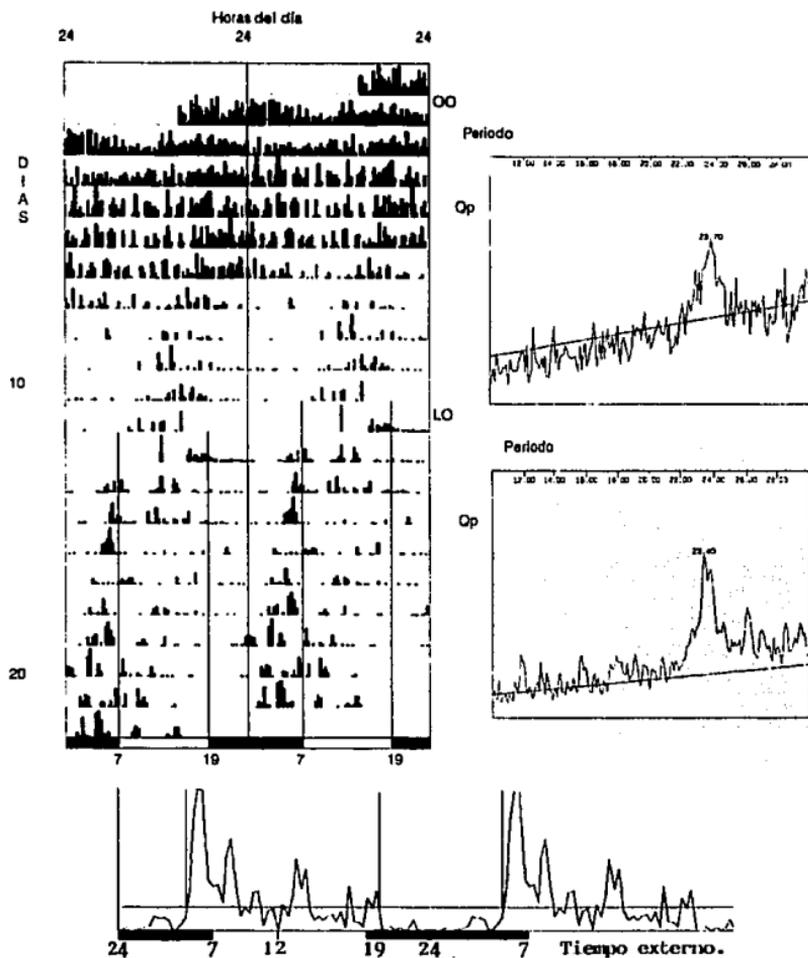


Fig. 10. Ritmo de actividad locomotora de un acocil correspondiente al grupo II. Se observa como se muestra una aparente sincronización en los últimos días de condición en LO.

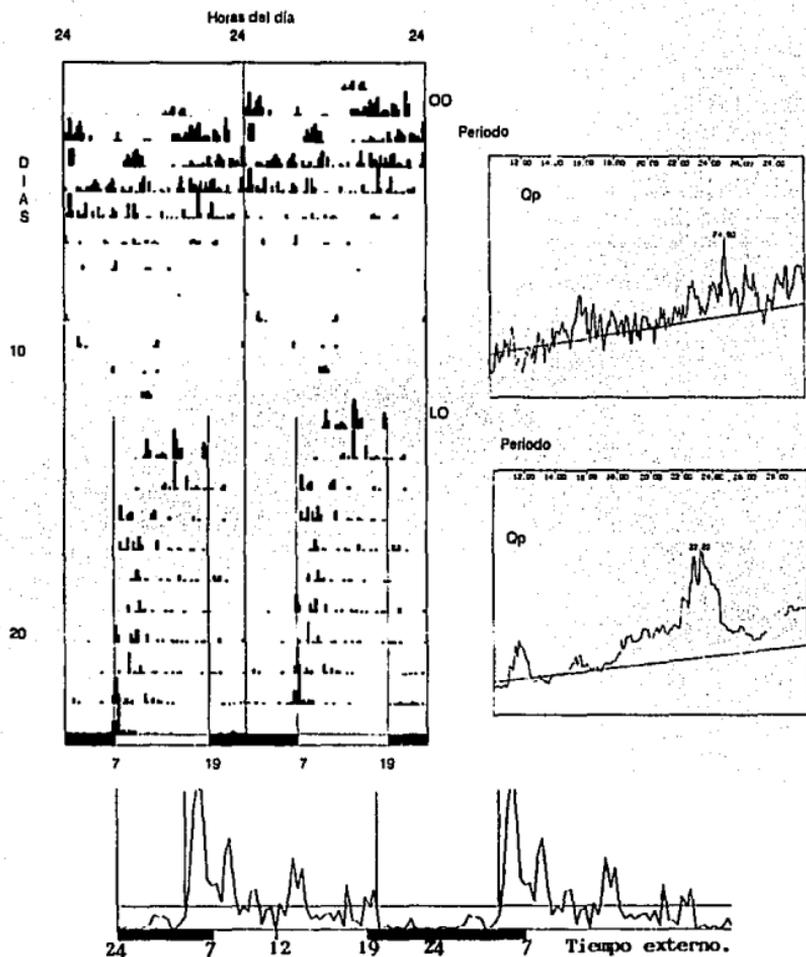


Fig. 11. Actividad locomotora de un organismo correspondiente al Grupo III. Se muestra la actividad durante la oscilación espontánea en oscuridad constante (OO) y durante el fotoperiodo (LO), además de los análisis correspondientes a cada condición.

#### GRUPO IV

Los organismos correspondientes al Grupo IV ( $n = 15$ ) con un intervalo de edad de 11 a 15 semanas de edad, mostraron mayor actividad durante el ciclo luz-oscuridad que en los del grupo anterior. Sin embargo, el porcentaje en que responden al fotoperiodo con tendencia a la sincronización se mantuvo más baja que en el Grupo III (36%,  $n = 5$ ). En la Figura 12, se muestra un ejemplo de la forma en que se presenta la actividad locomotora en un acocil de esta edad. Se observa que durante la condición de oscuridad constante (OO) el ritmo manifiesta un periodo de 24.3 horas, así como una tendencia a disminuir la actividad conforme avanza el registro.

Durante el fotoperiodo se observa que, al menos durante los tres primeros días, no se muestra una tendencia de organización clara. Sin embargo, al continuar el registro, se muestra una tendencia de ubicar un bloque de actividad un poco antes del inicio de la fase de oscuridad así como un pequeño bloque al inicio de la fase luminosa, pudiendo ser más clara la característica señalada por Page y Larimer (1975) de un pico de actividad de naturaleza exógena. El análisis por periodograma, elaborado para los cuatro últimos días durante LO muestra un pico significativo de 23.7 horas así como uno de menor amplitud muy cercano a las 12 horas. La curva promedio para esta condición se muestra con los dos picos mencionados al parecer uno como respuesta al encendido de la luz y otro que correspondería al endógeno (Page y Larimer, 1975).

