

177
29^o



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE UNA POSIBLE FASE FOTOINDUCIBLE
EN EL DESARROLLO GONADAL DEL ACOCIL

Procamburus clarkii.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

SONIA RUIZ YAÑEZ



DIRECTORA DE TESIS: MA. LUISA FANJUL PEÑA



1996
FACULTAD DE CIENCIAS
BOLSA DE TRABAJO

**TESIS CON
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
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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:

"Estudio de una posible fase fotoinducible en el desarrollo gonadal del acocil Procambarus clarkii".

realizado por Sonia Ruiz Yáñez

con número de cuenta 9150692-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Ma. Luisa Fanjul de Moles

Propietario Dra. Marcela E. Aguilar Morales

Propietario Dr. Francisco Javier Vega Vera

Suplente Dra. Marisela Villagran Santa Cruz

Suplente M. en C. Oscar Castañón Cervantes

Mano de Luis

Mano de Villagran

[Firma manuscrita]

Comisión Ejecutiva de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

En este campo como en muchos otros de la investigación, cada estudiante es, en el mejor de los casos, un émulo de las deidades portadoras de los destinos y significaciones del tiempo; ha recibido lo aportado y lo ha hecho suyo. Luego, como si ello fuera su día, su tiempo y su destino, debe enriquecerlo para entregarlo a quienes habrán de sucederlo. Trágico en verdad sería que se rompiera la sucesión de los periodos del tiempo con todos sus destinos o, la de los esfuerzos por investigar y ahondar en sus secretos, los del tiempo-espacio en la realidad existencial del hombre universal. Si ello ocurriera, entonces, la vieja antorcha se apagaría, no habría ni significaciones, ni destinos y todo retornaría a la oscuridad primordial...

A mis padres, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por todo lo que en ella y por ella he aprendido.

A CONACyT, ya que a través del apoyo brindado al proyecto 0112-1'N, contribuyó en la elaboración del presente trabajo.

Agradezco también a la Dra. María Luisa Fajul quien me dió la oportunidad de realizar un trabajo de tesis en su Laboratorio, además de que siempre me ha brindado su generosa ayuda.

A mis padres, Héctor Ruiz León y Sonia Yáñez de Ruiz, por haberme apoyado en todo momento durante la carrera.

A mis hermanos Claudia y Héctor.

Tanto a Adolfo como a Pilar, encargados de las Cámaras de Ambientes Controlados, quienes además de darme un espacio, me dieron su amistad.

A la M. en C. Beatriz Coutiño Bello por haberme permitido trabajar en las instalaciones del Lab. de Morfofisiología Vegetal.

A la Dra. Marcela Aguilar Morales por su dedicación y empeño; además de enseñarme pacientemente todas las técnicas histológicas.

Al Síndico, Dr. Francisco Javier Vega Vera y Dra. Marisela Villagran Santa Cruz, por haber corregido y enriquecido este esfuerzo.

Al inigualable "staff" del Laboratorio de Neurofisiología Comparada: Manuel Miranda Anaya, Oscar Castañón Cervantes, Julio Prieto Sagredo, Carolina García Rivera, Elsa Escamilla Chimal y Aquiles Moreno Bernal, así como a mis amigas y amigos: Belty, Mireya, Luisa, Carla, Rocío, Gina, Graciela, Dulce, Rosita, Paula, Esther, Berenice, Norma, Ma. Elena, Karla, Jooorge, Lucho, Pablo, Oscar, Tyson, Ubaldo, Gerardo, Jorge Iván, Daniel, Alejandro, José Luis y Leonardo quienes de alguna o de otra forma contribuyeron en la realización de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
I. DEFINICIÓN DE TIEMPO	10
II. RITMOS BIOLÓGICOS	11
1. CLASIFICACIÓN DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS	11
2. RITMOS ENDÓGENOS Y EXÓGENOS	11
3. CIRCARRITMOS	13
a) Ritmos Circadianos	13
b) Ritmos Circamareales	13
c) Ritmos Circalunares	13
d) Ritmos Circanuales	13
4. RITMOS ULTRADIANOS E INFRADIANOS	14
5. OSCILADORES Y MARCAPASOS	14
6. CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS	15
a) Sincronización	15
b) Desfasamiento	15
c) Amortiguamiento	15
d) Reestablecimiento	15
e) Oscilación espontánea o libre corrimiento	16
7. SISTEMA CIRCÁDICO	16
III. RELOJES BIOLÓGICOS	17
1. ANTECEDENTES DE RELOJES BIOLÓGICOS	17
2. ORIGEN DE LOS RELOJES BIOLÓGICOS	17
3. DEFINICIÓN DE UN RELOJ BIOLÓGICO	18
IV. FOTOPERIODISMO	18
1. INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA	19
a) Modelo de reloj de arena	20
b) Hipótesis de Bünning o coincidencia externa	20
c) Coincidencia interna	20
d) Modelo de resonancia	21
2. EFECTO DE LA INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA EN LA REPRODUCCIÓN Y EN EL CRECIMIENTO	21
a) Antecedentes de la fase fotoinducible (ϕ i)	22
b) Antecedentes de la inducción fotoperiódica en crustáceos	23
V. BIOLOGÍA DEL ACOCIL	24
1. HÁBITAT	24
2. UBICACIÓN TAXONÓMICA	25
3. MORFOLOGÍA EXTERNA	26
a) Aparato genital masculino	27

b) Aparato genital femenino	29
4. MORFOLOGÍA INTERNA	30
a) Histología del testículo	30
(i) Espermatogonias (E)	31
(ii) Espermatocitos primarios (E1)	31
(iii) Espermatocitos secundarios (E2)	31
(iv) Espermatidas (Es)	31
(v) Espermatozoides (Ez)	31
b) Histología del ovario	32
(i) Etapa +1 (Ovario inmaduro)	32
(ii) Etapa +2 (Ovario en vías de Maduración)	32
(iii) Etapa +3 (Ovario maduro)	32
5. CRECIMIENTO, MUDA Y REPRODUCCIÓN	33
a) Control hormonal	33
(i) Control hormonal desde el pedúnculo ocular	34
(ii) Hormonas femeninas	35
(iii) Hormonas masculinas	35
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.	36
III. HIPÓTESIS	36
OBJETIVO	37
MATERIAL Y MÉTODO	37
I. ORGANISMOS	37
II. ACUARIOS	37
III. CONDICIONES EXPERIMENTALES	39
IV. MANIPULACIÓN HISTOLÓGICA	40
RESULTADOS	42
I. FOTOINDUCCIÓN EN HEMBRAS	44
II. FOTOINDUCCIÓN EN MACHOS	49
DISCUSIÓN	60

CONCLUSIONES 63

GLOSARIO 64

LITERATURA CITADA 65

RESUMEN

ESTUDIO DE UNA POSIBLE FASE FOTOINDUCIBLE EN EL DESARROLLO GONADAL DEL ACOCIL *Procambarus clarkii*.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar si el desarrollo de las gónadas de los acociles se encuentra íntimamente ligado a su ciclo endógeno, mostrando una fase fotoinducible en él. Las condiciones experimentales empleadas fueron 12h.luz y 12h.obscuridad, con pulsos de media hora de luz durante la escotofase, desde las 21h.hasta las 5h.de la escotofase del ciclo luz-obscuridad. Peso, longitud y sexo fueron determinados en cada una de las semanas que duró el experimento. En el momento en que los animales alcanzaron la talla crítica establecida (55 mm), se extirparon las gónadas, procesándose con las técnicas histológicas tradicionales. Mediante técnicas de digitalización de imágenes se contaron el número de ovocitos y cistes maduros.

Los resultados indican que existe una fase fotoinducible dentro de la escotofase del acocil, esta fase presenta dos picos de sensibilidad, uno a las 21h.y otro a las 5 h, dichas horas corresponden al anochecer y al amanecer del organismo.

La mayor maduración gonadal se encontró a las 21:00h.seguido por la condición en la cual el pulso se aplicó a las 5:00h.La condición control, es decir, en la que no existió pulso alguno, no presentó maduración gonadal. Lo anterior demuestra que la luz juega un papel inductor muy importante en el desarrollo gonadal del acocil *P. clarkii*.

Debido al planteamiento del diseño experimental, los resultados encontrados demuestran más el efecto de la luz sobre las gónadas que sobre el crecimiento. Sin embargo, los resultados demuestran la acción fotoinducible de la luz sobre la maduración de las mismas.

INTRODUCCIÓN

I. DEFINICIÓN DE TIEMPO

A pesar de todas las complicaciones que muchos de los investigadores han tenido que enfrentar en sus intentos por dilucidar las bases fisiológicas del sentido del tiempo, ahora, tenemos abundantes evidencias experimentales que señalan la existencia de un reloj biológico capaz de medir el tiempo. El concepto de tiempo siempre ha estado estrechamente relacionado con el concepto de Universo, dicha relación se discute en el "Timeo" o "De la naturaleza de Platón", en donde, dentro de su visión cosmológica, concibe que Dios creó un orden eterno y un perfecto estado de absoluto descanso, al que le confirió una naturaleza eterna, creando una imagen móvil de la eternidad que avanza de acuerdo con un número al que se designa con el nombre de tiempo. Según este punto de vista, el tiempo y el Universo son inseparables. El tiempo, a diferencia del espacio, no está determinado como un marco preexistente en donde se pueda enmarcar el Universo, sino que el tiempo forma parte del universo; es decir, que el tiempo es una imagen móvil de la eternidad (Whitrow, 1984).

Todas las medidas físicas y biológicas al alcance de la observación corriente exigen la representación cíclica del tiempo. Este se inscribe naturalmente en un círculo, que junto con el movimiento de las estrellas, de los planetas y del Sol, son movimientos perpetuos. La experiencia existencial y la multitud de indicadores naturales dan la imagen de la circularidad del eterno retorno.

En biología, muchos investigadores creen que el tiempo es el resultado de la percepción basada en factores objetivos provisto por claves externas que controlan procesos fisiológicos, por lo que es característico de cada organismo. Sin embargo, la idea de que el tiempo es absoluto, en el sentido Newtoniano, por momentos se vislumbra como algo inexistente por sí mismo, pero que coexiste con eventos efímeros.

El tiempo no es una ilusión misteriosa del intelecto, es simplemente una característica esencial del Universo.

II. RITMOS BIOLÓGICOS

Un ritmo biológico o "tzotzil k'in",¹ es la recurrencia en el tiempo de cualquier evento dentro de un sistema biológico que mantenga intervalos más o menos regulares o bien una fase estable (Kalmus, 1935).

A pesar de la incredulidad de muchos investigadores, en los últimos años, se ha aceptado la existencia de variaciones periódicas en la mayoría de los procesos bioquímicos fisiológicos y conductuales que juegan un papel clave en la integración de los procesos funcionales de los seres vivos.

La ritmicidad es considerada como una propiedad fundamental de la materia viva, y se encuentra presente desde los organismos más simples hasta los más complejos.

1. CLASIFICACIÓN DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Los ritmos se pueden clasificar según distintos atributos, tales como el lugar donde se generen, la frecuencia de la oscilación y el período de la oscilación del ritmo. De acuerdo al lugar donde se genere la oscilación, los ritmos se dividen endógenos y ritmos exógenos.

La frecuencia de los ritmos en la naturaleza abarca una gran gama del espectro de unidades de tiempo, ya que se pueden observar desde aquéllos que ocupan sólo fracciones de segundo hasta los que llegan a durar un año, por lo que se dividen en: infradianos ($> 24h$) y ultradianos ($< 19 h$) y según su período, los ritmos pueden clasificarse en circadianos ($\cong 24 h$), circanuales ($\cong 1$ año) o circamareales ($\cong 29.7 h$).

2. RITMOS ENDÓGENOS Y EXÓGENOS

El ritmo refleja cambios que pueden ser producto de alguna influencia cíclica externa a la unidad biológica, por lo que sería denominado ritmo exógeno, o, que por el contrario, puede

¹ Vocablo Zinameca que significa periodo de tiempo en el que tiene lugar una ceremonia programada con regularidad (Popol Vuh)

reflejar un cambio o un comportamiento cíclico inducido desde el interior del mismo organismo, por lo que sería un ritmo endógeno. En otras palabras, se puede decir que un ritmo exógeno es análogo a las oscilaciones de un sistema pasivo, esto es, que los sistemas oscilan sólo bajo la influencia de señales externas periódicas, mientras que un ritmo endógeno tiene una oscilación libre de señales externas, ya que posee un período independiente al del ciclo ambiental, aunque en ciertos casos puede sincronizarse adecuando su período al de claves temporales cíclicas externas o zeitgebers. Por ejemplo: existen ritmos que en condiciones naturales muestran una frecuencia de oscilación similar a las de los ciclos naturales externos, como lo son las mareas, las fases lunares, el día y la noche y las estaciones del año; sin embargo, al observarlos en condiciones de aislamiento presentan una frecuencia de oscilación ligeramente diferente, debido a que no dejan de estar sincronizados con ciclos geofísicos.

Se ha demostrado que cada uno de estos ritmos persiste en condiciones aisladas de los ciclos ambientales (Aschoff, 1967), por lo que ahora bajo estas condiciones artificiales, el ciclo del organismo corre a su propia frecuencia natural o "free running", es decir, se manifiesta en oscilación espontánea. Si estas condiciones persisten en el tiempo, el organismo estaría considerado dentro de la clase de organismos que son capaces de autosustentar su propia oscilación (Ritmo Endógeno). Debido a que el período de un ritmo, que oscila libremente, sólo se aproxima al período de un ciclo ambiental, Halberg introdujo en 1959, el prefijo "circa" para caracterizar como circadianos a los ritmos diarios, y de esta forma, poder definir otros tres ritmos endógenos que corresponden a los ciclos del ambiente, como son los ritmos circalunares, circamareales y circanuales; éstos cuatro circarritmos tienen una característica común; muestran una oscilación endógena, que es capaz de ser sincronizada por el ciclo ambiental. Existen circarritmos tanto en plantas como en animales. No hay ningún circarritmo que no esté relacionado con el tiempo externo, por lo que se podría suponer que existe una razón adaptativa que le permite al organismo, ajustar sus procesos de vida al arreglo cronológico natural, mediante su sincronización con éste; es por esto que cada especie tiene una concepción diferente del día, la marea o el año, puesto que cada organismo se sincroniza de acuerdo a sus actividades y cada uno tiene una tabla fisiológica temporal; por esta razón sus fases de actividad y descanso se encuentran, reguladas metabólicamente, a este fenómeno se le conoce como "Nicho temporal", es decir, adaptación temporal de un organismo con el ambiente (Aschoff, 1964).

