

11261

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

COMUNICACION FUNCIONAL ENTRE DOS SISTEMAS
DE FOTORRECEPTORES EN EL ACOCIL *PROCAMBARUS*,
ESTUDIADA CON LUZ MONOCROMATICA.

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biomédicas (Fisiología)

presenta:

AARON BORGONIO AGUILAR

Asesora: Dra. Virginia Inclán Rubio

México, D.F.

1997

**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.

INDICE

	Página.
RESUMEN	1
INTRODUCCION.	3
1. Ritmos biológicos.	3
1.2. Características de los ritmos biológicos.	4
1.3. Ritmos circadianos en el acocil	5
2.- Sincronización.	10
2.1. Sincronización por luz blanca	12
2.2. Sincronización por luz monocromática	13
3. Estructura anatomofuncional de los crustáceos.	15
4. Sistema visual de los crustáceos.	17
4.1. Transmisión de la información visual	20
4.2. Fotoquímica de la visión.	21
4.3. Sensibilidad espectral en los crustáceos.	23
5. Fotorreceptores extrarretinianos.	24
FUNDAMENTO DE LA HIPOTESIS	27
HIPOTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y METODOS.	30
Cronograma	33
RESULTADOS	34
1.- Efectos a largo plazo de la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal.	34
1.1. Periodo.	34
1.2. Relación α/σ .	37
1.3. Nivel de la oscilación.	37
1.4. Amplitud	37

Pagina.

2.- Efectos a corto plazo de la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal. 44
3. - Curvas de respuesta de fase (CRF). 44
DISCUSION. 50
CONCLUSIONES. 66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS. 67

RESUMEN

La ritmicidad circadiana es el resultado de una compleja integración entre los ritmos endógenos y las señales ambientales. Los ritmos se acoplan a estas señales ambientales a través de su capacidad para ser sincronizados. En el acocil *Procambarus*, coexisten una gran cantidad de funciones con ritmicidad circadiana que se regulan por la cantidad de luz que capta el organismo. Se conocen dos sistemas de fotorreceptores, los retinianos y los extrarretinianos. Sabemos que existe un ritmo circadiano en la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales en el ojo compuesto del acocil (Electrorretinograma, ERG), el cual puede ser sincronizado mediante la aplicación, sobre los ojos, de luz blanca o luz monocromática aplicada sobre los ojos. Por otra parte también sabemos que estímulos únicos breves de luz blanca, aplicados sobre los fotorreceptores caudales del sexto ganglio abdominal (6o.GA), incrementan la actividad eléctrica a lo largo de la cadena ganglionar abdominal, provocando un efecto inhibitorio sobre la amplitud del ERG. Se sabe que el 6o. GA desempeña un papel importante en la modulación del ritmo circadiano de actividad locomotora y del ERG. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la capacidad que tiene la luz monocromática de 589.6 nm (luz amarilla) aplicada sobre el 6o. GA para sincronizar al ritmo circadiano ERG. Para ello trabajamos con acociles *Procambarus clarkii*, adultos, sin distinción de sexo, en etapa de intermuda, a 19 °C. Cada acocil se colocaba dentro de una caja de lucita negra dividida en dos compartimientos, con el objeto de que las porciones cefálica y caudal recibieran regimenes luminosos diferentes. EL ERG se obtuvo con las técnicas convencionales de registro, bajo un fotoperiodo L:O (12:12). Se trabajó con dos grupos experimentales, para obtener registros a corto y a largo plazo. En el grupo experimental a corto plazo se aplicaban estímulos luminosos de luz amarilla, de una hora de duración y 400 lux de intensidad, sobre el 6o. GA, y se medía el valor de la amplitud del ERG, cada 10 minutos, durante cinco horas. En los registros a largo plazo el estímulo de luz amarilla con las mismas características descritas anteriormente, era aplicado sobre el 6o. GA, al cuarto día de registro, cuando el ritmo circadiano se encontraba en una fase estable. Este registro se mantenía durante seis días más y con los datos obtenidos se construyó tanto la curva de respuesta de fase estable (CRFe) como la transitoria (CRFt). Ambos grupos experimentales se llevaron a cabo a cuatro diferentes horas circadianas (hc): 6, 12, 18 y 24. Los resultados a corto plazo muestran que : a) a la hc 6, se presenta una disminución importante en el valor de la amplitud, b) a la hc 12 y 18 se presentan tanto un aumento como una disminución en el valor de las respuestas, c) a la hc 24 no se observan efectos sobre el valor de la amplitud. Los efectos a largo plazo muestran que la aplicación de luz

amarilla de 589.6 nm provocan cambios en el ritmo circadiano ERG, que se manifiestan por: a) disminución en la amplitud del ERG después de la estimulación, b) la aparición de transitorios con duración de 36 a 48 h y c) cambios de fase que depende del momento de la aplicación de los estímulos (adelantos a las 12 y 18, y atrasos a las 6 y 24 hc). Estos resultados ponen de manifiesto una comunicación entre los dos sistemas de fotorreceptores que tenga como correlato funcional una actividad neuroendócrina que se traduzca en cambios a corto y a largo plazo sobre la actividad circadiana electrorretinográfica. Por otra parte es posible proponer la participación de éstos fotorreceptores en la sincronización de este ritmo, repercutiendo en los mecanismos adaptativos del acoplamiento a su medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

1.- Ritmos biológicos.

La periodicidad de muchos fenómenos naturales fue un descubrimiento importante para el hombre primitivo. Muchos años después pudo identificarse como la presencia de eventos periódicos no se limitaba al mundo exterior, sino que incluía eventos fisiológicos en los seres vivos. Los fenómenos autosostenidos han sido llamados ritmos, ciclos u oscilaciones. Se considera que la ritmicidad es una propiedad fundamental de la materia viva, presente desde los organismos simples hasta los más complejos. Se entiende por ritmo biológico, la recurrencia de cualquier fenómeno dentro de un sistema biológico a intervalos más o menos regulares. La frecuencia de los ritmos en la naturaleza cubre un amplio espectro de unidades de tiempo, se pueden observar ritmos que oscilan una vez cada fracción de segundo, como por ejemplo los ritmos de actividad eléctrica neuronal, aquellos que oscilan una vez en varios segundos, como por ejemplo el ritmo respiratorio de los humanos, o los que oscilan una vez al año, como el ritmo de hibernación de los osos.

Hay numerosas clasificaciones de los ritmos biológicos, con base en la duración del periodo, los ritmos biológicos se han clasificado en ultradianos, cuando el valor del periodo es inferior a 6 horas y mayor de 30 minutos, mientras que los de más de 28 horas y menos de 6 días se denominan infradianos. De la misma forma se habla de ritmos circatidales, circalunares, circamensuales o circaanuales, si su duración se aproxima al ciclo de las mareas, al mes lunar, al mes o al año sidereal, respectivamente (Aschoff, 1981).

Para la mayoría de los seres vivos los ritmos que son más evidentes son aquellos que oscilan con una frecuencia cuya duración es similar a la de algún ciclo ambiental. Uno de los ciclos ambientales más evidentes es el que resulta de la rotación de la tierra sobre su propio eje. Los hábitos de actividad-reposo, ingesta de comida, de agua, etc., se coordinan con la alternancia del día y la noche y no es sorprendente por lo tanto que algunos procesos fisiológicos, psicológicos y bioquímicos también oscilen con una frecuencia circadiana (Aschoff, 1964). El término circadiano (del latín circa, alrededor de, y diem, día) implica que el valor del periodo del ritmo no es de 24

horas exactas sino de 24 horas con algunos minutos o pocas horas de más o de menos, lo cual se pone en evidencia cuando un organismo es colocado en condiciones de aislamiento de señales ambientales temporales (Halberg, 1959). Se ha propuesto que los ritmos biológicos expresan la organización temporal de los procesos fisiológicos y conductuales para una óptima adaptación al medio ambiente. El probable significado de los ritmos biológicos reside en que proporcionan un marco para la organización temporal de los seres vivos en relación con el tiempo sideral. El ritmo es una forma de ordenar temporalmente las tareas y de sintonizarlas con el momento más adecuado del entorno (alimentación, cortejo, cría, etc.). Además esta organización temporal se encuentra en todos los niveles (célula, tejido, órgano, individuo, sociedad) y permite la realización sucesiva y acoplada con el ambiente de las tareas más diversas, imposibles de desarrollar en forma simultánea o sin coordinación (Pittendrigh, 1993).

1.2. Características de los ritmos biológicos.

En la década de los años 60s, Aschoff (1960), Pittendrigh (1960) y Bünning (1967) lograron establecer algunas características generales que poseen los ritmos biológicos, y que son comunes tanto en plantas como en animales y que se pueden resumir así:

En primer lugar son endógenos, es decir se generan en el propio organismo independientemente de la existencia de señales externas (Aschoff, 1967).

Otra característica es su origen genético. Lo cual implica que son heredables de generación a generación. Son ubicuos, esto implica que están presentes en múltiples funciones de los seres vivos.

Otra característica es que los ritmos biológicos son susceptibles de ser afectados por la manipulación de las variaciones cíclicas de algunos factores ambientales conocidos como sincronizadores. A la capacidad en la cual el periodo endógeno y la fase del ritmo se ajustan al periodo y la fase del estímulo cíclico externo se le denomina sincronización. Su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con la señales externas ambientales. Se hablará de ella con mayor detalle en las siguientes páginas.

Un ciclo circadiano obtenido en condiciones constantes presenta dos componentes: uno de actividad y uno de reposo, la relación entre estas dos variables se le denomina relación α/σ o relación actividad-reposo, que es una propiedad de los ritmos biológicos. El nivel de la oscilación que tiene el ciclo es otra propiedad de los ritmos, la pendiente entre el punto de inicio y fin de la oscilación puede dar una idea de cual es este valor y representa el comportamiento general de la oscilación. En la mayoría de los organismo estudiados, el nivel de oscilación, el valor del periodo y la relación α/σ están estrechamente ligados y el cambio en uno de ellos repercute sobre los otros dos. Cuando los organismos diurnos reciben más luz, aumenta la frecuencia natural de oscilación, la relación α/σ y el nivel de actividad del ritmo, en tanto que los nocturnos reducen los tres parámetros citados. La generalización de estos hechos se conoce con el nombre de "regla circádica de Aschoff" (Aschoff, 1960). Otra característica de estos ritmos es que su frecuencia natural de oscilación es "independiente de la temperatura ambiental" expresión propuesta por Büning (1967) y que se refiere al hecho de que los sistemas circadianos no modifican el valor de su periodo ante cambios bruscos de temperatura ambiental. El acócil *Procambarus bouvieri* posee un mecanismo compensador de la temperatura., al cambiar la temperatura de 20°C a 12°C, y de 12°C a 20°C, se observan modificaciones importantes en la amplitud del ritmo circadiano motor, pero no hay cambios en la frecuencia del ritmo. Este mismo efecto también se observa en el ritmo circadiano ERG (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). Aunque el mecanismo involucrado no está claro, parece evidente que la temperatura no afecta en forma importante el periodo circadiano, siempre y cuando el cambio térmico se aplique en el estado estable del ritmo y los intervalos tengan una duración tal que no pueda ser interpretada como señales periódicas (Pittendrigh y Caldarola, 1973).

Finalmente, otra característica que presentan los ritmos biológicos en particular los circadianos, es su dependencia de la historia previa al momento del registro. Un ritmo circadiano que expresa su frecuencia de oscilación libre en condiciones constantes puede estar influenciado durante más de cien días por la situación ambiental a la que estuvo previamente sujeto, esta condición se conoce con el nombre de posefecto (Pittendrigh, 1960). Entre las situaciones experimentales más efectivas para provocar posefectos está el número de horas de luz en un ciclo de luz-oscuridad que se quiera imponer a un sistema circadiano.

1.3. Ritmos circadianos en el acocil.

Los crustáceos decápodos, constituyen un modelo experimental adecuado para estudiar la ritmicidad circadiana. Una de las razones es que se conocen en ellos una amplia variedad de ritmos circadianos en funciones tan variadas como el nivel de glucosa, la coloración tegumentaria, la locomoción, el consumo de oxígeno, etc. (Aréchiga y cols., 1992). Otra de las razones es que su sistema nervioso está constituido por pocos elementos, y esto ha hecho posible analizar, desde un nivel celular, la posible integración temporal de la ritmicidad circadiana. (Wiersma, 1974).

Se ha reportado que el tallo ocular y el ganglio supraesofágico, también conocido como ganglio cerebroide, son las regiones del sistema nervioso central más estrechamente relacionadas con el mantenimiento de la ritmicidad circadiana. (Aréchiga y cols 1992).

Hay que considerar que los primeros ritmos identificados en crustáceos como lo son las funciones de actividad metabólica, la locomoción y la coloración tegumentaria están influenciados por hormonas sintetizadas, almacenadas y liberadas por un sistema denominado órgano-x glándula sinusal que se encuentra en el tallo ocular (TO). Se ha visto que éstas hormonas participan en el control circadiano de estas funciones (Aréchiga, 1993).

