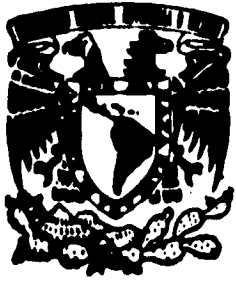


49
Res.



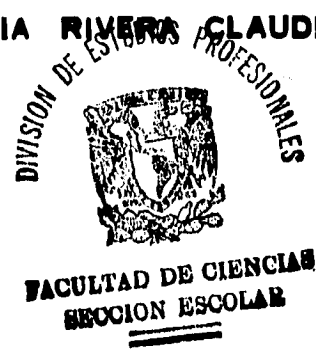
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**IDENTIFICACION DE SISTEMAS NEURALES
DURANTE EL DESARROLLO POSTEMBRIONARIO
DEL ACOCIL *Procambarus clarkii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A N I
ESCAMILLA CHIMAL ELSA GUADALUPE
GARCIA RIVERA CLAUDIA CAROLINA



MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Identificación de Sistemas Neurales Durante el Desarrollo
Postembrionario del Acocil Procambarus clarkii.

realizado por Escamilla Chimal Elsa Guadalupe y
García Rivera Claudia Carolina

con número de cuenta 8614005-8 y, pasante de la carrera de Biología.
8529984-7

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. María Luisa Fanjul Peña

Propietario Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales

Propietario M. en C. Viktor Javier Romero Díaz

Suplente Dra. María Genoveva González Morán

Suplente Biol. Oscar Castañón Cervantes

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena

Coordinador del Departamento.

GENERAL

INDICE

I. DEDICATORIA	A
II. AGRADECIMIENTOS	B
III. RESUMEN	C
IV. INTRODUCCION	
1. Características morfológicas del Sistema Nervioso del acocil adulto: Ganglio cerebroide	1
2. Características morfológicas del ojo y lóbulo óptico del acocil adulto	5
3. Desarrollo postembrionario	9
3.1. Etapa postembrionaria I (POI)	10
3.2. Etapa postembrionaria II (POII)	10
3.3. Etapa juvenil	12
3.4. Etapa adulta	12
4. Ontogenia del ritmo de sensibilidad visual en el acocil	14
5. Sustrato anatómico funcional del ritmo de amplitud electroretinográfico (ERG) en el acocil adulto	16
6. Serotonina y ritmos circadianos	20

VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
VII. HIPOTESIS	25
IV. OBJETIVO	26
V. MATERIAL Y METODO	
1. Montaje de acuarios	27
2. Extracción y tratamiento del ganglio cerebroide y lóbulos ópticos	29
3. Técnica de Inmunocitoquímica	30
VI. RESULTADOS	
1. Postembrionario I (POI)	31
2. Postembrionario II (POII)	39
3. Juvenil	45
4. Adulto	53
VII. DISCUSION	62

VIII. CONCLUSIONES	65
1. Etapa POI	65
2. Etapa POII	65
3. Etapa juvenil	65
4. Etapa adulta	66
IX. LITERATURA CONSULTADA	67

A MIS PADRES

ELSA Y ALBERTO

**A la memoria de mi mamá, que me ha
dado la fuerza para salir adelante, sabiendo
que siempre estará conmigo.**

**A mi papá por apoyarme y respetar las decisiones
que he tomado**

**Les agradezco a los dos por haberme dado la
vida y les dedico ésta tesis que es uno de mis
mayores anhelos.**

ELSA

AGRADEZCO A:

MI FAMILIA.

Mis abuelos, tíos y hermano

Por su apoyo moral, académico y económico

LEON.

Por estar conmigo en mis buenos y malos

momentos incondicionalmente, dándome

su cariño, apoyo y ayuda.

A MIS MAESTROS.

Que me han transmitido sus conocimientos

y me permitieron formarme como profesionalista

ELSA

A CONSUE Y DORO

**Gracias por su amor, confianza y dedicación,
por enseñarme a alcanzar y defender mis ideales,
por estar a mi lado siempre y por la libertad
que me han dado.**

A BEATRIZ, ADAN, HUGO, SAUL Y RAUL

Por sus locuras.

A DANIEL

Por su alegría

A TERE Y ROGE

Por su cariño.

CARO

AGRADECEMOS A:

La Dra Ma. Luisa por todo el apoyo académico, económico y moral que nos ha brindado en todo momento.

Dra. Ma. Luisa Fanjul Peña

Dra. Marcela Aguilar Morales

M. en C. Viktor Romero Díaz

Dra. Genoveva González Morán

Biol. Oscar Castañón Cervantes

Por la revisión y aportación de sus valiosas opiniones a este trabajo.

Todos los integrantes del laboratorio de Neurofisiología por su apoyo, en especial a Manuel, Julio y Oscar por su disposición incondicional ante nuestras dificultades y dudas.

Lab. de Morfofisiología Vegetal por permitirnos utilizar sus instalaciones.

Microcine, especialmente a Alejandro, Anabel y Antonio, por su apoyo en la toma de fotografías.

Don Chucho, por permitirnos utilizar el material del aula B- 003.

A nuestros amigos, por todos los momentos que compartimos desde el inicio de la carrera y por su apoyo y aliento durante todos estos años.

CARO Y ELSA

Por la libertad, así como por la horna, se puede y debe aventurar la vida.

Miguel de Cervantes

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGIA COMPARADA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS, U.N.A.M., BAJO LA
DIRECCION DE LA DRA. MARIA LUISA FANJUL PEÑA.**

III. RESUMEN

La serotonina (5-HT), ha sido propuesta como un neuromodulador en el desarrollo de sistemas neurales en el acocil, dentro de ellos se encuentran estructuras involucradas en la expresión del ritmo ERG. Este ritmo, en el acocil *Procambarus clarkii* muestra un periodo de naturaleza ultradiana durante la etapa postembrionaria I (POI), alargándose hasta llegar a ser circadiano aproximadamente a los 30 días de edad.

En este trabajo, se exploró la presencia de neuronas inmunorreactivas a serotonina, durante diferentes etapas postembrionarias del acocil *Procambarus clarkii*. Para ello, se realizaron cortes histológicos de lóbulos ópticos y ganglio cerebroide (protocerebro) que fueron incubados con un anticuerpo policlonal anti-serotonina.

Los resultados mostraron una inmunorreactividad positiva al anticuerpo desde las primeras etapas del desarrollo. La inmunorreactividad en el primer estadio fue difusa, manifestándose tanto en el interior como en el exterior de las estructuras propuestas como responsables del ritmo. Al ir avanzando el desarrollo va aumentando la especificidad de la reacción. Así mismo, se encontró la presencia del reflejo fotomotor a partir de la etapa postembrionaria II (POII).

Lo anterior sugiere que la serotonina puede tener un papel como neurotransmisor así como neuromodulador en las estructuras neurales y neuroendócrinas relacionadas con la expresión gradual del ritmo ERG, durante el desarrollo postembrionario de *Procambarus clarkii*.

V. INTRODUCCION

1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL ADULTO: GANGLIO CEREBROIDE

El acocil presenta el sistema nervioso central ganglionar en forma de escalera, característico de todos los crustáceos primitivos. Durante el desarrollo los ganglios se forman mediante la fusión de los diferentes pares embrionarios que se unen transversalmente mediante comisuras y longitudinalmente mediante conectivos. Es decir, el sistema nervioso esta formado por un doble cordón nervioso y una serie de ganglios pareados que van desde la región cefálica hasta la región caudal. La mayoría de estos ganglios dan lugar a tres pares de nervios, los dos primeros pares contienen tanto elementos motores como sensoriales, en tanto que el tercer par posee únicamente fibras motoras. Por debajo del esófago se encuentra un ganglio subesofágico, el cual representa seis ganglios cefalotorácicos fusionados y cuyos nervios inervan las piezas bucales. Todos los decápodos macruros, a los cuales pertenece el acocil, poseen un gran número de ganglios ventrales no fusionados, cinco torácicos y seis abdominales, de los cuales únicamente los primeros tres torácicos estan fusionados con el ganglio subesofágico.

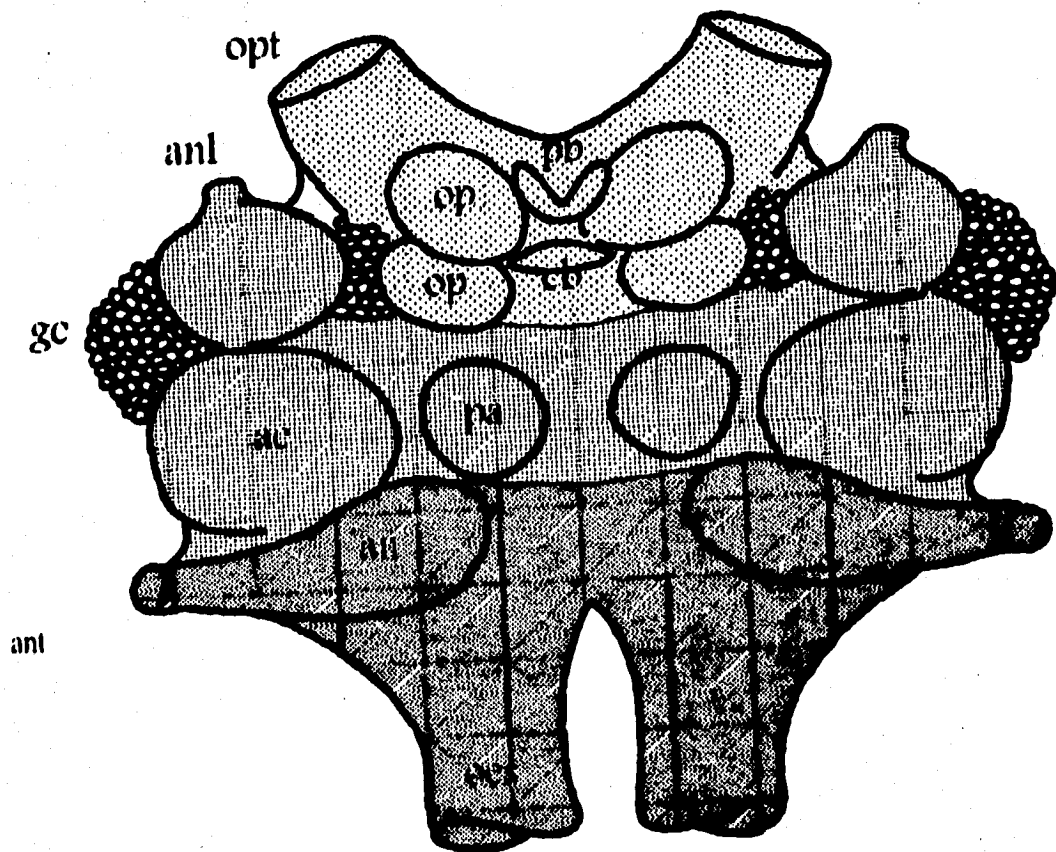
El primer ganglio torácico inerva los quelípedos, en tanto que del segundo al quinto ganglios se inervan los apéndices ambulatorios. Los ganglios abdominales del primero al quinto inervan los músculos extensores y flexores además de los pleópodos, el sexto los urópodos, el telson y la región anal del intestino posterior. La conexión entre los ganglios subesofágico y supraesofágico (ganglio cerebroide o cerebro) se lleva a cabo a través de los conectivos circumesofágicos. La división del ganglio cerebroide en proto, deuto y tritocerebro esta asociada a la evolución de los órganos de los sentidos anteriores. Nervios procedentes del protocerebro

inervan la región óptica, otros procedentes del deutocerebro las anténulas y aquellos que proceden del tritocerebro las antenas y el intestino.

El origen evolutivo del cerebro de los crustáceos ha sido sujeto de un debate considerable, pero es muy probable que el tritocerebro sea un ganglio segmental, previamente perteneciente al primer segmento torácico que se ha movido a la región anterior. Las dos regiones anteriores cerebrales anteriores pueden representar el "acrón" no segmentado o arquicerebro, el cual es homólogo al ganglio cerebral de la mayoría de los anélidos. Sin embargo, algunos investigadores consideran que estas regiones contienen ganglios segmentales que se han fusionado con el acrón original; el protocerebro y el deutocerebro, al igual que otras estructuras cefálicas emergen de numerosos rudimentos embrionarios que se han fusionado.

Por todo lo anterior, actualmente se considera que el ganglio cerebroide del acocil adulto representa por sí mismo una fusión de ganglios segmentados y en la mayoría de los artrópodos esta dividido en tres regiones: protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (Bullock y Horridge, 1965; Maynard, 1965) (Fig. 1). El protocerebro anterior esta constituido por dos lóbulos ópticos conectados al protocerebro medio por los tractos ópticos protocerebro medio, puente protocerebral y cuerpo central. El protocerebro medio consiste de cuatro lóbulos, dos anteriores y dos posteriores. El cuerpo central, un área de neuropilos especializada, está situada entre el par de lóbulos anterior y posterior. Su función se desconoce, pero probablemente tenga una función asociativa así como neuroendócrina (Sandeman, 1982). Además, se han descrito 8 neuronas gigantes inmunorreactivas a serotonina cuyos axones lo cruzan (Sandeman et al., 1988).

Por detrás del protocerebro se encuentra el deutocerebro. Sus neuropilos son: a) los lóbulos olfatorios, que reciben entradas quimorreceptoras, b) los neuropilos antenulares medios y laterales que reciben entradas de estatocistos y mecanorreceptores de las anténulas, c) los lóbulos accesorios, los cuales han sido relacionados con una función olfatoria y d) los lóbulos



opt = neurópilo óptico
 pb = puente protocerebral
 cb = cuerpo central
 ol = lóbulo olfatorio
 ac = lóbulo accesorio
 pa = lóbulo paraolfatorio

an = lóbulo antenal
 gc = células globulares
 anl = nervio antenular
 ant = nervio antenal
 oes = conectivos esofágicos

**Fig. 1.- Esquema del ganglio cerebroide de acocil adulto.
 (Redibujado de Sandeman y Luff, 1973).**

paraolfatorios cuya función no esta bien definida.

En el tritocerebro se encuentran el neuropilo tegumentario y los lóbulos antenales, que reciben terminaciones nerviosas tegumentarias del caparazón el primero, mientras que los segundos contienen interneuronas motoras y sensorias que controlan los movimientos antenales (Sandeman, 1990).

2. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL OJO Y LOBULO OPTICO EN EL ACOCIL ADULTO

El acocil adulto al igual que otros invertebrados posee ojos de tipo compuesto y pedunculados que se encuentran en la región anterodorsal del cuerpo, separados por el rostro. Cada ojo compuesto esta formado por 2 500 omatidias cada una de las cuales posee sus propios elementos ópticos (Stephen y Stowe, 1982). La superficie externa del ojo esta cubierta por la córnea, que es una cutícula transparente de aproximadamente 60 µm de ancho (Halström, 1966). Cada omatidia consiste de cuatro células corneágenas que dan lugar al cono cristalino, y un rabdomo principal largo en forma de huso compuesto por la asociación de los rabdomos individuales de ocho células retinulares, la membrana de cada una de las cuales se ha plegado extensamente en forma fibrilar para originar el rabdomo, área en la cual se concentra el pigmento fotosensible, la rodopsina. Los rabdomos individuales se fusionan para formar el rabdomo principal y una célula del tapetum, la cual está situada entre las porciones internas de la base de las células retinulares. El rabdomo principal entonces, está compuesto por capas de microvellosidades colocadas en ángulo recto una con respecto a la otra. Células pigmentarias, conteniendo gránulos de pigmento denso, rodean a cada cono cristalino, y dentro de estas células el pigmento se moverá de acuerdo con el grado de adaptación a la luz. Durante la iluminación intensa los gránulos de pigmento se extienden aislando a la omatidia de las omatidias vecinas y creando una imagen en mosaico. Un ligero cambio en la posición de un objeto estimulará otra omatidia y en esta forma, el ojo será sensible al movimiento del animal. A bajas intensidades de luz el pigmento se aleja de la zona clara y los rayos de luz de las diferentes omatidias pueden, por reflexión superponerse en un solo rabdomo; de este cambio resulta la formación de una imagen superpuesta. Cada una de las omatidias del ojo descansa sobre la membrana basal, la cual es perforada por axones de las células retinulares a través de las cuales se lleva a cabo la

información nerviosa por medio de las diferentes sinapsis a los lóbulos ópticos y al ganglio supraesofágico .A este conjunto de axones algunos autores le denominan nervio óptico . El lóbulo óptico del acocil contiene 17 000 axones, de la comunicación con el ojo y el cerebro depende la integración neural del sistema óptico.