3. CIRCARRITMOS

a) RITMOS CIRCADIANOS

La raíz de la palabra circadiano, se deriva del latín *circa-diem* que significa cerca de un día; estos ritmos se encuentran sincronizados a ciclos ambientales que muestran un período natural de 24 h, como lo es la duración del día; por esto, muchas características dentro de su fisiología, crecimiento y comportamiento, muestran una ritmicidad circadiana. Generalmente los ritmos circadianos no son exactamente de 24 h, sino que fluctúan en un rango de 20h.a 29h.por ciclo (Aschoff, 1981); este ritmo se encuentra estrechamente relacionado con el movimiento de rotación de la Tierra. Se ha propuesto al ritmo circadiano como la organización temporal óptima de los procesos fisiológicos y conductuales.

b) RITMOS CIRCAMAREALES

Este ritmo se puede observar claramente en los organismos que viven en la zona de marea media ya que tienen un ritmo de $\cong 12.4$ h, del mismo modo se muestra también en los organismos que habitan la zona de marea alta y marea baja, ya que presentan un ciclo tidal de $\cong 14.8$ h.

c) RITMOS CIRCALUNARES

Estos ritmos tienen la misma frecuencia que las fases lunares, un ejemplo típico de ellos es el ciclo menstrual de la mujer.

d) RITMOS CIRCANUALES

Los organismos de vida larga presentan tanto ritmos circanuales como ritmos circadianos; al parecer algunos organismos poseen relojes circanuales que oscilan en ausencia de claves ambientales y su frecuencia aparece una vez al año, similar al del movimiento de traslación de la Tierra.

4. RITMOS ULTRADIANOS E INFRADIANOS

Ritmos Ultradianos

El descubrimiento de los ritmos ultradianos permitió la comprensión de la estructura del tiempo biológico. Los ritmos ultradianos son denominados también ritmos de alta frecuencia ya que su periodo es menor al ritmo circadiano; puede durar desde fracciones de segundo hasta \cong 19 h. Los ritmos ultradianos podrían ser el fundamento del ritmo circadiano, algunos ejemplos de estos ritmos son el constante parpadeo, y los potenciales eléctricos del movimiento ocular durante el sueño, entre otros.

Ritmos Infradianos

El periodo de estos ritmos es mucho mayor a de los ritmos circadianos. Los ritmos infradianos y los ritmos circanuales son en realidad el mismo ritmo, la variación en los nombres se debe a las diferentes clasificaciones mencionadas.

5. OSCILADORES Y MARCAPASOS

Algo indudable en la esencia de los ritmos biológicos es que se encuentran constituidos por una oscilación autosostenida. A esto es a lo que se conoce bajo el nombre de oscilador, si este oscilador es capaz de establecer relaciones de fase con los ciclos ambientales externos se denominará marcapaso, de lo contrario tendrá que ser sincronizado mediante alguno. En esta forma se pueden establecer relaciones recíprocas entre los diferentes osciladores que constituyen un reloj.

El marcapaso, sería pues, una entidad capaz de controlar a los osciladores que a su vez gobiernan a algunos efectores y se realiza determinada función.

Un concepto simple de oscilador se puede establecer haciendo una analogía con una rueda y un punto marcado "X". Cuando la rueda gira y se aleja del punto "X", se forma una curva sinusoidal y cuando llega otra vez al punto de partida "X" se completa la oscilación.

La amplitud en este caso sería igual al diámetro de la rueda, y el periodo sería equivalente al tiempo que tarda la rueda en regresar al punto de partida, es decir, de "X" a "X".

La frecuencia se define como el número de oscilaciones por unidad de tiempo, en este caso, el número de revoluciones es recíproco al periodo.

Aschoff (1960) demostró que la relación entre el tiempo de actividad y reposo (α/p alfa-rho), cambia según la iluminación y se hace mayor o menor de 1, de acuerdo con este momento.

La fase es cualquier punto del ciclo de una oscilación. Cuando alguna parte del ritmo se adelanta o atrasa, como respuesta a cambios ambientales, se provoca un desfaseamiento.

El acoplamiento mutuo entre osciladores establece relaciones de fase estables y logra un alto grado de organización temporal interna.

6. CARACTERÍSTICAS DE LOS RITMOS

a) SINCRONIZACIÓN

Los ritmos endógenos pueden ser sincronizados o acoplados por factores exógenos periódicos como la luz, la temperatura y la alimentación, dichos factores muestran una fuerte influencia marcando el inicio o final de algunos procesos fisiológicos.

b) DESFASAMIENTO

Los ritmos biológicos después de estar determinado tiempo en condiciones constantes pierden totalmente su fase, es decir, el ritmo sufre un adelanto o un retraso.

c) AMORTIGUAMIENTO

Los ritmos después de estar sometidos mucho tiempo a condiciones constantes, poco a poco pierden el ritmo, es decir, la amplitud disminuye tanto que parece que no hay ritmo alguno.

d) REESTABLECIMIENTO

Una vez que se ha perdido el ritmo por completo, se aplica un estímulo aperiódico con lo que reaparece la fluctuación circádica acoplada o en fase con el estímulo (Aréchiga, 1976).

e) OSCILACIÓN ESPONTÁNEA O LIBRE CORRIMIENTO

Si el ritmo se deja bajo condiciones constantes de obscuridad se dice que corre libremente ("free running"), ya que no tiene ninguna señal externa que lo acople con su fase de inicio y el ritmo muestra sus características endógenas originales.

7. SISTEMA CIRCÁDICO

El sistema circadiano tiene tres componentes principales:

- 1.- Vías de acoplamiento, a través de receptores (Fotorreceptores).
- 2.- Marcapasos y osciladores.
- 3.- Pautas eferentes o salidas que se acoplan a los sistemas efectores del marcapasos y muestran un funcionamiento circadiano.

El término "Sistema Circádico" ha sido utilizado por muchos años, pero no ha sido sino hasta los últimos 20 años en los que se ha logrado comprender de manera más detallada su verdadero significado (Waterhouse, 1995). La naturaleza endógena de los ritmos circádicos implica la existencia de mecanismos fisiológicos que generen y mantengan la organización temporal del organismo, siendo cuatro los procesos regidos por éste sistema:

- ⇒ Cronometría, que es la generación de oscilaciones por parte de un reloj biológico por medio de las cuales el organismo puede medir el tiempo aún en la ausencia de claves temporales;
- ⇒ Sincronización, que se refiere a la conjunción de la ritmicidad biológica de los organismos con los ciclos ambientales.
- ⇒ Transmisión, es el paso de la señal proveniente del oscilador hacia los sistemas efectores que expresan la ritmicidad, es decir, se trata de la serie de señales internas que el organismo requiere en la manutención de su organización temporal, por lo que podría considerarse como una especie de cronómetro del organismo mismo.
- ⇒ Acoplamiento, se denomina así a la conjunción guardada por los osciladores logrando un funcionamiento coordinado (Granados *et al*, 1995).

III. RELOJES BIOLÓGICOS

1. ANTECEDENTES DE RELOJES BIOLÓGICOS

Aunque el interés en los relojes biológicos data aproximadamente de 2500 años, desde que el poeta griego Archilochus escribió "El ritmo que gobierna al Hombre" (Aschoff 1974), existieron ciertos períodos en la humanidad que se caracterizaron por manifestar esta inquietud. Jacques de Mairan, en 1729, observó que algunas actividades biológicas, que ocurren diariamente en condiciones naturales, persisten en temperatura y oscuridad constantes, el período de estas actividades es cercana a las 24 h, es decir, son de naturaleza circadiana (Pittendrigh, 1993).

En 1779, W. Hufeland denominó a los períodos de 24 horas como la unidad cronológica natural, en su frase "Die 24-stündige periode...sie ist gleichsam die Einheit unserer natürlichen Chronologie", en donde manifestó que el período de 24 horas es igual a nuestro biorritmo (Pittendrigh, 1988).

J. J. Virey utilizó, en 1874, por primera vez la expresión "Horloge vivante" que significa reloj que vive; a mediados del siglo XIX, ya no se cuestionaba que cada organismo vivo sobre la tierra, fuera capaz de generar una ritmicidad en sus propios procesos fisiológicos y fue en ese siglo cuando Augusto Forel sugirió que, los organismos poseían una especie de memoria temporal o Zeitgedächtnis.

Sin embargo, no fue sino hasta 1930 que Erwin Bünning hizo un análisis de los ritmos biológicos; tiempo después se logró demostrar que los organismos pueden medir el tiempo generando oscilaciones (Aschoff, 1960). Al poco tiempo Pittendrigh y Minis (1964) hizo una descripción más formal acerca de los relojes biológicos mediante la integración de sus fundamentos morfofisiológicos.

2. ORIGEN DE LOS RELOJES BIOLÓGICOS

Los primeros relojes biológicos probablemente tuvieron su origen hace cuatro mil millones de años cuando aún no existía la capa de ozono, por lo que, los primeros organismos, de no ser por el desarrollo de una organización temporal, seguramente hubieran perecido (Brady, 1979).

Algunos registros fósiles, como los anillos en los árboles, avalan dicha teoría, en la actualidad existen organismos tanto unicelulares como pluricelulares que presentan una ritmicidad de ≈ 24 h, lo que hace suponer que probablemente es en una de las formas más simples de vida de donde surgió el primer esbozo de reloj biológico.

3. DEFINICIÓN DE UN RELOJ BIOLÓGICO

Un reloj biológico es un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, es decir, un sistema que tiene la capacidad de oscilar con un período regular que permite que estas oscilaciones sean utilizadas como una referencia temporal interna, con lo que el organismo puede tener un completo dominio de la variante tiempo e integrarse adecuadamente a su entorno. Sin embargo, aún existen controversias con respecto a lo que es un reloj biológico, ya que autores como Pittendrigh (1993) y Aschoff (1964) lo definen como “un conjunto de estructuras orgánicas que funcionan como marcapasos capaces de imponer período y fase a los procesos orgánicos”, en tanto que otros autores como Halberg y Reinberg (1967) lo definen como “el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, en el cual la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos”.

IV. FOTOPERIODISMO

Como ya ha sido mencionado, la mayoría de los eventos biológicos se encuentran bajo una fuerte influencia del medio físico que los rodea; dicho medio tiene características periódicas, es decir, tienen cierta recurrencia en el tiempo, tanto por el movimiento de rotación, como por el de traslación de la tierra; estos eventos son traducidos por los organismos en fluctuaciones cíclicas de luz y oscuridad, lo que, de alguna o de otra forma, les ha permitido crear un mecanismo de predicción, es decir, de establecer anticipadamente una estrategia viable para su sobrevivencia.

La manera más evidente de obtener información del ambiente, es la luz, esto es, mediante la medición de la duración del día y de la noche, con lo que el organismo cuenta con un dato geofísico confiable y relativamente estable. Esta programación temporal se encuentra basada

en osciladores biológicos que tienen un período y una frecuencia determinada, generalmente alrededor de un día del ciclo ambiental (Pittendrigh, 1965); esta ritmicidad, parece ser una propiedad fundamental de la vida eucarionte, debido a la marcada influencia del ritmo ambiental periódico sobre los procesos fisiológicos de los organismos, a lo que Garner y Allard en 1920, le dieron el nombre de fotoperiodismo (Whitrow, 1984).

Muchas especies de animales y plantas son capaces de distinguir entre las noches cortas del verano de las largas noches de otoño y son capaces también de responder a estos cambios mediante apropiadas modificaciones estacionales de su fisiología y comportamiento.

Los insectos, como muchos otros organismos, utilizan el número de horas del día (fotofase) y de la noche (Escotofase) para regular ciclos estacionales de actividad, morfología, reproducción y desarrollo (Saunders, 1970), del mismo modo, el fotoperíodo controla la inducción de la diapausa, el comportamiento sexual, la muda y la fecundidad.

Los requerimientos mínimos para responder a los cambios periódicos del ambiente, son:

La presencia de un fotorreceptor capaz de distinguir el día de la noche, un reloj que mida e integre la duración del día y de la noche y un sistema efector que controle el proceso fisiológico que debe ser inducido (Saunders, 1978).

El reloj integra básicamente dos tareas: la medición de la duración del día o de la noche (Reloj fotoperiódico, *sensu stricto*) y la suma del efecto de las noches o días, cortos o largos sobre el número de ciclos contados diariamente (Contador fotoperiódico, Saunders, 1971).

Las respuestas fotoperiódicas son un mecanismo fundamental para la transferencia de información proveniente del medio en el control del sistema neuroendócrino del organismo.

1. INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA

La inducción fotoperiódica permite a los organismos ajustar sus procesos fisiológicos de manera tal que coincidan temporalmente con el medio externo más favorable para lograr una mejor adecuación.

Existen varios modelos que explican el fenómeno de la inducción fotoperiódica:

a) MODELO DE RELOJ DE ARENA

Este modelo postula un cambio en el inicio o terminación de determinados procesos fisiológicos, esto es que, a partir de un periodo de iluminación, se dispara o se inhibe algún proceso. Se denomina "reloj de arena" porque el estímulo tiene la particularidad de voltear el reloj, es decir, de comenzar o inhibir algún proceso fisiológico determinado.

b) HIPÓTESIS DE BÜNNING O COINCIDENCIA EXTERNA

Un modelo totalmente opuesto fue el propuesto por Bünning en 1936, en el cual sugiere que la medición del tiempo fotoperiódico es una función del sistema circadiano del organismo, por lo que este modelo supone la existencia de un ciclo endógeno diario que comprende una fase fotofílica de 12h.(medio ciclo) y una fase escotofílica de 12h.(medio ciclo). Por lo que cuando la fotofase del ciclo luz-oscuridad, es corta, la luz se restringe a la fase fotofílica y ocurren los efectos de la noche larga, pero cuando el fotoperíodo es largo, la luz se extiende a la fase escotofílica produciendo efectos de día largo. Son dos los fundamentos en los que se apoya este modelo:

- 1.- Se basa en una ritmicidad circadiana y,
- 2.- Supone una interacción entre la luz externa y una fase de la oscilación particularmente fotosensible.

28 años después, Pittendrigh y Minis, reconocieron un doble requerimiento de la luz, sincronización e inducción y sugirieron que la fase fotoinducible propuesta por Bünning se encuentra mucho más restringida, en tiempo, que la fase escotofílica y que la fotoinducción pone en fase diferentes actividades fisiológicas con claves temporales externas, a esto le dieron el nombre de Modelo de Coincidencia Externa.

c) COINCIDENCIA INTERNA

Este modelo reconoce la importancia de que los sistemas circadianos de los organismos complejos están seguramente constituidos por un multioscillador que, de acuerdo con las variaciones del fotoperíodo durante las estaciones, cambia las relaciones entre los componentes de los subsistemas de la fase interna. La fase interna puede ponerse en fase con un oscilador, por coincidencia, por el amanecer o por el anochecer, por lo tanto, admite que el único papel que juega la luz es el de acoplador, es decir, que la luz simultáneamente acopla

dos osciladores estableciendo un ángulo de fase entre ellos (Saunders, 1978). Es este acoplamiento entre los ritmos lo que origina la inducción y no la sincronización del ritmo con la luz.

d) MODELO DE RESONANCIA

Pittendrigh y Minis (1964) basándose en la naturaleza multioscilar del sistema circadiano, sugirieron que la ritmicidad circadiana podría estar involucrada con el fotoperiodismo, pero no necesariamente con la medición del tiempo, es decir, que sin importar de qué forma se mida el tiempo, la forma de medirse está en función de la proximidad de la resonancia del sistema multioscilar circadiano con su ciclo de acoplamiento.