#### GRUPO V

Los organismos que se incluyen en este Grupo (16 a 20 semanas) mostraron casi en su totalidad una actividad locomotora circadiana durante la oscilación espontánea (93%,  $n = 14$ ), pero solamente el 40% ( $n = 6$ ) mostraron sincronización al ciclo luz-oscuridad. Es notable dentro de organismos de este grupo, que la actividad durante la oscilación espontánea no siempre se presenta como bloques restringidos. Presenta por lo tanto actividad distribuida a lo largo de las 24 horas en forma aislada sobresaliendo bloques de de mayor magnitud. Durante aplicación de fotoperiodo, la actividad se concentró en regiones más definidas del nictémero, particularmente durante la fase de iluminación. El periodo promedio fue de  $24.7 \pm 0.69$  horas.

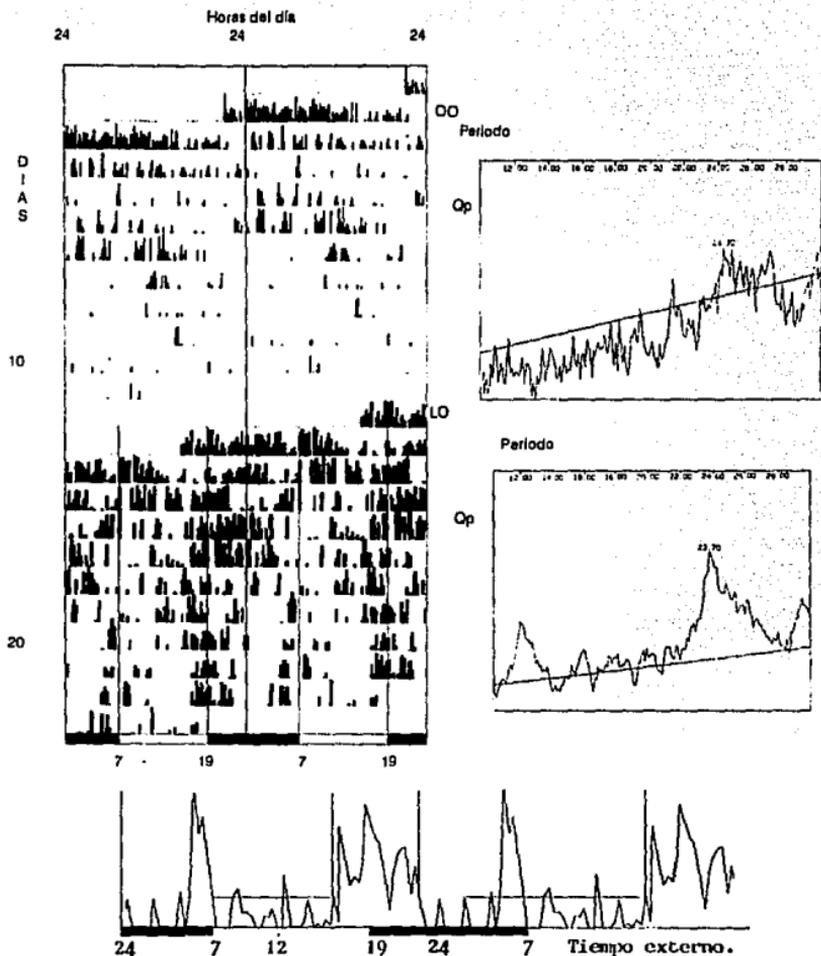


Fig. 12. Actividad locomotora de un acocil correspondiente al Grupo IV, durante la oscilación espontánea (OO) y durante el fotoperiodo (LO).

---

En la Figura 13 se muestra el actograma correspondiente a un organismo típico para este intervalo de edad, durante la condición de oscuridad constante (OO). No se muestran bloques de actividad en zonas exclusivas. Sin embargo, el análisis de esta sección muestra un pico de mayor amplitud correspondiente a las 24 horas entre una cantidad apreciable de otros picos significativos de menor amplitud.

Durante el fotoperiodo, la actividad tiende a mantenerse durante la fase de iluminación. Esto no fue constante en los registros obtenidos, ya que en otros casos la actividad se manifestó durante la fase de oscuridad como es típico en los organismos adultos (Page y Larimer, 1975). La aparición de un segundo pico en el período correspondiente al encendido de la luz se aprecia en el periodograma, aunque con muy baja amplitud. Sin embargo no es evidente en el registro como el reportado por Page y Larimer (1975). El período mostrado es de 23.05 horas y la curva promedio muestra la máxima actividad en forma de una cresta muy estrecha a lo largo del ciclo. Los datos cuantificados en esta parte del análisis comprenden los cuatro últimos días de registro en LO.

#### **RESUMEN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA BAJO CICLOS LO 12:12**

El efecto del fotoperiodo sobre el ritmo de actividad locomotora fue evidente particularmente en los registros correspondientes al primer grupo (1 a 5 semanas). La respuesta de los organismos a la luz era inmediata en muchos casos y aún sin presentar ciclos transitorios entre la fase presentada en oscilación libre y el fotoperiodo. Esto hace pensar que se probablemente la fase del ritmo coincidiera con la fase de inicio del fotoperiodo, por lo que no se aprecian ciclos transitorios. Otra hipótesis nos sugiere que posiblemente se presentó un efecto de enmascaramiento por el fotoperiodo a tal nivel que se llegó a presentar un registro con la actividad exclusivamente durante la fase luz como se muestra en la Figura 19, aún sin presentar actividad significativa durante la oscilación espontánea.