Los principales constituyentes de los lóbulos ópticos son células ganglionares, neurópilos centrales, senos venosos, células sanguíneas y glia. Los neuropilos periféricos de los lóbulos ópticos son cinco: lámina ganglionaris, médula externa, médula interna, médula terminalis y cuerpo hemielipsoidal (Fig. 2).

La función de los lóbulos ópticos en especial de la lámina, médulas externa e interna, está relacionada con procesos visuales y pueden considerarse como parte de un órgano receptor, mientras que la médula terminal y el cuerpo hemielipsoidal, al derivar embriológicamente del protocerebro medio, podrían intervenir en la integración olfatoria (Sandeman, 1990).

Sobre la punta anterior de la médula terminalis, esto es, entre la médula interna y terminalis, se localiza una región de células ganglionares que se caracterizan por un gran núcleo (de 12 a 16 mm) y escaso citoplasma, a este conjunto de células se le conoce como órgano-X. En la periferia del tracto óptico, entre la médula externa e interna, se localiza una estructura neurohemal altamente vascularizada que contiene proyecciones de la médula externa, interna, quiasma óptico interno y del órgano-X así como la porción vascular de numerosas células sanguíneas la cual está integrada por axones y se conoce como glándula sinusal. Hay dos quiasmas ópticos, uno entre la lámina ganglionaris y médula externa y el otro entre las médulas.

El quiasma está formado por muchas fibras nerviosas procedentes de las neuronas situadas en diferentes áreas del ganglio que cruzan y entran al siguiente ganglio en un sitio opuesto a su punto de origen. El nervio o tracto óptico esta compuesto por paquetes de axones y células gliales y se origina como parte de la médula terminalis.

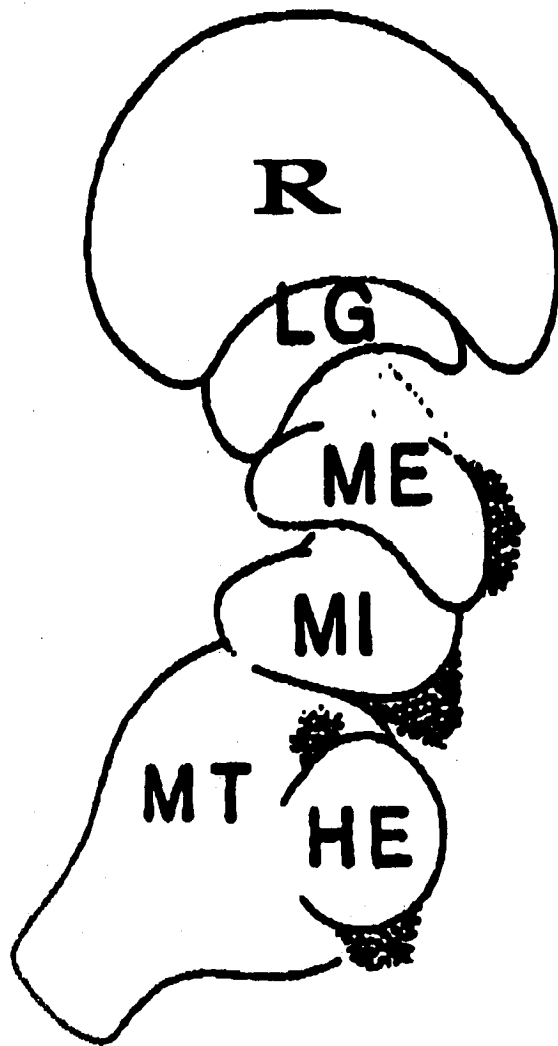


Fig. 2. Esquema de lóbulo óptico de acocil adulto. Retina (R), Lámina Ganglionaris (LG), Médula Externa (ME), Médula Interna (MI), Médula Terminalis (MT), Cuerpo Hemi-elipsoidal (HE), (Tomado de Sandeman et al., 1988)

Entre la membrana basal y la lámina ganglionaris hay una región compuesta de largos paquetes de axones que se originan de las células retinulares (Shivers, 1967), y que van a hacer sinapsis a la lámina ganglionaris, como se señaló anteriormente constituyen lo que algunos autores denominan nervio óptico.

Los elementos gliales generalmente forman una cobertura envolvente en todo el sistema nervioso y están formados por células que pueden ser confundidas con elementos neurales (Shivers, 1967), pueden rodear cuerpos celulares y fibras individuales en tractos y conectivos. No se conoce la manera en que la glia penetra en las fibras densas de los neurótipos en invertebrados (Trujillo-Céno, 1959). La glia ha sido considerada como soporte o elemento nutritivo (Wigglesworth, 1960), pero también ha sido implicada en el control del ambiente extracelular en los neurótipos (Hoyle, 1953; Twarog y Roeder, 1956; Treherne, 1961). Además la glia puede estar involucrada en la integración del sistema nervioso (Galambos, 1961).

Shivers (1967) describió cuatro clases de neuronas en base a los elementos granulares producidos en ellas:

a) Células neurosecretoras tipo 1, contienen gránulos delimitados por membrana y miden de diámetro entre 1000 a 1700 Å. Se localizan primariamente en el órgano X.

b) Células neurosecretoras tipo 2, contienen gránulos delimitados por membrana y miden de diámetro entre 1500 a 2000 Å. Parecen estar localizadas solo en médula terminalis.

c) Neuronas que contienen gránulos delimitados por membrana y cuyo diámetro es de 600 a 1000 Å. Estos gránulos se localizan en glándula del sinus. Los botones sinápticos además de los gránulos contienen vesículas claras de 300 a 500 Å de diámetro.

d) Neuronas cuyos procesos no contienen gránulos con membrana. Sus botones sinápticos contienen solo vesículas claras de 300 a 550 Å de diámetro, por lo que se cree que son vesículas sinápticas.

3. DESARROLLO POSTEMBRIONARIO

El acocil al igual que otros crustáceos malacostráceos, muestra un desarrollo directo y todos los estadios larvales se manifiestan durante la etapa embrionaria.

Los acociles de la especie *Procambarus clarkii* han evolucionado dentro de una serie de adaptaciones ideales para habitar temporalmente sistemas lénticos, los cuales periódicamente presentan lluvias abundantes, pero son secos en verano. Para poder habitar en estos ambientes y protegerse de sus depredadores, utilizan madrigueras. El apareamiento en esta especie se lleva a cabo en los meses de octubre y noviembre, época en la que la hembra tiene el ovario lleno de óvulos y el macho presenta en los conductos espermáticos una masa de color lechoso. El macho deposita un espermátforo en la superficie ventral de la hembra, poco tiempo después los huevecillos son liberados y fertilizados externamente y la masa de huevecillos se fija a los pleópodos por medio de una secreción adhesiva hasta la eclosión (Lowery, 1988), saliendo los acociles con un tamaño de aproximadamente cinco milímetros de largo. La cantidad de huevecillos es de 60 a 200 dependiendo del tamaño y la edad de la madre pudiendo llegar hasta los 250 (Hofmann, 1978).

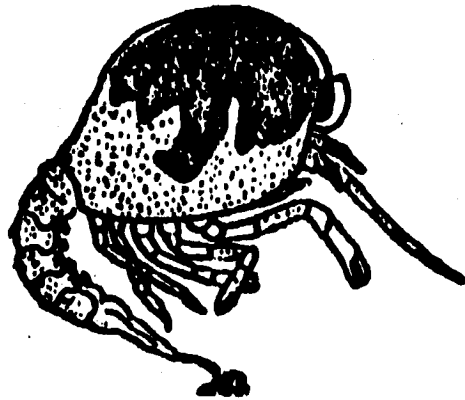
El crecimiento del acocil se lleva a cabo por medio de mudas, pasando por siete u ocho y hasta once mudas dependiendo de la temperatura del agua, hasta alcanzar la etapa de maduración sexual (Suko, 1958).

Tres semanas después de la oviposición se lleva a cabo la eclosión del huevecillo. Los embriones aparecen comprimidos contra la pared interna del corion, el cual se abre longitudinalmente y el primordio de animal aparece colgado entre las dos mitades del corion y se despoja el mismo de una membrana embrionaria, a este primer estado se le denomina estado postembrionario I ó POI (Sandeman y Sandeman 1990)

3.1. ETAPA POSTEMBRIONARIA I (POI). De la eclosión hasta 10 días después. El cefalotórax está lleno de vitelo, los ojos son sésiles y solamente un 25% de los fotorreceptores contiene pigmento. Las antenas y anténulas están curvadas posteriormente. El flagelo lateral de la antena es más largo que el medial y ambos están desprovistos de pelos sensorios, aunque en algunos animales pequeñas áreas del flagelo lateral puede representar quimorreceptores. Los dactilos de los 2 últimos pereópodos presentan un gancho. El telson y los urópodos no están aún diferenciados en apéndices separados (Sandeman y Sandeman, 1990) y se encuentran en el interior de una cubierta membranosa que adhiere el postembrión al corion. (Fig. 3a). Esta primera forma postembrionaria muda aproximadamente cinco u ocho días después a 22°C. Los animales salen de la exhubia y comienzan a nadar en el agua desprendiéndose y prendiéndose periódicamente a la madre. Esta muda convierte al animal en el segundo postembrión o POII.

3.2. ETAPA POSTEMBRIONARIA II (POII). De 10 a 14 días. Posee menos cantidad de vitelo en el cefalotórax y consecuentemente tiene una apariencia más delgada. Los ojos parecen pedunculados y la mitad de los fotorreceptores contienen pigmento. Las antenas son más largas que en POI, pero aún no presentan pelos receptores. El flagelo lateral de las anténulas es más largo que el medial. En esta etapa los animales tienen la capacidad para moverse libremente pero no son particularmente activos (Sandeman y Sandeman, 1990), (Fig. 3b). Al final de este periodo el animal se caracteriza por una disminución del vitelo y la aparición de gastrolitos en cada lado del estómago los cuales se pueden ver con facilidad pues el animal está cubierto por una cutícula transparente. Después de la muda el postembrión se convierte en un animal juvenil que tiene la apariencia de un adulto en miniatura.

a)



b)

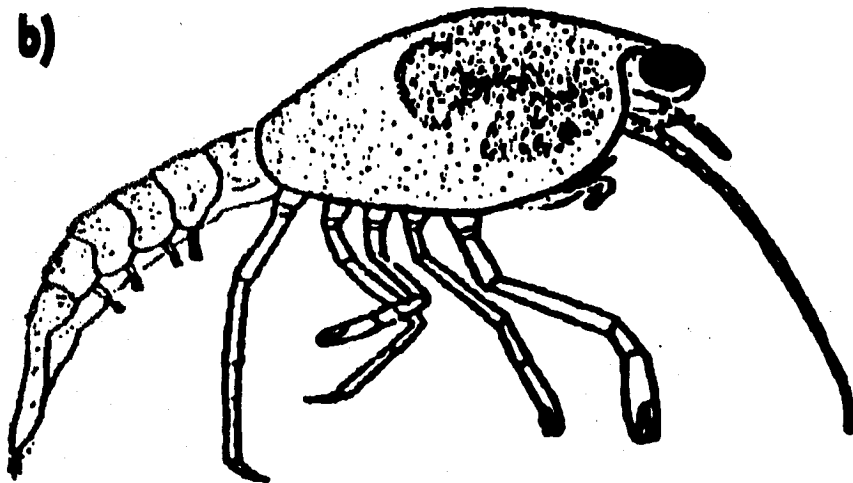


Fig. 3a Etapa del desarrollo postembrionario del acocil *Procambarus clarkii* : a. Estadío postembrionario I (POI); b. Estadío postembrionario II (POII) (Tomado de Andrews, 1922).

3.3. ETAPA JUVENIL. Son de color café verdoso, la primera forma juvenil es extremadamente móvil y toma el alimento del acuario a bien de poseer todavía vitelo almacenado en las glándulas digestivas. En este trabajo le llamaremos J1. Las antenas y las anténulas de este organismo poseen ya receptores pilosos, a pesar de que los pedúnculos son sésiles, característicos de las formas adultas. Esta primera forma juvenil tardará un año en alcanzar el estado adulto (Suko 1954; Castañón-Cervantes *et al.* 1995) durante el cual pasará por nueve mudas más hasta llegar a la madurez sexual.

3.4. ETAPA ADULTA. Los animales adultos son ovaes transversalmente con un rostro elongado y en forma de V y con abdomen relativamente angosto. Son de color rojo oscuro lateralmente y con frecuencia de color negro dorsalmente. El cuerpo esta cubierto por un exoesqueleto grueso y flexible compuesto por cutícula y epicutícula, el cual muda periódicamente hasta alcanzar el desarrollo final. Los machos presentan ganchos copulatorios en el tercer y cuarto par de pereópodos además el primer y segundo par de pleópodos para la manipulación del espermatóforo las quelas son de forma rectangular e infladas. Las hembras presentan un receptáculo seminal (*annulus ventralis*) "cornificado" localizado en la base del cuarto y quinto par de pereópodos. La longitud total puede ir desde los 45 mm hasta 125 mm o más (Huner, 1988). (Fig. 3c).



4. ONTOGENIA DEL RITMO DE SENSIBILIDAD VISUAL EN EL ACOCIL.

La ontogenia estudia la historia vital de los organismos desde la fertilización hasta la maduración funcional de todos los aparatos y sistemas, así como la degeneración de los mismos a través de la edad hasta la muerte. Son muchas las funciones de un ser vivo que muestran una ritmicidad circadiana, por lo tanto la ontogenia de una función rítmica incluirá la emergencia del ritmo como tal, así como cambios en sus características a través de la edad.

Los diferentes ritmos circadianos que se manifiestan en un animal no son independientes los unos de los otros, ya sea que estén controlados por un solo marcapaso circadiano o por muchos. Estos ritmos se encuentran organizados temporalmente unos con respecto a los otros, así como con el medio ambiente. Los marcapasos, las vías a los ritmos evidentes, así como los mecanismos de sincronización de estos ritmos, con el ambiente, son todos parte del "sistema circadiano" que delinea, no únicamente, la organización temporal interna de múltiples funciones, sino también la notable capacidad de los organismos para medir, en forma precisa y adaptativa el paso del tiempo astronómico.

Para que un ritmo circadiano se exprese es necesario que al sustrato anatómico funcional en el cual se origina haya alcanzado la madurez y se establezcan las relaciones funcionales necesarias entre los distintos elementos por medio de los cuales se expresan Rensing, 1965; Deguchi, 195 ; Davis, 1981).

Debido a lo anterior las características de los ritmos cambian durante el desarrollo; el periodo, la amplitud del ritmo, la fase y el nivel de oscilación son algunas de las características circádicas que cambian durante la ontogenia de los organismos (Rensing, 1965). La variación de estos parámetros parece involucrar cambios en la organización del marcapaso y los efectores por medio de los cuales se expresan los ritmos.

Un ritmo circadiano que ha sido bien caracterizado es el ritmo de sensibilidad visual del acocil, el cual se puede detectar mediante los cambios de amplitud en la respuesta del ojo del animal a un destello de prueba de intensidad constante (electrorretinograma, ERG). Este ritmo se ha caracterizado en diferentes especies de acocil, en estado adulto, tanto en los fotorreceptores retinianos como en las interneuronas visuales del acocil (Aréchiga y Wiersma, 1969; Aréchiga *et al.*, 1973) así como en diferentes especies de acociles del género *Procambarus* en desarrollo (Fanjul-Moles *et al.*, 1987; Fanjul-Moles *et al.*, 1992; Fuentes-Pardo *et al.*, 1992).

Durante el desarrollo postembrionario las características del ritmo ERG cambian (Fanjul-Moles *et al.*, 1987). Después de la eclosión en los animales más jóvenes (estado POI) este ritmo es de naturaleza ultradiana oscilando con un periodo de 15 min a 4 horas. El periodo del ritmo se va alargando durante el crecimiento del animal (segundo y tercer estadios, POII y A2) pero se conserva siempre con características ultradianas, hasta aparecer un ritmo circadiano aproximadamente a los 30 días de edad. Sin embargo, las características de los parámetros del ritmo (periodo, fase y amplitud) no alcanzan su madurez hasta que el animal tiene 140 días de edad postembrionaria.

5. SUSTRATO ANATOMICO FUNCIONAL DEL RITMO ERG EN EL ACOCIL ADULTO

El ERG (electrorretinograma) es la respuesta extracelular del ojo ante un estímulo luminoso. Esta respuesta se origina como una diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo activo en o cerca del ojo y un electrodo indiferente. Esta diferencia de voltaje (recogida por el electrodo extracelular) producida por todas las estructuras visuales del ojo del acocil como son las omatidias, y en especial el rabdomo y las células retinulares, puede ser registrada debido a que el líquido extracelular se comporta como conductor de volumen homogéneo ante el estímulo fótico. Las características del ERG y especialmente su magnitud cambian en relación con la intensidad del estímulo luminoso.