2. EFECTO DE LA INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA EN LA REPRODUCCIÓN Y EN EL CRECIMIENTO

El ciclo reproductivo necesita de una organización temporal en relación a los recursos del medio ambiente. Los cambios en las condiciones meteorológicas envían señales al sistema endócrino el cual responde con alteraciones adaptativas de sus funciones fisiológicas. Todos los factores físicos del medio ambiente, tales como la luz, varían según las distintas estaciones del año. Para asegurar la sobrevivencia de la especie, los organismos tienen que adaptarse a estas variaciones y de este modo sincronizar su actividad reproductiva con las estaciones más favorables del año (Pévet, 1986).

Los mejores diseños experimentales en el estudio de la inducción fotoperiódica sobre la reproducción de diversos organismos, han sido tanto la interrupción del período oscuro con un pulso de luz, como el uso de la duración anormal del ciclo de luz; particularmente cuando la noche, corta es acoplada a una gama de noches extendidas que proporcionan ciclos de gran duración.

Algunos de los trabajos aquí citados, tienen por objetivo el dilucidar el efecto de la fotoinducción en la reproducción de los organismos, a la luz de los diferentes modelos. Por ejemplo, una de las evidencias más representativas del modelo del reloj de arena, lo constituyen los extensos trabajos de Lees (1966, 1968, 1973) sobre el áfido verde *Megoura viciae*, en donde ha descrito que este insecto muestra dos picos de efecto de noche corta con interrupciones durante la noche, uno de ellos ocurrió dos horas después del anochecer y el

otro es más pronunciado y ocurrió cuando el pulso de luz cayó en las últimas 6 horas de la noche, estos resultados son interpretados como una evidencia de que la duración de la noche es de crucial importancia y que la medición del tiempo comienza durante el anochecer más que durante el amanecer, del mismo modo, demuestra que la reproducción de algunos insectos es especialmente fotoinducible en dos etapas de la escotofase, la primera es cuando inicia el anochecer y la segunda es antes del amanecer.

Bünning (1969) expuso larvas de la mariposa de la col, *Pieris brassicae*, a diferentes regímenes de luz en donde la noche era sistemáticamente interrumpida por pulsos de 30 min de luz, cuando los pulsos se aplicaban 15 h. después del anochecer y 15 h. antes del amanecer, se observaban efectos de día largo. Con estos resultados, Bünning sugirió que no había participación alguna del sistema circadiano en la inducción fotoperiódica. Sin embargo, Pittendrigh y Minis (1971), en experimentos de coincidencia externa, examinaron la inducción fotoperiódica en tres diferentes ritmos de la polilla rosa *Pectinophora gossypiella*, ovoposición, eclosión del huevo y eclosión de la pupa. Estos autores realizaron varios experimentos y concluyeron que los organismos son sistemas formados por muchas oscilaciones circadianas, en donde por lo menos una se encuentra acoplada a un evento lumínico externo. En este organismo, la inducción fotoperiódica no está relacionada ni con las horas del fotoperíodo ni con la duración de la escotofase. La inducción únicamente depende de la coincidencia de un pulso de luz con una fase específica de la oscilación circadiana.

Saunders (1978, 1979) analizó la inducción fotoperiódica en el ritmo circadiano de eclosión de la pupa de *Sarcophaga argyrostoma*, con el fin de examinar la sincronización de los sistemas circadianos oscilatorios. Este autor comparó la diapausa de *S. argyrostoma* y de *Nasonia vitripennis*, concluyendo que la inducción fotoperiódica de *S. argyrostoma*, puede explicarse mediante el modelo de coincidencia externa, en este organismo se encontró una fase fotoinducible (\emptyset_i), mientras que en *N. vitripennis* no hay fase fotoinducible (\emptyset_i) y el modelo explicativo es el de coincidencia interna.

a) ANTECEDENTES DE LA FASE FOTOINDUCIBLE (\emptyset_i)

Diferentes respuestas fotoperiódicas controladas según la estación del año indican la habilidad de los organismos de medir el tiempo, sin embargo, cómo se realiza esta medición

del tiempo fotoperiódico es aún desconocido. Dentro del tiempo fotoperiódico existe una particular fase de fotosensibilidad (O_i), la cual al ser iluminada durante la noche provoca efectos de día largo (Lees, 1966, 1968, 1973). La importancia de este momento de sensibilidad a la luz fue enfatizada por primera vez en 1936, en la hipótesis de Bünning, donde representa una fase específica del ritmo circadiano de sensibilidad fotoperiódica donde ocurre una fotoinducción.

La fase fotoinducible (O_i) ha sido encontrada en más de 50 especies de insectos, aves y mamíferos, dicha fase aparece como una constante en todos los organismos capaces de medir el tiempo fotoperiódico.

Muchos experimentos se han realizado en la búsqueda de la ubicación exacta de la fase fotoinducible (O_i), en la mayoría de ellos se aplican pulsos luminosos que interrumpen la escotofase. En la mariposa blanca de la col *Pieris brassicae*, como en otros insectos de otras especies, se han encontrado dos puntos (A y B) en los cuales existe una respuesta diferente, por ejemplo, si la luz incide en el punto A se provoca un efecto de día corto y si la luz incide en el punto B entonces provoca un efecto de día largo.

Lees (1966, 1968, 1973) realizó experimentos sobre el áfido verde *Megoura viciae*, el cual presentó dos picos de efecto de noche corta con dos interrupciones durante la noche, una de ellas dos horas después del anochecer y la otra, cuando el pulso de luz se situó en las últimas 6 horas de la noche.

Follet *et al* (1992) publicaron que cuando el pulso luminoso coincide con la fase fotoinducible, la codorniz japonesa *Coturnix coturnix japonica* responde como si estuviera sometida a un fotoperiodo largo. Trabajos posteriores, como los realizados por Castañón-Cervantes *et al* (1995) reportaron que la existencia de la fase fotoinducible (O_i) del acocil muy probablemente se encuentre al anochecer del ciclo luz-obscuridad.

b) ANTECEDENTES DE LA INDUCCIÓN FOTOPERIÓDICA EN CRUSTÁCEOS

El proceso de reproducción en los crustáceos muestra una marcada influencia de estímulos ambientales, ya que está muy relacionado con los ciclos de movilización de reservas orgánicas de su lugar de almacenamiento hacia las gonadas (Adiyodi y Adiyodi, 1970).

El primer indicio de que la glándula sinusal poseía funciones reproductoras importantes fue demostrado por Panouse en 1943, en experimentos realizados en el camarón *Leander serratus*.

Tiempo después, Stephens (1952) a través de comparaciones experimentales en el acocil, *Cambarus virilis*, encontró que existe una fuerte influencia del fotoperíodo sobre las hormonas involucradas en la reproducción. Sugirió que la luz juega un papel primordial en la síntesis de la hormona estimuladora de las gónadas (HEG) e inhibe la producción de la hormona inhibidora de las gónadas (HIG) sintetizada por el órgano-X y la glándula sinusal. Los trabajos de Stephens fueron corroborados por los realizados por Sukô (1958) y Castañón-Cervantes *et al* (1995) en lo cuales, estos autores, eliminaron los estímulos lumínicos y encontraron que no hay desarrollo gonadal en condiciones de obscuridad constante, por lo que los dos grupos de investigación concluyeron que la luz es un factor indispensable tanto para el crecimiento como para la maduración gonadal.

En el mismo trabajo los autores Castañón-Cervantes *et al*, determinaron que en el acocil *Procambarus clarkii* parece existir un fotoperíodo óptimo para el crecimiento, el cual es de 12h y encontraron que los organismos sometidos a regímenes de 12:12 LD pero con interrupciones de luz en la escotofase, mostraban una maduración gonadal más temprana durante los experimentos.

En el acocil, el proceso de reproducción está muy ligado al proceso de muda, ya que los eventos de ovulación, incubación y ovoposición, ocurren durante la intermuda, lo que implica que existe una sincronización entre ambos procesos.

Los crustáceos ajustan sus actividades reproductivas a los cambios estacionales, de manera tal que la liberación de los juveniles se realice cuando las condiciones ambientales sean las mejores para incrementar su sobrevivencia, esta sincronización parece ocurrir debido a la información genética de los individuos que se expresa a nivel endócrino y nervioso.

V. BIOLOGÍA DEL ACOCIL

1. HÁBITAT

Los acociles pertenecen al orden más grande de los crustáceos, *Decapoda*, que posee 1,200 géneros y 10,000 especies; la mayoría marinos, el único decapodo de agua dulce perteneciente

al grupo de *Macrura-Reptantia* (Cangrejos de cola larga) es el acocil. Este género se encuentra frecuentemente en el Norte de América; se localiza en diferentes hábitats, como pantanos, ciénegas, lagos y lagunas de agua dulce.

Durante sus primeras etapas de vida estos organismos viven principalmente en zonas de aproximadamente un metro de profundidad. Conforme van creciendo, migran hacia las partes someras que llegan a tener 3 cm de profundidad; una vez alcanzada su talla definitiva, estos animales se concentran en partes donde hay mayor vegetación, con el fin de ocultarse de los depredadores, debido a esto, este organismo tiene su mayor actividad durante la noche, ajustando su reloj biológico a las condiciones de luz tenue del crepúsculo. Durante la noche, se puede observar en plena actividad en busca de alimento y cuando aparece el sol, se esconden en sus guaridas donde se quedan desde el amanecer para reactivarse hasta ocultarse el sol.

2. UBICACIÓN TAXONÓMICA

Existen 12 géneros dentro de la familia *Cambaridae*, once de los cuales se pueden encontrar en el Norte de Mesoamérica. La nomenclatura se basa principalmente en la morfología de los gonopodios sexualmente maduros del macho denominados petasmas. Clasificación (Holdich y Lowery, 1988)



3. MORFOLOGÍA EXTERNA

El cuerpo del acocil *P. clarkii* se encuentra dividido en dos partes: una anterior, el cefalotórax y otra posterior que es el abdómen; los segmentos de la cabeza y del tórax están fusionados en lo que se conoce como cefalotórax, éste termina en un pico denominado rostro. El tórax está constituido por ocho segmentos: maxilípedos y periópodos y el abdómen está formado por seis somites, articulados y prolongados, llamados pleópodos (André, 1960).

El color más representativo en las partes laterales, es el rojo y café rojizo en las partes dorsales, aunque varía considerablemente dependiendo del sustrato en el que habiten. (Figura 1).

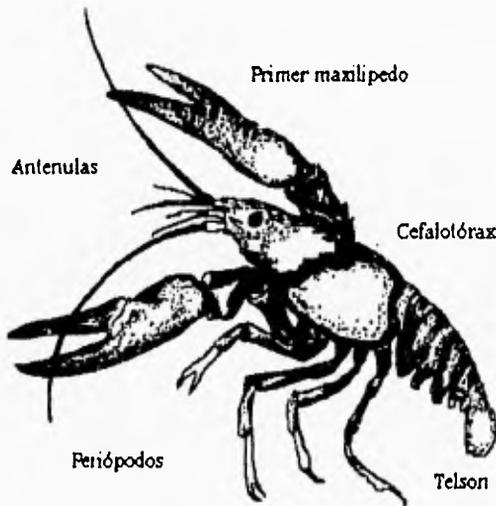


Figura 1
Vista lateral de un organismo perteneciente a la especie *Procambarus clarkii*. Tomado de Fresh Water Crayfish V

a) APARATO GENITAL MASCULINO

El aparato genital masculino está formado por un testículo, dos canales seminales y dos glándulas andrógenas. El testículo, a su vez, está formado por tres lóbulos, uno anterior y dos posteriores, los tres lóbulos muestran la misma longitud; el testículo está ubicado entre la base del primer maxilípodo y el quinto periópodo, éste se extiende dorsalmente en la región torácica; la fusión de sus regiones posteriores forma una "Y", donde se distingue una mitad anterior par y otra mitad posterior impar. Los canales espermáticos nacen de cada costado del testículo, muy largos y contorneados; desembocan en aberturas genitales o gonoporos situados en la base de la quinta pata caminadora.

Durante su desarrollo, el testículo crece paralelamente al organismo, sin embargo, esta relación se rompe, cuando el animal alcanza los 40 mm de longitud y aunque el organismo continúa su crecimiento, el testículo se mantiene en una talla constante, lo anterior indica que tal vez, el testículo, muestra histológicamente una maduración más temprana en relación al ovario.

Los espermatozoides de estos decápodos no presentan flagelos por lo que son inmóviles, la forma típica de los mismos es romboide (Harrison, 1992).

Las características sexuales secundarias de los machos maduros son la aparición del primero y segundo par de pleópodos modificados, en un órgano copulatorio, denominado petasma, capaz de manipular el espermatóforo. Las quelas presentan una forma marcadamente rectangular a diferencia de las hembras, así como una espícula en el tercer par de periópodos. (Figura 2)

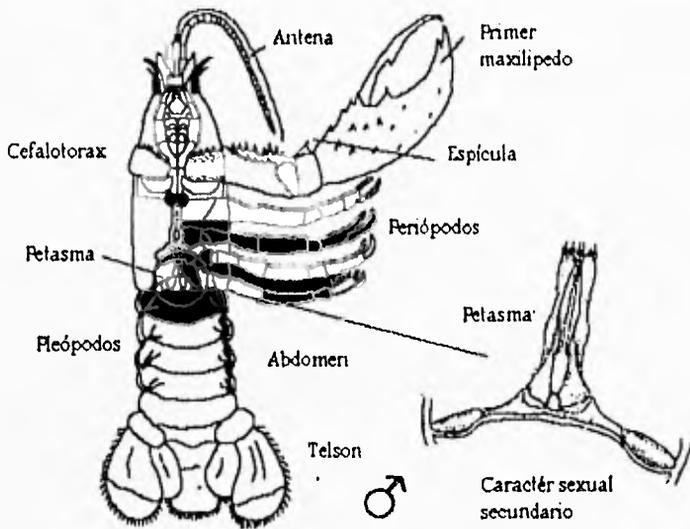


Figura 2

Izquierda, morfología externa de un acocil macho maduro, se observan caracteres sexuales secundarios como la espícula del tercer par de periópodos (Sukó, 1953), y a la derecha se observa la morfología del petasma.

El canal espermático derecho es evidentemente más ancho, opaco y contorneado que el izquierdo, lo que sugiere que el canal espermático izquierdo no es funcional, por lo que está considerado como un ducto atrofiado (Figura 3). Dentro del canal espermático derecho, los espermatozoides se agrupan tanto en la parte proximal, como media y distal del mismo, mientras que en el izquierdo no se encuentra ningún espermatozoide. La formación del espermatóforo ocurre en las partes media y distal del canal espermático derecho (Delong y Payne, 1987).