Existen otras funciones en las que se ha descrito la ritmicidad circadiana, y que también tienen regulación hormonal. Por ejemplo, en la retina se encuentran tres pigmentos que pertenecen a estructuras parareceptoras, que no participan en el proceso de fototransducción, pero que si modulan la cantidad de luz que incide sobre los fotorreceptores. Estos pigmentos son: El pigmento retiniano proximal (PP), el pigmento retiniano distal (PD) y el pigmento reflector (PR). El pigmento reflector se encuentra situado en la membrana basal, en el acocil está fijo, a diferencia de los otros dos pigmentos, EL PP se encuentra dentro de las células retinulares y el PD se encuentra dentro de las células que corren a lo largo de los conos cristalinos. Ambos pigmentos son de color oscuro. El pigmento distal y proximal ocupan diferentes posiciones según la intensidad de la iluminación. Si ésta es intensa el pigmento distal migra desde la córnea hasta la base de los conos cristalinos, y el proximal, desde la membrana basal hasta la zona nuclear de las células retinulares cubriendo prácticamente al omatidio. Si la intensidad luminosa disminuye, ambos pigmentos se retraen, el distal hacia la córnea y el proximal por debajo de la membrana basal (Fig. 1).

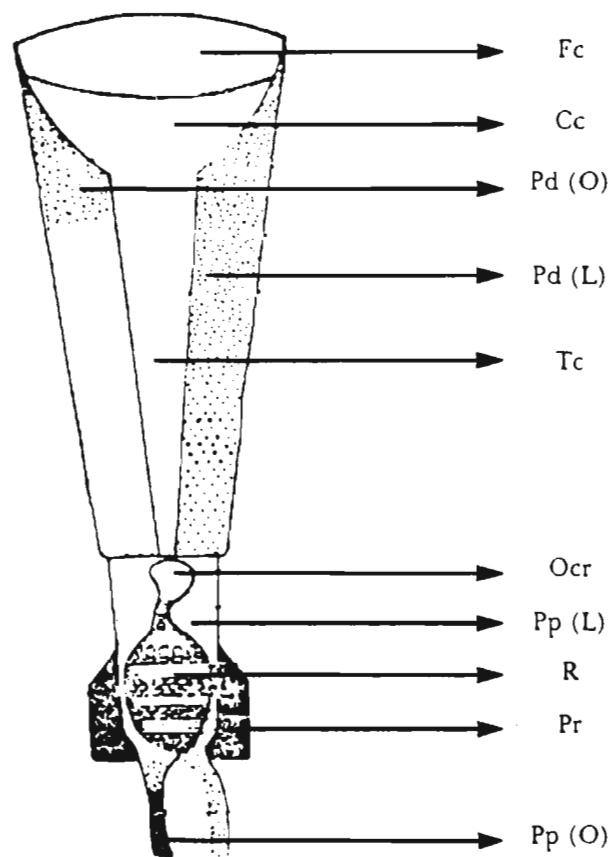


Fig. 1. Diagrama de un omatidio de acocil, representando la posición de los pigmentos retinianos en los estados de adaptación a la oscuridad (O) (izquierda) y adaptación a la luz (L) (derecha). Fc: faceta corneal; Cc: cono cristalino; Pd: pigmento distal; Tc: tracto cristalino; Ocr: octava célula retinular; Pp: pigmento proximal; R: rábdomo (7 células retinulares); Pr: pigmento reflector (Tomado de Kong y Goldsmith, 1977)

En tanto que el pigmento proximal se desplaza como respuesta directa del fotorreceptor al ser iluminado (Oливо y Larsen, 1978; Frixione y cols., 1979), el pigmento distal responde a la acción de una neurohormona que también se almacena en la glándula sinusal, denominada hormona dispersora del pigmento distal (HDPD) (Kleinholz, 1975). Esta neurohormona induce la migración del pigmento distal hacia la posición de adaptación a la luz en forma circadiana (Aréchiga y Mena, 1975). Además se ha reportado que la hormona concentradora de eritróforos (HCE), la misma que induce la retracción de los pigmentos tegumentarios participa también en la migración del pigmento retiniano distal. (Aréchiga y cols., 1992).

Se sabe que el ganglio cerebroide (GC) también participa en la integración de la ritmicidad circadiana. Los tallos oculares se comunican con el GC a través del nervio óptico, a su vez el GC se comunica con el ganglio torácico (donde se encuentran las motoneuronas de las patas). Mediante técnicas para llevar a cabo la extirpación o lesión de algunas de estas regiones del sistema nervioso del crustáceo fue posible reportar, que el GC es indispensable para el mantenimiento del ritmo circadiano de migración del pigmento retiniano proximal (Aréchiga y cols., 1973) y del ritmo locomotor (Page y Larimer, 1972; Barrera-Mera, 1976). También se conoce la participación del TO en el mantenimiento del ritmo locomotor (Aréchiga y cols., 1976; Aréchiga y cols., 1992).

En 1969, Aréchiga y Wiersma implantaron microelectrodos en diferentes elementos de la vía visual del acocil *Procambarus clarkii* y demostraron la existencia de cambios periódicos de la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma, ERG), y de la frecuencia de descarga de las interneuronas que integran la información sobre la intensidad luminosa. El ERG en el acocil tiene dos componentes H I y H II. El H I es generado por las células retinulares en tanto que el H II depende de la duración del estímulo (Naka y Kuwabara, 1959). Los cambios en la amplitud evidenciaron una mayor sensibilidad a la luz durante la noche que durante el día. Años más tarde Aréchiga y cols. (1974), caracterizaron las propiedades del ERG en el acocil *Procambarus clarkii* y comprobaron que los cambios de la amplitud del ERG correspondían a un ritmo circadiano con una actividad de predominio nocturno y con un periodo cuya duración depende de la cantidad de luz recibida por el acocil. Se han identificado tres componentes que participan en la generación y modulación de este ritmo. Por una parte la

movilización del pigmento distal, que muestra un ritmo circadiano que persiste en iluminación continua y que se debe a la liberación rítmica de la HDPD desde la glándula sinusal. Por otra parte, el pigmento proximal que muestra también un ritmo circadiano de migración, independiente de cualquier influencia hormonal procedente de la glándula sinusal, pero ligado al potencial de membrana del fotorreceptor. Finalmente la sensibilidad a la luz del propio fotorreceptor que se presenta en forma independiente de la presencia de los pigmentos accesorios y que también varía en forma circadiana. De la interrelación de estas tres actividades depende la amplitud de las variaciones circadianas en la respuesta a la luz. Si se suprime el ritmo del pigmento distal, la amplitud del ritmo ERG disminuye y, en preparaciones carentes de ambos pigmentos el ritmo ERG queda reducido a una fracción (Aréchiga y Huberman, 1980). Tanto el ritmo de migración del pigmento proximal como el de fotosensibilidad del receptor se presentan en retinas aisladas (Noguerón y Aréchiga, 1987). Se sabe que en condiciones de oscuridad constante y con retinas aisladas, el ritmo ERG persiste por varios ciclos, sin embargo la amplitud de la respuesta es menor que lo reportado para animales intactos. De los tres componentes que originan el ERG, sólo el ritmo de la sensibilidad a la luz del propio fotorreceptor y el de la migración de los pigmentos proximales persisten. La pérdida de la ritmicidad del movimiento del pigmento distal en la retina aislada era de esperarse, debido a que la modulación es principalmente hormonal.

En este mismo crustáceo se observó que si se lesionaba el ganglio cerebroide la amplitud de la oscilación del ritmo circadiano ERG disminuía aunque no desaparecía (Barrera-Mera, 1976). La persistencia del ritmo circadiano ERG en tallos oculares aislados se interpretó como que la actividad periódica está influida pero no depende de la integridad del sistema nervioso (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977). Por su parte Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1981), encontraron que la respuesta eléctrica ERG en el acocil *Procambarus bouvieri*, tiene características circadianas de un organismo nocturno. Su amplitud es capaz de ser modulada por los fotorreceptores caudales del sexto ganglio abdominal (Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987). Finalmente Inclán-Rubio (1991) reporta que el ritmo circadiano ERG es susceptible de modificar su frecuencia natural de oscilación cuando recibe estímulos de luz monocromática a nivel fotópico, estos cambios dependen tanto de la longitud de onda como del momento circadiano de aplicación del estímulo. La autora muestra dos grupos funcionales de fotorreceptores que responden selectivamente a tres

longitudes de onda diferente proponiendo que la oscilación circadiana ERG puede ser el resultado de la interacción de osciladores que se encuentran acoplados entre sí.

2. Sincronización.

Cuando los organismos se mantienen en un ambiente aislado de señales ambientales, se observa que el valor del periodo del ritmo endógeno se desvía ligeramente del valor que presentan en condiciones naturales. A esta situación se le denomina "free running" o "libre correr de la oscilación". En condiciones naturales el ambiente geofísico presenta diversas variaciones cíclicas, por lo que la ritmicidad biológica no manifiesta su oscilación espontánea, sino que presenta una estrecha relación temporal con estas variaciones. A la capacidad que tienen los ritmos biológicos de acoplar el valor de su periodo endógeno con el valor del periodo de las señales externas le denominamos sincronización, y su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico. De acuerdo con Pittendrigh (1984) la sincronización provee a los sistemas biológicos de un mecanismo por el cual estos son capaces de reconocer la hora local, propiedad sin la cual estos no tendrían relevancia adaptativa.

Diversos autores han demostrado que una variedad de fenómenos ambientales pueden funcionar como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos, entre los que se encuentran la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento y las señales sociales. De las anteriores, las variaciones de iluminación del ciclo día-noche (fotoperiodo) presentan la mayor estabilidad en su periodo y fase, lo que las hace las más predecibles. y se consideran como la principal señal de sincronización ambiental, por lo menos en los organismos epigeos (Rusak y Zucker, 1979).

Se sabe que estos estímulos sincronizadores pueden afectar al organismo sin necesidad de actuar sobre los osciladores biológicos, que son los responsables del ritmo. En estas circunstancias el estímulo actuaría directamente sobre los sistemas efectores de la ritmicidad manifiesta. A este fenómeno descrito por Aschoff (1960) se le denomina efecto de enmascaramiento. La característica del enmascaramiento que lo distingue de la sincronización es que cuando el ritmo enmascarado se deja en condiciones de oscilación espontánea, la fase y el periodo del ritmo en estudio se predicen por las condiciones del oscilador previas a la presencia del estímulo ambiental

que produjo el enmascaramiento. En otras palabras el estímulo ambiental no afecta ni el periodo ni la fase del oscilador biológico. En ocasiones, es posible el que la sincronización y el enmascaramiento se presenten simultáneamente sobre un sistema en estudio, lo cual puede entorpecer la interpretación de las observaciones (Aschoff, 1984).

Estudios realizados por Hoffmann (referido por Pittendrigh, 1993), mostraron que cuando ocurre un cambio súbito en la fase del estímulo sincronizador, la fase del ritmo endógeno se ajusta progresivamente con el ciclo ambiental, hasta que se restablece una relación de fase constante entre ambos fenómenos (estado estable). Durante los ciclos en los cuales ocurre el ajuste de fase, el periodo del ritmo cambia en forma transitoria, a estos ciclos se les denomina transitorios. Es importante mencionar que estos experimentos se realizaban con fotoperiodo completo. Es decir, en un ciclo 12:12. En dichas condiciones puede ocurrir el fenómeno de enmascaramiento.

Como alternativa para estudiar los mecanismos de sincronización, Pittendrigh y Bruce (1957) estudiaron la respuesta de fase de ritmos en oscilación espontánea ante estímulos de corta duración (pulsos de luz de 15 minutos) presentados a diferentes fases del ciclo circadiano. La gráfica que presenta estos resultados se denominó curva de respuesta de fase (CRF). Las CRF han sido estudiadas y obtenidas de diversas especies, desde organismos unicelulares, plantas y hasta el hombre, se ha reportado que salvo pequeñas diferencias entre especies, todas presentan un patrón común, es decir regiones relativamente refractarias al estímulo y regiones con mayor sensibilidad al estímulo que provocan zonas de atrasos o adelantos de fase. Los animales nocturnos como los crustáceos tienen una fase de actividad que es mayor por la noche que por el día, el efecto opuesto ocurre para los animales de hábitos diurnos. Sin embargo en todas las especies la CRF a la luz en forma general, se caracteriza por presentar una región relativamente refractaria al estímulo sincronizador, que ocurre durante el día subjetivo (En ausencia de señales ambientales, el día subjetivo se define como la fase circadiana en la cual un organismo se comporta como si estuviera durante el día sideral)), a continuación se observa la región de retrasos de fase, que ocurre al inicio de la noche subjetiva (En ausencia de señales ambientales, la noche subjetiva se define como la fase circadiana en la cual un organismo se comporta como si estuviera durante la noche sideral) (Czeisler, 1995), finalmente se observa la región de avances de fase durante los dos últimos tercios de la noche subjetiva.

Cuando se provoca un cambio de fase por pulsos discretos de luz, se observan ciclos transitorios, posterior a estos ciclos, el ritmo trata de reasumir sus características iniciales, esto refleja el comportamiento del oscilador o de los osciladores subyacentes que se encargan de mantener el ritmo.