Esta diferencia de voltaje a un pulso de intensidad constante, cambia en el animal adulto de la noche al día en condiciones constantes, existiendo una diferencia de 600 a 700 microvoltios entre el ERG del animal durante las horas de la mañana y de la noche. A este cambio se le conoce con el nombre de ritmo de amplitud del ERG y tiene una duración de aproximadamente 24 horas en condiciones constantes. Es decir, es un ritmo circadiano (Aréchiga *et al.*, 1970).

Aréchiga *et al.* (1992) proponen que la amplitud de la respuesta del ojo de un animal adulto, a un pulso de intensidad constante depende de la actividad fisiológica de tres tipos de estructuras, 1) la ganancia de los fotorreceptores, 2) la posición de los pigmentos proximales (PP) (pigmentos que se encuentran dentro de las células retinulares), los cuales en la oscuridad constante se retraen hacia la membrana basal, permitiendo que la superficie del fotorreceptor se exponga a la entrada luminosa; estos mismos pigmentos bajo una condición de luz constante se dispersan blindando a los fotorreceptores de la luz. 3) la posición de otro tipo de gránulos de pigmento blindante, el pigmento distal (PD), el cual se encuentra colocado dentro de un conjunto de células largas y esbeltas que están colocadas paralelamente a los fotorreceptores, y que cubren

la longitud total de la retina. Estos pigmentos también se retraen en la oscuridad constante o durante la noche, y se dispersan bajo iluminación constante o durante el día. Se ha demostrado que el pigmento proximal mantiene un ritmo circadiano de cambio de posición bajo la oscuridad continua (Bennet, R., 1983) y el pigmento distal lo hace tanto en DD (oscuridad constante) como en LD (luz-oscuridad) (Welsh, 1930).

La fisiología del PP y del PD son muy diferentes (Aréchiga, 1977). La respuesta del pigmento proximal a la luz posee un umbral mucho más bajo que el del pigmento distal. El pigmento proximal migra como una respuesta directa de los fotorreceptores a la luz y a la oscuridad (Olivo, 1978; Frixione *et al.*, 1979). Las células del pigmento distal, en cambio, no son reactivas a la luz sino sensibles a las neurohormonas liberadas como una respuesta a la luz y a la oscuridad. Un péptido, la hormona dispersora del pigmento distal (HDP) se libera durante la iluminación y promueve la dispersión del pigmento distal (Aréchiga *et al.* 1992). Por el contrario otra hormona, la hormona concentradora de eritróforos (HCE) (Ferlund y Joseffson, 1972) se ha demostrado que retrae el pigmento distal durante la oscuridad. Ambas hormonas se producen en el pedúnculo ocular.

El comportamiento de los dos lotes de pigmentos bajo condiciones constantes es algo diferente. En tanto que el pigmento proximal muestra variaciones circadianas de considerable amplitud bajo oscuridad constante, cambia muy poco bajo la iluminación constante (110 lux) y permanece la mayor parte del tiempo disperso. En cambio el pigmento distal varía mucho durante la iluminación constante y permanece retraído durante la oscuridad. La posición de los pigmentos proximal y distal determina en gran medida la responsividad de los fotorreceptores retinianos a la luz (Rodríguez-Sosa *et al.*, 1982). Debido a las diferencias en el comportamiento de los dos pigmentos se ha concluido que en oscuridad constante la sensibilidad retiniana se mantiene principalmente debido a los ritmos de la sensibilidad del fotorreceptor y la migración

del pigmento proximal. En cambio en luz constante el ritmo del pigmento distal es el elemento principal, y quizá el único que contribuye a la ritmicidad.

El ritmo circadiano de amplitud del ERG se ha confirmado en los dos tallos oculares aislados (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977) y aún en retinulas aisladas (Noguerón y Aréchiga, 1987). Sin embargo la amplitud del ritmo es menor que en el animal íntegro debido a que aunque persiste la ritmicidad de los fotorreceptores retinianos (fototransducción y posición del pigmento proximal) falta el ritmo del pigmento distal.

Para que un ritmo circadiano se manifieste se requiere la sincronización de la ritmicidad de los efectores a través de los cuales se expresa el ritmo. Se han propuesto dos tipos de marcapaso como posibles sincronizadores del ritmo ERG, el pedúnculo ocular para la sincronización unilateral y el ganglio supraesofágico (GSE) como un probable sincronizador bilateral. Puesto que los pedúnculos oculares están conectados al GSE a través del nervio óptico, una serie de experimentos de ablación y de corte parecen apoyar la hipótesis de que la supresión de la acción del GSE destruye el componente del ritmo ERG dependiente del pigmento distal, en tanto que se preservan los componentes dependientes del pigmento proximal y de los fotorreceptores retinianos, los cuales parecen ser capaces de generar sus propias señales circadianas. Sin embargo aunque cada pedúnculo ocular sea independiente, se requiere un mecanismo de sincronización bilateral sobre estos procesos rítmicos, procesos que parecen persistir tanto en tallos oculares aislados como en retina aislada, pero con mucha menos amplitud que en el animal adulto.

Se han sugerido dos vías posibles de sincronización bilateral. Una vía hormonal que muy probablemente exista en el animal adulto intacto, puesto que ambos pigmentos accesorios responden a agentes hormonales como la HDP, la HCE y la serotonina (5HT), y una vía axonal la cual está sustentada en la presencia de axones procedentes del GSE y de fibras eferentes que

corren a través del nervio óptico a la retina y hacen contactos con los axones de los fotorreceptores retinianos. Algunos de estos axones contienen serotonina (Aréchiga *et al.*, 1990).

Los elementos celulares responsables de la génesis y/o sincronización de este ritmo en el ganglio supraesofágico no se han encontrado todavía. Se han propuesto diferentes locus, el lóbulo olfatorio en el tritocerebro (Page y Larimer II, 1975) así como regiones más rostrales en el protocerebro (Barrera-Mera, 1976). Recientemente Sandeman *et al.* (1990) han descrito dos grupos de fotorreceptores extrarretinianos a lo largo del margen anterior del ganglio cerebroide en el acocil *Cherax destructor* adulto. Los axones de estas células terminan en el neurópilo del puente protocerebral, en elementos neurales que presentan inmunorreactividad anti-serotonina. En un trabajo previo (Sandeman *et al.*, 1988), se reportaron fibras inmunorreactivas a 5-HT proyectando desde el puente protocerebral a la médula externa y a la región de la glándula sinusal. Sandeman *et al.* (1990) han propuesto a los fotorreceptores extrarretinianos como una entrada sincronizante directa para los ritmos circadianos de este animal. Todo lo anterior hace pensar en la serotonina como un modulador muy importante dentro del rompecabezas que representa la integración del ritmo ERG.

6. SEROTONINA Y RITMOS CIRCADIANOS

La participación de neurohormonas en el control de los ritmos circadianos ha sido estudiada por varias décadas. Se ha encontrado que el pedúnculo óptico contiene muchas de estas sustancias (Aréchiga *et al.*, 1992), entre ellas: hormona hiperglicémica, hormona de dispersión del pigmento, hormona neurodepresora, hormona concentradora del pigmento rojo, hormona inhibidora de las gónadas y 5-hidroxitriptamina (serotonina). De éstas, la serotonina ha sido relacionada con la posición del pigmento proximal en la retina, la amplitud del electroretinograma y la actividad locomotora. Por medio de estudios histológicos e histoquímicos, se han identificado células neurosecretoras localizadas en el pedúnculo óptico, en particular un grupo de neuronas que forman el órgano-X. Sus axones corren distalmente a un órgano neurohemal, la glándula del sinus, la cual actúa como un órgano de liberación y almacenamiento de algunas de estas hormonas (Aréchiga *et al.*, 1985).

También a través de estos estudios se ha sugerido la posibilidad de que dichas sustancias no solo jueguen un papel como neurohormonas sino que además tengan una función de neuromoduladores locales.

La serotonina es una monoamina encontrada en diferentes ganglios del sistema nervioso central así como en los pedúnculos y la hemolinfa de los crustáceos. Se forma a partir del aminoácido triptofano, que por acción de una primera enzima, la triptofano hidroxilasa se transforma en 5-Hidroxitriptofano, el cual a su vez por efecto de la 5-Hidroxitriptofano descarboxilasa se convierte en 5-Hidroxitriptamina (serotonina) (Fig. 4).

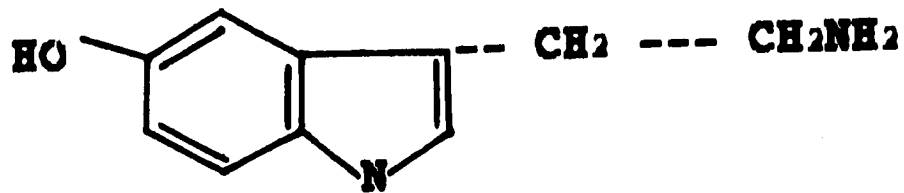


Fig. 4 Estructura química de la serotonina (5-Hidroxitriptamina)

Esta monoamina afecta la actividad de las motoneuronas en los ganglios centrales y la transmisión neuromuscular periférica. Es una neurohormona y/o neurotransmisor que modula la liberación de neurosecreciones, cambia la fase del ritmo circadiano de la actividad del nervio óptico en *Aplysia* e incrementa la sensibilidad visual en *Limulus* (Aréchiga *et al.*, 1990).

Los fotorreceptores retinianos juegan un papel muy importante en la sensibilidad visual de los acociles, ya que responden a la luz principalmente durante la noche, pudiendo esto deberse a cambios en la admitancia de la luz por el ojo compuesto.

Lo anterior depende principalmente de la posición de los gránulos de los pigmentos accesorios que migran longitudinalmente en respuesta a la intensidad de la luz.

Relacionado con esto, se ha observado que la concentración de serotonina durante la noche aumenta dando como resultado un incremento en la sensibilidad de los fotorreceptores ya que influye en la retracción del pigmento distal (Aréchiga *et al.*, 1990). Lo anterior podría indicar su papel como modulador en la fase nocturna del ciclo circadiano en la retina del acocil.

En el cerebro de *Cherax destructor*, la primera expresión de neuronas serotoninérgicas se da en un 75 a 80% del desarrollo, es decir, durante los tres primeros estadios del desarrollo postembrionario. Esta temprana aparición de células serotoninérgicas y su persistencia durante la ontogenia del acocil, puede estar relacionada no solo con la función neuromoduladora de varios

sistemas neurales, sino también para mantener la habilidad del animal para regenerar apéndices y receptores (Sandeman & Sandeman, 1990).

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Numerosos autores han sugerido que una variedad de fenómenos ambientales pueden funcionar como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos, entre ellos está la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento y las señales sociales. De todas ellas, las variaciones de iluminación del ciclo día-noche, presentan la mayor estabilidad de su periodo, por lo que se considera como la principal señal ambiental de sincronización.

Fanjul-Moles *et al.* (1987) y Fuentes-Pardo *et al.* (1992), propusieron que la tardía expresión del ritmo ERG en el acocil en desarrollo, podría ser debida en parte a cambios en la maduración de los efectores (fotorreceptores, pigmento distal, pigmento proximal) y/o el tardío desarrollo del sistema neuroendócrino, y en particular del órgano X- glándula sinusal, eje que se proponía como un posible sincronizador del ritmo. Así mismo, se piensa que estructuras como el puente protocerebral y neurópilos del lóbulo óptico como son la médula externa y lámina ganglionaris podrían jugar un papel preponderante tanto en la expresión circadiana del ritmo como en la maduración de los parámetros del mismo.

Considerando que los pedúnculos funcionan como marcapaso circadiano, faltaría explicar como los ritmos son sincronizados en ellos. Ambos pedúnculos están conectados al ganglio supraesofágico por medio de los nervios ópticos, de esta forma, el ganglio contribuye en la integración de los ritmos circadianos (Aréchiga, 1992). Barrera-Mena (1976), observó que el ritmo de respuesta retiniana en el acocil estaba presente aún después de haber sido aislado el ganglio supraesofágico.

Se sugieren dos posibles rutas para la sincronización del ritmo retinal. Existe una ruta hormonal en el animal intacto, desde el momento en que ambos pigmentos blindantes son sensibles a agentes como la DPLH, RPCH (hormona concentradora del pigmento rojo) y 5-HT (5-hidroxitriptamina). Una segunda posibilidad de ruta es un acoplamiento axonal, esto se apoya en

evidencias como la presencia de axones que corren de un lado del ganglio supraesofágico al otro, fibras eferentes en el nervio óptico y fibras eferentes que llegan a la retina y hacen contacto con los axones de los fotorreceptores. Algunos de estos axones reaccionan a serotonina (Aréchiga *et al.*, 1990).

Sandeman *et al.* (1990), han propuesto a la serotonina como un posible modulador de los procesos rítmicos en el acocil *Cherax destructor*. Frixione y Hernández (1989) han comprobado una acción moduladora de la serotonina sobre la posición del pigmento proximal del ojo aislado del acocil adulto. Aréchiga *et al.* (1990) han propuesto que la serotonina aumenta la respuesta de los fotorreceptores retinianos a la luz durante la fase nocturna del ritmocircadiano de la retina de acocil, debido a que este neuromodulador favorece la retracción del pigmento proximal. Estos autores reportaron también un efecto directo de esta amina sobre la conductancia de la membrana encontrando un conjunto de axones inmunorreactivos a 5-HT en la lámina ganglionaris. ganglio supraesofágico aún se desconocen. Sandeman y Sandeman (1990) reportan que en el ganglio cerebroide del acocil *Cherax destructor* la primera expresión de neuronas serotoninérgicas se presenta entre el 75 y 80% del desarrollo.

Lo anterior hace necesario un estudio tanto histomorfométrico como inmunocitoquímico, a través de las primeras etapas del desarrollo del acocil *Procambarus clarkii* para poder establecer si hay un momento en el cual la maduración neural pudiera coincidir con los cambios en las características fisiológicas de los ritmos sensores mencionados anteriormente.

VI. HIPOTESIS

Si la aparición de neuronas inmunorreactivas a serotonina en estados tempranos del desarrollo se presenta en *Procambarus clarkii* de la misma forma que ha sido reportado para *Cherax destructor*, es muy posible que la serotonina juegue un papel muy importante como modulador en el desarrollo de los sistemas neurales del acocil, lo cual podría estar relacionado con la maduración de los procesos fisiológicos involucrados en la expresión del ritmo circadiano de ERG.

VII. OBJETIVO

Determinar posibles cambios en el grado de inmunorreactividad a la serotonina en estructuras relacionadas en la expresión del ritmo ERG durante las primeras etapas postembrionarias así como en los animales juveniles y adultos del acocil *Procambarus clarkii*.

VIII. MATERIAL Y METODO

1. MONTAJE DE ACUARIOS.

Los acuarios en los que se encontraban los animales para experimentación medían 70 x 40 x 33 cm, contaron con un filtro biológico, formado por una placa de acrílico con dos orificios (en esquinas opuestas), en los que se colocó un tubo y una manguera para la aireación de los mismos, además toda la placa presentaba pequeños orificios a cada 2.5 cm. Toda la placa se cubrió con grava, la cual fue lavada previamente y posteriormente se colocó una capa de arena fina lavada y tamizada. Como fuente de carbonato de calcio para los organismos se utilizaron trozos de coral (Fig. 5). El fotoperiodo bajo el cual estuvieron expuestos los animales fue 12:12 (doce horas luz, doce horas oscuridad). La temperatura del agua en los acuarios fue de $22.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Los animales se alimentaron dos veces a la semana con verduras cocidas y una vez a la semana con filete de pescado crudo y desmenuzado.