Los organismos machos alcanzan la madurez sexual a los 13 meses de eclosionados, esto es aproximadamente a los 55 mm de longitud (Sukó, 1958).

Las espermatogonias no se dividen simultáneamente, por consiguiente, se pueden encontrar espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides dentro de un mismo testículo (Sukó, 1958). Niiyama (1934) en trabajos realizados en el acocil *Cambaroides japonicus* encontró que la espermatogénesis

generalmente ocurre en dos fases: la primera se da tempranamente en la parte central del testículo y en la salida del canal espermático, la segunda ocurre en la parte periférica de cada lóbulo del testículo. Esto mismo fue corroborado por Harrison (1992) quien describió que la maduración del testículo se da progresivamente comenzando por la capa de espermatogonias que se encuentra en la periferia del canal espermático. Los espermatozoides se sitúan en la parte central del lóbulo para después pasar al canal espermático.

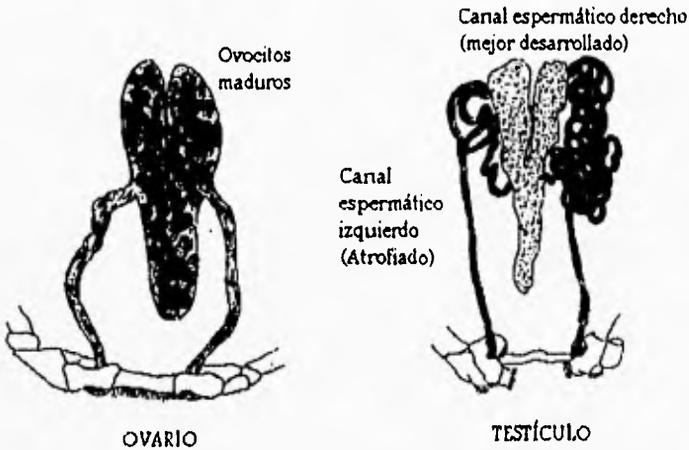


Figura 3

Se observa la morfología interna tanto del ovario (izquierda), repleto de ovocitos maduros (izquierda), como del testículo donde se observan ambos canales espermáticos (Derecha).

b) APARATO GENITAL FEMENINO

El aparato genital femenino comprende un ovario y dos oviductos. El ovario está localizado dorsalmente en la región torácica y se extiende hasta el segundo segmento abdominal (Figura 3). El ovario está formado por tres lóbulos y está rodeado por músculo, termina en el antepenúltimo segmento torácico. La característica sexual secundaria más evidente de las hembras, es la presencia de un desarrollado receptáculo seminal, también conocido como *annulus ventralis*, localizado entre la base de los pleópodos (Figura 4), así como la presencia de una hilera de papilas translúcidas, simétricamente distribuidas a lo largo del telson; estas

espinas o papilas son, en realidad, estructuras glandulares que facilitan la adhesión firme de las crías a su madre (Andrews, 1907). Los apéndices abdominales en la hembra son de mucho mayor tamaño que los de los machos, a la vez de que existe una diferencia significativa entre la longitud del endopodito y el exopodito en cada apéndice abdominal de la hembra, estas características son apreciadas de mejor manera en el quinto apéndice abdominal (Sukó, 1953).

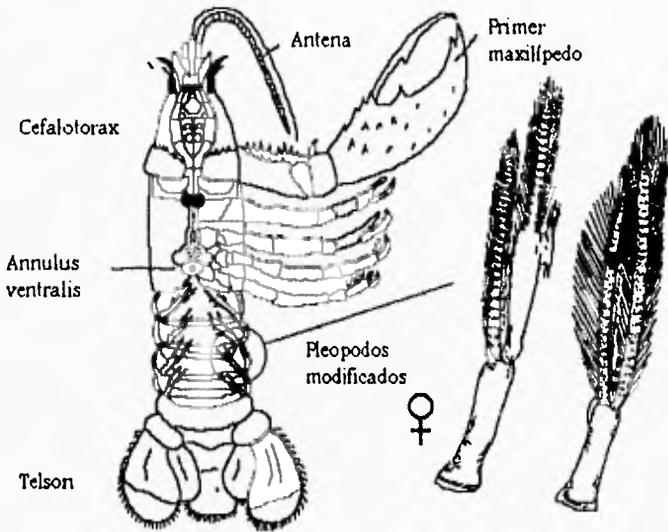


Figura 4

En esta figura se observa la morfología externa de un acócil maduro hembra en donde se aprecia la ubicación del *annulus ventralis* y los apéndices abdominales de la hembra que indican su completa maduración sexual (Sukó, 1953).

4. MORFOLOGIA INTERNA

a) HISTOLOGIA DEL TESTÍCULO

El testículo está compuesto por cistes que a su vez contienen células en diferente grado de diferenciación (Espermatogonias, espermatocitos primarios, espermatocitos secundarios, espermátidas y espermatozoides). Los cistes están característicamente rodeados por células intermedias (C.I.).

La maduración de las células de los cistes del testículo es completamente asincrónica, es decir, que las espermatogonias no maduran simultáneamente, por esto, se pueden encontrar varios tipos celulares en un mismo testículo (Niyama, 1934 y Sûko, 1958). Los diferentes tipos celulares se describen a continuación:

(i) Espermatogonias (E)

Contenidas en cistes que presentan células intermedias pequeñas, las espermatogonias son células que poseen un núcleo grande y un citoplasma irregular. Con la maduración de estas células el citoplasma comienza a disminuir en área.

(ii) Espermatocitos primarios (E1)

Estos cistes presentan células intermedias de mediano tamaño, las células del interior del ciste, se denominan espermatocitos primarios caracterizados por poseer núcleos centrales de gran tamaño.

(iii) Espermatocitos secundarios (E2)

Las células intermedias del ciste son de mayor tamaño, los espermatocitos secundarios poseen un núcleo pequeño excéntrico, las células presentan poco citoplasma.

(iv) Espermatidas (Es)

Las células intermedias aumentan su tamaño considerablemente, las espermátidas del interior del ciste presentan un núcleo ovoide, citoplasma muy escaso e inclusive ausente.

(v) Espermatozoides (Ez)

En el ciste se observan células intermedias muy grandes, las células del interior del ciste no presentan citoplasma, su núcleo es totalmente irregular, la forma típica del espermatozoide es romboide sin embargo, ocasionalmente se observa de forma totalmente irregular.

b) HISTOLOGÍA DEL OVARIO

El ovario esta formado por ovocitos cuyo grado de diferenciación se divide en tres etapas (Sukó, 1958):

(i) Etapa +1 (Ovario inmaduro)

Presenta ovocitos pequeños, es decir, menores de 20,000 micrómetros², su núcleo es esférico y central, su citoplasma es homogéneo ya que no presenta granulaciones, aunque ocasionalmente llega a presentarse alguna diminuta goata albergando sustancias de reserva.

Alrededor de los ovocitos se encuentra una capa sincicial de células foliculares íntimamente adosadas a los núcleos citoplásmicos de estos. Existen grandes espacios intraovocíticos llenos de fluido oxifílico.

(ii) Etapa +2 (Ovario en vías de Maduración)

El ovario está constituido por ovocitos de forma irregular de mediano tamaño, oscilando entre 20,000 y 50,000 micrómetros², su núcleo adopta una forma clipsoidal. Los gránulos de cromatina se vuelven gruesos grumos que migran hacia la membrana nuclear. Su citoplasma presenta pocas granulaciones. Los gránulos de sustancias de reserva incrementan en tamaño y se localizan a la periferia. El espacio intraovocítico es de menor tamaño.

(iii) Etapa +3 (Ovario maduro)

El ovario maduro presenta ovocitos grandes de forma irregular, su tamaño es mayor a 50,000 micrómetros². El núcleo ovoide excéntrico, con numerosos nucleolos situados hacia la membrana nuclear. El citoplasma perinuclear es densamente granular y en la zona cortical se localizan numerosas plaquetas de vitelo. Las células foliculares se encuentran notablemente aplanadas. Entre los ovocitos maduros se observan también algunos ovocitos inmaduros. Los espacios intraovocíticos disminuyen debido al incremento en el tamaño de los ovocitos.

5. CRECIMIENTO, MUDA Y REPRODUCCIÓN

Muchos son los estudios que se han hecho sobre la ovoposición y eclosión del acocil americano, *Procambarus clarkii* (Girard), por lo que de acuerdo a Van Deventer (1937) y Tack (1941), la ovoposición ocurre generalmente de abril a mayo y la eclosión de mayo a junio. El desarrollo de los huevos no sólo se encuentra influido por la temperatura del agua, sino que también influye de manera importante el movimiento de los apéndices abdominales de la hembra, denominado vibración, ya que el número de vibraciones se incrementa conforme aumenta la temperatura, con lo que la hembra estimula el desarrollo de los huevecillos (Sukô, 1953).

El ciclo de vida del acocil, se basa en una serie de mudas, durante las cuales los organismos incrementan su talla; su desarrollo embrionario tiene una duración de dos a tres semanas, a una temperatura de 22° C aproximadamente. Después de eclosionar, a las tres semanas de edad, presentan sus dos primeras mudas, lo que les proporciona una autosuficiencia total.

Los acociles requieren de 11 mudas antes de alcanzar su madurez sexual, variando la talla en un rango de 45 mm a 125 mm. Los períodos de intermuda varían según la temperatura (20°C - 22°C), por lo que pueden ser de 6 hasta 30 días, es decir, lo que tardan en incrementar su tamaño (Holdich y Lowery, 1988). El período de intermuda, convierte a éstos organismos en presa fácil del canibalismo, debido a la falta de protección de un exoesqueleto rígido; es por ello que se da cierta sincronización en los períodos de muda en estos animales.

El ambiente en el que se desarrollan se ve reflejado en el tiempo que tardan en alcanzar la talla definitiva, ya que en estos organismos, la fecundidad se encuentra estrechamente ligada a su talla corporal.

La regulación de tiempo de muda del acocil se encuentra controlada por el sistema endócrino de los crustáceos el cual involucra la interacción de los órganos X y Y y la secreción de neurohormonas. Las neurohormonas generalmente se acumulan en los órganos neurohemales, compuestos por terminales axónicas y fibras de tejido conectivo.

a) CONTROL HORMONAL

En el acocil hay tres órganos neurohemales: la glándula sinusal, los órganos post-conisurales y los órganos pericárdicos. Son principalmente tres, los tipos de hormonas liberadas:

- 1.- Neurohormonas del Sistema Nervioso Central.
- 2.- Las hormonas procedentes de glándulas epiteliales como el órgano-Y, las glándulas androgénicas, el ovario y el órgano mandibular.
- 3.- Las feromonas.

(i) Control hormonal desde el pedúnculo ocular

El pedúnculo ocular fue la primera estructura sugerida como la generadora de los ritmos circadianos en crustáceos, lo que se comprobó mediante la ablación de la misma, lo cual inhibe completamente el ritmo circadiano de la locomoción (Kalmus, 1938); otra razón para considerar al pedúnculo ocular como un posible marcapaso, fue la identificación de tres ritmos: el de actividad metabólica, el de cromatóforos del pedúnculo ocular y el de locomoción. Todas estas funciones se encuentran controladas por hormonas secretadas y almacenadas en el pedúnculo ocular (Kleinholz, 1976).

Durante los años 60 se propuso que el ciclo de la muda está regido por dos hormonas: la hormona inhibidora de la muda (IIM), secretada por el órgano X-glándula sinusal y la hormona de la muda (HM) o ecdisona sintetizada por el órgano Y.

El órgano Y es un cuerpo pareado situado en la región posterior del esófago cerca de la base de cada maxila y es el responsable del comienzo de la muda, mediante la liberación de la ecdisona. En un animal intacto, la muda es inhibida por la secreción de la hormona inhibidora de la muda secretada por el órgano-X-glándula sinusal localizada el pedúnculo ocular, si alguna de estas estructuras, son extirpadas durante la fase de intermuda, la ecdisona es liberada por lo que comienza la muda, sin embargo, se ha propuesto que la pérdida de apéndices o autotomía (Passano y Jyssum, 1963) además del daño a cualquier estructura nerviosa (Bittner y Kopanda, 1973), podrían inducir también, el comienzo de la muda.

Los principales sitios de producción neurohumoral, son el cerebro y el pedúnculo ocular, durante el crecimiento se da fundamentalmente en éste último por lo tanto, su extirpación o lesión tiene efectos evidentes sobre aspectos variados en la fisiología y etología del acocil. Se ha comprobado que como resultado de su extirpación se acelera la muda en organismos juveniles y se incrementa el desarrollo gonadal en organismos maduros. Las neurohormonas son

secretadas por el cerebro y órgano-X y son acumuladas en la glándula sinusal hasta que se liberen hacia la hemolinfa (Bliss, 1954).

(ii) Hormonas femeninas

Actualmente existe evidencia que sugiere que los ovarios podrían controlar hormonalmente el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de las hembras, sin embargo, la existencia de la Hormona Femenina (FH) aún no ha sido confirmada. Algunos estudios en decápodos indican que los caracteres sexuales secundarios de las hembras son inhibidos por la presencia de la hormona androgénica. Esto fue comprobado por experimentos realizados por Reidenbach en 1967, en el isópodo *Idotea balthica* al cual le fue extirpada la glándula androgénica con lo que aparecieron caracteres sexuales secundarios femeninos. La evidencia indica que podría existir una autodiferenciación del ovario de los crustáceos similar a la que ocurre en otros invertebrados, sin embargo, el conocimiento del control hormonal en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en decápodos, aún es muy escaso (Adiyodi, 1970).

(iii) Hormonas masculinas

La glándula androgénica fue descubierta por Charniaux-Cotton en 1960, en los machos de los anfípodos *Orchestia gammarellus* Pallas, este autor estableció que esta glándula secreta hormonas encargadas no sólo de la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios en machos, sino que también influye en la maduración de los testículos, de los conductos espermáticos y de la espermiogénesis. La diferenciación testicular requiere de la presencia de las hormonas tanto femenina (HF) como de la hormona masculina (HM). Trabajos anteriores demuestran que implantaciones de la glándula androgénica en hembras inmaduras provoca una masculinización. Sin embargo, la extirpación de la glándula masculina no provoca que los machos presenten características de hembras, sino que se detiene la producción de espermatozoides. El control hormonal androgénico en la diferenciación sexual de los machos no sólo se encuentra en crustáceos, también está presente en celenterados, insectos y miriápodos (Adiyodi, 1970).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

En un trabajo anterior (Castañón-Cervantes *et al*, 1995) se reportó la fotoinducción de la maduración gonadal en relación con la longitud de la escotofase. Esta fotoinducción se llevaba a cabo en el momento en que un pulso de luz de 30 min, caía 4h. y 2h. antes de iniciar la fotofase, durante un régimen luz-obscuridad de 12:12. Debido a lo anterior se propuso la posibilidad de que el acocil, al que se le ha comprobado que a los 2 meses de edad presenta un sustrato circadiano (Fanjul-Moles *et al*, 1987), pueda poseer una fase fotoinducible durante la noche subjetiva, dicha noche debe coincidir con el intervalo obscuro en un animal nocturno como lo es el acocil, que se encuentra sincronizado a un régimen LD 12:12.