Hay dos tipos de CRF: La CRFt (curva de respuesta de fase transitoria) si los cambios de fase son medidos inmediatamente después del estímulo. Y la CRFe (curva de respuesta de fase estable) si son medidos algunos ciclos posteriores al estímulo (generalmente 4 días después). La CRFe nos da la oportunidad de estudiar el resultado del proceso de la sincronización como consecuencia del comportamiento del oscilador u osciladores que componen un ritmo. Por su parte la CRFt ha sido utilizada para tratar de conocer la dinámica o funcionamiento de un oscilador biológico. Winfree (1970) y Pavlidis (1973) definieron matemáticamente la CRFt obtenida con estímulos intensos y débiles y llegaron a la conclusión que ambos tipos de estímulos representaban un sistema bimodal simple. Los efectos sincronizadores de estímulos ambientales sobre los osciladores biológicos pueden explicarse desde dos mecanismos de acción distintos, los cuales se denominan sincronización paramétrica y sincronización no paramétrica. En la sincronización paramétrica se propone que el estímulo ambiental afecta de manera continua la velocidad angular del oscilador (la rapidez con que transcurren las diferentes fracciones del ciclo denominaremos velocidad angular del oscilador). En contraste, en la sincronización no paramétrica solo se afecta la fase del oscilador en las transiciones del inicio y del fin del estímulo (Pittendrigh, 1993).

2.1. Sincronización por luz blanca.

Desde la década de los 50's, se ha demostrado que estímulos únicos de luz blanca pueden reajustar la fase circadiana (Pittendrigh y Bruce, 1957) y que la magnitud y la dirección de los cambios de fase dependen de la intensidad y la duración de la exposición a la luz blanca. Así mismo se pueden representar los cambios de fase producidos por la exposición a la luz por medio de la CRF. Las CRF por estímulos de luz blanca han sido descritas para una gran variedad de organismos desde algas unicelulares hasta primates (Johnson, 1990). Se han realizados estudios

acerca de los efectos de la aplicación de pulsos únicos de luz blanca sobre el sistema circadiano del alga unicelular marina *Gonyaulax polyedra*, en donde se ha encontrado que la entrada del sistema circadiano involucra un mecanismo complejo que va más allá de los cambios tiempo-dependientes en la sensibilidad del oscilador. En este dinoflagelado como en otros organismos unicelulares, muchas funciones celulares están bajo control circadiano, por ejemplo su bioluminiscencia es emitida por la noche como breves destellos de luz brillante de baja intensidad (Fritz, 1990), la actividad fotosintética (Samuelsson, 1983) y la actividad de la enzima superoxidasas dismutasa (Colepicolo, 1991) son mayores durante el día y su división celular está restringida a horas tempranas de la mañana (Honma y Hastings, 1989). En este dinoflagelado, los estímulos únicos de luz blanca contribuyen a la sincronización de estos ritmos circadianos. En muchos organismos, la longitud del periodo bajo condiciones constantes depende de la intensidad de la luz (Aschoff, 1979). Los ajustes específicos en el valor del periodo posterior a la aplicación del estímulo son diferentes de acuerdo a la intensidad de la luz aplicada y esta respuesta se atribuye a las características de la respuesta de fase del marcapaso del propio organismo (velocidad de respuesta) (Daan y Pittendrigh, 1976). En *Gonyaulax*, el valor del periodo puede acortarse o alargarse al incrementar la intensidad de la luz, pero dependiendo de la hora de aplicación del estímulo (Roenneberg y Hastings, 1991).

El ritmo circadiano ERG en el acóelido *Procambarus clarkii* también posee la capacidad de ser sincronizado mediante señales luminosas únicas aplicadas en forma directa sobre los ojos (Fuentes-Pardo e Inclán Rubio, 1987). La CRF para este crustáceo muestra avances de fase cuando el estímulo se aplica entre las 5 y las 13 hc, mientras que se observa un retraso de fase cuando el estímulo se aplica entre las 20 y las 5 hc. No se encontró efecto cuando el estímulo se aplicó entre las 13 y las 20 hc. Estos resultados sugirieron la existencia de un circuito implicado en el control de la sensibilidad a la luz de los osciladores responsables de mantener el ritmo circadiano del ERG (Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal, 1983).

2.2. Sincronización por luz monocromática.

Son muchos los antecedentes conocidos en relación al papel sincronizador de la luz blanca, pero es muy poco lo que se conoce acerca del papel sincronizador de la luz monocromática. Gordon y Brown (1971) determinaron la sensibilidad espectral para cambios de fase del ritmo circadiano de la temperatura corporal en el ratón *Perognatus penicilatus* y Mc Guire y cols. en 1973, realizaron el mismo estudio en ratas. Hope y Bhatnagar (1979) realizaron estudios electrorretinográficos en cuatro especies de murciélagos, determinando las características espectrales de los fotorreceptores visuales; conociendo estos datos Joshi y Chandrashekarán (1985) realizaron un análisis de la sensibilidad espectral de los fotorreceptores responsables del cambio de fase del ritmo circadiano de actividad motora de vuelo en el murciélago *Hiposideros speoris* y encontraron que estos cambios dependen de la longitud de onda utilizada, responsabilizando a la luz verde ($\lambda=520$ nm) de los adelantos y a la luz violeta ($\lambda=430$ nm) de los atrasos. Con base en estos resultados, los autores postularon la existencia de cuando menos dos clases de fotorreceptores en la retina de estos vertebrados que probablemente actúan como osciladores mutuamente acoplados y sean capaces de sincronizar al ritmo circadiano de la actividad de estos animales. Mote y Black (1981) demostraron en la cucaracha *Periplaneta americana* la interacción entre el sistema visual dicromático (al color verde y al ultravioleta) del ojo compuesto y el sistema circadiano de actividad motora. Encontraron que el mecanismo de sincronización de este último ritmo, está dominado por el grupo de receptores sensibles a longitudes de onda larga (verde) y que los osciladores en el ojo son extraordinariamente sensibles a estos estímulos, ya que sólo un flujo de 5 fotones en el ojo, es suficiente para sincronizar esta actividad. Sin embargo el papel que desempeña la luz monocromática como sincronizador de los ritmos circadianos cuando se aplica en forma periódica se conoce poco.

Knüll (1976), observó que el inicio de la actividad de vuelo en pájaros diurnos, depende del cambio de color y de la intensidad del régimen aplicado, encuentra que la variación diaria durante el verano en el color del cielo polar ártico es capaz de sincronizar éste ritmo circadiano. Nuboer y cols. (1983) estudiaron el inicio y el final de la actividad circadiana locomotora del conejo silvestre y observaron su relación con los cambios en la intensidad y en la composición espectral del tipo de longitud de onda utilizada.

En estudios recientes realizados en el acocil *Procambarus clarkii* se observó que al aplicar luz monocromática en forma continua sobre el ritmo circadiano ERG de esta especie, se provocaban cambios en la velocidad angular del ritmo circadiano dependiendo del contenido espectral utilizado. Inclán-Rubio (1991) ha postulado que la luz monocromática puede actuar como una señal sincronizadora del ritmo circadiano ERG del acocil, debido a que al aplicar pulsos únicos de luz monocromática (500 lux durante 50 min.), se obtienen cambios de fase que dependen de la longitud de onda que se utilice. Los resultados de la autora muestran dos grupos de fotorreceptores funcionales que responden selectivamente a tres longitudes de onda diferentes y que en la mayoría de los casos provocan cambios de fase con signos opuestos, mientras que la luz roja provoca atrasos de fase cuando se aplica a las 2, 6, 12 y 20 hc, a esas mismas horas circadianas (a excepción de la hc 20) la luz verde genera adelantos, proponiendo la existencia de por lo menos dos grupos de fotorreceptores funcionales, uno responsable de la sensibilidad a longitudes de onda corta y otro relacionado con longitudes de onda larga. Herrera-León (1990), estudió también la capacidad sincronizadora que tiene la luz roja (632 nm) al aplicar pulsos únicos breves (15 min.) de baja intensidad (100 lux) sobre el ritmo circadiano ERG en el acocil *Procambarus clarkii*, observó que la luz roja con estas características provoca cambios en todos los parámetros del ritmo, los cuales están relacionados con el momento circadiano en que el estímulo se aplicó, sus resultados muestran efectos propios de la capacidad sincronizadora del estímulo sugiriendo que el cambio que provoca la luz roja sobre el ritmo circadiano ERG, modifica en forma importante a los osciladores responsables de esta oscilación repercutiendo en los mecanismos adaptativos del acocil a su medio ambiente.

Finalmente Fanjul-Moles y cols. (1992) observaron que la aplicación de luz monocromática (400-700 nm) a acociles *Procambarus clarkii* en estadios juveniles (2-12 semanas) también produce cambios significativos en las características del ritmo circadiano ERG y tiene un efecto sincronizador sobre los ritmos ultradianos ERG que se presentan en animales de 2 a 28 días, proponiendo la existencia de por lo menos dos grupos de fotorreceptores que relacionan dos sistemas independientes implicados en la sincronización del ritmo circadiano ERG, es decir un sistema de detección para longitudes de onda corta y otro sistema para detección de longitudes de onda larga. Mientras que el sistema de detección de onda corta (400-599 nm) se desarrolla en etapas tempranas, el sistema de detección de ondas largas (600-700 nm) tiene un desarrollo tardío.

3. Estructura anatomofuncional de los crustáceos.

Los acociles son crustáceos decápodos de agua dulce, su distribución geográfica es mundial ya que se localizan desde el Asia oriental y el sur de Europa, hasta el noroeste americano. Son animales que viven en ríos caudalosos o en aguas tranquilas, en ocasiones estancadas con fondos cenagosos. El acocil o acuitzilli (viene de ail: agua, y quitzilli: que se retuerce) es mejor conocido como cangrejo de río. Para su descripción anatómica se divide en dos partes, una anterior llamada cefalotórax y otra posterior o abdomen. El esqueleto externo del acocil o exoesqueleto, está compuesto por quitina, un polisacárido semejante a la celulosa, cuya estructura química es la de una acetil-glicosamina. Según el estado fisiológico del animal, la quitina puede estar impregnada o no de carbonato de calcio. Además está recubierta por un barniz amorfo segregado por las células ectodérmicas que revisten el cuerpo y los apéndices. Las articulaciones del cuerpo y de los apéndices no están calcificadas, lo que permite a las diferentes piezas el movimiento (Arrignon, 1985). La cabeza y el tórax están unidos en una estructura común, denominada cefalotórax (Fig. 2).

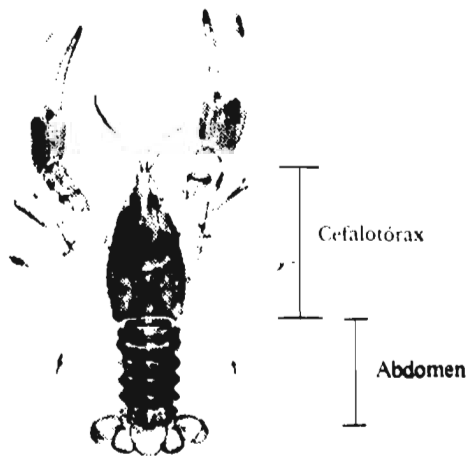


Fig. 2.- Acocil *Procambarus clarkii* adulto (Tomado de Arrignon, 1985).

Sistema nervioso: A diferencia del sistema nervioso del vertebrado que está formado por millares de células nerviosas que establecen entre sí comunicaciones innumerables, el sistema nervioso del crustáceo está constituido por aproximadamente un millón de células. Fue en este grupo donde se propuso por primera vez el concepto de “neuronas identificables” para aludir a aquellas células que pueden ser reconocidas tanto por su forma como por sus funciones (Wiersma, 1974). El sistema nervioso de los crustáceos es esencialmente ganglionar. Los ganglios están dispuestos sobre la línea media de la cara ventral del cuerpo y están unidos a los músculos y a los apéndices por fibras nerviosas. En el cefalotórax se localiza el ganglio cerebroide o supraesofágico constituido por tres grupos ganglionares unidos por fibras nerviosas. A este nivel los ganglios inervan los apéndices anteriores (Arrignon, 1985; Bullock, 1965). El ganglio cerebroide se comunica a través del collar esofágico con la masa ganglionar esofágica, constituida también por tres grupos ganglionares, esta a su vez se continua con la cadena ganglionar abdominal, la cual consta de seis pares de ganglios (del I al VI) en donde el último está fusionado. Cada uno de ellos está unido entre sí, por nervios conectivos formados por los axones de las neuronas que constituyen los ganglios (Skinner, 1985). Cada ganglio abdominal contiene cerca de 600 a 700 neuronas e inervan los músculos motores de la cola, los que están divididos en dos grupos, los extensores y los flexores (Kondoh y Hisada, 1986). El sexto ganglio abdominal (6o. GA) ha sido bien caracterizado morfológica y fisiológicamente. Su papel funcional en la integración sensorial y la generación de eferencias motoras ha sido motivo de estudio en los últimos años (Reichert y cols., 1982; Nagayama y cols., 1993). En la Figura 3, se observa el esquema del sistema nervioso del acocil, en el que se aprecia la situación que ocupa el 6o. GA, ocupando la posición más caudal de la cadena abdominal, la cadena torácica y el ganglio cerebroide. Es relevante mencionar que a lo largo de todo el sistema nervioso del acocil se han encontrado estructuras que participan en la fotorrecepción extrarretiniana. (Sandeman, 1990; Binkley, 1993).