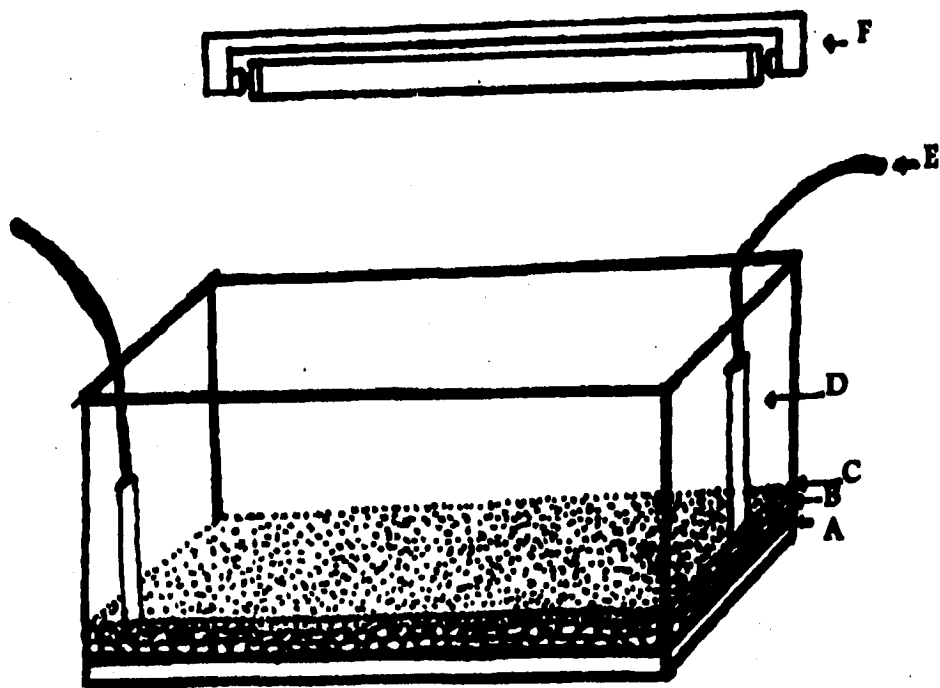


Fig. Esquema de los acuarios utilizados durante el experimento.

- A) Capa de acrilico, B) Capa de grava,
- C) Capa de arena, D) Tubo de aeración
- E) Mangera y F) Lámpara

2. EXTRACCION Y TRATAMIENTO DE GANGLIO CEREBROIDE Y LOBULOS OPTICOS

Se utilizaron un total de 20 animales de la especie *Procambarus clarkii*, en la siguiente proporción: 5 del estadio postembrionario I (POI), 5 del estadio postembrionario II (POII), 5 juveniles y 5 adultos.

Todos los animales fueron anestesiados con frío (introduciéndolos en el refrigerador) a la misma hora del día. Los de la etapa POI fueron manipulados en forma completa, los POII fueron despojados del cefalotórax únicamente, mientras que en los juveniles y adultos se disecó el ganglio cerebroide y los tallos oculares (Fig. 6). Los ojos de los animales juveniles y adultos fueron pelados, eliminándose de esta forma la capa quitinosa que los recubre (para poder realizar los cortes).

En todos los estadios la fijación se llevó a cabo con formaldehído al 10% durante 12 horas, posteriormente se deshidrataron en alcoholes graduales con los siguientes tiempos: 50% 24 horas, 70% 24 horas, 96% 12 horas y 100% 12 horas, aclarándose el tejido en xileno por 30 minutos e incluyéndose en paraplast (Oxford Labware) durante 12 horas dentro de una estufa a 59°C para ser incluido en un bloque al final de este tiempo.

Con un microtomo (American Optical modelo 820) se realizaron cortes longitudinales de 4 mm de espe. espesor. Los cortes se desparafinaron en xileno por 25 minutos y se prosiguió a rehidratarlos en alcoholes graduales: 100% 10 minutos, 96% 10 min., 70% 5 min. y 50% 5 min. para llegar finalmente a agua destilada.

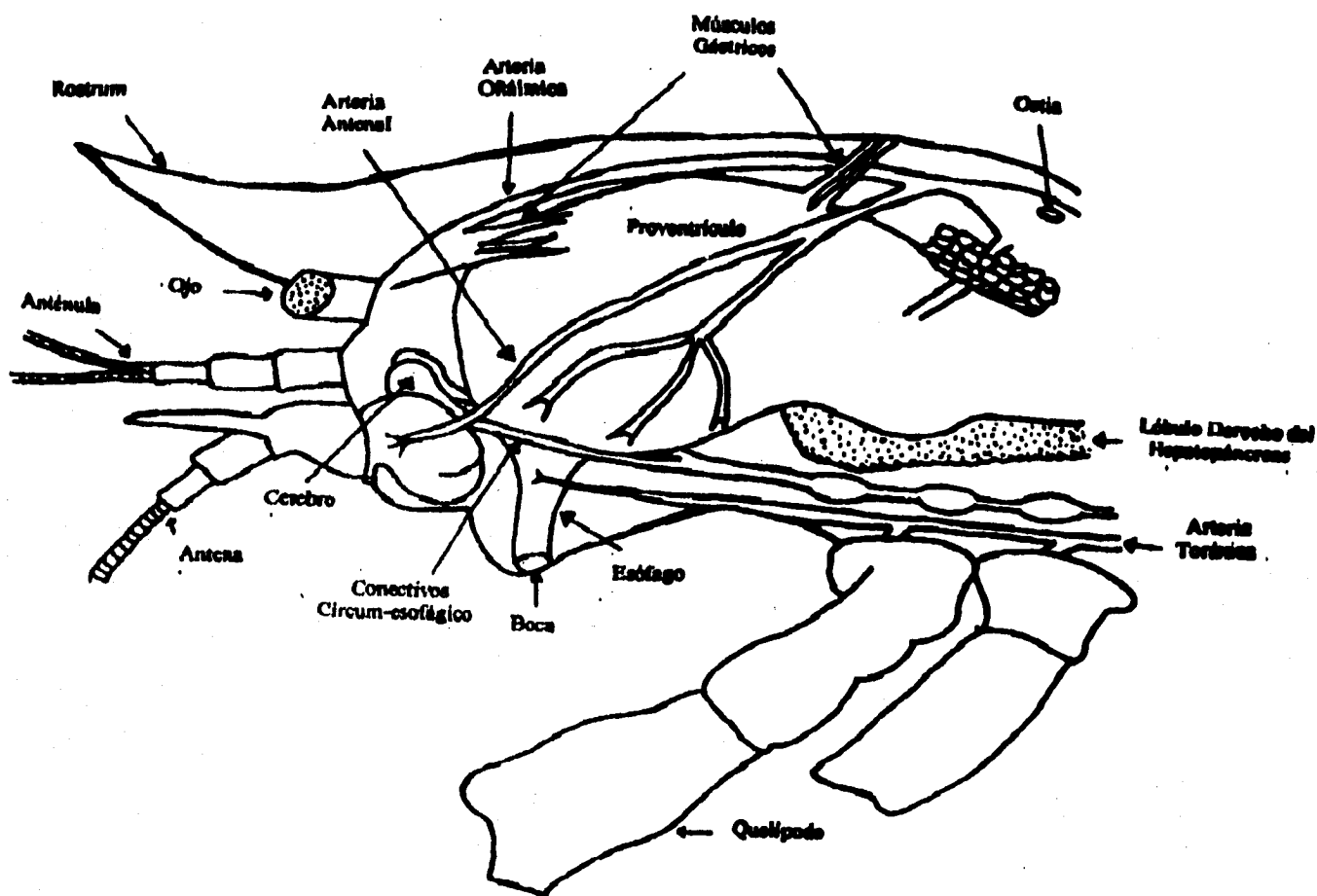


Fig.6 Esquema de la región anterior de un acocil donde se muestra la posición del ganglio cerebroide y los pedúnculos oculares.
 (Redibujado de Holdich, 1988.)

10.3. TECNICA DE INMUNOCITOQUIMICA.

Las laminillas fueron colocadas en una cámara húmeda a temperatura ambiente, en donde se trataron de la siguiente manera: (*1) bloqueador de proteínas por 30 minutos, se incubaron con un anticuerpo policlonal primario antiserotonina (Bio Genex) (1:80) durante 30 min. (*1), posteriormente con un anticuerpo secundario de IgG de conejo marcado con estreptavidina (Multilink) durante 20 min. (*1), con una fosfatasa alcalina biotinilada por 20 min. (*1), se prosiguió a revelar la reacción con un cromógeno (Rojo rápido) con Levamisole (para evitar la reacción de fondo) en 40 min. aproximadamente (*1), Para contrastar la reacción siguió un baño de hematoxilina de Mayer de 5 min. Después se sacaron de la cámara húmeda y se lavaron con agua corriente, prosiguiendo a esto un baño con agua amoniacal de 10 segundos, se colocaron posteriormente en agua de la llave, se limpiaron y se montaron en un medio acuoso (Vikel).

Las preparaciones fueron observadas para su análisis en un microscopio óptico (Labophot-2 Nikon), detectando las zonas en donde se presentó una reacción positiva al anticuerpo contra serotonina. Las microfotografías fueron tomadas con una cámara de 35 mm (FX-35 DX Nikon).

NOTA (*1) Todas las preparaciones fueron lavadas en buffer PBS a pH 7.6 de 5 a 10 minutos.

IX. RESULTADOS

1. ETAPA POSTEMBRIONARIA I (POI)

En los cortes histológicos se encontró que en la forma POI ya se puede observar un gran desarrollo de los lóbulos ópticos del acocil y un cierto desarrollo del cerebro (Fig. 7). En esta forma, los ojos sésiles y los dos lóbulos ópticos parecen estar unidos por la parte central. La longitud del tallo ocular en su eje proximal es muy corto en comparación con los otros estadios. La superficie distal está ligeramente redondeada. En la figura 8, se puede observar la retina en pleno desarrollo (células en proliferación), detrás de la cual pueden observarse cuatro neurópilos. En primer lugar, inmediatamente por detrás de la retina esta la lámina ganglionaris, le siguen la médula externa, médula interna y la médula terminalis.

Se puede observar cierta diferenciación de las células en la retina posterior lo que origina que las células del cono cristalino ocupen la mitad distal de la retina y se extiendan hacia los rabdómeros que se encuentran localizados más proximalmente.

Los rabdómeros son largos y claramente visibles, se extienden hacia una clara membrana basal que delimita a la retina. Por debajo de la retina posterior se localizan los axones de las células retinulares que se extienden para formar la membrana basal subdividiendo el espacio vascular y la lámina ganglionaris; por debajo de la capa superficial anterior se encuentra el espacio vascular.

La formación del pigmento accesorio proximal en las células retinulares es muy pronunciada en la región posterior de la retina. El citoplasma de las células retinulares que rodea los rabdómeros esta lleno de pigmento el cual se extiende hacia los axones que atraviesan la membrana basal. En esta zona se pudo localizar una fuerte inmunorreatividad en el citoplasma de las células retinulares (granos fuertemente teñidos en rojo), así como en el pigmento distal de

**Fig. 7.- Panorámica de lóbulos ópticos y ganglio cerebroide.
Retina (R), Lámina Ganglionaris (LG), Médula Externa (ME),
Médula Interna (MI), Médula Terminalis (MT) y Ganglio
Cerebroide (GC). Estadio POI. 100 X. I-H.**

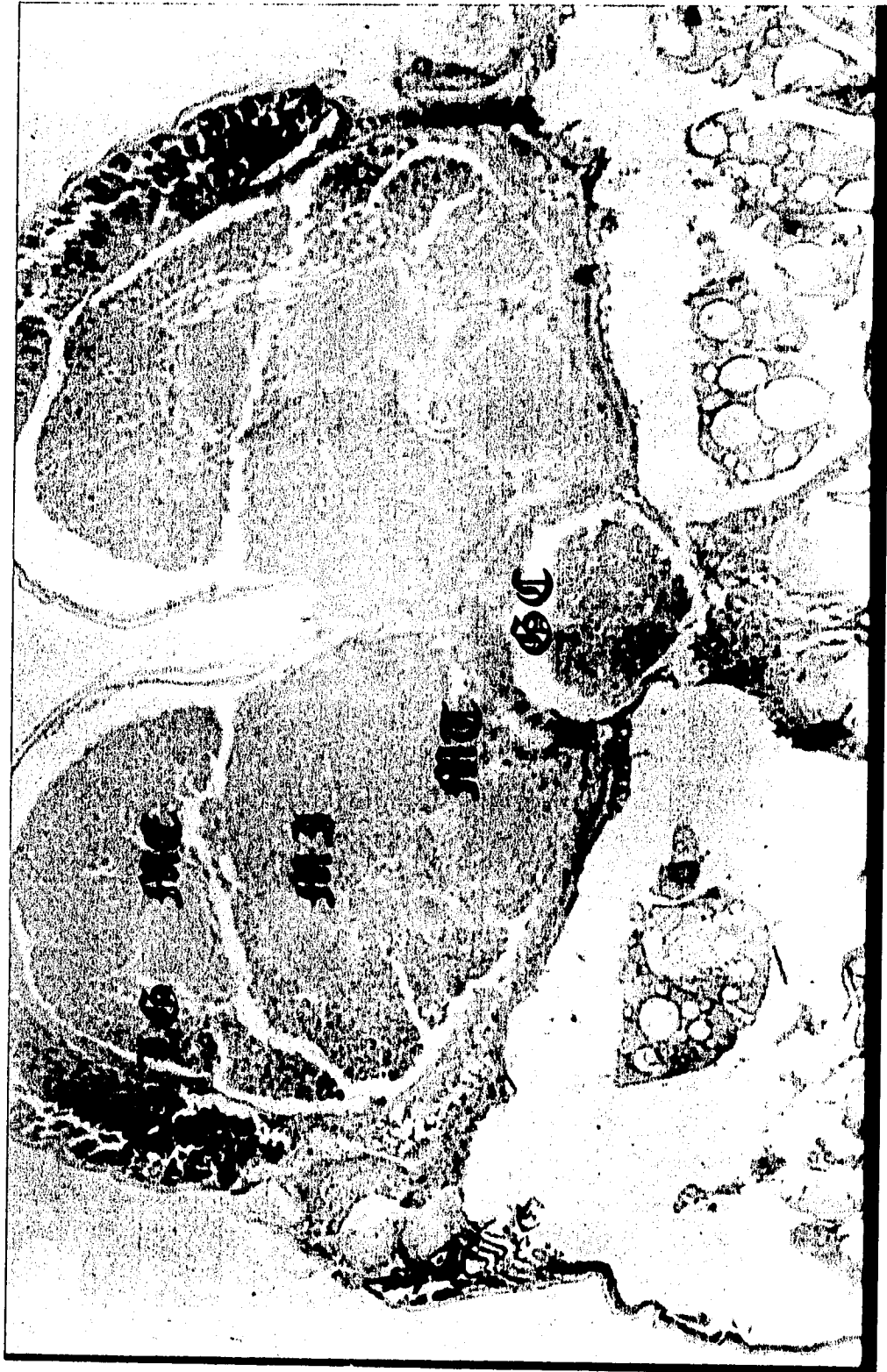


Fig. 8.- Acercamiento del lóbulo óptico con las diferentes regiones que lo conforman. Retina (R), Lámina Ganglionaris (LG), Médula Externa (ME), Médula Interna (MI), Médula Terminalis (MT). Estadio POI. 100 X. I-H.



las células que rodean al cono cristalino. En este estadio no existe una separación clara entre el pigmento proximal y el distal, lo cual hace suponer que aún no existe reflejo fotomotor (Fig. 9).

Posterior al espacio vascular se observa una zona de gran proliferación celular que va a diferenciarse para formar la lámina ganglionaris donde se puede localizar una pequeña región sináptica que presenta una intensa inmunorreactividad. Algunos axones parecen descender hacia la médula externa formando lo que podría ser el quiasma externo. Algunos de estos axones también muestran inmunorreactividad.

La médula externa es pequeña y esta formada por glia y unas pocas células nerviosas en la periferia, además de senos venosos. El quiasma interno no es muy claro pero hay una cierta inmunorreactividad. Entre la médula externa y la interna lateralmente a la izquierda, se encuentra el esbozo de la glándula del sinus fuertemente inmunorreactiva e iridiscente, perifericamente a ella se observan senos venosos grandes que parecen llevar fibras de la médula externa. Lateralmente a la glándula del sinus se observa un grupo formado por dos grandes neuronas rodeadas por neuronas pequeñas. Estas neuronas se caracterizan por mostrar núcleos muy grandes y escaso citoplasma con granulaciones inmunorreactivas.

La médula interna es muy grande con senos venosos grandes en la región ventral y granulaciones inmunorreactivas a su alrededor.

Lateralmente a la derecha se observa un grupo de neuronas de gran tamaño que posiblemente sean las que van a formar el órgano X, sin embargo no parecen estar en diferenciación (Fig. 10), no se observa inmunorreactividad en estas células. La médula terminalis comienza a aparecer y diferenciarse a pesar de que las neuronas parecen estar en etapa de intensa proliferación, sin observarse claramente los tractos ópticos. Estos últimos que son muy cortos y delgados, presentan granulaciones inmunorreactivas a serotonina y células gliales.