---

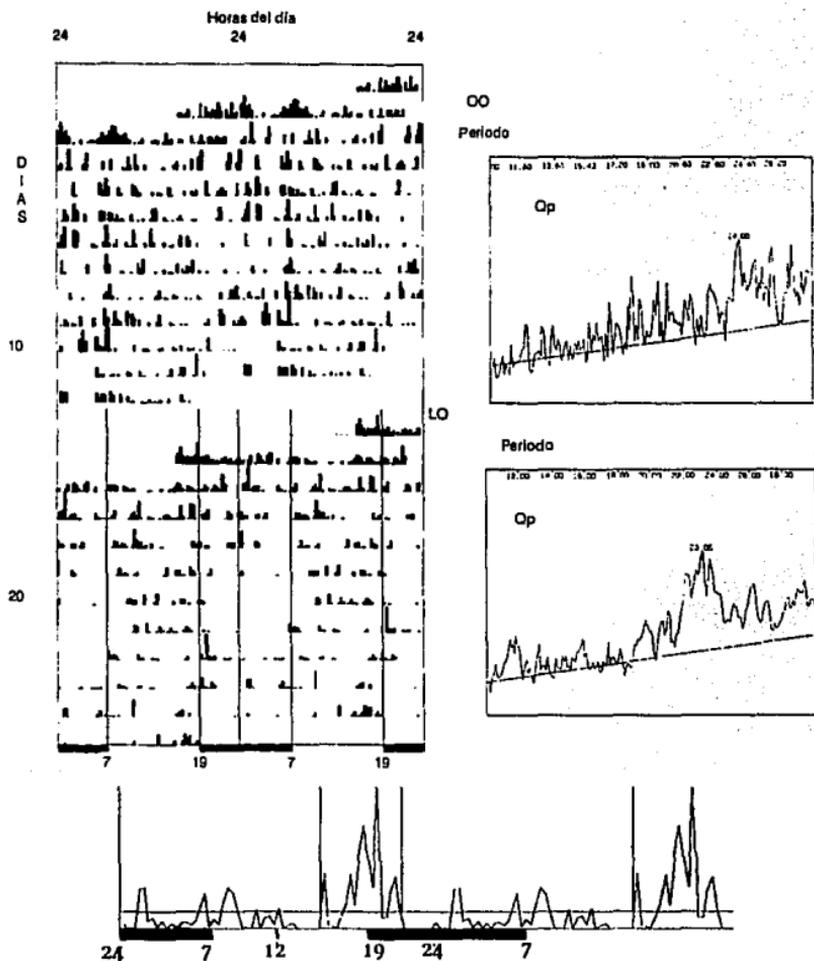


Fig. 13. Ritmo de actividad locomotora de un aciculus del Grupo V. Durante la oscilación espontánea (OO) y durante la aplicación del fotoperiodo (LO).

---

La Figura 14, presenta el porcentaje de organismos que presentaron una aparente respuesta de sincronización al fotoperiodo. Es notable que en el primer intervalo de edad, se alcanzó un valor de 60%. El porcentaje declina en la segunda, aumenta en la tercera y nuevamente se reduce en la cuarta y quinta serie. Cabe señalar que pocos organismos mostraron ciclos transitorios durante los primeros intervalos de edad. Para cuantificar esto, se consideraron exclusivamente aquellos registros que al entrar a fotoperiodo mostraron un cambio de fase gradual a través de tres o más ciclos transitorios. Los que presentaron sincronización inmediata no fueron considerados en este análisis pues como anteriormente se ha mencionado, es posible que se trate de un proceso de enmascaramiento del ritmo. O bien que la fase del sincronizador concuerda con la fase específica del ritmo endógeno.

Lo anterior nos lleva a preguntar que, si el animal no se está sincronizando, ¿se está llevando un cambio de fase a expensas del periodo externo?, ¿sigue manifestandose el oscilador sensible a la luz lo que indicaría una coordinación relativa por el fotoperiodo?

La Figura 15 muestra de que manera se presenta el periodo promedio en los últimos 4 días en que se aplicó el fotoperiodo. Se observa que los periodos, muestran menor variabilidad que los presentados durante la oscilación espontánea, sin ajustarse ninguno de ellos al valor de 24 horas,

La Figura 16, muestra de que manera varían los ciclos transitorios en los registros considerados, se observa que los organismos de la primer serie llegan a requerir un promedio de 6 ciclos para presentar un periodo de muy cercano a 24 horas, aparentemente acoplado al fotoperiodo. Esta cantidad de ciclos decrece constantemente hasta mantenerse en un promedio de 3 ciclos en los organismos más grandes.

---

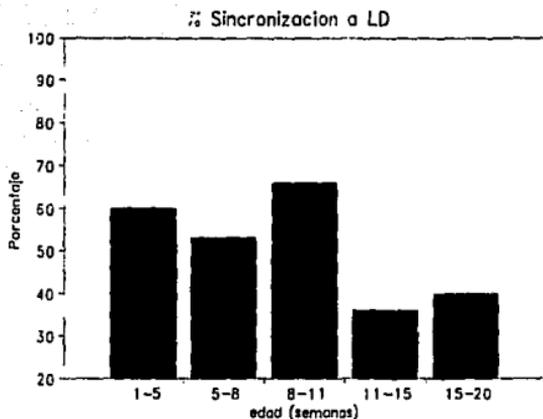


Fig. 14. Porcentaje de organismos de cada grupo que presentaron una aparente respuesta a la aplicación del ciclo Luz-Oscuridad.

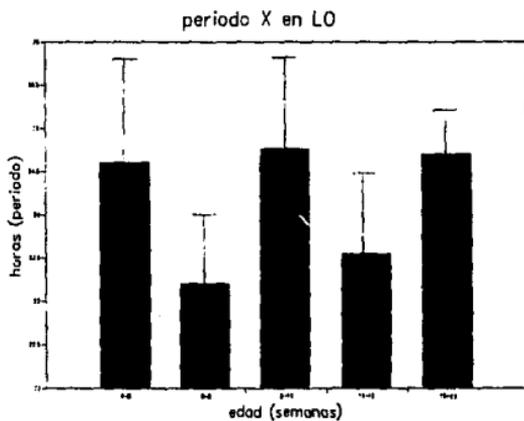


Fig. 15. Promedio de los periodos circadianos obtenidos en los últimos cuatro días de registro bajo fotoperiodo.

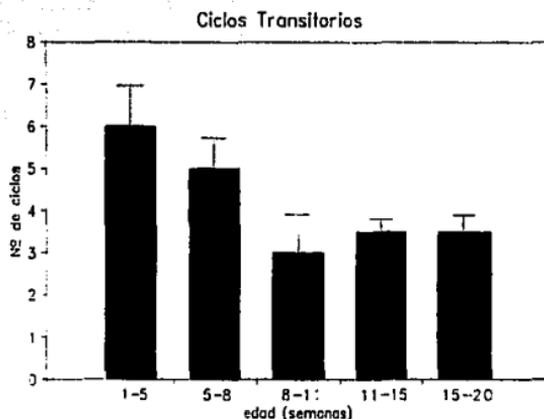


Fig. 16. Número de supuestos ciclos transitorios determinados para los organismos que mostraron una aparente sincronización al fotoperíodo. Cada barra muestra la desviación estándar correspondiente.