El presente trabajo fue diseñado para encontrar esta posible fase fotoinducible utilizando un régimen de luz-obscuridad fijo (12:12) y explorando la noche subjetiva del animal, mediante 5 interrupciones luminosas durante el intervalo obscuro (Escotofase) durante las 12h. del mismo.

HIPÓTESIS

El acocil es un animal nocturno. Si las horas de mayor sensibilidad a la luz están relacionadas con el sustrato circadiano de este animal es muy posible que la fase fotoinducible se encuentre en la noche subjetiva del mismo, lo cual coincide con la noche externa del organismo.

Si el desarrollo de las gonadas de los acociles es un proceso íntimamente ligado a los fenómenos de medición del tiempo estacional, podría ubicarse temporalmente la presencia de la fase fotoinducible dentro del escotoperíodo, en las zonas cercanas a la transición del fotoperíodo.

OBJETIVO

Encontrar el intervalo temporal en el que se registre fotoinducción en el menor tiempo, e decir, donde se dé la mayor maduración gonadal posible.

MATERIAL Y MÉTODO

I. ORGANISMOS

Se utilizaron 36 acociles *Procambarus clarkii*, aproximadamente de 2 meses de edad debido a que en esta etapa, estos organismos presentan ya un ritmo circadiano bien establecido y un comportamiento marcadamente nocturno (Fanjul *et al*, 1987).

Se alimentaron dos veces por semana; la dieta consistió, principalmente, de zanahoria, chayote y calabaza previamente cocidas y finamente picadas.

II. ACUARIOS

Se emplearon 6 peceras de 31.3 cm de largo, 26.3 cm de ancho y 40 cm de alto cada una, por lo que albergaban 30 lts de agua, se forraron con papel aluminio para evitar el paso de la luz; cada pecera estuvo equipada con un filtro biológico y 3 capas de sustrato, siendo grava gruesa la del fondo, grava fina la del centro y arena la de encima, lo que sumaba un total de 3 cm de grosor; el nivel del agua se mantuvo a 15 cm por encima del filtro biológico, por lo que las bombillas de los filtros se recortaron para lograr un burbujeo óptimo (Figura 5). El aire fue suministrado diariamente de las 18:00h. a las 10:00 h., por una bomba de aire fija.

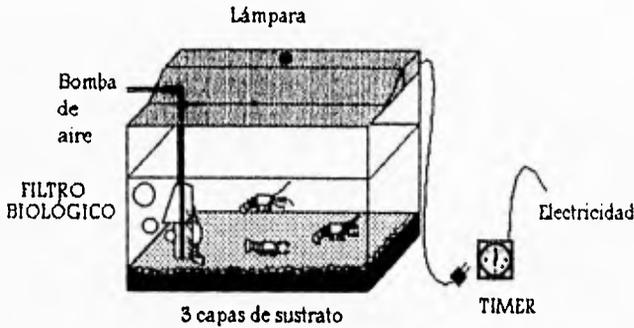


Figura 5

Esquema representativo de las 6 peceras en las que se mantuvieron aislados a los organismos, las 6 peceras utilizadas contaron con iluminación y aereación continua. Todas las peceras estuvieron provistas de un filtro biológico. El apagado y encendido de la luz fue programado en un "Timer". En cada pecera se colocaron 6 organismos.

Inmediatamente después de la muda, los organismos requieren de sales de carbonato de calcio, necesarias para ser reabsorbidas en la formación de un nuevo exoesqueleto, es por ello que el carbonato de calcio, fue provisto por conchas de bivalvos y cáscaras de huevo, previamente lavadas y maceradas.

Las peceras fueron colocadas en la cámara 2 de la Unidad de Ambientes Controlados, en el 3er Piso de la Facultad de Ciencias, U.N.A.M., donde la temperatura externa fue de 23°C, registrado por un termómetro digital "Fisher Scientific" ahí colocado; por lo que la temperatura del agua se mantuvo constante a 22°C. Las lámparas estuvieron conectadas individualmente a relojes programables "Timer", por lo que se encendieron puntualmente a la hora previamente ajustada; los focos de todas las lámparas fueron marca "Solar" de 15 watts, la intensidad de la luz blanca fue de 200 lx, medido por un fotómetro "Quantum/Radiometer/Photometer", marca LI-COR Modelo LI-189®.

III. CONDICIONES EXPERIMENTALES

El régimen fotoperiódico al que fueron sometidos los organismos fue de 12h.luz y 12h.obscuridad, por lo que la luz se encendió a las 7:00h.y se apagó a las 19:00 h, con un pulso de 30 minutos de luz a diferentes horas durante la noche subjetiva. El tiempo total del experimento fue de seis meses.

Cinco fueron las condiciones experimentales, puesto que se trató de abarcar la mayor parte posible de la fase oscura, y tomando en cuenta que la luz se apagaba a las 19:00 h, se escogieron 5 horas, con dos horas de diferencia entre ellas, por lo que el primer pulso se dió a las 21 h, el siguiente a las 23h.y así sucesivamente, hasta el último pulso que se encendió dos horas antes de que comenzara la fase luminosa (7 am), con lo que prácticamente se cubrió toda la escotofase, lo anterior se resume en la siguiente tabla:

Control	—	—
2	5:00 am	5:30 am
3	3:00 am	3:30 am
4	1:00 am	1:30 am
5	23:00 pm	23:30 pm
6	21:00 pm	21:30 pm

En todos los grupos se mantuvieron 12 horas luz y 12 horas obscuridad, con los pulsos antes definidos, a excepción del control ya que éste, no recibió pulso alguno (Figura 6).

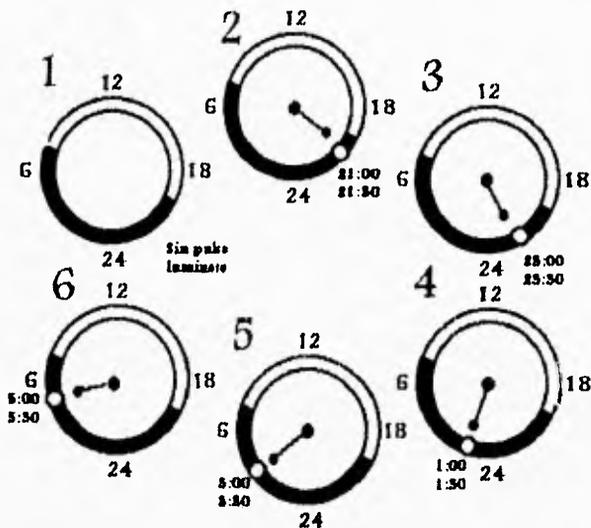


Figura 6

Esquema representativo de las 5 condiciones experimentales, con interrupciones de luz a diferentes horas de la escotofase (2, 3, 4, 5 y 6) y el grupo control al que no se le aplicó pulso alguno (1). La luz fue encendida a las 7:00 h. y apagada a las 19:00h. Todas las interrupciones luminosas duraron 30 min.

IV. MANIPULACIÓN HISTOLÓGICA

Los acociles juveniles desarrollan los caracteres sexuales secundarios a partir de los 5 meses de edad, aproximadamente cuando adquieren una talla de 5.5 cm. (Sukó, 1953). Una vez que los acociles alcanzaron dicha talla se les anestesió mediante la aplicación directa de frío, para posteriormente decapitarlos y cuidadosamente extirparles los órganos sexuales para ser fijados en formol al 10% y comenzar su deshidratación en alcoholes del 50% (24 horas), 70% (24 horas), 96% (12 horas), 100% (12 horas) y una hora en xilol.

Una vez deshidratados los órganos (testículo y ovario) se colocaron en paraplast durante 12 horas, se dejaron secar por 24 horas más para posteriormente realizar cortes, de 6 micras, en un microtomo marca American Optical, modelo 820, los cortes fueron tratados con grenetina disuelta en agua contenida en un baño de flotación (Lab. Line Instruments Inc.

0180), Las técnicas de tinción utilizadas fueron 3: Hematoxilina y Eosina (H-E), Azul de Toluidina (A-T) y Tricrómica de Masson (T-M).

El efecto de la fotoinducción en la madurez gonadal fue determinado de distinta manera para cada sexo.

En el caso de las hembras se calculó el área de los ovocitos mediante el análisis de digitalización de imágenes, a través de un digitalizador de imágenes SONY ® HR Triniton, con lo cual se estimó el número de ovocitos maduros, inmaduros y en vías de maduración. Este análisis permitió evaluar que número de ovocitos se encontraba en cada etapa por condición experimental. Dicha evaluación fue complementada por la realizada por Sukò (1953). El color de los ovarios no se tomó en cuenta debido a que todos los ovarios fueron de color amarillento y aunque existe una clasificación según el color de los ovarios que determina su grado de madurez (Adiyodí 1985), no deja de ser un parámetro cualitativo, en tanto que el utilizar la digitalización además de proporcionar datos numéricos precisos constituye una prueba cuantitativa confiable y de mucha mayor exactitud.

Para determinar la madurez sexual de los machos se realizó un conteo del número de cistes que contuvieran espermatozoides, ya que, los testículos son considerados maduros una vez que se encuentran diferentes tipos celulares dentro de éste (Sukò, 1953). El grado de madurez se evaluó tomando en cuenta tanto el mayor como el menor número de espermatozoides encontrados en las diferentes condiciones. Con el fin de obtener los resultados más verídicos posibles, los promedios representativos de cada condición se estimaron tomando en cuenta 3 diferentes cortes histológicos, el primero, un intermedio y el último, de una serie de 30 cortes por organismo, y se calculó, en el caso de las hembras tanto el promedio del área de los ovocitos como el tipo y cantidad de estos, en el caso de los machos se promedió la cantidad de cistes en los diferentes grados de maduración, posteriormente se obtuvo el corte más representativo y se procedió a la toma de fotografías. La madurez del testículo fue calculada por medio del conteo de cistes maduros, es decir, cistes que contuvieran espermatozoides, por lo que se contaba la cantidad del total de cistes existentes en el testículo y posteriormente se calculaba que porcentaje de cistes maduros se habían encontrado.

Los datos obtenidos de la medición semanal del peso y de la longitud de los organismos fueron sometidos a un análisis estadístico denominado ANDEVA de una sola vía.

Una vez encontrados los campos más representativos de cada condición se procedió a la toma de fotografías con una cámara Nikon FX-350X.

RESULTADOS

Los organismos utilizados en este trabajo fueron sacrificados en el momento en el que reunieron las características que indicaban su madurez sexual, es decir, que el organismo debía tanto alcanzar una longitud total de 55 mm, como presentar características sexuales secundarias. Por lo anterior el experimento se llevó a cabo durante 25 semanas momento en el cual el último organismo alcanzó dichas características. De acuerdo con Sukó (1953), los organismos alcanzan su madurez sexual a las 56 semanas de edad; en el presente trabajo los organismos alcanzaron la talla de madurez 23 semanas antes de lo normal. Esto es cuando los organismos tenían aproximadamente 33 semanas de edad.

Debido a que todos los organismos presentaron la misma longitud, el efecto de la fotoinducción sobre el crecimiento fue evaluado mediante la relación entre la madurez y el tiempo en que ésta se llevaba a cabo, ya que entre la longitud total y la madurez sexual existe una evidente correlación, ya que, los primeros organismos en alcanzar 55 mm de longitud, fueron también aquellos en mostrar una mayor cantidad de ovocitos maduros y cistes maduros. Es importante hacer notar que el peso promedio de los organismos fue ligeramente mayor a 4 g, (4.1 - 4.3 g) en las condiciones en las que el pulso se aplicó a las 21:00h. y a las 5:00h.e y menor a 4 g (3.7 - 3.9 g) en la condición control, aunque dichas diferencias no fueron significativas, ($f=1.67$ $p>0.05$). Resulta interesante destacar que los organismos que obtuvieron un peso ligeramente mayor presentaron la mayor madurez sexual y el grupo control que presentó un peso menor presentó también un menor desarrollo sexual.

La maduración de los organismos fue un factor dependiente de la condición a la que fueron sometidos. El 74% ($n=36$) de los organismos maduraron entre las semanas 18 y 22 (figura 7), sin embargo, uno de los organismos maduró desde la semana 15. Los resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas entre machos y hembras. Por lo anterior la representación gráfica no contempla este parámetro.

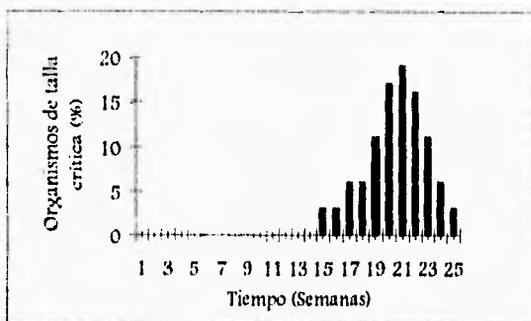


Figura 7

Distribución temporal de los acociles que alcanzaron la talla crítica, en esta gráfica se ilustra el porcentaje de organismos de talla crítica por semana de experimentación. El mayor porcentaje de organismos alcanzó la talla crítica entre la semana 18 y la semana 22 representado por el 74% de toda la población experimental, 25 organismos de los 36 utilizados

Los organismos alcanzaron las características sexuales secundarias y una longitud de 55 mm, talla crítica, a partir de la semana 15 del tiempo del experimento, es decir, a la semana 23 de la edad real del organismo, en las 11 semanas subsecuentes todos los organismos alcanzaron también la talla crítica (n=36).

Los primeros organismos en madurar fueron aquellos en los que el pulso luminoso se aplicó a las 21:00 h, seguido a este se encontraron los organismos pertenecientes a la condición en la cual el pulso se dió a las 5:00 h, posteriormente comenzaron a madurar los organismos en donde el pulso se situó a las 23:00 h, 3:00 h, 1:00 h y finalmente maduraron los organismos de la condición control, en donde no se aplicó pulso alguno (Figura 8).

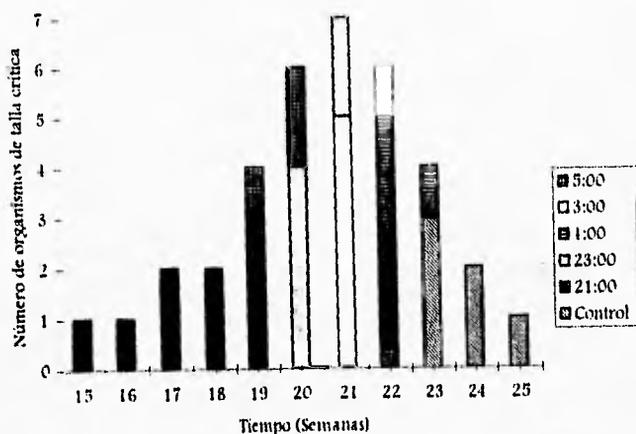


Figura 8
 Semana en la cual los organismos de cada condición alcanzaron la talla crítica. Esta gráfica relaciona el cuadro temporal en el cual se alcanzó la talla crítica (55 mm) con la hora en la que se aplicó el pulso luminoso. A los organismos de la condición control no se les aplicó ningún pulso luminoso.