Sistema endocrino: Los crustáceos son organismos que han contribuido de manera significativa en el estudio de la fisiología de los invertebrados y particularmente en el desarrollo de conceptos de neurosecreción como parte del sistema endocrino. En crustáceos decápodos, algunas neuronas especializadas con actividades secretoras precedieron evolutivamente a las glándulas endocrinas. Estas células neurosecretoras se pueden encontrar en varias partes del sistema

SISTEMA NERVIOSO DEL ACOCIL

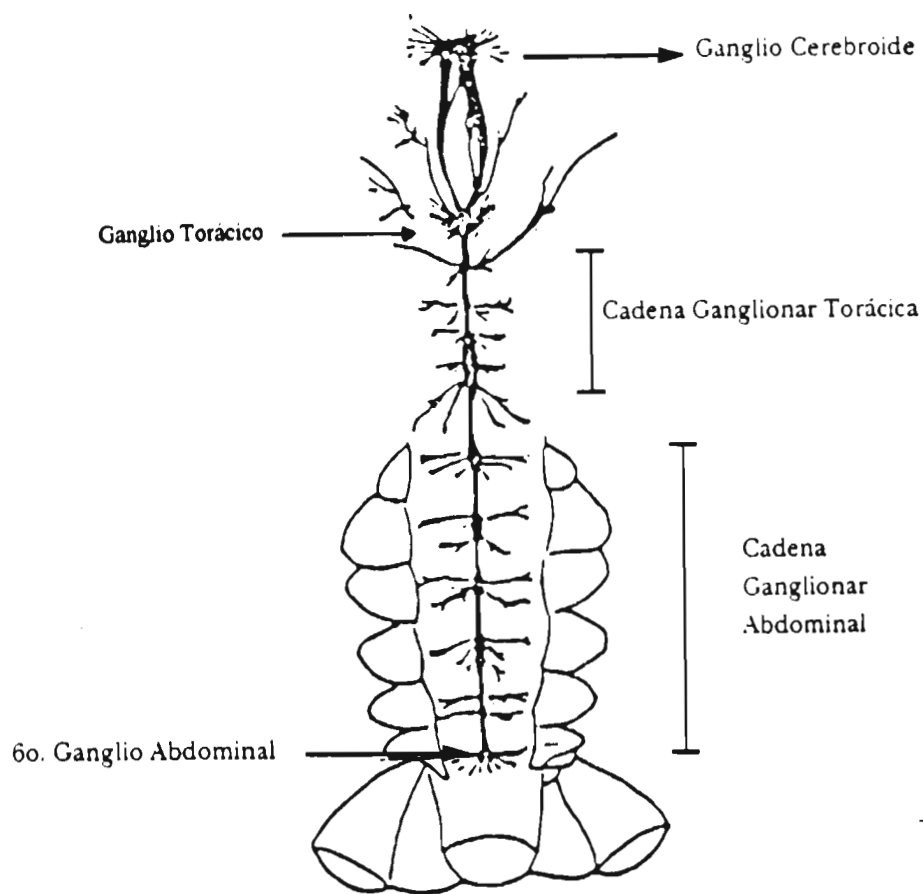


Fig. 3.- Esquema del sistema nervioso del acocil, en el que se puede observar la comunicación anatómica existente entre el sexto ganglio abdominal, que se encuentra localizado en la región más caudal de la cadena abdominal, con otras regiones del sistema nervioso como son la cadena ganglionar torácica y el ganglio cerebroide (modificado de Hermann y stark, 1963).

nervioso: en el ganglio cerebroide, en los ganglios de la cadena nerviosa ventral y en los ganglios ópticos. También se pueden encontrar diferentes tipos de células con actividad secretora, por ejemplo: los órganos pericárdicos y los órganos poscomisurales. En algunas especies existen ramificaciones del órgano pericárdico que transportan hormonas hacia los músculos respiratorios, por lo que estos órganos pueden ser considerados reguladores activos del transporte e intercambio gaseoso. Otro de los órganos endocrinos es la glándula sinusal (GS) es análogo a la neurohipófisis de los vertebrados localizado en la médula terminal de cada tallo ocular (Bliss, 1982). Fue descrito por Carlisle y Knowles (1953) como el principal centro de control neuroendocrino del acocil. La GS está formada por las terminaciones de fibras nerviosas, que se originan en las células neurosecretoras de diferentes partes de los ganglios del tallo ocular. Los conjuntos de somas celulares se denominan órganos-X (OX), con varias denominaciones para indicar el sitio específico donde se encuentran, por ejemplo órgano X del poro sensorial y órgano-X de la pars distalis (Barnes, 1984). El material sintetizado por el OX es transportado intraaxonalmente hacia la GS para su posterior secreción (Fig. 4). Según estudios fisiológicos y bioquímicos, la GS es el principal órgano en la secreción de una gran variedad de diferentes hormonas (Knowles, 1950). Aunque el número exacto de estas hormonas aún no se ha determinado, las cinco conocidas son: la hormona concentradora de eritróforos, la hormona hiperglucemiante, la hormona inhibidora de la muda, la hormona neurodepresora y la hormona dispersora del pigmento distal. (Aréchiga, 1992).

Por otra parte, también se ha examinado en el microscopio al OX mediante preparaciones teñidas con cobalto, utilizando esta técnica se pudo observar que son aproximadamente 115 axones los que conforman la vía nerviosa del sistema OX-GS. Estos axones contienen vesículas neurosecretoras similares a las encontradas en la GS. Además de la vía OX-GS, existen otro tipo de fibras que son fácilmente identificables en el microscopio de luz, cerca de 70 de estas fibras, forman la vía glándula sinusal-ganglio cerebroide. Con el microscopio electrónico se ha podido determinar que estos axones están empaquetados y se encuentran adheridos al tracto que forma el sistema OX-GS. (Andrew y Saleuddin, 1978). Estos órganos neuroendocrinos parecen jugar un papel importante en el control de las actividades viscerales, las que en los vertebrados son regulados por el sistema nervioso autónomo.

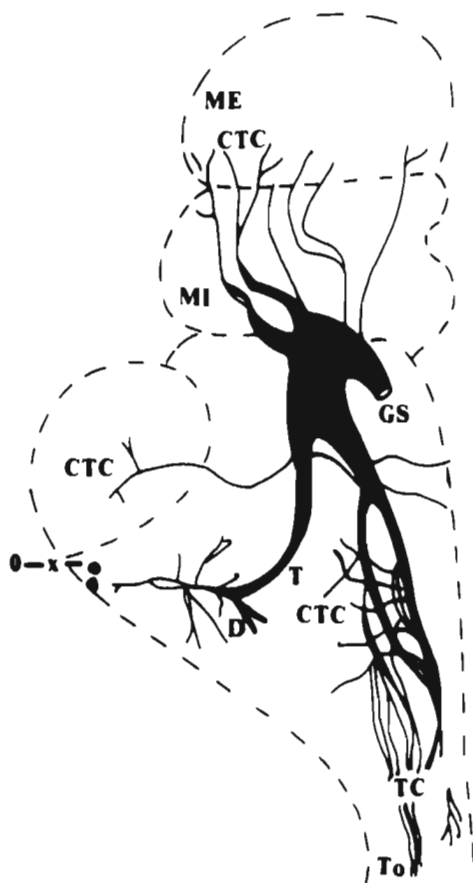


Fig. 4.- Representación esquemática de un corte de tallo ocular en donde se observa el sistema órgano-x -glándula sinusal. Órgano X (OX); glándula sinusal (GS); Tracto óptico (To); Tracto del órgano-x-glándula sinusal (T); dendritas (D); tracto cerebroide (TC); médula externa (ME); médula interna (MI); colateral del tracto cerebroide (C). Tomado de Andrew y Saleuddin, 1978).

4. Sistema visual en los crustáceos.

El acocil posee dos ojos compuestos, situados en su porción cefálica. Tienen un contorno casi hemisférico y se encuentran situados en el extremo de un pequeño pedúnculo llamado tallo ocular, que les da la posibilidad de ser móviles. El tallo ocular es una estructura en forma cilíndrica, con un ligero aplanamiento dorsoventral que en su parte proximal se encuentra unido de forma articulada a la cabeza del acocil. En su mayor parte está cubierto por quitina. (Referido por Nässel, 1976). Si hacemos un corte longitudinal del tallo ocular observamos cuatro grupos ganglionares. De la retina hacia el extremo proximal se encuentran: la lámina ganglionar, la médula externa (donde se localiza el OX-GS), la médula interna, la médula terminal y una gran parte del nervio óptico (Fig. 5). En general hay poca diferencia intergenérica en la morfología del tallo ocular dentro del grupo de los crustáceos decápodos, en especial de los acociles: *Astacus*, *Pacifastacus* y *Procambarus* (Waterman y cols. 1982). El nombre de ojo compuesto en los artrópodos se debe a que está formado por varias unidades anatómicas denominadas omatidios, cada ojo compuesto tiene alrededor de 2500 (Nässel, 1976). El omatidio es una estructura alargada constituida por cinco tipos celulares. La porción más superior de cada omatidio la ocupa la córnea y el conjunto de córneas da un aspecto facetado en el exterior que es característico del ojo compuesto. Cada córnea se forma por la secreción de cuatro células corneáneas translúcidas, unidas en su base a los conos cristalinos, que son estructuras cilíndricas que se extienden desde la córnea hasta la retina y conforman el sistema dióptrico del omatidio (Waterman, 1961). Por debajo de los conos cristalinos se encuentran de 7 a 8 células retinulares que forman los fotorreceptores. La octava célula retinular o R8 se encuentra más diferenciada que las otras siete y forma un pequeño rábdomo separado con microvellosidades horizontales situadas distalmente al omatidio (Waterman, 1977; Hafner y Tokarski, 1978). Las otras siete células retinulares, también llamadas R1 a R7, forman la porción proximal del rábdomo y se pueden dividir en dos subgrupos con base en la orientación de sus microvellosidades. R1, R2, R5 y R6, están orientadas verticalmente, mientras que R3, R4 y R7 se presentan en forma horizontal (Waterman y Fernández, 1970).

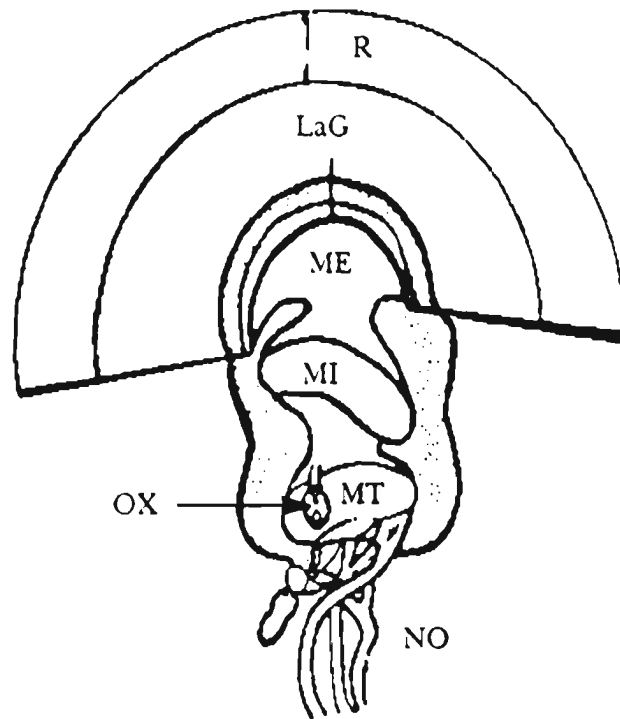


Fig. 5. Esquema de un corte longitudinal del tallo ocular del acocil *Procambanus*, en el que se señalan los principales componentes. R: retina; LaG: lámina ganglionar; ME: médula externa; MI: médula interna; MT: médula terminal; NO: nervio óptico; OX: órgano X. La zona sombreada representa las regiones en las que se localizan los cuerpos celulares.

Cummins y Goldsmith (1981) marcaron con el colorante vital amarillo lucifer, las células de la retina del acocil *Procambarus*, encontrando que el cuerpo celular del fotorreceptor que responde al color violeta, se localiza en la octava célula retinular y las células que responden al color verde, son las que contribuyen a formar el rábdomo principal constituido por las células retinulares de R1 a R7.

4.1. Transmisión de la información visual.

La transmisión de la información visual hacia las estructuras centrales de integración se lleva a cabo por axones que viajan desde la médula terminal hacia el lóbulo óptico del ganglio supraesofágico, viajan agrupadas en el llamado nervio óptico, en esta estructura además de las fibras visuales hay otra variedad de axones, que van a los músculos que mueven el tallo ocular.