El ganglio cerebroide que se encuentra aún en primordios y que parece estar envuelto

Fig. 9.- Amplificación de las células retinulares (CR).

Estadio POI. 100 X. I-H.

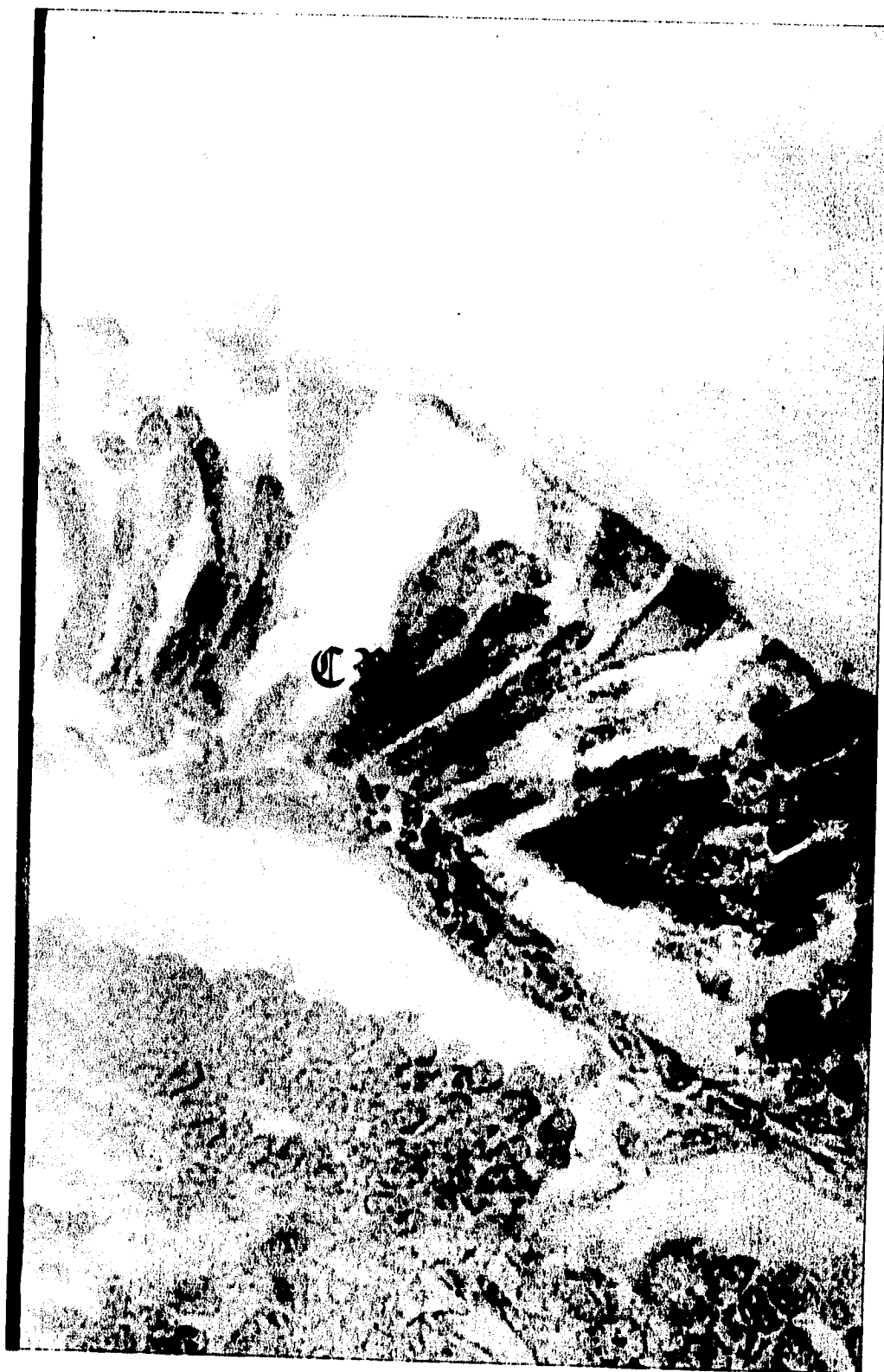


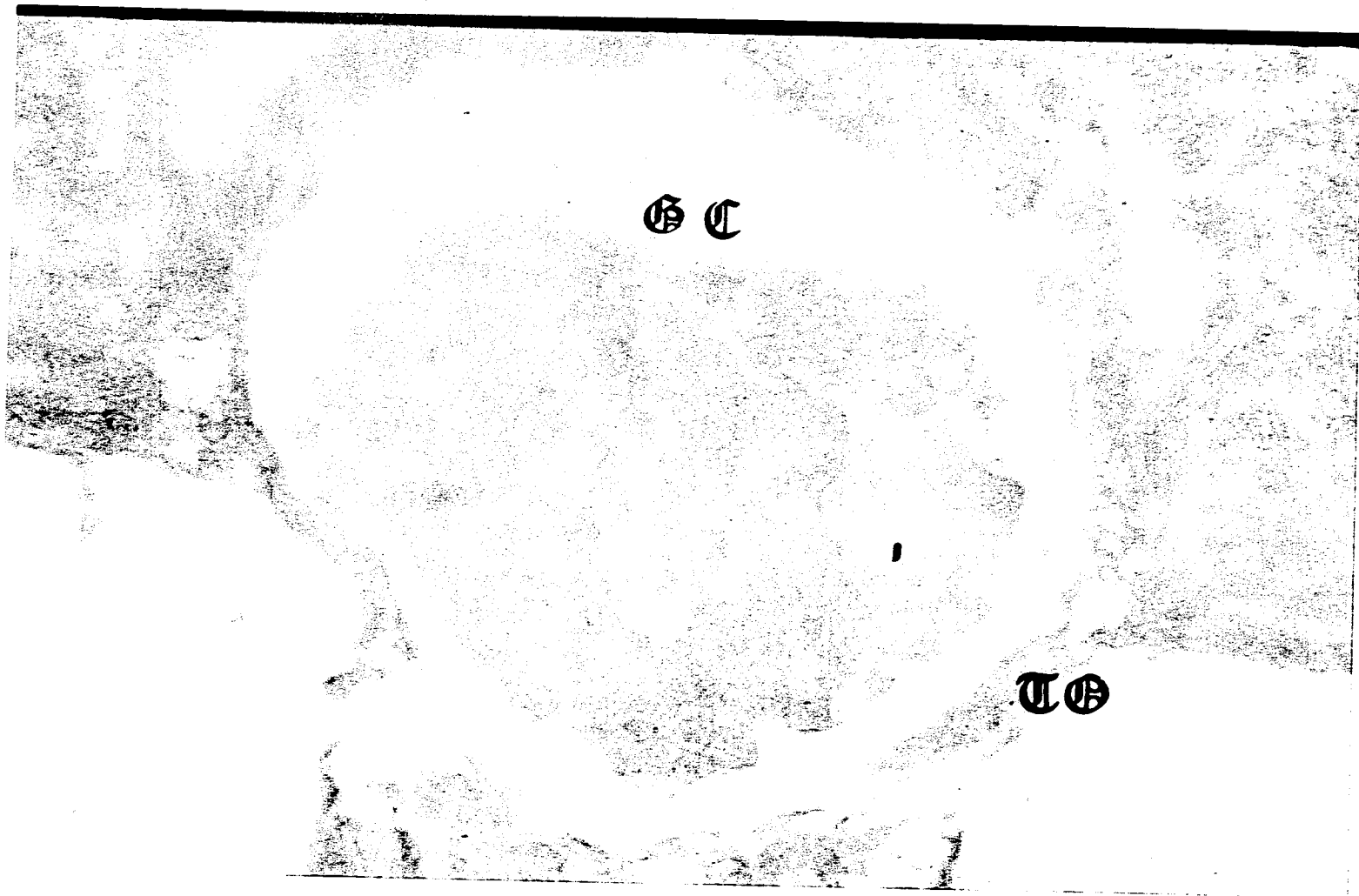
Fig. 10.- Organo-X (O-X). Estadio POI. 400 X. I-H.



por los lóbulos ópticos, es pequeño comparándolo con los estadios juvenil y adulto, la mayoría de las células que lo conforman son de tamaño mediano, pero destacan cuatro grandes neuronas con una inmunorreactividad positiva, las cuales podrían corresponder a las descritas en *Cherax destructor* por Sandeman (1990). Las granulaciones inmunorreactivas estuvieron presentes en el ganglio, sobre todo en algunas regiones bien definidas (Fig. 11).

Fig. 11.- Primordios de ganglio cerebroide (GC) y tráctos ópticos (TO).

Estadio POI. 400 X. I-H.



C E

E C

2. ETAPA POII

Observamos claramente diferentes regiones que conforman a los lóbulos ópticos, tales como la retina (cono cristalino y rabdómeros), lámina ganglionaris, médula externa, médula interna, médula terminalis y tracto óptico (Fig. 12).

La retina, el cono cristalino, la lámina ganglionaris y la médula externa se observaron más grandes y mejor delimitadas unas de otras que en la etapa POI, mientras que la médula interna y la terminalis no se han delimitado por completo.

Se observaron varias células del cono cristalino y tienen forma similar a un bastón con la porción anterior más amplia, alrededor de estas se presentó una gran cantidad de granulaciones positivas a serotonina, mientras que hacia la córnea hay vesículas redondas de tamaño regular que presentaron afinidad por la hematoxilina (hemocitos granuloso) y algunas granulaciones. Hacia la parte posterior del cono se encuentran células parecidas a las antes mencionadas pero con citoplasma más claro (hemocitos hialinos) (Fig. 13).

En este estado se observó, que al compararlo con el estado POI, hay un desplazamiento del pigmento distal en dirección a la córnea y el pigmento proximal se desliza hacia la membrana basal. Las granulaciones inmunorreactivas en los dos pigmentos son evidentes. En la base de los rabdómeros se observaron hemocitos granuloso afines a la hematoxilina.

En la lámina ganglionaris y en las diferentes médulas se presentaron las mismas células que en el cono y los rabdómeros (de tamaño regular y con afinidad a hematoxilina). Se encontró inmunorreactividad positiva en los diferentes neuropilos que en este caso son más grandes que en el POI.

En esta etapa el tracto óptico aún es corto comparado con las etapas posteriores, se

Fig. 12.- Lóbulo óptico en el que se observa:

Retina (R), Lámina Ganglionaris (LG), Médula Externa

(ME) y Médula Interna (MI). Estadio POII. 100 X. I-H.

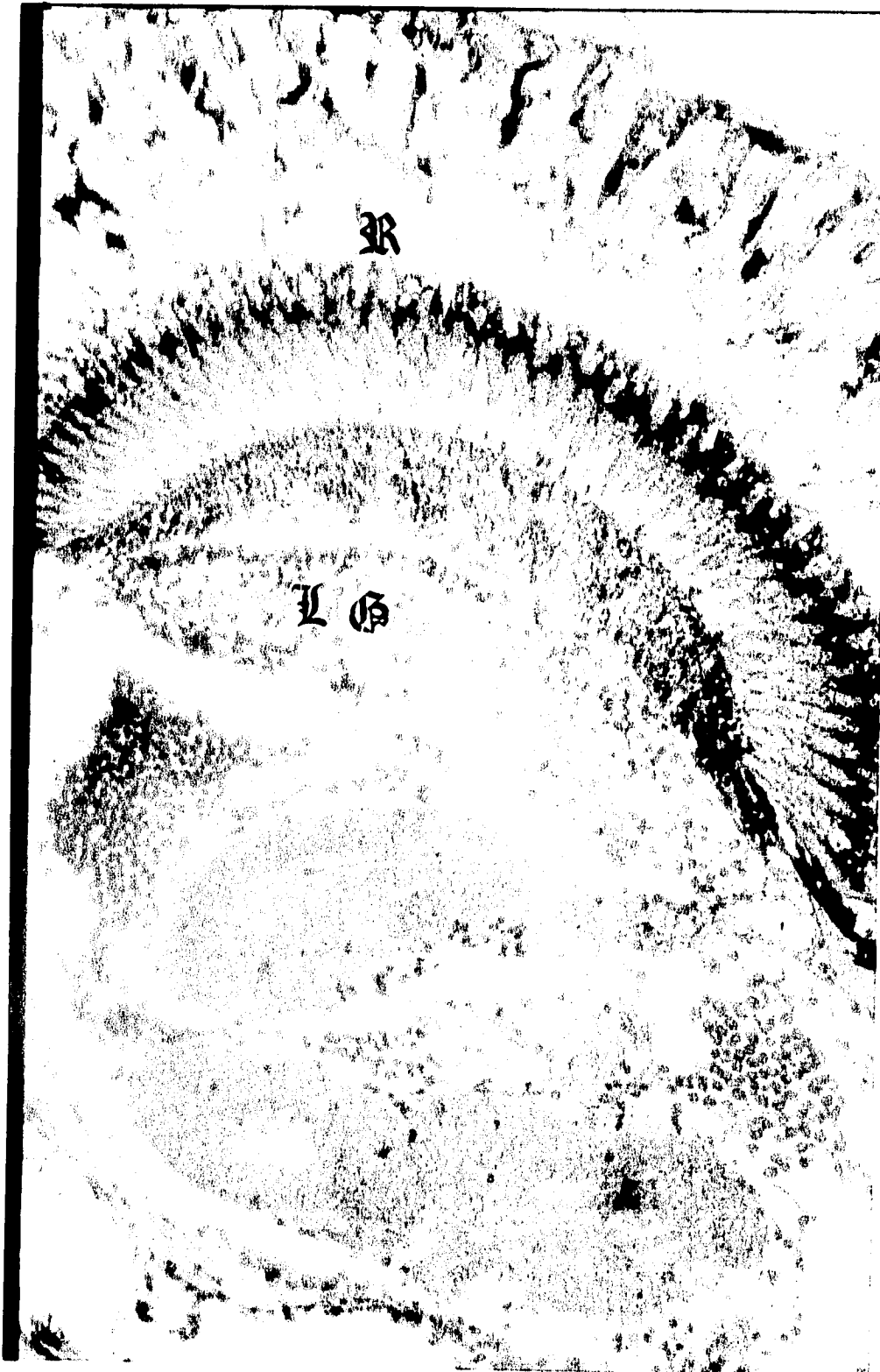


Fig. 13.- Retina en la cual se observan las células del cono cristalino (CC) y el reflejo fotomotor, pigmento proximal (PP) y pigmento distal (PD).

Estadio POII. 160 X. I-H.



localizaron granulaciones positivas a serotonina así como también células gliales a lo largo de él (Fig. 14).

En el ganglio cerebroide (Fig. 15) no se detectó inmunorreactividad aparente durante esta etapa, sin embargo, pueden distinguirse células de tamaño mediano y grandes que presentan algunas granulaciones inmunorreactivas. Estas últimas tal vez sean las mismas observadas en el POI, y aquellas reportadas por Sandeman en 1990 para el acocil *Cherax destructor*.

Fig. 14.- Tracto óptico (TO).

Estadio POII. 400 X. Contraste de Fases.



Fig. 15.- Ganglio cerebroide (GC) y tractos ópticos (TO).

Estadio POII. 100 X I-H.



3. JUVENIL (JI)

En este estadio debido a que el ojo tuvo que ser despojado de la quitina para procesarlo, la retina no se observa. Sin embargo, se pudieron identificar en los diferentes cortes omatidias incompletas, restos de células pigmentarias y retinulares, en estas últimas se encontró inmunorreactividad así como en las regiones laterales de las células pigmentarias. Se observó claramente la membrana basal, por debajo de la cual se localiza la lámina ganglionaris más grande y diferenciada que en el estadio POII. Sólo se observan unas pocas células en las regiones laterales y una enorme cantidad de fibras y senos venosos con inmunorreacción. Delimitando al neurópilo se encuentran células pequeñas en las cuales también se observó gran inmunorreactividad en el citoplasma (Fig. 16).

La médula externa presentó un neurópilo con una alta densidad de fibras, senos venosos, algunos hemocitos granulados y con pocas neuronas en comparación con la lámina ganglionaris y granulaciones inmunorreactivas. En la periferia se observaron escasas células con poca inmunorreactividad. El tamaño de éstas neuronas es pequeño pudiéndose observar granulaciones en sus axones. En la médula interna se observó un neurópilo desarrollado en cuanto a su tamaño y forma, en el cual se encuentran neuronas de tamaño pequeño en el límite de ella así como en la médula terminalis. En el citoplasma de estas células se pueden localizar numerosas granulaciones inmunorreactivas de diferente diámetro (Fig. 17).