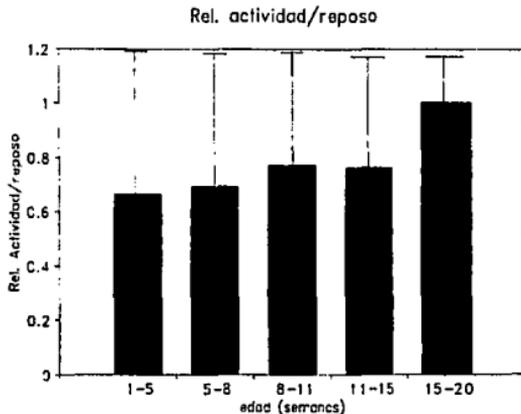


Fig. 17. Relación de actividad-reposo durante la oscilación espontánea obtenida en oscuridad constante.

---

### III.- PARAMETROS DE LA OSCILACION DURANTE OSCURIDAD CONSTANTE.

De los parámetros más importantes que se pueden obtener en una oscilación son, además del período y la frecuencia, la relación entre la fase de actividad y la fase de reposo ( $\alpha/p$ ). Esta últimas fueron obtenidas a través de la curva promedio de cada registro exclusivamente durante la condición de oscuridad constante mediante el valor obtenido por el periodograma de  $X^2$ , se ordenaba el eje de las horas para cada actograma y se promediaba la actividad de manera vertical. El resultado se graficó para obtener la oscilación promedio de la actividad.

La Figura 16 muestra la relación entre la fase de actividad y la de reposo ( $\alpha/p$ ) en los diferentes grupos que mostraron oscilación espontánea durante la oscuridad constante. La actividad era considerada desde el inicio al final de la noche subjetiva en cada curva promedio. La tendencia fué un aumento a lo largo de los diferentes grupos en la cantidad de actividad por encima del promedio calculado. Sin embargo estos resultados no son claros debido a que la actividad durante la noche subjetiva no es constante, mostrando bloques aislados que se diferencian de la fase de reposo por la frecuencia en la que aparecen. Cada barra muestra la desviación estándar correspondiente.

---

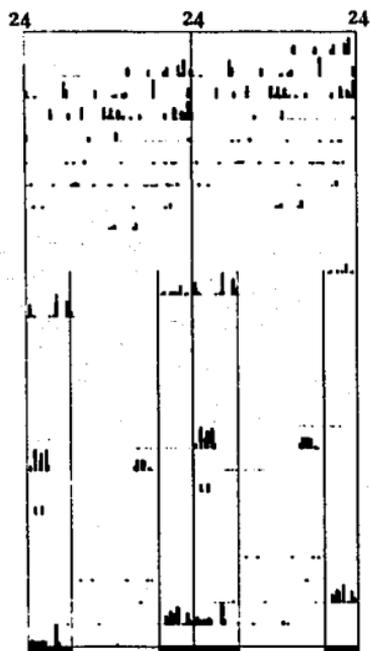
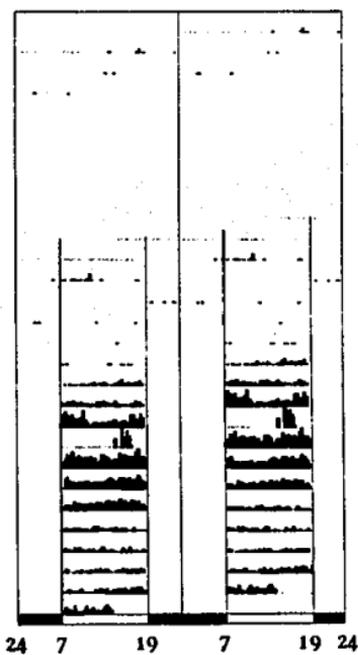


Fig. 18. Sincronización a fotoperiodo de un organismo del Grupo I.

Fig. 19. Sincronización a fotoperiodo de un organismo del Grupo I, se nota el mantenimiento de fase durante el ciclo de iluminación.



---

## DISCUSION

Los resultados de este trabajo indican que hay expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora en el acocil desde estadios tempranos de la ontogenia. Sin embargo, tanto el porcentaje de casos que mostraron un ritmo circadiano evidente así como la significación estadística ( $P < 0.05\%$ ) del mismo es baja. El porcentaje obtenido para el grupo I fue tan solo de 26% (Fig. 6). Dentro de este porcentaje se encontraron actogramas en los cuales el ritmo no es evidente y otros en los cuales, solo se manifiesta débilmente. La significación estadística apenas sobrepasa el 0.05%. Al ir aumentando la edad del animal, el porcentaje de ritmos evidentes, tiende a incrementar hasta el 93 % en el Grupo V.

La duración del periodo circadiano varió desde 24.8 horas hasta las 23.5 horas desde el grupo I al grupo III con una disminución de la variabilidad del periodo. Del grupo IV al grupo V, la variabilidad del periodo vuelve a elevarse ligeramente.

Los ritmos biológicos en oscilación espontánea generalmente muestran cambios en la frecuencia de oscilación asociados con la inestabilidad del periodo  $\tau$  que a menudo difieren intra e interindividualmente. Debido a que la labilidad de los ritmos está asociada generalmente con la dispersión de los valores de  $\tau$  (Pittendrigh y Daan, 1976), utilizamos la desviación estándar de la estimación del periodo de los diferentes grupos como una medida de labilidad de este ritmo circadiano. En la Figura 8 se muestran estas variaciones las cuales parecen ser mayores en el grupo I (1 a 5 semanas de edad). Estos resultados coinciden en cierta medida con los reportados por Fanjul-Moles et al (1987) en el estudio de la ontogenia del ritmo ERG en esta especie. Aunque en ese trabajo, las diferencias de labilidad en el periodo entre los primeros y los últimos estadios del desarrollo fueron mucho mayores, pues se computaron tanto periodos circadianos como ultradianos y el número de la muestra para cada edad utilizado en dicho trabajo, fué mucho menor (5 individuos para cada edad) que en el presente. Page en 1990, mostró cambios semejantes en la labilidad de  $\tau$  de la actividad locomotora de ninfas de la cucaracha *Leucophaea maderae*. Lo que demuestra que la labilidad en  $\tau$  durante estadios postembrionarios tempranos parece ser un fenómeno común en la maduración de los ritmos. Por otra parte, estos mismos autores encontraron cambios en el porcentaje de organismos rítmicos a través de las edades estudiadas. A pesar de que la muestra usada por este autor fue mayor, el porcentaje de animales rítmicos fue tan solo del 41%, para la primer semana posteclosión.

---

---

La ausencia de una ritmicidad detectable durante el periodo de registro en OO (oscuridad constante) ha llevado a la conclusión al menos en el caso de *Leucophaea maderae*, de que la actividad podría estar controlada por un proceso estocástico más que uno circadiano (Wiedenmann y Martin, 1980). Esta posibilidad no se excluye en el caso de los datos del presente trabajo, sin embargo la presencia de los ritmos ultradianos (no analizados en esta tesis) en los registros de animales sin actividad circadiana, podría hacer pensar en procesos caóticos dentro de la generación del ritmo circadiano.