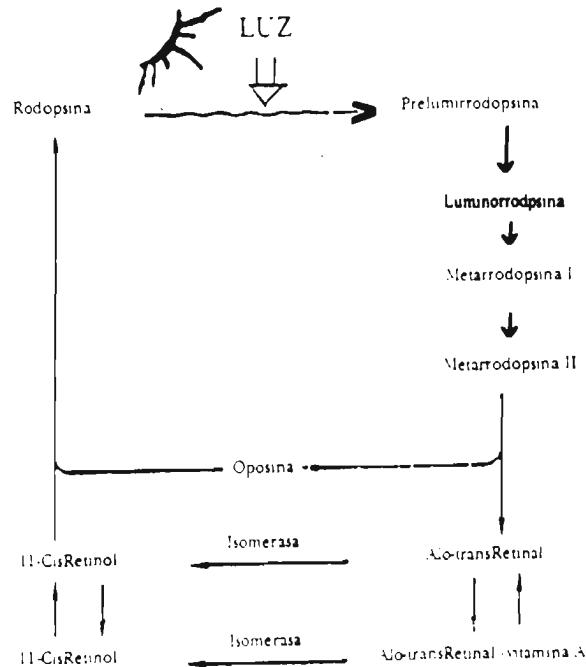
De las aproximadamente 1700 fibras que constituyen el nervio óptico (Nunnemacher y cols., 1962), en el acocil *Procambarus* se han descrito 46 fibras visuales (Wiersma y Yamaguchi, 1966). De las fibras que responden a estímulos luminosos están las fibras de acción sostenida, las cuales se activan al iluminarse el ojo. Existen también fibras que se activan espontáneamente en la oscuridad y fibras que detectan un movimiento rápido de aproximación, así como fibras que se activan con la aplicación de luz monocromática de 430 a 650 nm (Treviño y Larimer, 1970; Woodcock y Goldsmith, 1970). Además de los axones sensitivos y motores, se han identificado en el nervio óptico, fibras de tipo secretor, que terminan en los diferentes ganglios como en la glándula sinusal.

4.2. Fotoquímica de la visión.

Los ftopigmentos son moléculas complejas, formadas por una proteína, la opsina y un cromóforo, el retinal. La opsina esta constituida por siete segmentos intramembranales en forma de hélices de tipo alfa-helicoidal, conectadas por segmentos no helicoidales. Los retinales son aldehidos de las vitaminas A. Existen dos grandes series: los derivados del retinol (vitamina A1) o

retinales 1 y los derivados 3-dehidroretinol (vitamina A2) o retinales 2. En consecuencia, existen dos series de fotopigmentos: los que contienen retinal 1 y los que contienen retinal 2. Los fotopigmentos de los tetrapodos y peces marinos son derivados del retinal 1, mientras que derivan del retinal 2 los fotopigmentos de los peces de agua dulce (Provencio, 1993). El retinal se encuentra en un complejo proteico con cargas eléctricas cuya distribución varía según las distintas opsinas. A esta distribución se atribuye el espectro de absorción del retinal que caracteriza a cada fotopigmento y que se define por su absorción máxima (Spillman, 1990).

Al igual que muchos vertebrados de agua dulce, los acociles poseen un sistema visual a base de rodopsina-porfirropsina (Susuki y cols. 1984). Es en la membrana del rábdomo donde se encuentran estos pigmentos fotosensibles (Fernández y Nicker, 1976) y donde por efecto de la luz, la rodopsina se transforma en metarrodopsina. No hay intermediarios o bien son poco estables y la capacidad para cambiar de metarrodopsina a rodopsina, varía de acuerdo a la longitud de onda que estimule al ojo (Cronin y Goldsmith, 1984). La rodopsina es un pigmento que está presente en los bastones de vertebrados, contiene 11-cis-retinal como cromóforo, que al transformarse en el isómero todo-trans por la energía de un fotón cuando éste incide sobre el fotorreceptor es el responsable de iniciar el proceso de transducción, iniciando así una serie de cambios bioquímicos en ambos componentes del pigmento, regenerando el estado inicial mediante un ciclo (referido por Provencio, 1993). La rodopsina, como se ha comprobado, cambia su conformación química al interactuar con la luz, luego de varias etapas de un ciclo, la molécula vuelve a su forma inicial. El ciclo es el siguiente:



Se ha reportado en la membrana del rábdomo del acocil *Procambarus clarkii* la actividad de dos enzimas, la retinil-éster-hidrolasa (REHasa) y la retinol-deshidrogenasa (RDHasa) que participan en la conversión del retinol a dehidrorretinal, después de la hidrólisis de retinilésteres. Además se reporta un nuevo retinoide llamado 3-hidroxitretinol y sugieren que es probablemente un intermediario de la conversión de retinol a dehidrorretinol (Susuki y Miyata, 1991; Susuki, 1993).

La proporción de porfirropsina con respecto a la cantidad total de pigmento visual, incrementa en condiciones de bajas temperaturas y disminuye en condiciones de altas temperaturas, como consecuencia tenemos variaciones en la cantidad total del pigmento visual de acuerdo a la estación del año en que se realiza la cuantificación (Susuki y cols., 1985, 1993). La porfirropsina absorbe longitudes de onda más largas que la rodopsina y su presencia representa probablemente una adaptación al ambiente lumínico de agua dulce, ya que la distribución espectral de la luz en el agua dulce, se sitúa en longitudes de onda mayores a los encontrados en los ambientes marinos y terrestres (Knowles y Dartnall, 1977; Provencio, 1993).

4.3. Sensibilidad espectral en los crustáceos.

El estudio de la sensibilidad espectral en crustáceos ha sido posible con base en técnicas electroretinográficas, esto es, analizando la amplitud de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores retinianos a la luz (Goldsmith, 1986). Al comparar las características de sensibilidad espectral en cuatro especies de crustáceos, Goldsmith y Fernández (1968) encontraron valores de respuesta ERG entre 300 y 600 nm. Por otra parte Wald (1962, 1968) encontró evidencias electrofisiológicas en los ojos de acociles *Procambarus*, la existencia de más de un pigmento visual. Trabajos posteriores a este demostraron la presencia de pigmentos fotosensibles con variaciones en la absorción de la longitud de onda (Fujimoto y cols. 1966; Wald 1967). En los rábdomos aislados del acocil se realizaron determinaciones microespectrofotométricas, y se observó una banda de absorción amplia con un pico de 525-535 nm (Fujimoto y cols., 1966; Waterman y cols., 1969) y una metarrodopsina con una longitud de onda máxima cercana a 515 nm (Goldsmith, 1972).

En el ojo del acocil *Procambarus* las células retinulares muestran respuestas a longitudes de onda, que varían en cuanto a espectro de absorción, con los cambios en las estaciones del año (Goldsmith, 1977). Waterman y Fernández (1970) con registros intracelulares de estas mismas células encontraron que de 91, 17 respondían a la aplicación de luz violeta (440 nm), y 74 respondían a la luz de color amarillo-naranja (594 nm).

La presencia de dos tipos de fotorreceptores con diferente sensibilidad espectral, también se ha observado en el acocil mediante la realización de curvas de sensibilidad espectral para cuatro neuronas de acción sostenida del nervio óptico de *Procambarus clarkii*. En adaptación a la oscuridad, la longitud de onda máxima reportada fue de 570-572 nm y en adaptación a la luz una longitud de onda máxima de 445 nm. Estos datos sugieren que las fibras de acción sostenida puedan llevar información compatible con la visión en color (Treviño y Larimer, 1970; Woodcock y Goldsmith, 1970).

5. Fotorreceptores extrarretinianos.

A lo largo de la escala filogenética existe una gran variedad de células capaces de detectar fotones en distintos órdenes de complejidad que van desde simples indicadores luz-oscuridad hasta arreglos estructurales tan elaborados como el ojo de ciertos invertebrados y por supuesto, el de los vertebrados. En términos generales se observa que los organismos inferiores poseen fotorreceptores dispersos en las distintas regiones del cuerpo, las cuales han sufrido cierta tendencia a lo largo de la evolución, para agruparse y poder así suministrar mayor información acerca del medio que los rodea, éste es el caso de los fotorreceptores retinianos, que permiten la ubicación espacial del organismo. Por otra parte, en muchos de los casos en que se han conservado los fotorreceptores extrarretinianos, se ha observado que su papel funcional está relacionado principalmente con determinar o colaborar en la ubicación temporal del organismo. Un ejemplo de ello fue descrito por Hanna y cols., (1988) quienes estimularon la cola de *Limulus* a diferentes horas del día y encontraron cambios de fase en el ritmo ERG de los ocelos mediales o de los ojos laterales.

El hecho de que algunos animales puedan percibir la luz de manera extraóptica se conoce desde inicios de este siglo. Los primeros datos fueron proporcionados por Parker (1903) y por

Pearse (1910) quienes estudiaron la sensibilidad ocular y dérmica de los anfibios a la luz. En 1911, Von Frisch encontró una relación entre la captación de la luz por vía no ocular y las modificaciones en la posición de los pigmentos cutáneos de peces. Mientras Adler (1970) prefiere utilizar el término de fotorreceptores extraoculares, Block utiliza el término de fotorreceptores extrarretinianos, ya que no descarta la probable existencia de fotorreceptores extrarretinianos intraoculares por lo menos en *Aplysia* (Block, 1973).

A pesar de que las estructuras fotorreceptoras extrarretinianas pueden ubicarse en múltiples sitios, su lugar más probable parece ser el sistema nervioso, como el sexto ganglio abdominal y el ganglio cerebroide en el acocil (Prosser, 1934; Page y Larimer, 1976; Binkley, 1993).

El estudio de los elementos fotorreceptores extrarretinianos en el acocil se inició en 1934, cuando Prosser realizó experimentos tendientes a sistematizar la respuesta eléctrica a la luz de la cadena ganglionar abdominal en la especie *Cambarus*. Las experiencias que lo llevaron a proponer la existencia de fotorreceptores caudales se puede resumir de la siguiente manera: Al hacer un registro de la actividad eléctrica espontánea de la cadena ganglionar se notaba en ella un incremento, como resultado de la aplicación de señales luminosas que se hacían llegar a la región del 6o. GA y que se había cuidado que no pasaran por la región cefálica (Fig. 2). Este aumento de la actividad eléctrica coincidía con el momento de la aplicación del estímulo y persistía algunos segundos después que éste se había suspendido. Mas aún, animales a los que se les había extirpado previamente los tallos oculares y cadenas ganglionares separadas del resto del animal seguían respondiendo a los estímulos luminosos, el aumento de la actividad eléctrica se podía obtener de cualquier segmento de la cadena pero sólo cuando la luz se hacía incidir sobre el 6o. GA. Los potenciales provocados por la luz podían registrarse en la región torácica, las comisuras esofágicas y en la porción izquierda o derecha de la cadena, si previamente ésta se había escindido. La aplicación de calor en la zona caudal no se acompañaba de modificaciones en la actividad eléctrica espontánea, lo que indicaba que los receptores de esa zona no eran termorreceptores. El mismo autor encontró que los fotorreceptores caudales respondían con mayor lentitud, con mayor umbral y eran de adaptación más lenta que los fotorreceptores visuales.

Por su parte Kennedy (1958) continuó con estos estudios usando cadenas abdominales aisladas de las que había eliminado la actividad eléctrica espontánea, mediante la aplicación de

bajas temperaturas (de 8 a 10°C durante las 12 a 30 horas anteriores al registro) o por adición al medio de una solución de cloruro de potasio 3M, el autor encontró en las fibras aferentes de los fotorreceptores del ganglio abdominal caudal, un patrón de descarga tónica de gran latencia y bajo nivel de adaptación. La actividad eléctrica del ganglio caudal fue estudiada por medio de registros intracelulares (Kennedy y Preston, 1960).

Los estudios de Hama (1961) sobre la estructura de la cadena abdominal, le llevaron a proponer la posibilidad de que hubiera fotorreceptores en todos los ganglios, ya que de los seis que integran la cadena, el autor encontró cuerpos formados por un grupo de estructuras membranosas y multivesiculares que recuerdan la organización característica de las células fotorreceptoras visuales. Esta proposición sugirió a otros autores (Hermann y Stark, 1963) aplicar diferentes intensidades de iluminación a los ganglios abdominales y analizar los efectos provocados en cada uno de ellos.

Los resultados pusieron de manifiesto que sólo el ganglio caudal contiene elementos fotorreceptores, con predominio de bajas frecuencias, gran tiempo de latencia y poca adaptación al estímulo. Al comparar las respuestas de las unidades aisladas con las de la población se comprueba que los dos sistemas tienen características dinámicas similares.

Los fotorreceptores del 6o. GA son elementos fotorreceptores primarios y sus aferencias contralaterales están relacionadas con la inhibición (Wilkins y Larimer, 1972, 1976; Kennedy, 1963). Los elementos fotorreceptores son también interneuronas de segundo orden con posibilidad de integrar estímulos mecánicos originados en los apéndices del telson (Preston y Kennedy, 1960).

La función principal de los fotorreceptores extrarretinianos en el acocil parece ser el control de la actividad locomotora del animal (Simon y Edwards, 1990), aunque se ha propuesto que podrían estar jugando un papel importante en la sincronización de los ritmos circadianos (Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987), en estos trabajos se describe la capacidad sincronizadora que pueden ejercer los pulsos breves de luz blanca, tanto en el ojo como en el 6o. GA sobre los ritmos de actividad locomotora y ERG, encontrando que la estimulación en el sexto ganglio provoca evidentes cambios de fase, así como la reducción en la amplitud del ERG. La misma estimulación provoca cambios en la frecuencia de descarga de las fibras de la cadena ganglionar, efecto que depende de la hora del día.