I. FOTOINDUCCIÓN EN HEMBRAS

El grado de madurez del ovario se determinó tanto cualitativamente como cuantitativamente, por lo que se tomaron en cuenta tanto las características morfológicas de los ovocitos así como el área de los mismos, y esto se comparó con la clasificación realizada por Sukô (1958):

Los únicos ovarios representativos de la Etapa +1 o inmaduros fueron aquellos encontrados en los organismos pertenecientes a la condición control. No hubo ningún organismo, de esta condición, que presentara ovocitos maduros o en vías de maduración. (Figura 9)



Figura 9

Fotografía de un ovocito inmaduro perteneciente a un organismo de la condición control.

Se observan células foliculares (cf) pequeñas, citoplasma (c) con pocas granulaciones, núcleo (n) ovoide con pocos nucleolos (ns).

Tamaño $\approx 18,560\mu^2$

Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina.

Los ovocitos en vías de maduración fueron presentados por aquellos organismos pertenecientes a las condiciones en el que el pulso se aplicó a las 23:00, 3:00 y 1:00 h. Observándose ovocitos maduros y ovocitos en vías de maduración, siendo mayor la cantidad de ovocitos medianos que de ovocitos grandes. (Figura 10)

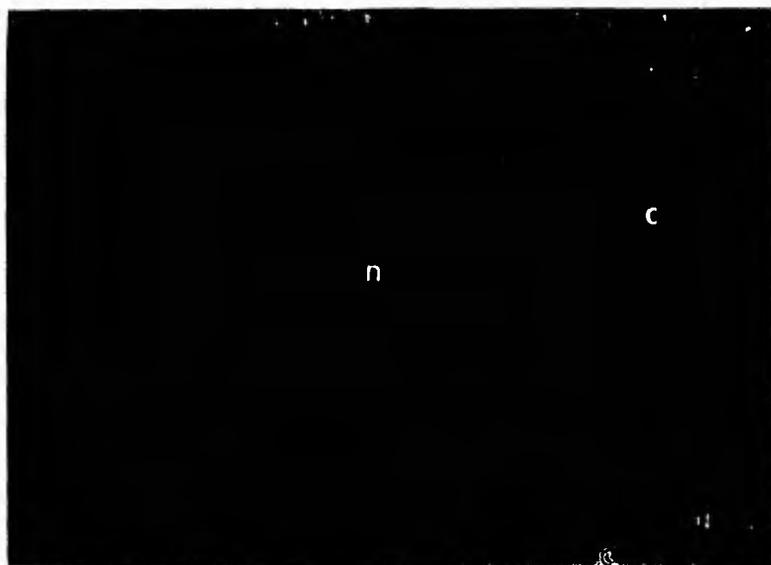


Figura 10

Ovocito de un organismo de la condición en la que el pulso luminoso se aplicó a las 23:00, 3:00 y 1:00 hrs, dicho ovocito se encuentra en vías de maduración, se observan células foliculares de mediano tamaño, citoplasma (c) con pocas granulaciones, el núcleo (n) del ovocito es excéntrico de forma irregular y presenta acumulación de sustancias de reserva en pequeñas gotitas cercanas a la membrana citoplasmática.

Tamaño del ovocito $\approx 45,6800 \mu^2$.

Técnica histológica: Tricrómica de Masson.

Los ovocitos con un grado de madurez mayor fueron encontrados en aquellos organismos a los cuales se les aplicó el pulso a las 21:00 y 5:00 h. La mayoría de ovocitos de estas condiciones se encontraban en la Etapa 43 mostrando las características que evidenciaban su completa maduración, aunque también se observaban ovocitos inmaduros y en vías de maduración pero en mucho menor proporción. (Figura 11)

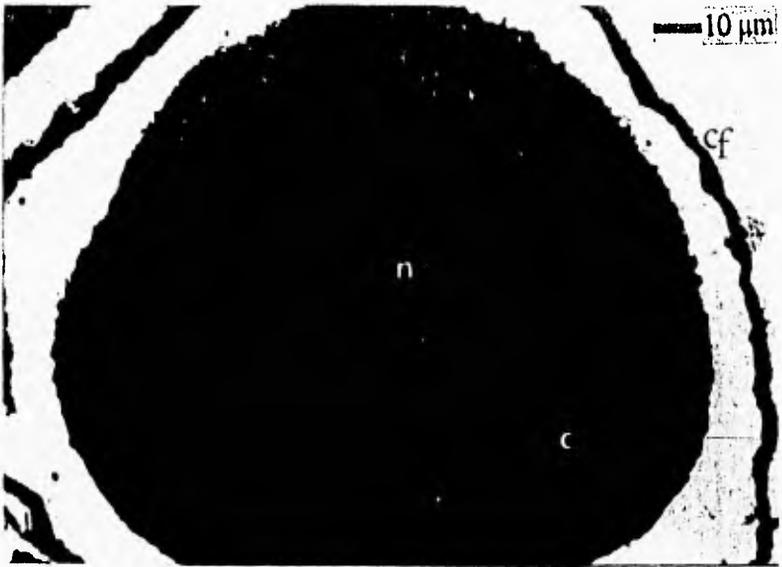


Figura 11

Fotografía de un ovocito maduro, tomado de un organismo perteneciente a la condición 21:00 y 5:00 h. Existe gran cantidad de granulaciones en el citoplasma (c) por la presencia de sustancias de reserva, incluso se llegan a observar plaquetas vitelinas hacia la membrana citoplasmática. Alrededor de ésta se observan células folículoares aplanadas (cf).

Tamaño del ovocito $\approx 78,300\mu^2$

Técnica histológica: Tricrómica de Masson.

Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones en las que existe un mayor número de ovocitos maduros fueron aquellas en las que el pulso se aplicó a las 21:00 hrs, 5:00 hrs y 23:00 hrs, donde se encontró un porcentaje de 51% , 47% y 40% respectivamente, mientras que en las condiciones en las que se aplicó el pulso a la 1:00 hrs y 3:00 hrs se encontró un porcentaje menor al 40%. El mayor número de ovocitos pequeños se encontró en la condición control, además de que no presentó ningún ovocito mayor de $50\ 000\ \mu^2$, por esto, obtuvo un porcentaje de 100% de ovocitos totalmente inmaduros. (Figura 12)

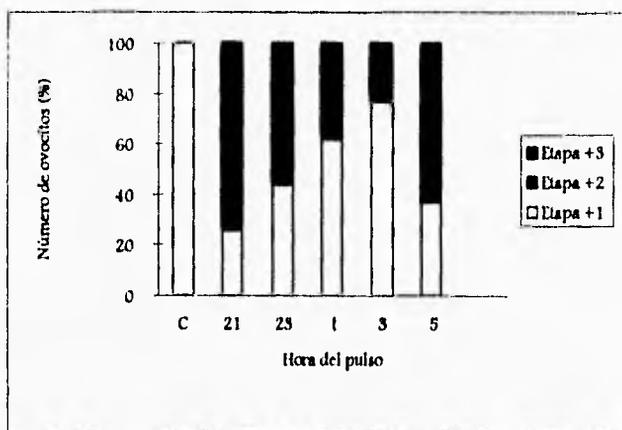


Figura 12
Grado de madurez de los ovocitos por condición experimental. En esta FIGURA se observa la relación entre el número de ovocitos inmaduros, maduros y en vías de maduración por condición experimental. La condición control no presentó ovocitos maduros.

En los resultados se observa que existe una clara inducción fotoperiodica en las condiciones en las que el pulso se aplicó a las 21:00 hrs y a las 5:00 hrs ya que a esas horas fue cuando se registró un mayor número de ovocitos maduros por lo que se consideró al ovario como maduro. (Figura 13)

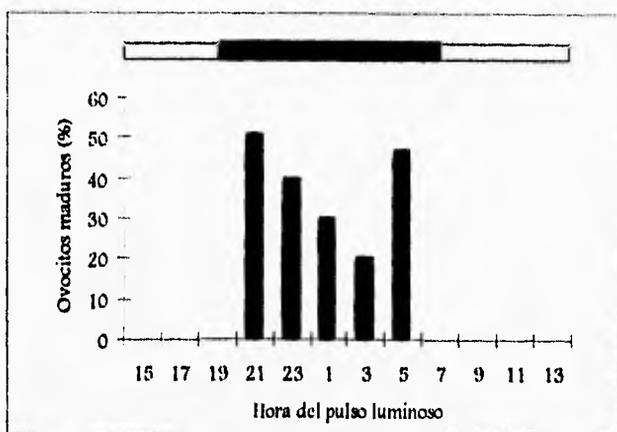


Figura 13

Porcentaje de ovocitos maduros por condición experimental. En esta gráfica se puede apreciar que existen dos horas en las cuales se da una inducción fotoperiódica, estas horas corresponden a los extremos de la escotofase, es decir, 2 horas después de apagada la luz y dos horas antes de ser encendida. (n = 18).

II. FOTOINDUCCIÓN EN MACHOS

El testículo a diferencia del ovario, es difícilmente observable en el material fresco; sin embargo, en la preparación histológica, claramente se aprecia que el testículo inmaduro está formado en su mayor parte por espermatogonias, de núcleo elipsoidal (Sukò, 1953).

Niiyama (1934) reportó que los acociles de la especie *C. japonicus*, al alcanzar una longitud de 40 mm, los testículos muestran una maduración completa, por lo que se considera que entran a una etapa adulta. Las espermatogonias de los testículos de estos organismos, no se diferencian simultáneamente por lo que es posible observar desde cistes con espermatogonias hasta cistes con espermatozoides, pasando por todos los tipos celulares intermedios de la espermatogénesis.

En el acocil *P. clarkii* se observó que al igual que *C. japonicus*, las espermatogonias sufren diferenciación asincrónica, por lo que también se observaron varios tipos celulares dentro de un mismo testículo (Figura 14).

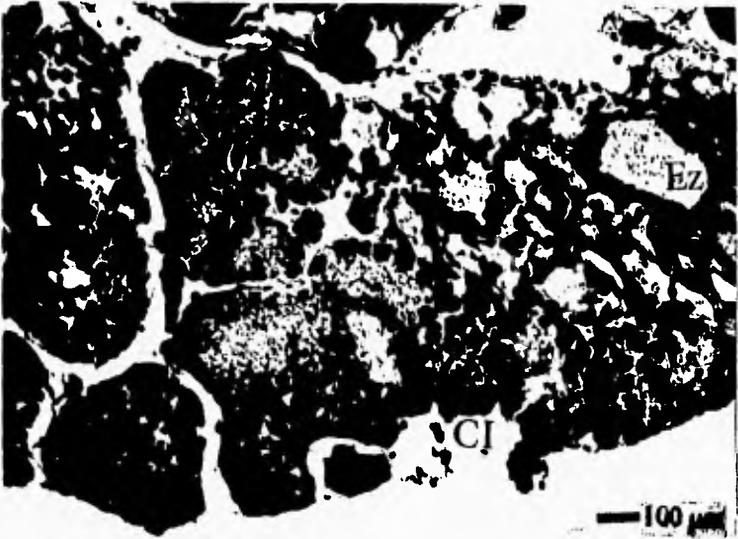


Figura 14

Fotografía de un testículo perteneciente a un organismo de la condición en la cual el pulso luminoso se aplicó a las 21:00 h.

La diferenciación de las espermatogonias es asincrónica, por lo que se logra observar diferentes tipos celulares que van desde cistes con espermatogonias (E) hasta cistes con espermatozoides (EZ). CI: células intermedias.

Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

Los diferentes tipos celulares fueron contados y porcentualizados, de forma tal, que se trató de determinar que cantidad cada tipo celular se encontraba en cada condición experimental (Figura 15), los tipos celulares más representativos de cada una de las condiciones fueron fotografiadas. Sin embargo, esto no significa que el testículo estuviera únicamente compuesto por determinado tipo celular.

La determinación de la madurez sexual del testículo se realizó mediante el conteo del número de cistes maduros, es decir, cistes que contienen espermatozoides.

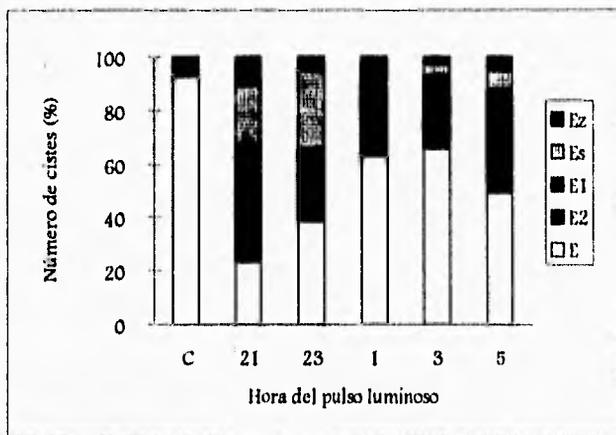


Figura 15

Comparación entre los diferentes tipos celulares por condición experimental. En esta gráfica se observa que las condiciones de las 21 h y 5 h obtuvieron el mayor porcentaje de cistes con espermatozoides, por el contrario la condición control presentó el mayor porcentaje de espermatogonias (93%). E.- Espermatogonias, E1.-Espermatozoides primarios, E2.- Espermatozoides secundarios, Es.- espermátidas, Ez.- Espermatozoides

Las espermatogonias resultan ser el tipo celular de menor grado de diferenciación, aunque también se observa en testículos donde se encuentran cistes con espermatozoides (Figura 16). La condición experimental en la que se encontró un mayor número de espermatogonias fue en la condición control.

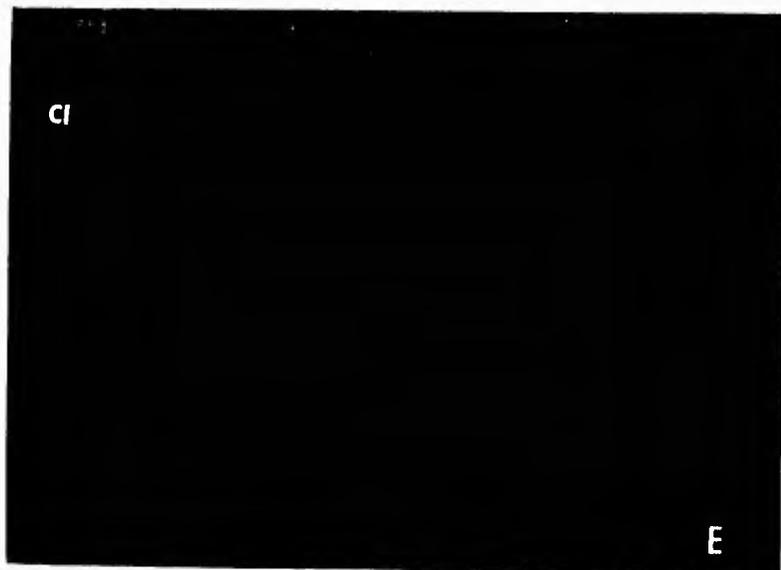


Figura 16
Espermatogonias (E) fotografiadas de un organismo inmaduro de la condición control. Se observan células intermedias (CI) pequeñas. Las espermatogonias poseen grandes núcleos y citoplasma irregular. Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

Tanto los espermatoцитos primarios como secundarios fueron encontrados en la mayoría de las condiciones experimentales, aunque en diferentes proporciones (figura 17 y 18).