Como se señaló en los resultados, en algunos registros se ha encontrado que la actividad puede desaparecer y reaparecer a intervalos regulares. Sin embargo esto no parece afectar la fase del ritmo, pues al reaparecer la actividad, la fase siempre se presentó en el tiempo esperado (Fig. 18). Estudios en otros organismos como en la cucaracha (Page y Block, 1980) y en el grillo (Yagi y Loher, 1986), en los que se han llevado a cabo registros muy largos (más de 30 días), se ha observado el mismo fenómeno, el cual estos autores han relacionado con el ciclo de la muda.

En los experimentos de esta tesis es muy posible que la falta de actividad en algunos segmentos de un mismo registro este relacionada con la muda. Este animal, llega a mudar aproximadamente 14 veces durante el primer año de desarrollo (Suko, 1958). Puesto que la fase no se ve afectada por estos periodos de inactividad (Fig. 18), es lógico pensar que en el acocil, al igual que en la cucaracha y el grillo (Page, 1990; Yagi y Loher, 1986), el marcapaso continúa corriendo pero la actividad no expresa este proceso.

Los registros de esta tesis no son suficientemente largos ya que debido a las condiciones en las que se encontraron los organismos, no era posible mantener durante mucho tiempo el acuario de registro sin cambiar el nivel de agua así como su limpieza y la eliminación de residuos alimenticios. De no ser así sería alta la probabilidad de muerte de los mismos.

Aún en individuos de edad temprana que expresan ritmos circadianos de actividad estadísticamente significativos, (Fig. 3), los ritmos no son tan robustos como los reportados para el adulto (Page y Lárimer, 1975). Todos estos resultados parecen sugerir que el acoplamiento del marcapaso y la actividad locomotora es débil y variable en los diferentes individuos.

---

---

La fase del RALM durante la oscilación espontánea, medida por el inicio de actividad en la curva promedio, muestra una notable dispersión en el grupo I y II (figura 19), presentando mayor tendencia hacia las horas de la noche y posteriormente agrupándose en las horas del día en los grupos III y V. En este ritmo parece haber mucho mayor variabilidad en la fase que en el periodo del ritmo de amplitud del ERG (electroretinograma) durante la ontogenia (Fanjul-Moles et al, 1987; Fuentes Pardo et al, 1992), el cual muestra una fase diurna durante los primeros estadios postembrionales, para sufrir un cambio de aproximadamente  $180^\circ$  a los 60 días de edad y presentar la máxima actividad por la noche. Este cambio de fase parece darse a través de un alargamiento de periodo. En el ritmo de actividad locomotora, el cambio podría darse más tardíamente, sin embargo hay un agrupamiento de fase muy notorio entre las 18 y las 24 horas del tiempo externo (Fig. 20) en los animales del grupo V. Este cambio en la fase parece coincidir con un posible cambio en la longitud del periodo, disminuye a un valor de 23.5 horas en el grupo III, con un aumento de 24.5 horas en el grupo IV y una disminución posterior en el grupo V. Quizá en este ritmo, la inversión de fase se da más tardíamente que la observada para el ritmo ERG (Fanjul-Moles et al, 1987).

Tomiloka y Chiba, (1982), encontraron diferencias en la fase del ritmo de actividad locomotora del grillo *Grillus bimaculatus*. Este animal muestra un ritmo diurno el cual cambia a nocturno en las formas adultas; la inversión del ritmo se produce repentinamente a 5 días después de la muda imaginal simultáneamente con la formación de espermatozoides. Además de la relación de fase, los ritmos difieren en la duración de  $\tau$  durante la oscuridad constante. Estos autores proponen que se pudiera tratar de osciladores distintos.

En el acocil la muda de reproducción no se produce hasta los 12 a 14 meses posteclosión. En esta tesis no se exploraron edades más allá de 4 meses por lo que es quizá muy pronto para explorar un cambio de fase tan pronunciado como el que se vió en el ritmo ERG a esta edad. Lo anterior podría hablar, por una parte de la necesidad de un proceso de maduración más prolongado para que las características del RALM adquieran las del ritmo de un animal adulto y por otra parte de sistemas marcapasos rítmicos diferentes involucrados en los dos procesos.

---

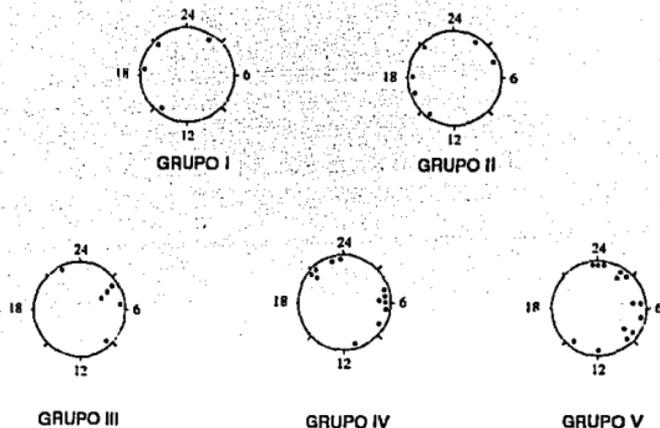


Fig. 20. Fases de inicio de actividad determinadas con base en la curva promedio obtenida por TAU. Los círculos determinan el tiempo externo. Cada punto equivale al inicio de actividad encontrado durante la oscilación espontánea.

#### EXPOSICION A CICLOS DE LUZ OSCURIDAD (LO)

El registro del ritmo bajo el fotoperiodo, se llevó a cabo para explorar la aparición del pico de encendido y apagado en el RALM, de acuerdo con los reportes de Page y Larimer (1975) y Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981). En este protocolo no se llevó a cabo un estudio formal de los mecanismos de sincronización del ritmo, pues después la condición en LO, no se registró el ritmo en oscuridad constante nuevamente. Lo anterior hubiera permitido estudiar los ángulos de fase.

El hecho de que en los animales del primer grupo, la fase de actividad se agrupe en el periodo oscuro (Fig. 9) o en el periodo luminoso (Fig. 19) sin ciclos transitorios en algunos casos, puede hablar de un fenómeno de enmascaramiento (Aschoff, 1969), que parece repetirse en animales de mayor edad (Fig. 13). Por otra parte es probable que la fase de inicio de luminosidad coincidiera con la de inicio de

---

actividad por lo que no se observaran ciclos transitorios, este último supuesto es más improbable ya que parece que la luz posee un fuerte efecto en la expresión de actividad en animales muy pequeños (grupo I) como se muestra en la figura 19.