También se ha propuesto que el 6o. GA del acocil puede ser en si mismo uno de los osciladores que juegan un papel fundamental en el sistema circadiano de estos animales (Fanjul y cols., 1991). Sin embargo, la interacción entre estos fotorreceptores y los receptores reinianos ha sido poco estudiada y hasta el momento no se han encontrado fibras nerviosas que conecten directamente el fotorreceptor caudal con el ojo.

Fundamento de la Hipótesis.

La organización temporal de muchas variables biológicas puede estudiarse por medio del conocimiento de los ritmos circadianos. La posibilidad de modificar las características de la frecuencia natural de una oscilación circadiana dependen de la capacidad del sistema para captar las señales que llamamos potencialmente sincronizadoras. La luz es uno de los sincronizadores más potentes. El fenómeno denominado sincronización establece la posibilidad de que un ritmo acople o modifique su frecuencia natural de oscilación a una señal o estímulo externo que denominamos como potencialmente efectivo. Este fenómeno se puede llevar a cabo en base, tanto a la existencia de estructuras receptoras del estímulo (fotorreceptores si se trata de la luz), como a la susceptibilidad del sistema circadiano para modificar su organización temporal de acuerdo con las señales que reciba. En el acocil *Procambarus* existen por lo menos dos sistemas de fotorreceptores, los visuales y los caudales. Se sabe que la amplitud de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma, ERG) en el acocil *Procambarus*, presenta cambios circadianos, con una actividad de predominio nocturno. Este ritmo posee la capacidad de manifestar cambios de fase (adelantos o atrasos) cuando se le aplican sobre los ojos, estímulos únicos de luz blanca o luz monocromática (LM). Ahora sabemos también que estímulos únicos de luz blanca aplicados sobre los fotorreceptores caudales del 6o. ganglio abdominal incrementan la actividad eléctrica a lo largo de la cadena ganglionar abdominal lo que provoca una consistente disminución en la amplitud del ritmo ERG, así como en el área pseudopupilar, efecto que depende de la hora del día. Las características espectrales de estos receptores indican que el fotopigmento implicado en la transducción es una rodopsina muy similar a la que media la fotorrecepción en el ojo del acocil. Se conoce la existencia de estos fotorreceptores en el 6o. ganglio abdominal, pero no se ha determinado cual es su participación en las funciones adaptativas del organismo, en particular en la sincronización de los ritmos circadianos. Finalmente mientras que la importancia de la luz blanca como agente sincronizador de los ritmos circadianos está perfectamente establecida en organismos desde unicelulares hasta vertebrados superiores, el papel de la luz monocromática se encuentra en estudio, relacionando su efecto con la modulación y sincronización de las actividades rítmicas.

HIPOTESIS

Si los fotorreceptores caudales del 6o ganglio abdominal son sensibles a la luz amarilla de 589.6 nm y estos tienen comunicación funcional con las estructuras responsables de la generación y modulación del ritmo circadiano ERG. Entonces la aplicación de un estímulo único y breve de esta luz sobre el 6o ganglio abdominal provocará modificaciones en algunas de las características del ritmo ERG (Amplitud, nivel de oscilación, relación α/σ) lo que indique la presencia de la participación de los fotorreceptores caudales en la modulación de este ritmo.

Si la luz amarilla de 589.6 nm aplicada sobre el 6o ganglio abdominal tiene la capacidad de sincronizar al ritmo circadiano de actividad electroretinográfica, la aplicación de este estímulo luminoso a diferentes momentos del ciclo circadiano provocará cambios de fase (adelantos o atrasos) que dependerán de esta longitud de onda utilizada y de la hora circadiana de aplicación del estímulo.

OBJETIVOS

Para comprobar las hipótesis propuestas, el trabajo experimental contempló los siguientes objetivos.

Generales.

- Evaluar la participación del 6o. ganglio abdominal en la modulación y sincronización del ritmo circadiano ERG a través de estímulos de luz monocromática de 589.6 nm. en el acocil *Procambarus*.

Específicos.

- Caracterizar los efectos a corto plazo sobre el valor de la amplitud de la respuesta electroretinográfica en el acocil *Procambarus*, que ocurren por la aplicación de luz amarilla de 589.6 nm sobre el 6o. ganglio abdominal.

- Evaluar las características del ritmo circadiano ERG cuando se aplica un estímulo único de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal en el estado estable.

- Analizar las curvas de respuesta de fase estable (CRFe) y transitoria (CRFt) que se tienen como resultado de la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal.

Material y Método

Generalidades.

Se utilizaron acociles hembras y machos de la especie *Procambarus clarkii*, adultos, con un peso aproximado de 20 a 40 g y un tamaño de 7 ± 1 cm. procedentes de Michoacán, México, donde se encuentran en condiciones de vida libre. Antes de los experimentos, los acociles se mantenían en tinas con agua aereada, se alimentaban dos veces por semana con zanahorias y pescado fresco y recibían un fotoperiodo con iluminación natural.

Durante la fase experimental se trabajó cada animal en forma individual, colocándolo dentro de una cámara con un sistema que controlaba la temperatura a $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y en condiciones de fotoperiodo 12/12 (luz: 6:30 a 18:30 h y, oscuridad: 18:30 a 6:30 h) con una intensidad que se regulaba individualmente para cada acocil y que no provocara una disminución en la respuesta electroretinográfica mayor a 20% de la amplitud inicial. Los acociles eran colocados en una caja de lucita negra dividida en dos compartimentos lo que permitía aplicar regímenes luminosos diferentes a cada porción anatómica del acocil. Inmóviles con su caparazón sujeto a una pieza de acrílico y las patas amarradas con hilo, en posición dorso-ventral con una ligera inclinación de 45° y sumergidos parcialmente en agua. (fig.6).

Obtención y caracterización del ritmo circadiano electroretinográfico.

A cada acocil con los tallos oculares inmóviles con una pequeña pieza de algodón entre los tallos oculares, se le implantó un electrodo de metal de 5 a 10 micras de diámetro a través de la superficie corneal. El electrodo captaba la respuesta de los fotorreceptores retinianos a los destellos de luz blanca enviados cada 30 minutos por un fotoestimulador (Grass PS22) con una intensidad de 400 lux y 10 microsegundos de duración. La actividad eléctrica captada bajo estas condiciones era transmitida a un

preamplificador (Grass P15) y de ahí era enviada a un polígrafo (Grass P7) por medio del cual se obtenía un registro gráfico que duraba no menos de 15 días, necesario para su análisis ulterior.

Los resultados de estos experimentos se analizaron midiendo cada 30 minutos, el valor total del componente H1 del ERG, de acuerdo por lo propuesto por Naka y Kuwabara (1959). Los valores obtenidos se graficaron en función del tiempo. Estas gráficas mostraron cambios en la amplitud de la respuesta, lo cual permitió establecer el valor de los siguientes parámetros: a) el periodo (medido de valle a valle en cada oscilación); b) la relación actividad/reposo (α/σ) (medida tomando como punto de referencia el 50% de la amplitud de la oscilación y trazando una recta hasta el punto de la siguiente oscilación que representa el 50% de su amplitud y considerando el punto en que cambia el sentido de la oscilación dentro de un mismo ciclo); c) el nivel de oscilación (medido como la pendiente de una recta trazada del punto de inicio de una oscilación al punto de inicio de la siguiente); d) el valor de la amplitud (que se obtiene tomando en cuenta el valor más alto de la amplitud de la oscilación del ERG con respecto a su valor más bajo). En cada caso se obtuvo el promedio, la media y la desviación estándar.

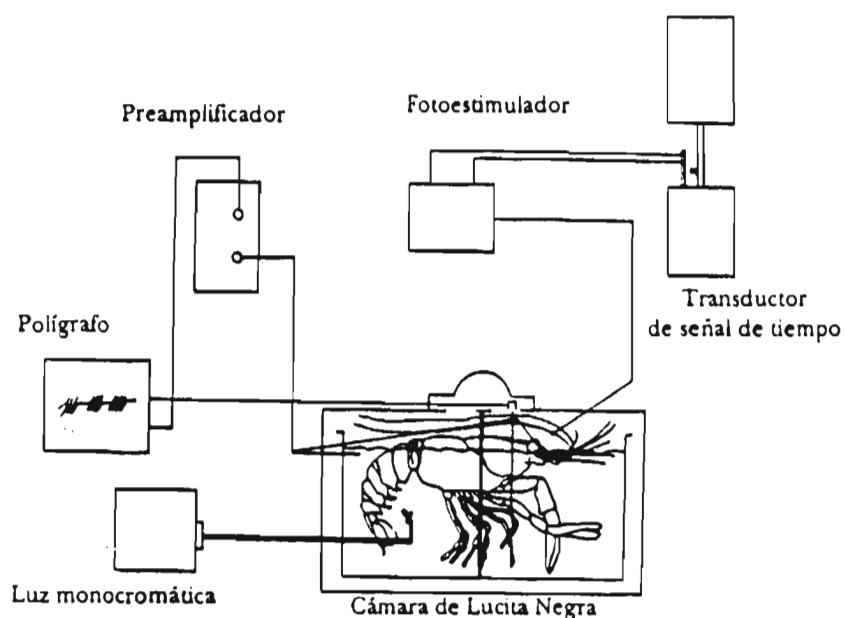


Fig. 6. Esquema del dispositivo utilizado en nuestros experimentos. El electrodo capta la respuesta de los fotorreceptores retinianos a destellos de luz blanca enviados cada 30 minutos por el fotoestimulador. La actividad eléctrica captada en estas condiciones se registra gráficamente en un polígrafo. La aplicación de luz amarilla en el sexto ganglio abdominal se hizo mediante un iluminador con adaptación para fibra óptica con acoplamiento de filtros.

Fotoestimulación del 6o. ganglio abdominal.

Para conocer el efecto que tiene la estimulación por luz monocromática de 589.6 nm (luz amarilla) sobre el 6o. ganglio abdominal en el ritmo circadiano ERG en el acocil, se utilizó un sistema de iluminación de luz blanca fría (Fiber-lite, Modelo 1700; Dolan Jenner Industries) con adaptación para fibra óptica con acoplamiento de filtros. Se utilizó el filtro de interferencia Diel (Edmund Scientific. Co.) para el color amarillo de 589.6 nm. Los estímulos de esta longitud de onda específica fueron aplicados en la parte posterior del abdomen, sobre la región que ocupa el 6o. ganglio abdominal con una intensidad de 400 lux y 60 minutos de duración al cuarto día, es decir una vez que el ritmo circadiano ERG presentaba características estables y bien definidas. El experimento continuaba durante 6 días más, con la finalidad de analizar los cambios ocurridos en el ritmo ERG. El estímulo se aplicó a cuatro diferentes horas circadianas (6, 12, 18 y 24) con el fin de explorar el ciclo a lo largo de las 24 horas. Una hora circadiana (hc) es un punto en el ciclo y corre de las 0 a las 24 horas, mide un ciclo completo de la sensibilidad de un organismo. Para determinar la hc, el valor del periodo de un ciclo se ajusta a una duración de 24 horas. La hc=0 es el punto del ciclo en el cual la actividad excede el 50% de la amplitud del ciclo, la hc=24 ocurre un ciclo completo después (Pittendrigh, 1960). El intervalo entre el apagado y el encendido del estímulo se controló mediante un marcador de tiempo automático (Intermatic. Modelo T101). La intensidad luminosa se calibró con un luxómetro Li-cor, Inc. (modelo LI-185B, Q/R/F).

Los resultados de estos experimentos se analizaron en tres partes:

1a. -Efectos a largo plazo de la aplicación de luz amarilla de 589.6 nm sobre el 6o. ganglio abdominal en el ritmo ERG.

Como se menciona anteriormente, en cada registro se midió cada 30 minutos el valor del componente H1 del ERG, durante 15 días. En el cuarto día de registro se aplicaba el estímulo luminoso sobre el 6o. ganglio abdominal y se dejaba por 6 a 10 días más. Los valores obtenidos se graficaron en función del tiempo, analizando los cambios en el valor del periodo, la relación α/σ , el nivel de oscilación y la amplitud, tanto antes del estímulo como al 4o día después de este. (ver cronograma).

2a. - Efectos a corto plazo de la aplicación de luz amarilla de 589.6 nm sobre el 6o. ganglio abdominal en el ritmo ERG.

En esta parte se realizó una gráfica que relaciona la amplitud de la respuesta ERG (en porcentaje) con respecto al tiempo de aplicación de la luz amarilla. Para ello se consideró el valor de la amplitud del ERG con el 100%, a una medida previa al inicio de la aplicación del estímulo, después se graficó el valor de la amplitud durante y finalmente se consideraron cinco horas posteriores a la aplicación del estímulo. De esta manera se observó la influencia a corto plazo de la aplicación de la luz amarilla sobre la amplitud de la respuesta ERG evaluando la latencia y magnitud de la estimulación con respecto a cada hora circadiana estudiada (ver cronograma).

3a. - Obtención y caracterización de las curvas de respuesta de fase.