Entre la médula externa y la interna se localizó la glándula del sinus con las mismas características pero con diferente tamaño que en el estadio POII y perfectamente delimitada. Esta formada por terminaciones nerviosas que forman una red en donde se localizan gran cantidad de senos venosos con granulaciones inmunorreactivas y algunas de ellas con hemocitos

Fig. 16.- Retina (R) y lámina ganglionaris (LG).

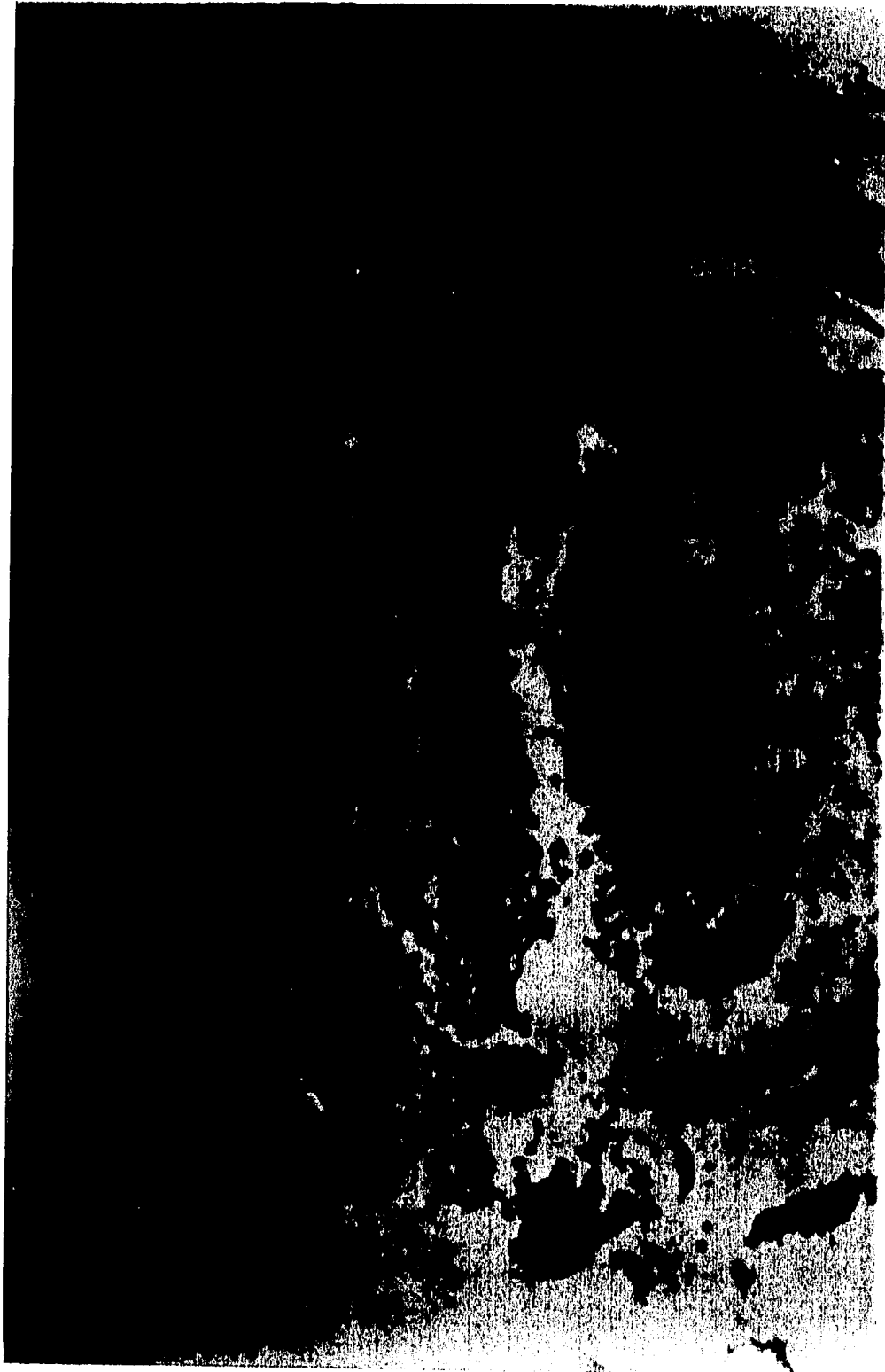
Estadio JI. 100 X. I-H.



Fig. 17.- Lóbulo óptico en el que se observan:

**Retina (R), Lámina Ganglionaris (LG), Médula Externa
(ME) y Médula Interna (MI).**

Estadio JI. 100 X. I-H.



granulosos en su interior. Periféricamente se localizaron neuronas de tipo III (Shivers, 1967) (Fig. 18).

Asociado a la médula terminal se observó al órgano-X, formado por un grupo de neuronas grandes que al parecer pertenecen a las células neurosecretoras tipo I (Shivers, 1967), los axones de estas células posiblemente se continúen hacia el neurópilo de la médula terminalis, la cual se caracteriza por presentar una forma piramidal truncada invertida. El neurópilo está formado por un gran número de fibras, terminales nerviosas y células gliales además de una gran cantidad de senos venosos con hemocitos.

El neurópilo está formado por una gran cantidad de fibras entre las cuales se pueden observar engrosamientos y terminaciones sinápticas llenos de granulaciones inmunorreactivas. En los axones del tracto nervioso que sale para formar el nervio óptico se presentan claras granulaciones. En este tracto se observó perfectamente un haz de fibras procedentes del órgano-X. Lateralmente a la médula y del lado izquierdo del campo hay un conjunto de neuronas tipo II con citoplasma claro y granulaciones inmunorreactivas en las prolongaciones del axón.

Al final de la médula se pudo observar como se forma el tracto óptico que termina en el protocerebro. Este se encuentra ya bien desarrollado a diferencia de los estadios POI y POII, en él se localizan una gran cantidad de senos venosos y numerosas células gliales. La inmunorreactividad se detectó a todo lo largo del tracto (Fig. 19).

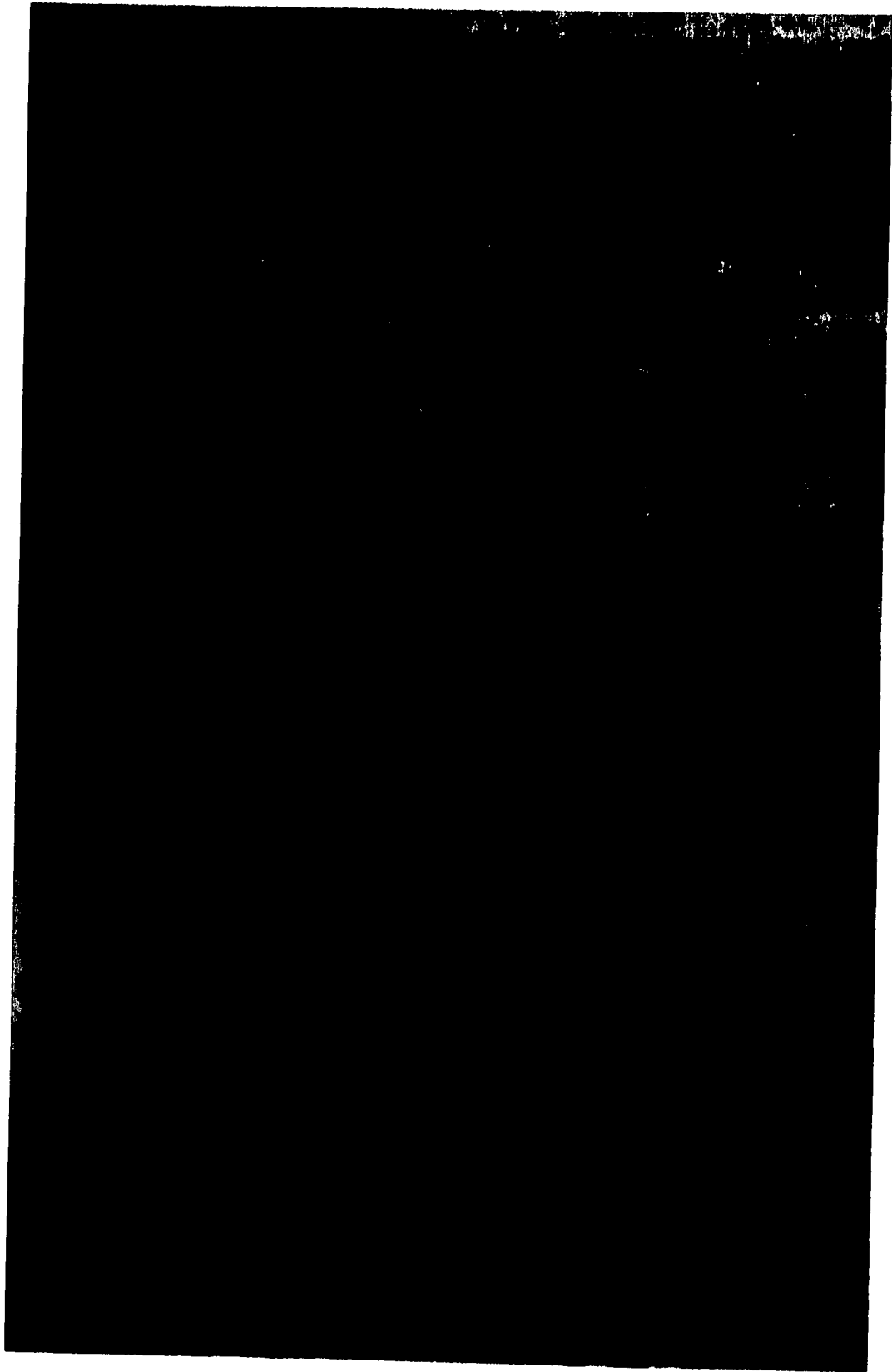
Al comparar el ganglio cerebroide del juvenil con el de los dos estadios anteriores, se encontró que pueden detectarse claramente dos de las zonas que lo conforman, éstas son el protocerebro y el deutocerebro, mientras que el tritocerebro no puede distinguirse con certeza de acuerdo con el nivel del corte. Sin embargo, de la zona que correspondería al tritocerebro, ya se desprenden los conectivos circumesofágicos que conectan al ganglio cerebroide con el resto de

Fig. 18.- Glándula del Sinus (GS).

Estadio JI. 100 X. I-H.

**Fig. 19.- Tracto óptico (TO), en el que se observan
núcleos de glía.**

Estadio JI. 100 X. I-H.





los ganglios corporales (Fig. 20).

En la región del protocerebro medial, se distinguen numerosos senos venosos y dos tipos de células principalmente (estas células corresponderían al paquete celular anteromedial), unas con un núcleo de tamaño mediano y con una cantidad de citoplasma proporcional al núcleo, y otras de mayor tamaño mostrando un núcleo grande y gran cantidad de citoplasma. (Fig. 21).

Por debajo de estas células, en la parte media, se localizó una zona que tiene una forma alargada y que posiblemente corresponda al cuerpo central. Las granulaciones inmunorreactivas se observaron en todo el neurópilo, pero especialmente alrededor de los senos venosos, algunas granulaciones se detectaron sobre el citoplasma de algunas células del paquete anteromedial.

En el deutocerebro se distinguen los neurópilos correspondientes a los lóbulos olfatorios y accesorios, observándose así mismo los paquetes celulares dorsales, los paquetes de los lóbulos olfatorios y los paquetes laterales posteriores. La inmunorreactividad se presentó principalmente en los neurópilos (Fig. 20).

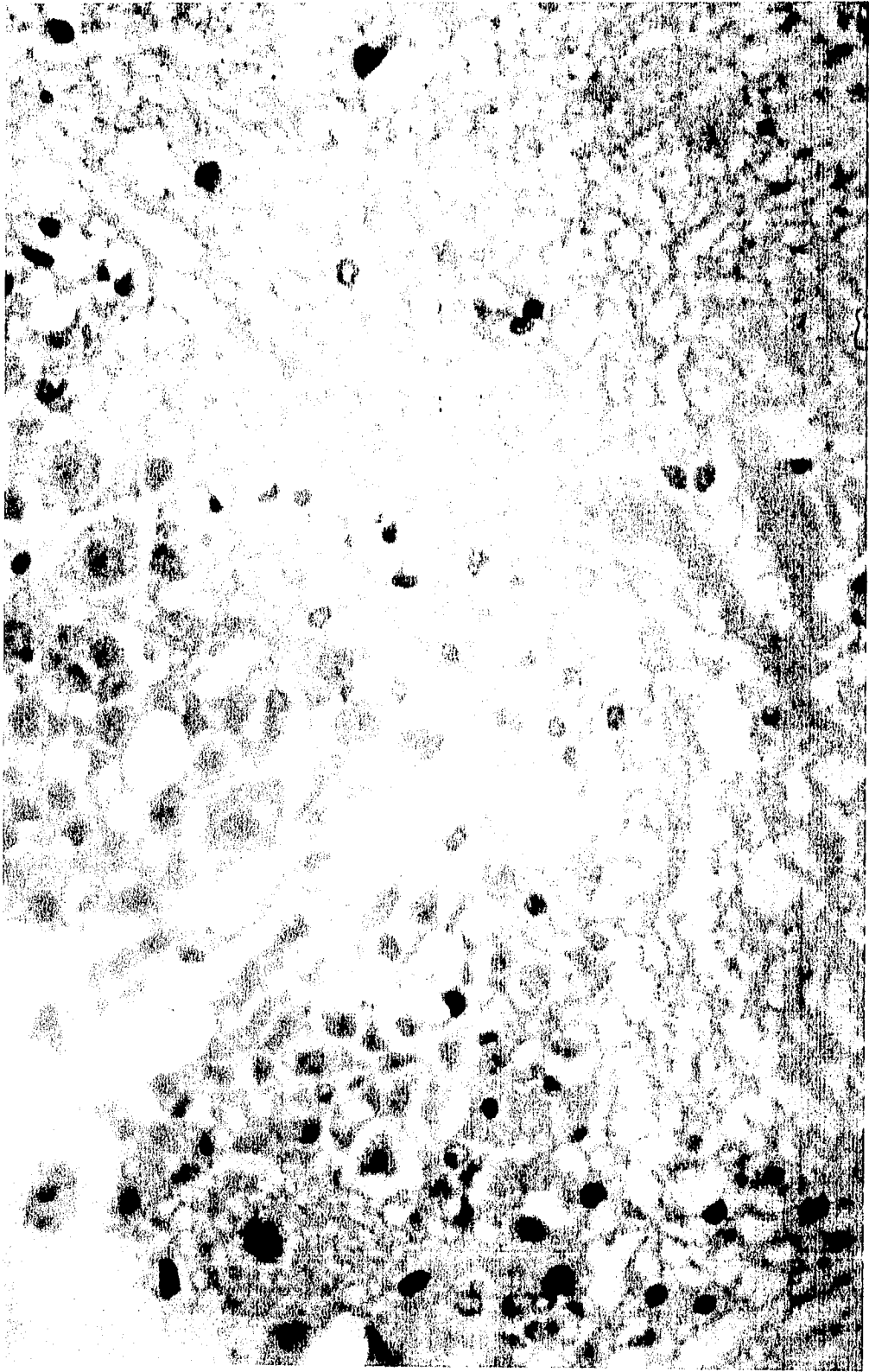
Fig. 20.- Tracto óptico (TO), ganglio cerebroide en el que se observa protocerebro (PC), deutocerebro (DC) y tritocerebro (TC) y conectivos circumesofágicos (CC).

Estadio JI. 40 X. I-H.



Fig. 21.- Protocerebro medial, en el que se observa el paquete de células anteromedial (AM), gran cantidad de senos venosos y núcleos de glía.

Estadio JI. 200 X. I-H.



4. ADULTO.

El pedúnculo ocular esta bien desarrollado, pudiéndose diferenciar cada una de sus estructuras como lo son la retina, lámina ganglionaris, médula externa, interna y terminalis, órgano-X y glándula del sinus, en la parte lateral de las médulas se encuentran células afines a hematoxilina.

En el caso de los adultos no se pudieron observar la córnea y la retina, debido a la supresión de la quitina para poder procesar los cortes, por lo que tampoco se vieron las células del cono cristalino ni los rabdómeros. La parte que quedó de las células retinulares fueron los largos axones que presentan gran inmunorreactividad a serotonina, entre ellos, se encuentran células con grandes núcleos, aunque en algunas de estas no es posible verlas debido al nivel del corte, así como también se detectaron hemocitos, tiñiéndose claramente con hematoxilina.