El desarrollo del ojo del acocil requiere de un proceso de maduración relativamente prolongado (Hafner et al, 1982) tanto en el proceso de diferenciación de los rhabdomeros como en el de los procesos neuroendócrinos relacionados con el movimiento de la pseudopupila, lo cual se ve reflejado en la amplitud de su respuesta a la luz (ERG) (Fanjul-Moles et al, 1987, 1988, 1991).

De acuerdo con lo anterior, podríamos esperar un enmascaramiento mayor en los animales más desarrollados que en los animales más jóvenes, sin embargo sucede aleatoriamente tanto en unos como en otros. La entrada de luz es a través de todo el cuerpo del animal, no solo mediante de los ojos. Hay que tener en cuenta que la cutícula de este animal es mucho más fina y transparente en los primeros estadios estudiados (grupos I, II y III); por lo tanto esta característica pudo haber creado un exceso en la entrada de luz que enmascara el ritmo.

El número de transitorios del periodo oscuro al luminoso a través de una aparente sincronización, decrece a través del desarrollo (Fig. 17) lo que aparenta estar en relación directa con un mejor acoplamiento entre el marcapaso y el ritmo manifiesto.

La figura 21, muestra la fase de mayor actividad durante la los últimos cuatro días de aplicación del fotoperiodo. Se observa que en todos los grupos existe actividad tanto al inicio de la fase luminosa como en el inicio de la fase de oscuridad. Esto nos da a entender que el ritmo aparece invertido con respecto al presentado por organismos adultos en casi la mitad de cada uno de los lotes estudiados o bien que en aquellos registros que mostraron actividad durante la fase luminosa se refuerce la teoría de enmascaramiento.

En algunos registros entre ellos el mostrado en la figura 10 y 11, se podría dudar de si el pico de actividad que se produce con el encendido de la luz, está representando un oscilador que se va sincronizando a través de transitorios al periodo de oscuridad o si es un oscilador que se hace evidente con la luz (no necesariamente de naturaleza exógena) y continúa su corrimiento espontáneo hasta acomodarse en el periodo oscuro por un cambio de fase natural en un oscilador menor a 24 horas. Lo

---

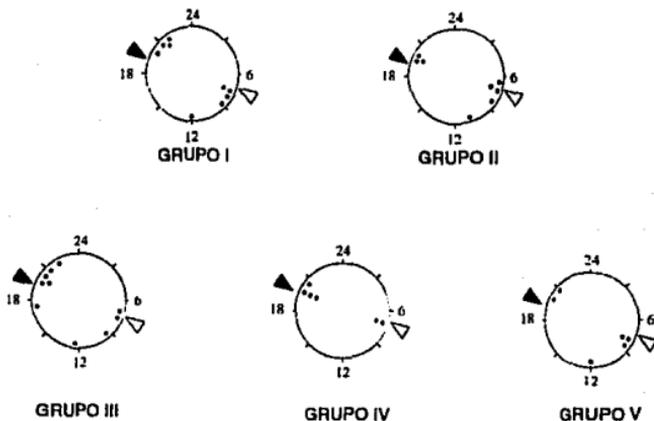


Fig. 21. Fases de mayor actividad durante la condición LO de los diferentes grupos experimentales. Se observa que en cada grupo la proporción de registros con fase de actividad diurna es semejante a la nocturna. Los triángulos oscuros representan el inicio de la fase de oscuridad y los claros el inicio de la fase luminosa en sentido de las manecillas del reloj.

anterior es particularmente notable en la figura 11, en donde los valores del periodo obtenidos mediante el periodograma de  $X^2$  mostraron un valor de 23 horas bajo condiciones de LO. En tanto, en OO el valor va de 24.9 con un segundo pico menor alrededor de las 23 horas.

En la Figura 12 se puede observar en el régimen LO un posible fenómeno de coordinación negativa externa (Van Holst, 1939), en donde dos osciladores parecen estar corriendo en diferente dirección debido quizá a las diferencias en la fuerza de acoplamiento con el sincronizador. El análisis de periodograma muestra dos picos, uno de 24.3 y otro de 22hs, que nuevamente parecería estar mostrando un oscilador que continúa oscilando libremente en presencia de un sincronizador. Este fenómeno aunado al mencionado en las Figs. 10 y 11, apoya la idea de la existencia de al menos dos osciladores implicados en el RALM, uno de ellos que se hace evidente ante la luz pero que no parece

---

sincronizarse a ella y que quizá en los primeros estadfos es más robusto o está menos amortiguado.. que el segundo, el que se hace evidente en OO pero que podría ser susceptible a enmascaramiento ante el ciclo LO.

La interacción de los osciladores debe ser compleja, como lo es la organización de los mecanismos neuromotores, lo que permite a los animales caminar en todas direcciones a diferentes velocidades. Esta compleja interacción probablemente incide en los valores de dispersión obtenidos tanto para la fase, como para el período en condiciones de oscuridad constante y en LO. Probablemente los sistemas marcapasos del ritmo no se encuentran en una sola estructura, sino que están involucrados el tallo ocular a través del sistema órgano X-glándula sinusal y el ganglio supra esofágico como lo han señalado Page y Larimer (1975); Sandeman y Sandeman (1990). Los tiempos de maduración de ambas estructuras deben ser diferentes durante la ontogenia. El sistema órgano X-glándula sinusal no se hace funcional hasta los 28 días de edad (Fanjul-Moles et al, 1987) y tal vez la funcionalidad total del ganglio cerebroide medido por la estabilización del ciclo de la muda y la maduración sexual, no se alcanza hasta los 12 a 14 meses posteclosión (Suko, 1958) La ventaja del modelo ontogénico a pesar de su complejidad es que quizá puede evidenciar la maduración diferencial de los posibles osciladores involucrados en el RALM. Sin embargo, la presente tesis sólo puede aportar datos que hay que corroborar y comprobar tanto con otro tipo de experimentos, como prolongando los días de registro y la edad a la que se lleve a cabo.

---

**FALTA**

**PAGINA**

**55**

## **CONCLUSIONES**

- 1) Se observó una correlación positiva entre la maduración del RALM manifiesto durante la oscilación espontánea y la edad del animal.
- 2) La maduración del ritmo mediada por los parámetros del mismo parece darse hacia las 20 semanas de edad. A esta edad, el RALM obtenido en oscilación espontánea mostró un periodo promedio de 23.9 hs, una relación actividad reposo de 1.0 y una fase estable propia de un animal nocturno.
- 3) Durante la aplicación del ciclo LO 12:12, el RALM no mostró características bimodales claras. El Número de transitorios parece estar en relación directa con la edad. Por otra parte se observaron fenómenos de enmascaramiento y coordinación relativa.
- 4) Debido a todo lo anterior se propone que el RALM manifiesto sea resultado de dos o más osciladores.