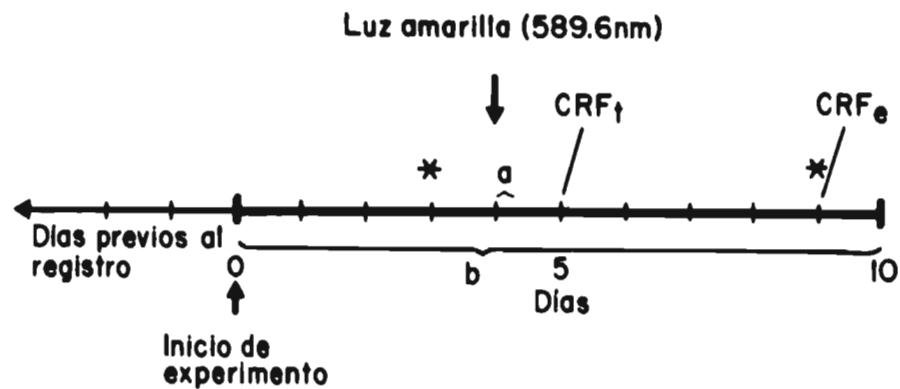
Como tercera parte del análisis de resultados y con el objeto de evaluar en forma sencilla, los efectos provocados por un estímulo único sobre el sistema circadiano, se construyeron la curva de respuesta de fase estable (CRFe) y la curva de respuesta de fase transitoria (CRFt).

Para construir la CRFe se grafica en la ordenada, la fase del ciclo circadiano en la que se aplica el estímulo y en la abscisa, la magnitud del cambio de fase observada en el ritmo en estudio una vez alcanzado el estado estable, generalmente cuatro ciclos después de aplicado el estímulo. La fase del estímulo se expresa en horas circadianas. Los cambios de fase del ritmo en estudio pueden ser graficados (en horas) como avances ($\Delta\theta+$), retrasos ($\Delta\theta-$) o sin cambio.

La curva de respuesta de fase transitoria (CRFt) se construye graficando el valor de la fase del ciclo, al día siguiente de aplicado el estímulo, en función de la hc de aplicación. Una vez construida la CRFe se calculó el área bajo la curva de los atrasos y de los adelantos por medio de un programa de computadora que utiliza la regla de los mínimos cuadrados (Enright, 1965), para expresar con la relación atrasos/adelantos (at/ad) el tipo de cambio predominante. Fueron realizados cinco experimentos de no menos de 15 días para cada hora circadiana estudiada.

CRONOGRAMA

- a) Evaluación a corto plazo (5 horas)
- b) Evaluación a largo plazo (* periodo, nivel de oscilación, amplitud, relación ω/ω_0)



RESULTADOS

Nuestros resultados se describirán en dos partes, primero los efectos a largo plazo, y después los efectos que provoca a corto plazo, la aplicación de la LM de 589.6 nm (luz amarilla) sobre el 6o. ganglio abdominal en las características del ritmo circadiano ERG.

1.- Efectos a largo plazo provocados sobre el ritmo circadiano ERG cuando se aplica luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal.

Los estímulos de luz amarilla de 589.6 nm aplicados sobre el 6o. ganglio abdominal, a cuatro diferentes horas circadianas (6, 12, 18 y 24) provocaron cambios en la frecuencia natural de oscilación del ritmo ERG. Los parámetros que evaluamos, fueron: el valor del periodo, la relación α/σ , el nivel de oscilación y la amplitud. Se describirán para mayor detalle en forma separada. Es importante mencionar que todos estos parámetros fueron evaluados en una fase estable del ritmo (cuarto día de aplicado el estímulo).

1.1. Periodo.

En nuestros experimentos encontramos que para esta especie de acocil (*P. clarkii*), el valor promedio del periodo fue de 24 hrs, bajo condiciones de fotoperiodo 12/12. En todos nuestros experimentos, no encontramos cambios en este parámetro. Este valor fue evaluado en una fase estable del ritmo, dos días antes y cuatro días después de haber aplicado el estímulo luminoso. (Fig. 7 y Cuadro 4).

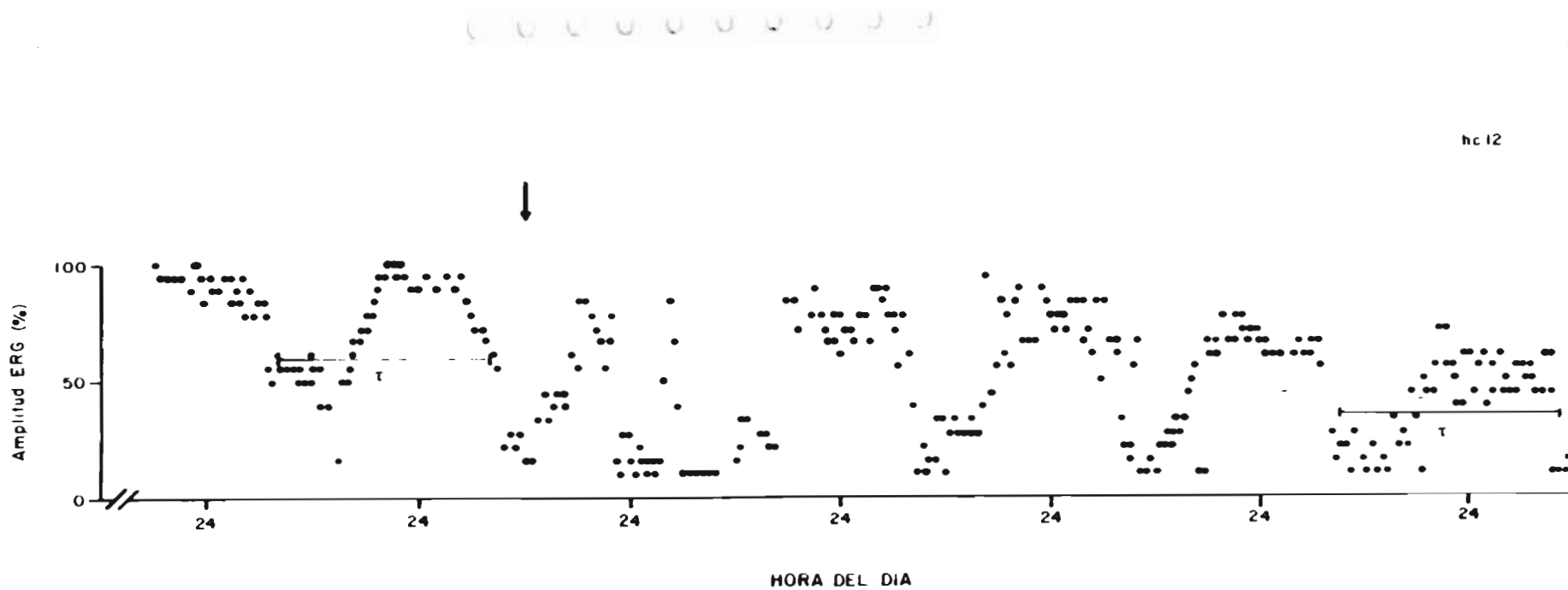


Fig. 7.- Registro típico que muestra un ritmo circadiano ERG obtenido en condiciones constantes de temperatura y con un fotoperiodo 12/12 (L: 6-18 y O: 18-6). La flecha indica el momento de aplicación del estímulo de luz amarilla (60 min. y 400 lux de intensidad) sobre el 6o. ganglio abdominal, a las 12 hc. Note que el valor del periodo (τ) no se modifica en el estado estable.

Hora circadiana	Relación α/σ		Cambio Total
	Antes	Después	
6	1.5	1.9	+ 0.40
	1.06	1.4	- 0.20
	1.0	1.52	+0.52
	1.5	1.63	+0.10
12	1.2	1.16	+ 0.40
	2.2	3.0	+ 0.80
	1.2	1.56	+ 0.36
	1.16	1.6	+ 0.44
	1.2	1.16	+ 0.40
18	1.66	2.22	+ 0.54
	1.56	2.22	+ 0.64
	2.25	3.0	+ 0.75
	1.8	1.3	- 0.5
24	1.52	1.76	+ 0.24
	1.76	1.9	+ 0.14
	1.9	2.2	+ 0.30
	1.6	1.9	+ 0.30

Cuadro 1.- Resumen de los efectos de la aplicación de un estímulo único de luz amarilla de 589.6 nm (60 min. de duración y 400 lux de intensidad) sobre el 6o. ganglio abdominal en la relación α/σ del ritmo circadiano ERG en el acocil.

1.2. Efectos sobre la relación α/σ .

Este parámetro se modificó en todas las horas circadianas en las que se aplicó el estímulo luminoso. Un aumento de la duración de la fase de actividad con relación a la fase de reposo (aumento en la relación α/σ) fue aparente tanto en el día, como en la noche subjetiva. Cuando el estímulo luminoso se aplicó a las 12 y 18 hc, observamos que el valor de la relación α/σ , tenía un promedio que va de 0.50 a 0.68 hrs. con una DS de 0.04 y 0.03, respectivamente. Mientras que cuando el estímulo se aplicó a las 6 y 24 hc, el valor promedio de la relación α/σ fue de 0.30 y 0.25 hrs. respectivamente y con una DS de 0.01 para ambos casos (Fig. 8 y Cuadro 1).

1.3. - Efecto sobre el nivel de oscilación.

El nivel de oscilación es otro parámetro del ritmo circadiano ERG, que se modificó por la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal. Cuando el estímulo se aplicó a las 6 y las 24 hc, encontramos que el valor de la pendiente (m) se encontraba con un promedio que va de +0.16 y +0.11, y una DS de 0.08 y 0.05, para estas horas circadianas respectivamente. Mientras que, cuando los estímulos se aplicaron a las 12 y 18 hc, no se encontraron cambios en el valor de la pendiente (Cuadro 2). En la Fig. 9 se muestra un registro representativo de este efecto.

1.4. - Efectos sobre la amplitud.

En nuestros resultados, encontramos en forma general un predominio en la disminución en el valor de la amplitud. Los cambios más representativos se presentaron cuando el estímulo luminoso se aplicó a las 12 y 18 hc, con un valor promedio que va del 30 al 50 %, respectivamente. A la hc 6, tenemos experimentos donde el valor de la disminución era del 28% como promedio. Cuando el estímulo luminoso se aplicó a la hc 24, encontramos de manera interesante, experimentos en donde el valor de la amplitud aumenta, sin embargo este aumento tan sólo fue del 10 al 15 %. Es importante señalar que, aunque encontramos en forma general una disminución en el valor de la amplitud, también encontramos que, en por lo menos un experimento para cada hora circadiana estudiada, no se presentaron cambios en este parámetro (Cuadro 3). En la Fig. 10 se muestra un registro con un cambio representativo en el valor de la amplitud del ritmo circadiano ERG.

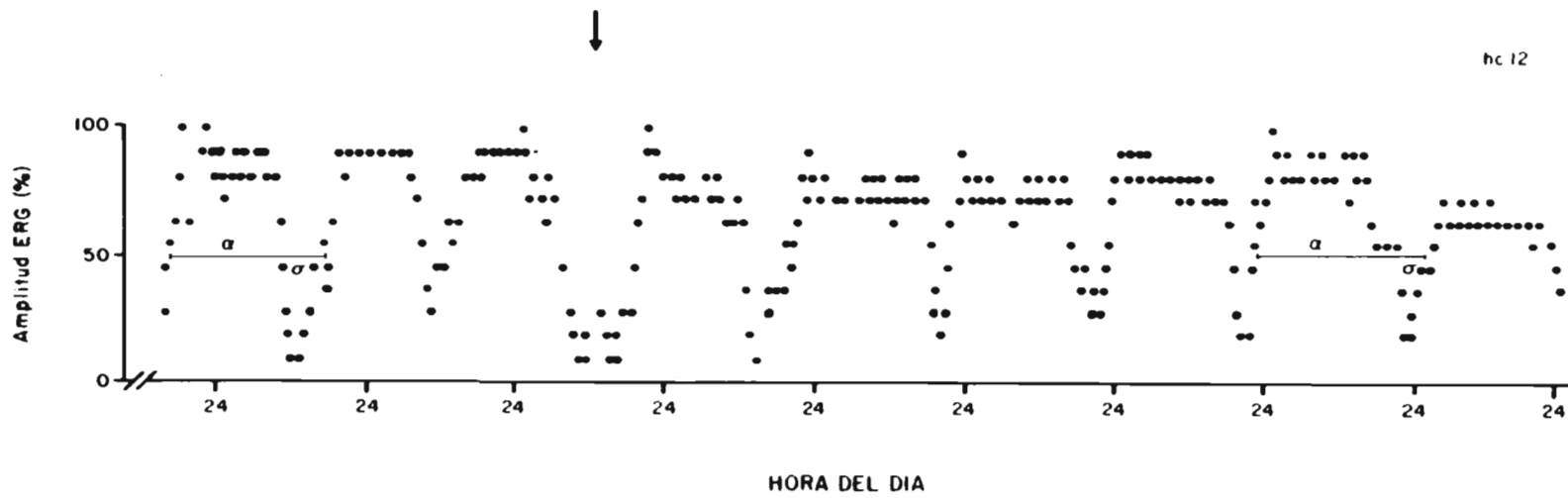


Fig. 8.- En esta gráfica se ilustra el efecto que provoca la aplicación de un estímulo único de luz amarilla (\downarrow) sobre el 6o. ganglio abdominal en la relación α/σ . El estímulo fue aplicado a la hc 12, provocando un aumento en la relación α/σ de 2.2 a 3.0 hrs., a expensas de un aumento en la duración de la fase de actividad, con respecto a la fase de reposo.