Hacia la parte inferior de estos axones, se encuentra la lámina ganglionaris bien diferenciada, con un neurópilo conformado de pocas fibras en comparación con la cantidad de fibras de los neurópilos de las diferentes médulas, pero presentan gran cantidad de granulaciones inmunorreactivas a serotonina y abundantes cuerpos celulares. De esta lámina salen fibras que se dirigen hacia la médula externa formando lo que al parecer es el quiasma externo, y que también resultó positiva a serotonina (Fig. 22).

El neurópilo de la médula externa es grande, de forma arriñonada y con cuerpos celulares no tan numerosos como en la lámina ganglionaris, en algunas de estas células se observa el núcleo claramente y en otras no debido al nivel del corte y se encuentran granulaciones inmunes a serotonina. Hacia abajo de ésta se localiza la médula interna, la cual debido a sus características de forma, posición y tamaño está bien desarrollada con un neurópilo que presenta gran

**Fig. 22.- Axones de células retinulares (ACR), lámina
ganglionaris (LC) y médula externa (ME).**

Estadio Adulto. 40 X. I-H.



inmunorreactividad, en él observamos gran cantidad de senos venosos así como células con un gran núcleo y hemocitos (afines a hematoxilina) (Fig. 23).

Entre las médulas externa e interna, hacia la parte externa se encuentra la glándula del sinus (Fig. 24).

Por último se puede observar la médula terminalis (Fig. 25) cuyo neurópilo muestra gran cantidad de granulaciones inmunorreactivas entre las fibras, además tiene grandes células que podrían pertenecer a las células neurosecretoras de tipo II descritas por Shivers (1967) así como hemocitos. A un costado se localiza un conjunto de grandes células neurosecretoras de tipo I (Shivers, 1967), de núcleo bien definido que forman el órgano-X, el cual es de forma oval y alargado, su afinidad es por la hematoxilina (Fig. 26).

También puede observarse el cuerpo hemielipsoidal, su neurópilo es redondo y su tamaño es similar al de la médula externa, presenta inmunorreactividad a serotonina en las fibras que lo conforman, alrededor se encuentran células (neuronas y células gliales) afines a hematoxilina, hay también senos venosos. A un costado se localiza un agrupamiento alargado de células (Fig. 27).

De la médula terminalis se desprenden fibras que van a formar al tracto óptico, el cual es muy largo y ancho, presenta células gliales y granulaciones inmunorreactivas en toda su longitud.

El ganglio cerebroide está bien desarrollado en lo que respecta a sus diferentes lóbulos y conectivos. En la región del protocerebro medio se puede distinguir lo que correspondería al paquete celular anteromedial, del cual algunas células son muy grandes con núcleos también grandes y con afinidad a hematoxilina y algunos pigmentos inmunorreactivos a serotonina, posiblemente sean las descritas por Sandeman en *Cherax destructor* (1988). Se puede distinguir

Fig. 23.- Médula externa (ME) y médula interna (MI).

Estadio Adulto. 40 X. I-H.

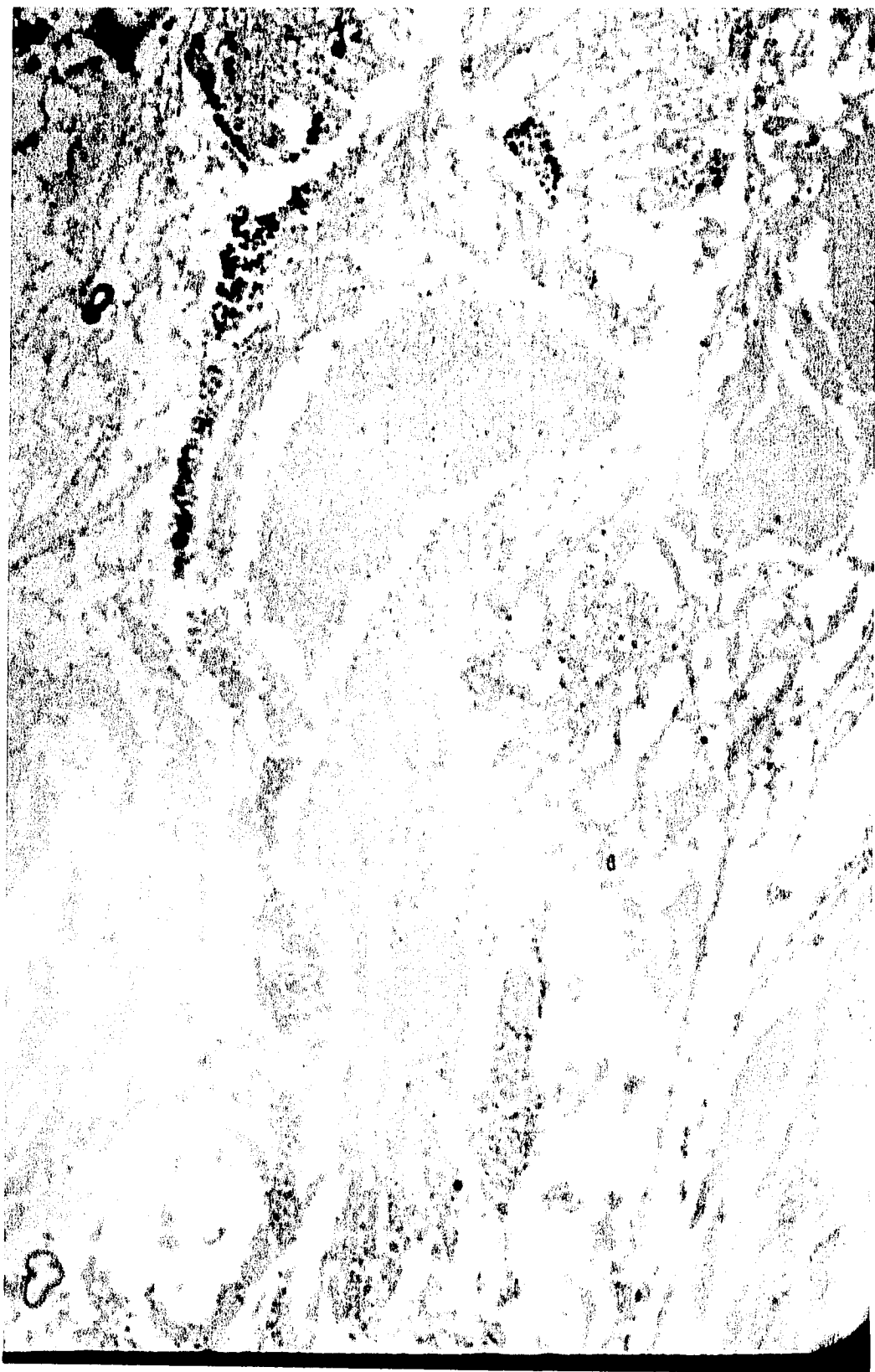


Fig. 24.- Glándula del Sinus (GS).

Estadio Adulto. 100 X. I-H.

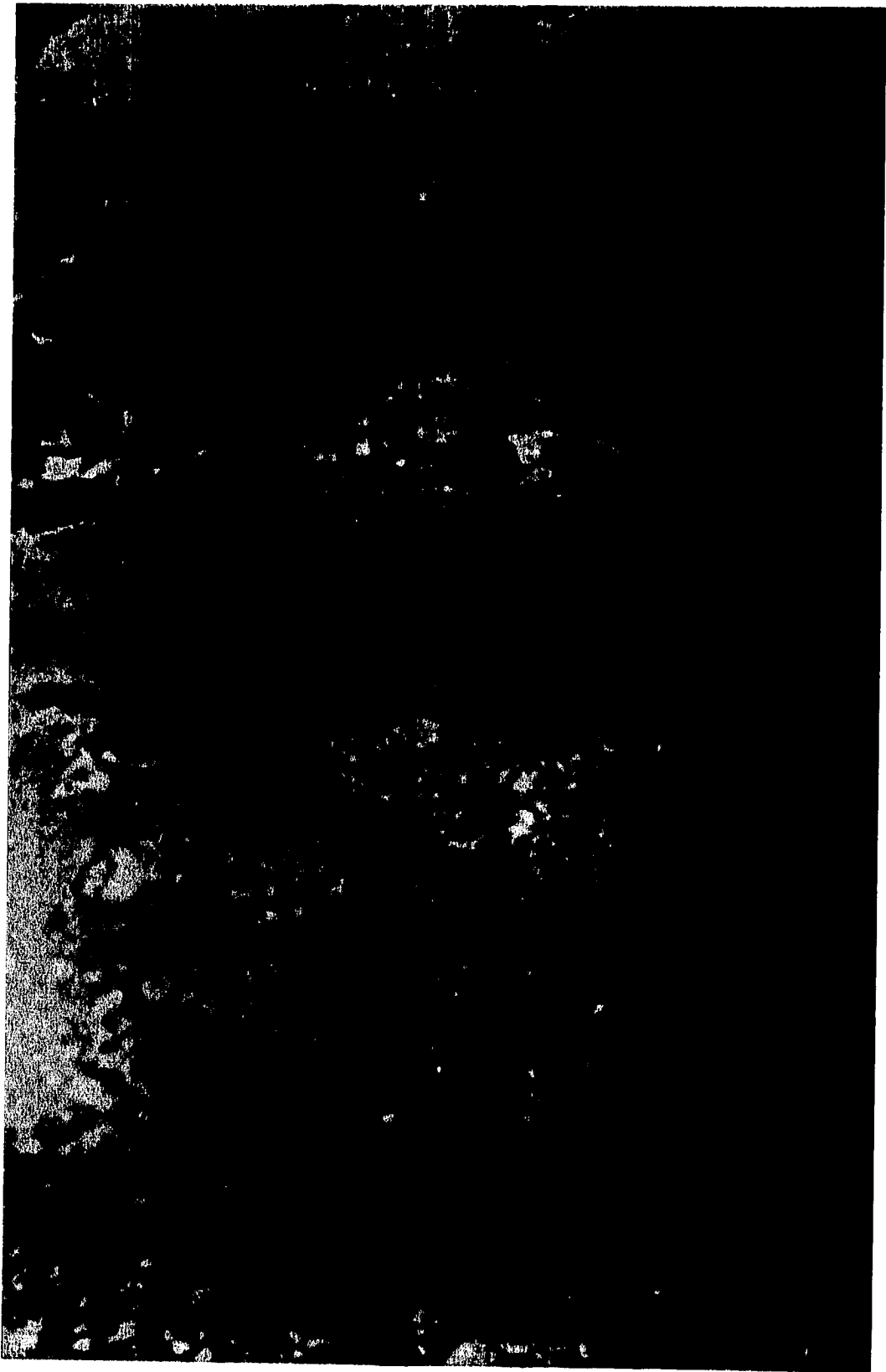


Fig. 25.- Médula terminalis (MT) y tracto óptico (TO).

Estadio Adulto. 40 X. I-H.



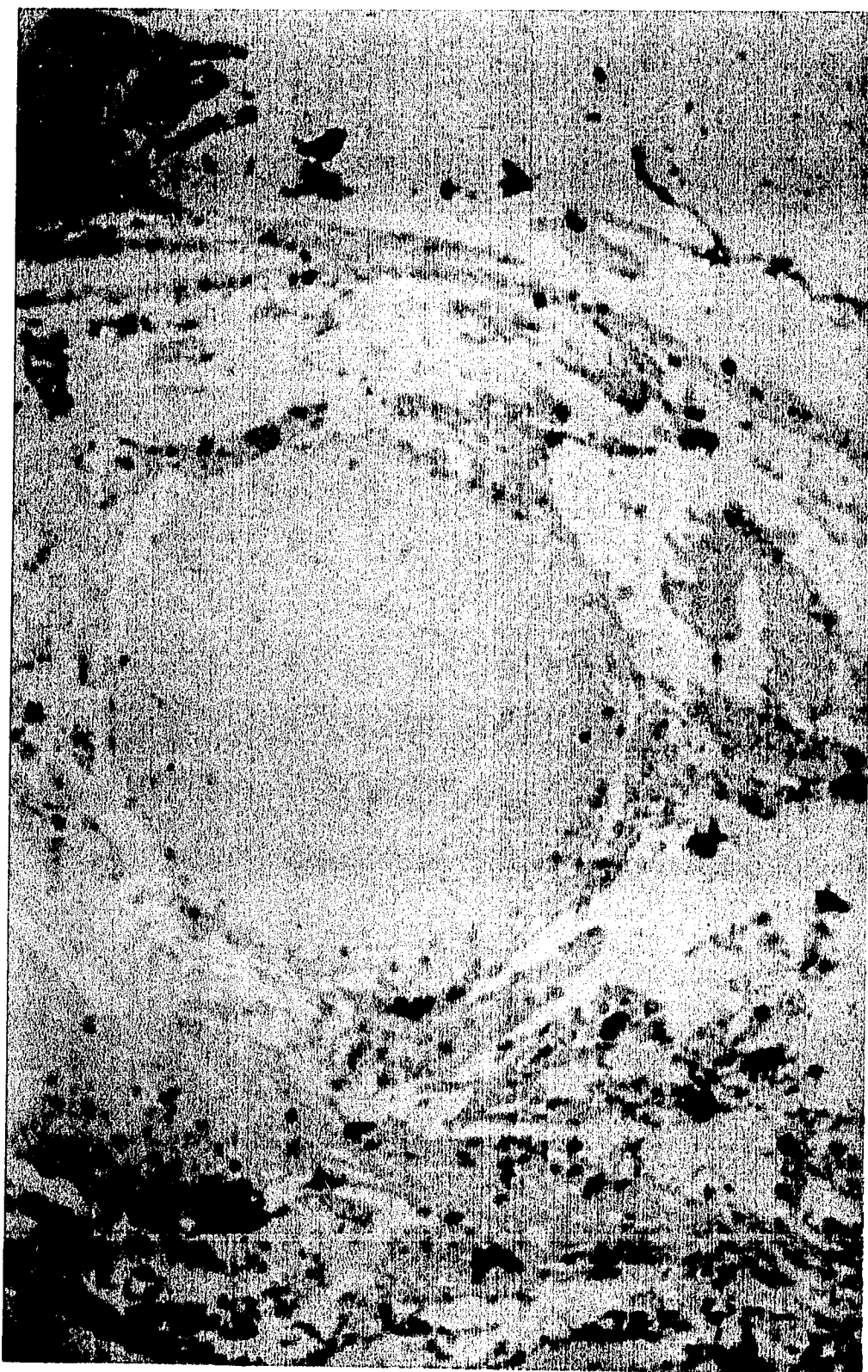
Fig. 26.- Organo-X (O-X).

Estadio Adulto. 200 X. I-H.

Fig. 27.- Cuerpo hemielipsoidal (HE).

Estadio Adulto. 100 X. I-H.





una región en forma de "ojal" que posiblemente corresponda al cuerpo central, las fibras localizadas en esta zona presentan inmunorreactividad a serotonina (Fig. 28).

Las regiones neuropilares que están mejor definidas son las del deutocerebro, y corresponden a los lóbulos olfatorio y accesorio, en las cuales se observaron granulaciones inmorreactivas a serotonina. En ciertas regiones se encuentran grandes cúmulos de células afines a hematoxilina y con algunos pigmentos positivos a serotonina y son al parecer los paquetes dorso-lateral y del lóbulo olfatorio (Fig. 29).

En el tritocerebro no pudieron observarse regiones bien definidas, sin embargo las fibras que se encuentran en esta zona presentan inmunorreactividad positiva a serotonina.

En los conectivos circumesofágicos, bien desarrollados, también hay granulaciones inmunorreactivas en las fibras, además de haber células de tamaño regular y células gliales que fueron afines a hematoxilina.

Fig. 28.- Protocerebro medial paquete de células anteromedial.

Estadio Adulto. 250 X. I-H.

**Fig. 29.- Ganglio cerebroide en el que se observa protocerebro
(PC), deutocerebro (DC) y tritocerebro (TC).**

Estadio Adulto. 40 X. I-H.





X. DISCUSION.

En los resultados de esta tesis, las observaciones realizadas en el acocil *Procambarus clarkii*, muestran una inmunorreactividad positiva a la serotonina tanto en los lóbulos ópticos como en el ganglio cerebroide desde el primer estadio postembrionario hasta la etapa adulta. Esto concuerda con lo reportado por Sandeman y Sandeman (1990) en el estudio sobre el desarrollo del acocil *Cherax destructor*. Estos autores han reportado que la primera expresión de neuronas serotoninérgicas se presenta durante los primeros tres estadios postembrionarios del desarrollo. También en la langosta *Homarus gammarus* se encontró que las primeras trazas de inmunorreactividad a serotonina en el protocerebro se presentaron desde los 17 días de edad (Helluy y Beltz, 1990).