---

## GLOSARIO

(tomado de Moore-Ede, 1982)

<b>Amplitud.</b>	Diferencia entre el valor medio y el máximo (o mínimo) en una oscilación sinusoidal.
<b>Cambio de fase.</b>	Desplazamiento de una oscilación a lo largo de un eje de tiempo. Puede ocurrir instantáneamente o después de algunos ciclos transitorios.
<b>Control de fase.</b>	Control del periodo y de la relación de fase de un ritmo por un zeitgeber.
<b>Coordinación relativa.</b>	Modulaciones en el periodo de un ritmo como resultado de la exposición a un zeitgeber débil para sincronizar al ritmo.
<b>Curva de respuesta de fase.</b>	Gráfica que indica el incremento y la dirección de un cambio de fase inducida por un estímulo único, dependiendo de la fase en la cual fué dado el estímulo.
<b>Desincronización.</b>	Pérdida de sincronización entre dos o más ritmos debido a que presentan periodos independientes.
<b>Fase.</b>	Estado instantáneo de una oscilación dentro de un periodo
<b>Fotoperiodo.</b>	Duración de la luz en un ciclo luz-oscuridad
<b>Frecuencia.</b>	Recíproco al periodo.
<b>Infradiano.</b>	Ritmo biológico con un periodo mayor al de los ritmos circadianos.
<b>Marcapasos.</b>	Entidad funcional, capaz de mantener oscilación autosostenida, la cual sincroniza a otros ritmos.

---

---

<b>Oscilador Secundario.</b>	Oscilador dentro de un organismo capaz de generar oscilaciones las cuales, usualmente son menos estables y persistentes que en un marcapasos. No es directamente sincronizable por zeitgebers y no necesariamente sincroniza a otros osciladores.
<b>Periodo.</b>	Intervalo de tiempo entre recurrencias de una fase definida del ritmo.
<b>Oscilación espontánea.</b>	Estado de un ritmo en condiciones constantes, es decir, en ausencia de agentes sincronizantes.
<b>Ritmo circadiano.</b>	Ritmo biológico autosostenido el cual en el ambiente natural del organismo es sincronizado a un periodo de 24 horas.
<b>Ritmo endógeno.</b>	Ritmo autosostenido generado dentro de un organismo.
<b>Ritmo exógeno.</b>	ritmo generado por influencia de una periodicidad ambiental sobre un organismo.
<b>Sincronizador.</b>	Sinónimo de Zeitgeber.
<b>Transitorios.</b>	Estado de oscilación temporal entre dos estados estacionarios.
<b>Ultradiano.</b>	Ritmo biológico con periodo más corto que el de los ritmos circadianos.
<b>Zeitgeber.</b>	Oscilación de parámetros ambientales los cuales sincronizan un ritmo autosostenido.

---

---

## BIBLIOGRAFIA

- Aréchiga H. , Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel F. y Leonardo Rodríguez-Sosa. 1992. The circadian System of Crustaceans. (Review). *Chronobiology International*. Vol 9 No 6. pp 001-019.
- Aschoff, J. (1954). Zeitgeber der tierischen tages-periodik. *Naturwissenschaften* 41:49-56.
- Aschoff, J. (1969). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Colds Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:11-28.
- Aschoff, J. (1974). Speech after dinner. Chronobiological aspects of endocrinology. En : Aschoff, J. Ceresa, F. y Halberg, F. *Chronobiological aspects in endocrinology. Cronobiologia. Suppl.* 1. 1:483-495.
- Aschoff, J. (1981). Free running and Entrained Circadian Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp.81-96.
- Bliss, D.E. (1962). Neuroendocrine Control of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis* *Mem. Soc. Endocrinol.* 12, 391-408.
- Block, G.D. (1976) Evidence for entrainable circadian oscillator in the abdominal ganglia of crayfish. *Neuroscience abstracts*, 2, 315.
- Brady, J. (1981). Behavioral rhythms in invertebrates. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp. 126.
- Brady, J. (1972b). The visual responsiveness of tsetse fly *Glossina morsitans* (Glossiniade) to moving object: The effect of hunger, sex, host odour and stimulus characteristics. *Bulletin of entomological research* 62, 257-279.
- Brady, J. (1974). The physiology of insect circadian rhythms. *Advances in Insect Physiology*. 10, 1-115.
-

- 
- Bünning, E. (1935). Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primärblättern von *Phaseolus multilobus* Jahrb wiss Bot. 81:411-418.
- Bünning, E. (1963). Die Physiologische Uhr. Berlin: Springer Verlag. (2a ed.)
- Buck, J. B. (1937). Studies on the firefly I. The effects of light and other agents on the flashing in *Photinus pyralis* with special reference to periodicity and diurnal rhythm. *Physiol Zoology*, 10:45-58
- Chapple, W.D. (1960). Light and the movement of crayfish. Master Thesis, Syracuse University.
- Davis Fred C. (1980). Circadian rhythmicity in the Wheel Running Activity of rodents: Factors affecting development of the pacemaker. Ph. D. Thesis, Univ. of Texas, Austin.
- Davis Fred C. (1981). Ontogeny of Circadian Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York.
- Enright T. J. (1981). Methodology. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp. 11-19.
- Enright T. J. (1990). Comparisons Between Periodograms and Spectral Analysis: Don't Expect Apples to taste Like Oranges. *J. Theor. Biol.* 143, 425-430.
- Fanjul-Moles M.L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart N. y Fuentes-Pardo. B. (1987) Circadian rhythm in the course of the ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 213-219.
- Fanjul-Moles M.L. y Fuentes Pardo B. (1988). Spectral sensitivity in the course of ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 91A: 61-66.
- Fanjul-Moles M.L., M. Miranda-Anaya, y Fuentes-Pardo. B. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during the ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii* *Comp Biochem. Physiol.* Vol 102A, N°1. pp.96-106.
- Fuentes-Pardo. B. e Inclán-Rubio, V. (1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman). *Comp Biochem Physiol.* Vol 68-A. pp 477-485.
-