Figura 17

Espermatoцитos primarios (EI) pertenecientes a un organismo de la condición con pulso a las 23:00h. Se observan células intermedias (CI) de mediano tamaño. En el interior los espermatoцитos primarios presentan células con una relación núcleo citoplasma 1:1.

Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

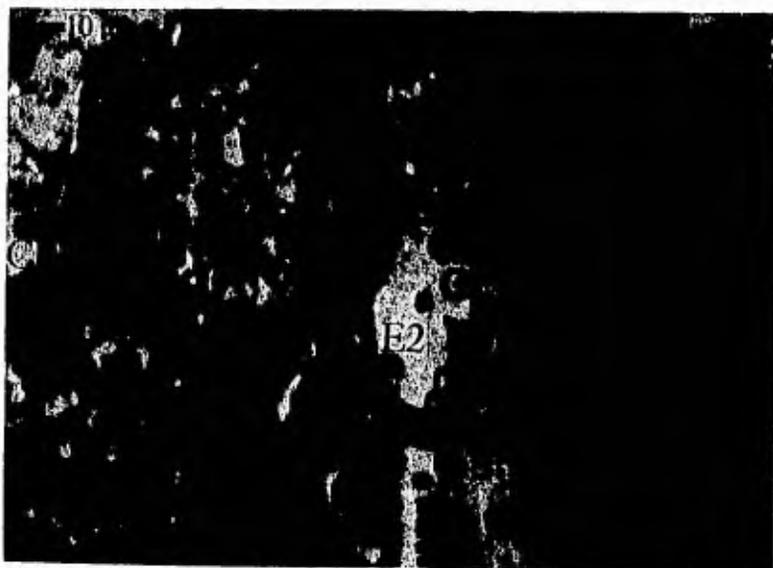


Figura 18

Espmatocitos secundarios (E2) de un organismo de la condicion con pulso a las 5:00 h. Se observan que las células intermedias (CI) han aumentado notablemente su tamaño. Los E2 presentan células con núcleos redondeados y pequeños en relación a la cantidad de citoplasma. Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

La mayor cantidad de espermátidas se encontraron en las condiciones en las que el pulso se aplicó a las 21:00, 23:00 y 5:00 h. Las espermátidas son la última etapa celular antes de convertirse en espermatozoides. (Figura 19)

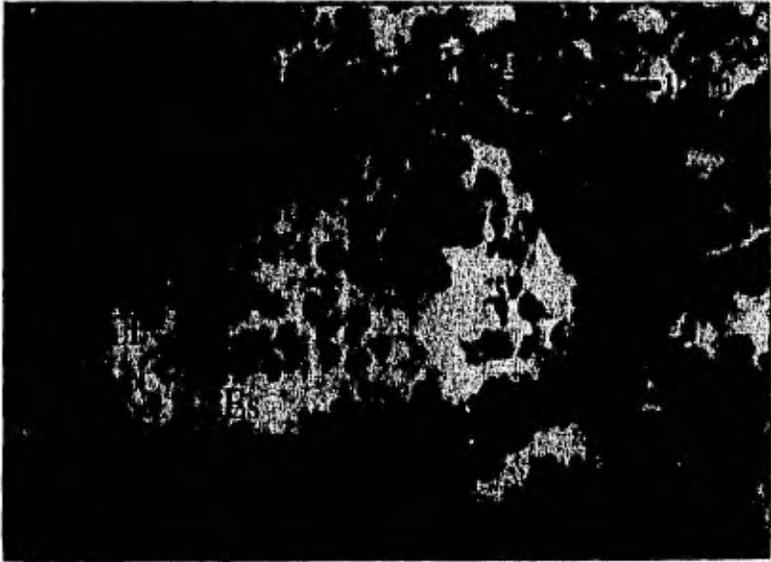


Figura 19

En esta fotografía se aprecian las espermátidas (ES) de un organismo de la condición 21:00 h. Se observan células intermedias (CI) grandes, y hacia la luz del ciste se acumulan las espermátidas que se caracterizan por poseer muy poco citoplasma.

Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

Los espermatozoides son el tipo celular de mayor diferenciación, es por esto que se consideraron como organismos totalmente maduros a aquellos que presentaron cistes con espermatozoides. En todas las condiciones se observaron espermatozoides, a excepción del grupo control (Figura 20).

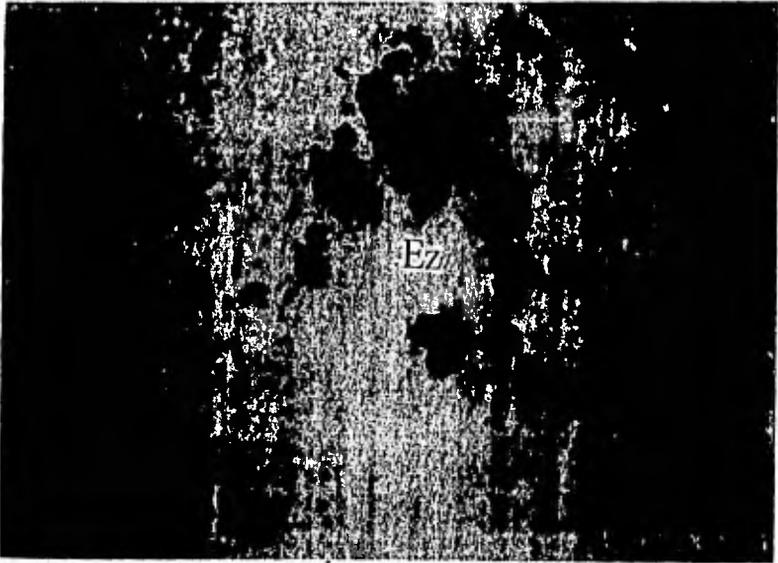


Figura 20

Se observan espermatozoides (Ez) acumulados al centro del ciste, carecen completamente de citoplasma, esta fotografía fue tomada de un organismo perteneciente a condición 21:00 h.

Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

El análisis de la maduración de las gonadas masculinas demostró que la condición en la cual se encontraron un mayor número de cistes con espermatozoides, fue aquella en la cual el pulso se aplicó a las 21:00 hrs y a las 5:00 h, lo que coincide con el inicio y el final de la escotofase. El número de cistes con espermatozoides fue inversamente proporcional al número

de espermatogonias encontradas dentro de un mismo testículo, ésto junto con los datos reportados por Niiyama (1934) y Sukó (1955) se puede determinar que en el momento en que los testículos presentan cistes con espermatozoides, son considerados como maduros. El grado de madurez está dado por la cantidad de cistes con espermatogonias (Inmaduro) o con espermatozoides (Maduro) que contengan. (Figura 21)

En las condiciones en las cuales el pulso fue aplicado a las 21h y 5 h, se encontraron canales espermáticos con espermatozoides en su interior. (Figura 22)

En la figura 23, se observa que la mayor cantidad de cistes con espermatozoides se encuentran en ambos extremos de la escotofase, lo que corresponde a las 21h y 5 h.

Al igual que los resultados obtenidos en ovario, la condición en la que se encontró un menor desarrollo gonadal fue aquella en al cual el pulso luminoso se aplicó a las 3:00h.

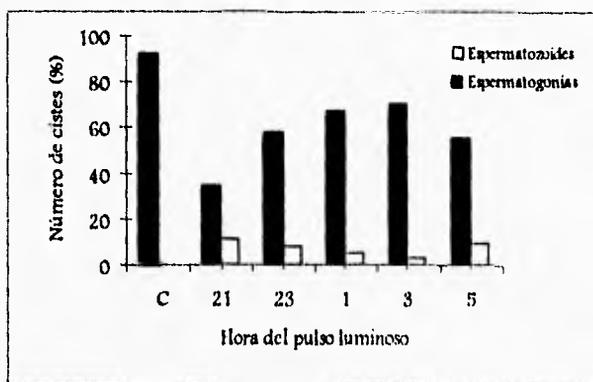


Figura 21

Comparación del número de espermatogonias y espermatozoides por condición experimental. Así como el mayor número de cistes con espermatogonias indican la falta de madurez del testículo, el número de cistes con espermatozoides son un indicativo de que el organismo ha entrado en su etapa adulta (Sukó, 1955). En esta gráfica se observa como la relación entre cistes con espermatogonias y cistes con espermatozoides es inversamente proporcional, siendo los organismos más maduros los pertenecientes a los grupos cuyo pulso se les aplicó a las 21 h y 5 h. El grupo control presentó los organismos totalmente inmaduros.



Figura 22

Fotografía tomada a un organismo perteneciente a condición 21:00 h en la que se observa el canal espermático derecho, parte media, donde se encuentran espermatozoides.
Técnica histológica: Hematoxilina y Eosina

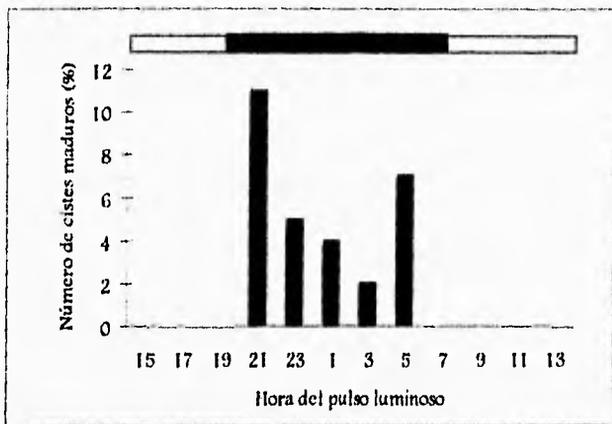


Figura 23

En esta gráfica se ilustra el tiempo externo en el cual se aplicó el pulso luminoso y el porcentaje de cistes maduros, es decir, con espermatozoides. El mayor número de cistes maduros se encontró al estimular la escotofase a las 21 h (11%) y a las 5 h (7%).

Los resultados obtenidos tanto para hembras como para machos, presentaron una gran similitud en cuanto a las horas en las que se obtuvo un mayor desarrollo gonadal, esto es, que los ovarios y testículos mejor desarrollados fueron encontrados al principio y al final de la fase oscura, es decir, a las 21:00 hrs y a las 5:00 hrs respectivamente, del mismo modo, los resultados fueron iguales en cuanto a la condición en la cual se dió el menor desarrollo gonadal, ya que para ambos sexos fue el grupo control, en el que se presentó una escasa madurez sexual.

DISCUSIÓN

El impacto de los ciclos ambientales, resultado de los movimientos de la tierra, sobre la vida de los organismos es de vital importancia. La periodicidad diaria, lunar, tidal y anual, representa, por un lado, dramáticos cambios como el calor del desierto y el frío del Ártico, y por otro lado representa el desarrollo de un programa temporal de las funciones biológicas de los organismos que se acoplen apropiadamente a la periodicidad de los cambios estacionales.

Los resultados de este trabajo demuestran el papel inductor de la luz sobre la maduración gonadal del acocil *P. clarkii* durante el desarrollo ya que los organismos alcanzaron la maduración 23 semanas antes de lo observado en condiciones normales. (Sukō, 1953, 1958)

Este trabajo parece demostrar la existencia de una fase fotoinducible (Φ i) durante la escotofase del acocil *P. clarkii*, la existencia de dicha fase fue propuesta por primera vez por Bünning en 1936, quien sugirió que la medición del tiempo fotoperiódico es una función del sistema circadiano del organismo.

El parámetro manejado en este trabajo, fue la luz, debido a que ya en trabajos anteriores, como los realizados por Stepiens (1952) y Sukō (1958) se demostró que la luz es el principal factor inductor de la síntesis de la Hormona Estimuladora de las Gonadas (HEG), es decir que la luz es un agente inductor en la maduración gonadal. Estos trabajos fueron corroborados por los realizados por Sukō (1958) y Castañón-Cervantes *et al* (1995) en los cuales, ambos eliminaron los estímulos luminosos y encontraron que no hay desarrollo gonadal en condiciones de oscuridad constantes. Estos autores concluyen que la luz es un factor indispensable tanto para el crecimiento como para la maduración gonadal.

La estimulación de pulsos luminosos en horas sensibles, debe ser captada por fotorreceptores únicos encargados de la recepción lumínica durante la fase fotoinducible, dichos impulsos son transmitidos por el sistema nervioso central a los órganos encargados de la estimulación sexual (Adiyodi, 1985), induciendo el desarrollo gonadal en los organismos.

La fotoinducción pone en fase diferentes actividades fisiológicas con claves temporales externas, a este fenómeno, Fritz Buhnemann, se refería como "el día interior" ("day within") de los organismos que se acopla perfectamente con el "día externo". (Pittendrigh, 1988). En este caso específico las señales externas fueron los pulsos luminosos y la actividad fisiológica sobre la que repercutió fue la reproducción mediante la inducción de la maduración gonadal.

El trabajo de Castañón-Cervantes *et al* (1995), propusieron que la fase fotoinducible (O) del acocil *P. clarkii* debe encontrarse en la noche subjetiva del mismo, muy cercana al amanecer, es decir, al incremento en la luminosidad. Los resultados del presente análisis indican que existen dos picos dentro de la escotofase del acocil, encontrados dos horas antes del amanecer y dos horas después del anochecer, es decir, a las 5h. y a las 21h. respectivamente. Estos resultados concuerdan con los antes reportados por Lees (1966, 1968, 1973) en el áfido verde *Megoura viciae*, el cual presentó dos picos de efecto de noche corta con dos interrupciones durante la noche, una de ellas dos horas después del anochecer y la otra cuando el pulso de luz se situó en las últimas 6 horas de la noche.

Estos resultados son interpretados como una evidencia de que la duración del fotoperiodo de 12 h en un régimen de 24 h., es de crucial importancia en el crecimiento del acocil (Castañón-Cervantes *et al* 1995) y que la inducción gonadal es promovida por pulsos de luz a determinadas horas de la noche, indicando que la medición del tiempo comienza durante el anochecer más que durante el amanecer, y demuestra que estos organismos son especialmente fotoinducibles en dos etapas de la escotofase, la primera es cuando inicia el anochecer y la segunda, antes del amanecer.