En este trabajo, en la etapa POI, las granulaciones inmunorreactivas se encontraron en forma difusa en la retina, presentándose tanto en rabdómeros, células retinulares, en células pigmentarias, estando principalmente a lo largo de las células retinulares, las cuales aparecen fuertemente teñidas, así como en los neuropilos de la lámina ganglionaris y de las diferentes médulas.

Estos hallazgos no parecen estar de acuerdo con lo reportado por Hernández *et al.* (1987) y Aréchiga *et al.* (1977), que reportan únicamente serotonina en las células retinulares (pigmento proximal). Lo anterior podría ser debido a que la serotonina está actuando como una neurohormona inductora del desarrollo de una forma indiferenciada sobre todas las estructuras, como se ha propuesto en otros organismos (Goldberg y Karter, 1989). En tanto que Aréchiga y Hernández lo reportan en el animal adulto en donde ya existe una diferenciación neural.

En los primordios del ganglio cerebroide del primer estadio, resaltaron unas grandes neuronas en las que no se pudo distinguir el núcleo con claridad, lo cual podría deberse al nivel en que fueron hechos los cortes, éstas al igual que el resto de las células presentan granulaciones

inmunorreactivas, y parecen corresponder a las neuronas protocerebrales reportadas por Sandeman. En los cortos tractos ópticos también se detectó inmunorreactividad. Sin embargo, a pesar de que en este trabajo no se llevó a cabo un estudio cuantitativo de la misma, se observó más reacción en la región más cercana a los lóbulos ópticos.

En el POII, a diferencia del POI se distinguió claramente la separación de los pigmentos distal y proximal, el primero se desplazó hacia la región superior de la retina mientras que el segundo tuvo un desplazamiento hacia la membrana basal, esto parece indicar que en esta etapa ya se presenta el reflejo de adaptación a la oscuridad (reflejo fotomotor). Lo anterior concuerda con lo reportado por Hafner en 1982 en estudios morfológicos del desarrollo de la retina del acocil. Este autor describió el reflejo fotomotor a partir del estadio POII.

En los diferentes neurópilos de la lámina y médulas se presentó reacción al anticuerpo contra serotonina. En el ganglio cerebroide, aún no bien formado, se localizaron también unas neuronas de gran tamaño y núcleo conspicuo en las que se distinguieron muy pocas granulaciones inmunorreactivas. La inmunorreactividad fue muy evidente en zonas específicas en los tractos ópticos. Lo anterior parece apoyar la posibilidad de que la serotonina se encuentre como un neurotransmisor en el sistema nervioso de este animal desde las primeras etapas del desarrollo postembrionario como lo ha propuesto Sandeman para *Cherax destructor* adulto.

En los estados juvenil y adulto a diferencia de los dos estadios anteriores, al quitar la quitina de los ojos también se desprendió la mayoría de la retina, debido a lo cual no pudieron observarse claramente las estructuras que la forman sino únicamente los axones de las células retinulares, éstos mostraron una inmunorreactividad positiva.

Los diferentes autores que han estudiado una posible acción de la serotonina en el ritmo de sensibilidad a la luz (ERG), no han reportado serotonina en los axones de células retinulares (Aréchiga *et al.* y Hernández *et al.*). Esta monoamina se ha reportado como un posible neuromodulador que actúe sobre el pigmento proximal (dentro de las células retinulares).

Nuestros hallazgos parecen apoyar no sólo la idea de una neuromodulación sino también neurotransmisión específica.

A lo largo de los lóbulos ópticos de ambas etapas, la inmunorreactividad se localizó en los neurópilos de la lámina y las médulas, así como también en las terminaciones nerviosas de la glándula sinusal. En el órgano-X, las granulaciones estuvieron ausentes. El tracto óptico presentó granulaciones inmunorreactivas.

En el ganglio cerebroide ya diferenciado del animal adulto, la inmunorreactividad se detectó principalmente en la zona neuropilar, algunas de las células correspondientes al paquete anteromedial (Sandeman *et al.*, 1988) presentaron gránulos inmunorreactivos. También en los conectivos circumesofágicos la inmunorreactividad fue positiva.

Por otra parte, no se encontraron diferencias importantes entre el estadio juvenil y el adulto a pesar del mayor tamaño de las estructuras en el animal adulto.

Todo lo anterior podría indicar que el grado de diferenciación del sistema serotoninérgico durante el desarrollo estuviera jugando un papel tan importante en la expresión del ritmo ERG, como la diferenciación del reflejo fotomotor. El órgano-X, formado por las neuronas responsables de las neurosecreciones involucradas en el reflejo de adaptación a la luz (hormona concentradora del pigmento distal) (Klenholz, 1961), no mostró en ninguna de las etapas del desarrollo inmunorreactividad a la serotonina, lo cual parece indicar que la acción de la misma sobre el reflejo de adaptación a la luz se limita a su acción sobre el pigmento proximal, probablemente vía axones y no a través de la liberación neurohumoral desde la glándula sinusal para actuar sobre el pigmento distal. La procedencia de esta serotonina podría encontrarse en neuronas de la lámina o de alguna de las médulas que sí mostraron inmunorreactividad positiva.

XI. CONCLUSIONES

1. ETAPA POI

- **Las estructuras de los lóbulos ópticos se encuentran comprimidas y presentan un leve giro a la región lateral. Los tractos ópticos son muy cortos.**
- **El ganglio cerebroide está poco desarrollado, sin embargo se distinguen algunas neuronas de gran tamaño en la posición anterior y está rodeado por los lóbulos ópticos.**
- **La inmunorreactividad a serotonina se presenta tanto en los lóbulos ópticos como en el ganglio cerebroide.**
- **No se observa el reflejo fotomotor.**

2. ETAPA POII

- **Los lóbulos ópticos son similares a los del POI, pero presentan una posición más anterodorsal con respecto al cuerpo. Los tractos ópticos son cortos.**
- **El ganglio cerebroide es de mayor tamaño que en el POI, sin embargo aún no se distinguen las tres regiones que lo conforman (proto, deuto y tritocerebro).**
- **Los lóbulos ópticos y el ganglio cerebroide presentan reacción positiva a la serotonina.**
- **El reflejo fotomotor se presenta.**

3. ETAPA JUVENIL

- **Los lóbulos ópticos están en una posición anterodorsal con respecto al cuerpo, están separados por el rostro y son pedunculados. Las diferentes regiones que los forman se distinguen claramente. Los tractos ópticos son largos.**
- **El ganglio cerebroide tiene un mayor tamaño que en los estadios anteriores y se encuentra diferenciado en las tres regiones que lo forman, distinguiéndose los diferentes lóbulos y paquetes**

celulares. De la médula terminalis se desprenden los tractos ópticos, claramente visibles.

- La inmunorreactividad fue positiva en los lóbulos ópticos, en las fibras de los tractos ópticos, en el ganglio cerebroide y en los conectivos circumesofágico.

4. ETAPA ADULTA

- No hay gran diferencia con el estadio anterior, las estructuras tanto de los lóbulos ópticos, tractos, ganglio cerebroide y conectivos en general son más grandes y alargadas.

- La inmunorreactividad presenta el mismo patrón que en el juvenil.

5. La serotonina parece actuar tanto como neuromodulador como neurotransmisor a través del desarrollo postembrionario del acocil *Procambarus clarkii*.

XII. LITERATURA CITADA

ANDREWS E. A. (1907). The attached young of the crayfish *Cambarus clarkii* & *Cambarus diogenes*. *Am. Nat.* 41:253-271.

ARECHIGA H. & WIERSMA C. A. G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *Journal of Neurobiology.* 1:71-85.

ARECHIGA H. (1977). Modulation of visual input in the crayfish. En: Hoyle G. Ed. *Identified neurons and behavior in arthropods*. New York: Plenum Press, pp. 387-403.

ARECHIGA H., GARCIA U. & RODRIGUEZ-SOSA L. (1985). Neurosecretory role of crustacean eyestalk in the control of neural activity. In: Selverston AI Ed. *Model neural networks and behavior*. New York: Plenum Press pp. 361-379.

ARECHIGA H., BAÑUELOS E., FRIXIONE E., PICONES A. & RODRIGUEZ-SOSA L. (1990). Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150, 123-143.

ARECHIGA H. GARCIA U. & MARTINEZ-MILLAN L. (1990). Synaptic regulation of neurosecretory cell activity in the crayfish eyestalk. *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Sciences*, pp. 373-380.

ARECHIGA H., FERNANDEZ-QUIROZ F., FERNANDEZ DE MIGUEL F. & RODRIGUEZ-SOSA L. (1992). The circadian system of crustaceans. *Chronobiology International*. Vol. 9, No. 6, pp. 0001-0019.

BARRERA-MERA B. (1976). The effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm in the crayfish. *Physiol Behav.* 17:59-64.

BENNETT R. R. (1983). Circadian rhythm of visual sensitivity in *Manduca sexta* and its development from an ultradian rhythm. *J. Comp. Physiol.* 150:165-174.

BULLOCK T. H. & HORRIDGE G. A. (1965). Structure and function in the nervous system of invertebrates. San Francisco-London: Freeman & Co.

CUADRAS J. (1993). Secretory organelles in the crayfish nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 104A. No. 3 pp. 419-422.

DAVIS F.C. (1981). Ontogeny of circadian rhythms. En *Handbook of Behavioral Neurobiology, Biological Rhythms* (Aschoff J., Ed.), pp. 257-274. Plenum, New York.

DEGUCHI T. (1975). Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proc. natn. Acad. Sci.* 72, 2814-2818.

ELOFSSON R., LAXMYR L., ROSENGREN E. & CHRISTER H. (1982). Identification and quantitative measurements of biogenic amines and dopa in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 71C, No. 2, pp. 195-201.

ELOFSSON R. (1983). 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Cell Tissue Res.* 232:231-336.

FANJUL-MOLES M. L., MORENO-SAENZ E., VILLALOBOS-HARIART N. & FUENTES-PARDO B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 88A. No. 2 pp. 213- 219.

FANJUL-MOLES M. L., MIRANDA-ANAYA M. & FUENTES-PARDO B. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 102A, No. 1, pp. 99-106.

FERNLUND P. & JOSEFSSON L. (1972). Crustacean color change hormone; aminoacid sequence and chemical synthesis. *Science*.

FRIXIONE E., ARECHIGA H. & TSUTSUMI V. (1979). Photomechanical migrations of pigment granules along the retinula cells of the crayfish. *J Neurobiol.* 10:573-90.

GALAMBOS, R. (1961). A glia-neural theory of brain function. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 47:129-136.

GOLDBERG J. I. and KARTER S. B. (1989). Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous system. *Developmental Biology*. 131, 483-495.

HAFNER G. S. TOKARSKI T. & HAMMOND-SOLTIS G. (1982). Development of crayfish retina: a light and electron microscopic study. *Journal of morphology*. 173:101-120.

HELLUY S. and BELTZ B. (1990). Stages in the embrionic development of the american lobster with special emphasis on its nervous system. *Frontiers in Crustacean Biology. Advances in Life Sciences*.

HERNANDEZ-FALCON J., MORENO-SAENZ E., FARAS J. M. & FUENTES-PARDO B. (1987). Role of the sinus gland in crayfish circadian rhythmicity I. Pseudopupil circadian rhythm. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A:111-118.

HOLDICH, D. M. & REEVE, I. D. (1988). Functional morphology and anatomy. En *Freshwater crayfish. Biology, managment and explotation*. Holdich, D. M. ed. Timber Press, pp. 11-51.

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

LOWERY, R. S. (1988). Growth, moulting and reproduction. En *Freshwater crayfish. Biology, managment and explotation*. Holdich D. M. ed. Timber Press, 83-113.

MAYNARD M. D. (1962). Organization of neuropil. *Zoologist*. 2:79-96.

MAYNARD M. D. (1965). Integration in crustacean ganglia. *Symp. Soc. exp. Biol.* 20:111-149.

MEIER T. and REICHERT H. (1990). Neuronal development in the crustacean nervous system studied by neuron-specific antibody labelling. *Frontiers in Crustacean Biology. Advances in Life Sciences*. 523-529.

NASSEL D. R. (1992). The retina and retinal projection on the lamina ganglionaris of the crayfish *Procambarus leniusculus* (Dana). *Comp Neur.* 167:341-360.

NOGUERON I. & ARECHIGA H. (1987). Ritmo de sensibilidad a la luz en la retina aislada del acocil. *Bol Estud Med Biol Mex.* 35:165.

OLIVO R. & LARSEN M. E. Brief exposure to light initiates screen pigment migration in the retinula cells of the crayfish *Procambarus*. *J Comp Physiol.* 125A:91-96.

PAGE T. L. & LARIMER J. L. (1972). Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. Comp. Physiol.* 78, 107-120.

PAGE T. L. & LARIMER J. L. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97, 59-80.

PEREZ M. (1988). Bioquímica de la transmisión sináptica. En UNAM ed. *Bioquímica e Inmunología*. Cap. 29, Vol. 1, pp. 557-575.

RENSING L. (1965). Circadian rhythms in the course of ontogeny. En *Circadian Clocks* (Aschoff J. Ed.), pp. 399-405.

RODRIGUEZ-SOSA L & ARECHIGA H. (1982). Range of modulation of light sensitivity by accessory pigments in the crayfish compound eye. *Vision Res.* 22:1515-24.

SANCHEZ J. & FUENTES-PARDO B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of retinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp Biochem Physiol.* 56A:601-605.

SANDEMAN D. C. & LUFF S. E. (1973). The structural organization of glomerular neuropile in the olfactory and accessory lobes of a freshwater crayfish brain, *Cherax destructor*. *Z. Zellforsch.* 142, 37-61.

SANDEMAN D. C. (1982) Organization of the central neurosystem. En: Bliss Ed. *The Biology of Crustacea*. Vol. 3, Cap. 1, pp. 1-54.

SANDEMAN R. E. & SANDEMAN D. C. (1987). Serotonin-like immunoreactivity of giant olfactory interneurons in the crayfish brain. *Brain Research*. 403:371-374.

SANDEMAN D. C., SANDEMAN R. E. & AITKEN A. R. (1988). Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish *Cherax destructor*. *The Journal of Comparative Neurology*. 269:465-478.

SANDEMAN R. and SANDEMAN D. C. (1990). Development and identified neural system in the crayfish brain. *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science*. 498-516.

SANDEMAN D. C., SANDEMAN R. E. & DE COUET H. G. (1990). Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *Journal of Neurobiology*. Vol. 21, No. 4, pp. 619-629.

SANDEMAN D.C. (1990). Structural and functional levels in the organization of decapod crustacean brains. *Frontiers in Crustacean Neurobiology. Advances in Life Science*. 223-239.

SHAW S. R. & STOWE S. (1982). Photoreception. En: Bliss Ed. *The Biology of Crustacea*. Vol. 3, Chap. 7, pp. 291-367.

SHIVERS R. R. (1967). Fine structure of crayfish optic ganglia. *The University of Kansas Science Bulletin* Vol. XLVII, No. 10. pp. 677-733.

SUKÔ T. (1954). Studies on the development of the crayfish . II. The development of egg-cell before fertilization. *Sci. Rep. Saitama Univ.* 1(2):77-96.

SUKÔ T. (1958). Studies on the development of the crayfish. VI. The reproductive cycle. *Sci. Rep. Saitama Univ.* 3 (2): 79-91.

TAUTZ J. & MULLER-TAUTZ R. (1983). Antennal neuropile in the brain of the crayfish: morphology of neurons. *The Journal of Comparative Neurology.* 218:415-425.

TREHERNE, J. E. (1961). Sodium and potassium fluxes in the abdominal nerve cord of the cockroach *Periplaneta americana*. *L. J. Exp. Biol.* 38: 315-322.

TRUJILLO-CENOZ, O. (1959). Study of the fine structure of the central nervous system of *Pholus labruscoc*. I. (Lepidoptera). *Zeit. f. Zellforsch.* 49:432-446.

TWAROG, B. M. & ROEDER, K. D. (1965). Properties of the connective tissue sheath of the cockroach abdominal nerve cord. *Biol. Bull.* 111:278-286.

WEBB H. M., BENNETT M. F. & BROWN F. A. (1954). Persistence of an endogenous diurnal rhythmicity in eyestalkless *Uca pugilator*. *Biol. Bull.* 106:371-377.

WELSH, J. H. (1930). Diurnal rhythms of the distal pigment cell in the eyes of certain crustaceans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 16:386-395.

WIERSMA C. A. G. (1962). The organization of arthropod central nervous system. *Zoologist.* 2:67-78.

WIGGLESWORTH, V. B. (1960). The nutrition of the central nervous system in the cockroach. *Periplaneta americana* I. *J. Exp. Biol.* 37:500-512.