- 
- Fuentes Pardo, B., Fanjul-Moles, M. L., y 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, pp 81-89.
- Halner G. S., Tokarski, T. y Hammond Sollis, G. (1982). Development of the crayfish retina : a light and electron microscopy study. *J. Morphol.* 173, 101-118.
- Halberg, F., Halberg E., Barnum, C. P.; (1959). Physiological 24 hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. En: Withrow, R. B. ed. *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals.* Washington, D. C. A.A.A.S. 55:803-878.
- Halberg, F. (1960). Temporal coordination of physiological function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol.* 25:289-310.
- Halberg, F., y Reinberg, A. (1967). Rythmes circadiens et rythmes de basses fréquences en physiologie humaine. *J. Physiol. (Paris)* 59:117-120.
- Halberg, F. (1967). Claude Bernard and the "Extreme variability of the internal milieu" E: Grade F. & Vissher, M. G. eds. *Claude Bernard and experimental medicine*, Cambridge Mass. Schenkman Publ. Company. pp. 193-210.
- Hawking, F. Gammage, K. y Worms, M.J. (1965). The periodicity of microfilariae, X. The relation between circadian temperature cycle of monkeys and microfilarial cycle. *Transaction of the Royal Soc. of Tropical Medicine and Hygiene.* 59, 675-680.
- Jacklet, J.W. (1969). Electrophysiological organization of the eye of *Aplysia*. *Journal of General Physiology*, 53, 21-42.
- Kalmus, H. (1938). Das Actogram des Flusskrebse und seine Beeinflussung durch Organextrakte. *Z. Vergl. Physiol.* 25.784-802.
- Loher, W. (1989). Temporal organization of reproductive behavior, en *Cricket Behavior Neurobiology*. F. Huber, T Moore, y W. Loher, eds. pp 83-114. Cornell Univ. Press. Ithaca NY.
-

- 
- Moore-Ede, M. C., F. M. Suizman, y Ch. A. Fuller. (1982). The Clocks that Time Us. Physiology of the circadian timing system. Harvard Univ. Press. 448 pp. Cambridge, Massachusetts, and London, England.
- Moore-Ede, (1981). Internal temporal order. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp. 215-238.
- Naylor, E., Williams, B. G. (1968). Effects of eyestalk removal on rhythmic locomotor activity in *Carcinus*. J. exp. Biol. 49: 107-116.
- Nowosielski, J. W. y R. L. Patton. (1963). Studies on circadian rhythm of the house cricket *Grillus domesticus*, L. J. Insect Physiol. 9:401-410.
- Page, T. L. y Larimer J.L. (1972). Entrainment of the locomotor activity rhythm in crayfish. J. Comp. Physiol. 78, 107-120.
- Page, T. L. y Larimer, J.L. (1975). Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. I. The locomotor activity Rhythm. J. Comp. Physiol. 97, 59-80.
- Page, T.L. (1981). Control of Circadian Rhythm in Invertebrates. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp.145-169.
- Page, T. L. y G.D. Boick, (1980). Circadian rhythmicity in cockroaches: Effects of early postembryonic development and aging. Physiol. Entomol. 5:271-281.
- Page, T. L. (1990). Circadian rhythms of locomotor activity in Cockroach Nymphs: Free Running and Entrainment. J. of Biological Rhythms, Vol 5, N° 4, pp. 273-289.
- Page, T. L. (1990 a). Circadian organization in the cockroach In Cockroaches as model for neurobiology: Applications in Biomedical research. I. Huber. Ed. pp 225-246. CRC Press Inc. Boca Raton FL.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 119-182.
-

- 
- Pittendrigh, C. S. (1961). On temporal Organization in living systems. Harvey Lect. ser. 56: 93-125.
- Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian systems: Entrainment. En: Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp.95-123.
- Pittendrigh, C. S. (1981). Circadian systems: General Perspective. En Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol 4, Biological Rhythms. Ed. Jürgen Aschoff. Plenum Press. New York. pp.57-77.
- Pittendrigh, C. S. y Daan. S. A. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. Stability and lability of spontaneous frequency. Journal of Comp. Physiol. 106:233-252.
- Reinberg, A. (1974). Des rythmes Biologiques à la Cronobiologie. Paris: Gaultier-Villars. (3rd. ed, 1979).
- Roberts, T.W. (1941). Evidences that hormonal inhibition of locomotion occurs for the crayfish *C. virilis* Hagen. Anat. Rec. (suppl.) 81: 46-67.
- Roberts, T.W. (1944). Light eyestalk chemical and certain other factors as regulators of community activity for the crayfish *Cambarus virilis*. Hagen Ecol. Mono. 14, 361-385.
- Sánchez, J. A. y Fuentes-Pardo, B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of electroretinogram in the isolated eyestalk in crayfish. Comp. Biochem Physiol. 56A, 601-605.
- Sandeman, D. C., R.E. Sandeman y H.G. de Covet. (1990) Extraretinal photoreceptors in the brain of crayfish (*Cherax destructor*) J. of Neurobiol. Vol. 21. Nº 4 pp. 619-629.
- Selinger, M., y Levitz, M. (1969). Diurnal Variation of total Plasma estriol levels in the pregnancy. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 29. 005-977.
- Smolensky, M. Halberg, F. y Sargent, F II. (1972). Chronobiology in the life sequence. En Ito S Ogata., K. and Yoshimura. H. eds. Advances in Climatic Physiology. Tokyo: Igaku Shoin. pp. 281-318.
- Sokolove, P.G. y Wayne N. B. (1978). The Chi square periodogram: Its Utility for analysis of circadian rhythms. J. Theor. Biol. 72,131-160.
-

- 
- Sukó, T., (1958). Studies in development of the crayfish. VI The reproductive cycle. Sci. Rep. Saitama Univ. 3(2):79-91.
- Tysches, P. H. y Fletcher, B. S. (1971). Studies on the rhythm of mating in the Queensland fruit fly *Dascus tryoni*. Journal of Insect Physiology, 17, 2319-2156.
- Truman, J. W. (1972). Physiology in insect rhythms. II. The silk moth brain as the location of the biological clock controlling eclosion J. Comp. Physiol. 81, 99-114.
- Tomloka, K. y Y. Chiba, (1982). Post embrionic development of circadian rhythm in cricket *Grillus bimaculatus*: a rhythm reversal. J. Comp. Physiol. 147:299-304.
- Von-Holst, E. (1939). Relative coordination as a phenomenon and as a method for análisis of central nervous functions. Ergeb. Physiol. 42:228-306.
- Wiedenmann, G. (1988). Circadian Timing of cricket calling song: A clock persisting from nymphs to adults. Physiol. Entomol. 13:111-129.
- Wiedenmann, G. y Martin, W. (1980). Running activity patterns of females and last larval instars of the cockroach *Leucophaea maderae*. Zelt. Naturforsch. 35c: 826-828.
- Woodring, J. P. y C. W. Clifford (1986). Development and relationship of locomotor, feeding oxygen consumption rhythms in house crickets. Physiol. Entomol. 11:89-96.
- Yagi, K. J. y W. Loher, (1986). Circadian locomotory rhythm and the influence of moulting in an Australian field cricket nymphs. Physiol. Entomol. 11:97-105.
-