La noche subjetiva del acocil *P. clarkii*, al ser un animal nocturno, es notablemente fotosensible tanto al inicio como al final de la misma, ésto indica que existe una adaptación del organismo a los cambios del medio ambiente ya que al ser vulnerable en ambos extremos de la noche subjetiva, manifiesta que justo en esas horas (amanecer y anochecer) el organismo es capaz de percibir cambios en la duración del día y de la noche, con lo que puede anticipar diversas funciones a los cambios del fotoperiodo durante el año.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían suponer que el reloj fotoperiódico del acocil *P. clarkii* es del tipo de coincidencia externa, puesto que concuerda con lo antes propuesto por Pittendrigh y Minis (1964) quienes sugieren que la luz controla la inducción fotoperiódica mediante la coincidencia temporal del pulso luminoso con la fase fotoinducible de un oscilador; dicha inducción fue encontrada en la escotofase. En este modelo la luz tiene a la vez un papel inductor y sincronizador, por lo que para poder comprobarlo se requiere diseñar experimentos que lo confirmen.

Debido al diseño experimental los organismos se sacrificaron conforme alcanzaban la talla de 55 mm, es decir, la talla crítica en la cual son considerados maduros sexualmente (Sukó, 1953), y no fue posible establecer qué organismos fueron los que alcanzaron la mayor talla y

qué organismos presentaron el menor crecimiento; sin embargo, sí se logró establecer que aquellos organismos que llegan a medir 55 mm en las primeras semanas de maduración fueron también los que presentaron un mayor desarrollo gonadal. Lo anterior sugiere que la función reproductora está íntimamente ligada al crecimiento corporal y está modulada por hormonas y por la luz como han indicado algunos autores (Stephens, 1952; Sukö, 1953, 1956, 1958, y 1985A; Adiyodi y Adiyodi 1970; Adiyodi, 1985). Lo anterior puede explicar el hecho de que los organismos pertenecientes a la condición control, condición sin pulso luminoso durante la escotofase, presentaron la menor maduración gonadal y tardaron más tiempo en alcanzar la talla crítica.

Los resultados de este trabajo indican, por lo tanto, más el efecto de la luz sobre las gonadas que sobre el crecimiento, pues debido al diseño experimental y al valor crítico escogido para sacrificar a los animales, estos resultados no son indicativos de esta acción. En cambio los resultados obtenidos sí demuestran la acción fotoinducible de la luz sobre la maduración de las gonadas.

El hecho de haber encontrado dos picos fotoinducibles dentro de la escotofase del acocil parece corroborar lo ya antes propuesto por Castañón-Cervantes *et al* (1995), puesto que los resultados parecen estar relacionados con las características de la curva de respuesta de fase (CRF) construída para animales nocturnos, en donde la CRF presenta dos picos de sensibilidad, uno en la noche subjetiva temprana y otra en la noche subjetiva tardía. Lo anterior sugiere el diseño de nuevos experimentos que correlacionen esta fase con ritmos circadianos del mismo animal.

Los resultados encontrados en este trabajo constituyen la base de otros muchos más, que podrían analizar la relación del sustrato circadiano con la fase fotoinducible ya sea en esta especie o en otras más, o del mismo modo ahondar en la naturaleza de los fotorreceptores retinianos, así como su alta especialización y su notable diferenciación del espectro luminoso, con ello la ciencia se acercaría cada vez más al esclarecimiento de los principios de la fisiología en la evolución del comportamiento de los organismos.

CONCLUSIONES

- Los animales sometidos a pulsos luminosos a las 21:00h. obtuvieron la mayor maduración gonadal, seguidos a éstos pero en menor proporción estuvieron los organismos sometidos a pulsos luminosos a las 5:00h.
- Los organismos a los que no se les aplicó ningún estímulo luminoso mostraron el menor desarrollo gonadal así como el más lento crecimiento corporal.
- Los organismos en los que el pulso se aplicó a las 21:00h. y a las 5:00h. fueron los que más rápidamente alcanzaron el valor crítico de crecimiento.
- Existe una fase fotoinducible (Φ_i) que presenta dos picos importantes dentro de la noche subjetiva del acocil; uno de ellos, el más evidente, es a las 21:00h. y un segundo a las 5:00 h, lo que coincide con el inicio y final de la escotofase, esto es, 2 horas después de apagar la luz y dos horas antes de ser encendida.

GLOSARIO

Ciclo luz-obscuridad (L:O)

Tiempo total que comprende la duración de la escotofase y de la fotofase

Curva de respuesta de fase

Gráfica que indica la magnitud y la dirección de un cambio de fase inducida por un estímulo único. El cambio depende de la fase circádica en la cual fue dado el estímulo.

Diapausa

Periodo en el cual bajo estricto control endócrino se disminuye tanto el crecimiento como el desarrollo de algunos insectos. La diapausa es una adaptación cuyo fin es el de evitar condiciones adversas.

Escotofase

Periodo perteneciente al ciclo luz-obscuridad en el cual no existe exposición a la luz.

Fase

Estado instantáneo de una oscilación dentro de un período

Fase fotoinducible

hora determinada, dentro de la escotofase, en la cual existe mayor sensibilidad a la luz.

Fotofase

Parte del ciclo luz-obscuridad (L:O) a la cual corresponde al período luminoso, también se le llama fotoperiodo.

Fotoinducción

Inducción al disparo de algun proceso fisiológico mediante pulsos luminosos

Oscilación espontánea (free running)

Estado de un ritmo autosostenido en condiciones constantes, es decir, libre de señales temporales externas.

LITERATURA CITADA

- Adiyodi, K.G. y R. G. Adiyodi, (1970) Endocrine Control of Reproduction in Decapod Crustacea. *Bio. Rev.* 45:121-165.
- Aiken, D.E. (1969) Photoperiod, Endocrinology and the Crustacean Molt Cycle. *Science*, 164:149-156 pp.
- André M., (1960) *Les écrevisses françaises*, Ed. P. Lechevallier, 12, rue de Tourmon, Paris, 293p
- Andrews E.A. (1907) The attached young of the crayfish *Cambarus clarkii* and *Cambarus diogenes* *Am. Nat.* 40, 343-356 pp.
- Aréchiga H. *et al* (1993) The Circadian Systems of Crustaceans. *Chronobiology International*. 10(1):1-19 pp.
- Aschoff J. (1960) Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. En: *Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25:11-28.
- (1964) Survival value of diurnal rhythms *Symp Zool. Soc. London* 13:79-98.
- (1967) Adaptive Cycles: Their significance for defining environmental hazards. *International Journal Of Biometeorology* 11, 255-278 pp.
- (1981) A survey on Biological Rhythms. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology Vol 4.- Biological Rhythms* 3-79 pp.
- Bittner, G.D. y Richard Kopanda (1973) Factors influencing molting in the crayfish *Procambarus clarki*. *J. Exp. Zool.* 186:7-16 pp.
- Bliss, D.E. y J. H. Welsh (1954) The neurosecretory system of the branchyuran Crustacea. *Z. Zellforsch.* 39:520-536 pp.
- Brady J. (1979) *Biological Clocks (Studies in Biology, No. 104)* London Edward Arnold 79-95 pp
- Büning, E., (1936) Die dondogen tagesrhythmik als grandlage der photoperiodischem reaction. *Berichte der*

deutsche. Botanisch Gesselschaft. vol. 54 590-607 pp.

Castañón-Cervantes, O., Lugo-Pérez, C.M., Aguilar-Morales, M., y Fanjul-Moles, M. L. (1992). Inducción Fotoperiódica sobre el crecimiento, maduración sexual y gonadal del acocil *Procambarus clarkii*. Memorias del XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Cartel C61; Puerto de Veracruz, 2-6 Agosto (1992)

Charniaux-Cotton, H., (1962) Androgenic Gland of Crustacean. Gen. Comp. Endocr. (ssupl.) 1:241-247.

DeLong M.D and J. F. Payne (1987) Structural variation in the sperm ducts of *Procambarus* (Decapoda, Cambaridae). Dept. of Biology, Memphis Crustaceana 53(2), E.J. Brill Leiden 194-199 p.

Fanjul-Moles M. L., Moreno-Sáenz, E. Villalobos-Hiriart, N.B. Fuentes-Pardo, B. (1987) Circadian Rhythm in the course of the ontogeny in crayfish Comp. Bioch. Physiol 88 A, 213-219pp

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

Follet, B.K. and P. J. Sharp (1969) Circadian Rhythmicity in photoperiodically induced gonadotrophin release and gonadal growth in the quail. Nature Vol. 223. August 30th. 968-971 pp

Follet, B. K., V. Kumar y T. S. Juss., (1992) Circadian Nature of the Photoperiodic clock in Japanese Quail J. Comp. Physiol A. 171:533-540pp.

Garner, W. H. y H. A. Allard (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. J. Agr. Res. 27:553-606 pp.

Granados H. F. A. Salazar J., P Vergara A., J. Escandón C., A. Vega G. y R. Aguilar R. (1995) Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos implicaciones y bases biológicas, en: Temas Selectos de Neurociencias J. Velazquez Moctezuma (Ed.) U.A.M. México. 1995 433-458 pp.

- Halberg F. (1959) 24-hour periodicity: General and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Zeitschrift für Vitamin, hormon and fermentforschung* 10, 225-293 pp.
- Halberg F, y Reinberg A. (1967) Rythmes circadiens et rythmes de basses fréquences en physiologie humaine. *J Physiol (Paris)* 59:117-120pp.
- Harrison W. Frederick (1992) *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. volume 10 Decapod Crustacea Viley-Liss Inc. 459 pp.
- Holdich, D. M. y Lowery, R. S. (1988) Functional morphology and anatomy. In D.M Holdich y R. S Lowery (eds) *Freshwater crayfish: biology, management and exploitation*, Croom Helm, London 11-51 pp
- Kalmus, H. (1935) Periodizität und Autochronie als zeitreglende Eigenschaften des Organismus, *Biologia Generalis*, 11, 93-114 pp.
- (1938a) Übereinen latenten physiologischen Farbwechsel beim Flusskrebse. *Potamobius astacus*, sowie seine hormonale Beeinflussung. Z. vergleich Physiol 25:784:97.
- (1938b) Das Aktogramm des Flusskrebse und seine Beeinflussung durch organextrakte. Z. vergleich Physiol 25 798-802 pp.
- Kleinholz, L. H. (1976) Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity *Amm. Zool.* 16:151-166 pp.
- Lees, A.D. (1964) The location of the photoperiodic receptors in the aphid *Megoura viciae*, *J. exp. Biol.* 41, 119-133 pp
- (1968) Photoperiodism in insects. In: *Photophysiology*, Vol. IV. (de A.C. Giese, New York: Academic Press 47-137 pp.
- (1973) Photoperiodic time measurements in the aphid *Megoura viciae*. *J. Insect Physiol.* 19:2279-2316 pp.
- Lowery, R.S. (1988) Growth, moulting and reproduction. In: Freshwater crayfish. Timber Press 83-113 pp.
- Niyama, H. (1934) The chromosomes of the crayfish, *Cambaroides japonicus* Jour. Fac. Sci. Univ. Hokkaido, vol 3, No. 2.

- Page, T. L. (1982) Extraretinal photoreception in entrainment and photoperiodism in invertebrates. *Experientia* 38:1007-1013 pp.
- Page, T. L. y Larimer, J. L. (1972) Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in the crayfish. *J. Comp. Physiol* 78:107-120 pp.
- Passano, L. M., y Sidani, Jysum. (1963) The role of the Y-organ in crab proecdysis and limb regeneration. *Comp. Biochem. Physiol.* 9:195-213 pp.
- Pévet, Strausbourg. (1986) *Comparative Physiology of Environmental Adaptations* Karger, Switzerland 187 pp.
- Pittendrigh, C.S. y D. H. Minis (1964) The Entrainment of Circadian Oscillations by Light and Their Role as Photoperiodic Clocks. *Am. Nat.* 98(902):261-294pp.
- (1971) The photoperiodic time measurement in *Aectinophora gossypiiella* and its relation to the circadian system in that species. In *Biochronometry*, N. Menaker. Ed., pp 212-250. National Academy of Sciences. Washington. D.C.
- Pittendrigh, C.S. (1965) On the mechanisms of entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In circadian clocks, en J. Aschoff, 277-297 Amsterdam North Holland.
- (1966). The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura pupae*: a model for the photoperiodic clock. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 54, 275-207 pp.
- (1993) Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Ann Rev. Physiol* 55, 17-54 pp.
- Reidencbach, J. M., (1967) Démonstration expérimentale de la neutralité des caractères sexuels externes de la femelle chez le crustacé, isopode *Idotea ballhica blaseri* Audouin. *C.R. hebdom. Séanc. Acad. Sci Paris* 265:1321-1323
- Sandeman. D.C. Sandeman. R.E., y De Couet H.G. (1990) Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol* 21:619-629

- Saunders, D.S. (1970) Circadian clock in insecto photoperiodism Science. 168, 601-603 pp.
- (1971) The temperature-compensated photoperiodic clock "programming" development and pupal diapause in the flesh-fly, *Sarcophaga argyrostoma*. J. Insecto Physiol. 17, 801-812 pp.
- (1978) An experimental and theoretical analysis of photoperiodic induction in the flesh-fly *Sarcophaga argyrostoma*. Journal of Comparative Physiology. Vol. 124. 75-95 pp.
- Stephens, G.D. (1952) Mechanisms Regulating the Reproductive Cycle in the Crayfish, *Cambarus*. The Female Cycle I. Physiol Zool. 25:187-190.
- (1979) External coincidence and the photoinducible phase in the *Sarcophaga* photoperiodic clock. Journal of Comparative Physiology. Vol. 132. No. 1. 179-180 pp.
- Sukò, T. (1953) Studies on the development of the crayfish I. The development of secondary sex characters in appendages. Sci. Rep. Saitama Univ., Vol. 1, No. 2 78-97 pp.
- (1954) Studies on the development of the crayfish II. The development of egg-cell before fertilization. Ibid., Vol 1, No. 3.45-56 pp.
- (1955) Studies on the development of the crayfish III. The development of testis before fertilization Ibid, Vol 2, No. 1 39-47 pp.
- (1956) Studies on the development of the crayfish IV The development of the winter eggs. Ibid Vol. 2, No. 2, 213-239pp.
- (1958) Studies on the development of the crayfish V. The histological changes of developmental ovaries influenced by the condition of darkness. Ibid., Vol. 3. No. 1.66-80 pp.
- (195) Studies on the development of the crayfish VI The reproductive cycle Ibid, 79-91pp.
- Tack, P. L. (1941) The life history and ecology of the crayfish, *Cambarus immunis* (Hagen America Mid. Nat., Vol 23.

- Van Deventer, W. C. (1937) Studies on the biology of the crayfish *Cambarus propinquus* Girard. Illinois Biol. Monogr., Vol. 15, No 3
- Waterhouse, J. M. (1995) Circadian Clocks and their adjustments John Wiley and sons. Ciba foundation 337 pp.
- Whitrow G. J. (1984) The Natural Philosophy of Time. Oxford Science Publications. Clarendon Press. Oxford. 48-159 pp.