Hora circadiana	Cambios en el nivel de oscilación pendiente (m)
6	No cambia + 0.15 + 0.16 + 0.16
12	No cambia No cambia No cambia - 0.14 No cambia
18	No cambia No cambia + 0.13 No cambia
24	+ 0.13 + 0.12 + 0.12 + 0.07

Cuadro 2.- En este cuadro se resumen los cambios obtenidos en el nivel de oscilación a todas las horas circadianas estudiadas, cuando se aplica un estímulo único de LM de 589.6 nm (60 min. de duración y 400 lux de intensidad) en el 6o. ganglio abdominal. Note el predominio de los cambios en este parámetro a las 6 y 24 hc, así como la falta de cambios a las 12 y 18 hc.

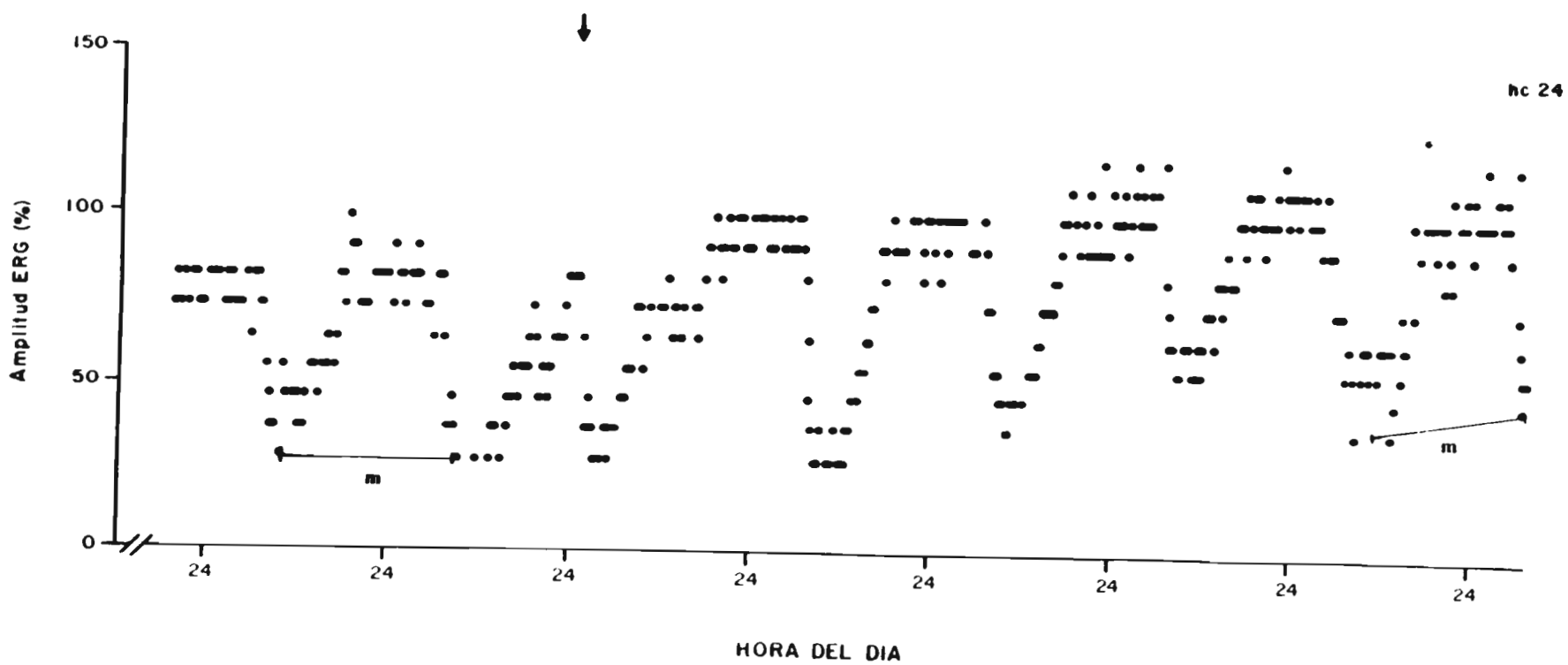


Fig. 9.- En esta gráfica se muestra un aumento en el nivel de oscilación ($m=0.30$) en el ritmo circadiano ERG, provocado por la aplicación de un estímulo único de luz amarilla (\downarrow) sobre el 6o. ganglio abdominal a la hc 24.

Hora circadiana	Valor de la amplitud (%)
6	↓ 25 ↓ 16 No cambia No cambia
12	↓ 25 ↓ 30 ↓ 15 ↓ 12 No cambia
18	↓ 50 No cambia ↓ 15 ↓ 20
24	↓ 7.5 ↑ 15 No cambia ↑ 10

Cuadro 3.- En este cuadro se resumen los cambios (representados en %) en el valor de la amplitud relativa, al aplicar un estímulo único de luz amarilla de 589.6 nm sobre el 6o. ganglio abdominal a cuatro diferentes horas circadianas (6, 12, 18 y 24). Note el predominio en general, de los valores de disminución en la amplitud relativa, principalmente a las 12 y 18 hc. (↓: disminución; ↑: aumento).

Hora Circadiana	Valor del Periodo (24 hrs)	Cambio en la Relación α/σ (hrs)	Cambio en la Amplitud (%)	Nivel de Oscilación (m)
6	SIN CAMBIO	+ 0.40 - 0.20 + 0.52 + 0.10	↓ 25 ↓ 16 No cambia No cambia	No cambia + 0.15 + 0.16 + 0.16
12		+ 0.40 + 0.80 + 0.36 + 0.44 + 0.40	↓ 25 ↓ 30 ↓ 15 ↓ 12 No cambia	No cambia No cambia No cambia - 0.14 No cambia
18		+ 0.54 + 0.64 + 0.75 - 0.50	↓ 50 No cambia ↓ 15 ↓ 20	No cambia No cambia + 0.13 No cambia
24		+ 0.24 + 0.14 + 0.30 + 0.30	↓ 7.5 ↑ 15 No cambia ↑ 10	+ 0.13 + 0.12 - 0.12 + 0.07

Cuadro 4.- Resumen general de los efectos a largo plazo provocados por la aplicación de luz monocromática de 589.6 nm en el 6o. ganglio abdominal sobre el ritmo circadiano ERG. Los cambios fueron medidos al cuarto día de aplicado el estímulo . (m= pendiente).

2.- Efectos a corto plazo de la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal.

En este grupo experimental, graficamos los cambios en las características del ERG, inmediatamente después de haber aplicado un estímulo de luz amarilla. La luz se aplicó directamente sobre el 6o. ganglio abdominal en cuatro horas circadianas diferentes (6, 12, 18 y 24 hc).

Analizamos el valor de la latencia, los cambios en la amplitud y la duración en la estabilización del ERG. A la hc 6, la disminución en el valor de la amplitud se presentó en forma simultánea con la aplicación del estímulo luminoso. Este valor disminuye en forma notable en algunos de nuestros experimentos, hasta en un 30 %. La disminución en el valor de la amplitud fue tan intensa que después de cinco horas no había alcanzado su valor inicial. (Fig. 11,A). A la hc 12, los efectos se presentaron aproximadamente 30 min. después de haber aplicado el estímulo luminoso. Se encontró una gran dispersión en el valor de la amplitud, con experimentos que presentaron tanto aumentos de hasta un 30%, como disminuciones de hasta un 22%. En ningún caso el valor de la amplitud se estabilizó en el valor inicial (Fig. 11,B). A la hc 18 los efectos en el valor de la amplitud, también se presentaron en forma simultánea con la aplicación del estímulo luminoso. En este grupo experimental se presentaron tanto aumentos de tan sólo un 10%, como disminuciones de un 15%. Sin embargo, después de cinco horas, el valor de la amplitud, en casi todos los experimentos, trató de estabilizarse hasta alcanzar el valor inicial (Fig. 11,C). A la hc 24, no se encontraron cambios en el valor de la amplitud, a excepción de un experimento en donde disminuye sólo un 5%. En este grupo experimental se observa una estabilización del valor de la amplitud, durante las cinco horas que duró nuestro registro (Fig. 11,D).

3.- Curvas de respuesta de fase.

Aplicamos un estímulo luminoso único de luz amarilla, a cuatro diferentes horas circadianas, y graficamos nuestros resultados al medir los cambios de fase en el ritmo circadiano ERG. Medimos los cambios de fase a las 24 horas y al cuarto día después de haber aplicado el estímulo luminoso, y construimos una curva de respuesta de fase transitoria (CRFt) y estable (CRFe), respectivamente.

La CRFt en nuestros experimentos se caracteriza por presentar un comportamiento bimodal. Existe una zona de adelantos de fase a las 12 y 18 hc, los valores promedio de los

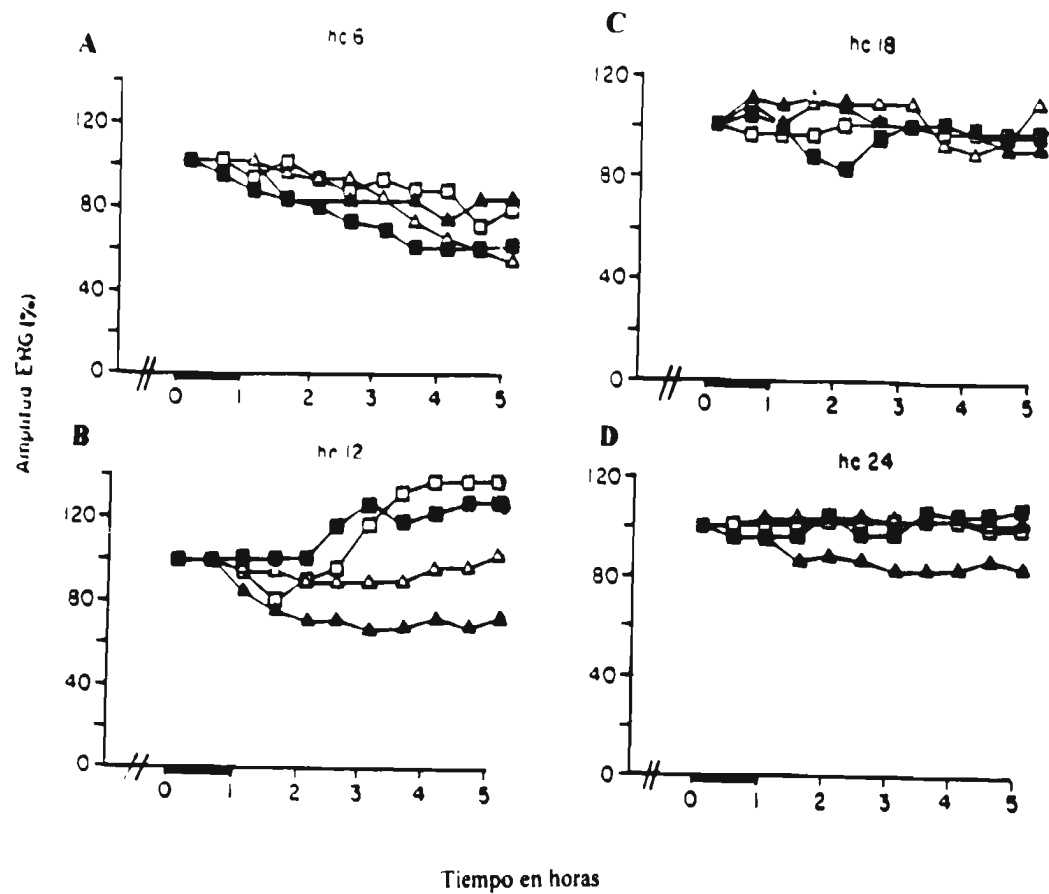


Fig. 11.- En estas cuatro gráficas se muestran los efectos a corto plazo en el valor de la amplitud del ERG, al aplicar un estímulo de luz amarilla de 589.6 nm (400 lux de intensidad y 60 min. de duración) sobre el 6o. ganglio abdominal, acuatro diferentes horas circadianas (6, 12, 18 y 24). La barra negra horizontal en el eje de las ordenadas indica el inicio y la duración del estímulo. Cada trazo representa un registro individual.

adelantos de fase para estas horas circadianas fueron de 2.86 y 2.1 hrs. respectivamente. La zona de atrasos de fase se presentó a las 6 y 24 hc, con valores promedio de 1.4 y 1.2 hrs. respectivamente. Con base en nuestros resultados, calculamos los valores del área bajo la curva de los atrasos (at:30) y de los adelantos (ad:47), obteniendo una relación at/ad de 0.62, es decir un ligero predominio para el área de los adelantos de fase. (Fig. 12)

En el caso de la CRFe, de acuerdo a nuestros experimentos, se caracteriza por presentar también un comportamiento bimodal. La zona de adelantos de fase, se presenta cuando el estímulo se aplicó a las 6 y a las 24 hc, el valor promedio de los adelantos de fase fue de 2.68 y 3.25 hrs. respectivamente. La zona de atrasos de fase se presentó a las 12 y a las 18 hc, con un valor promedio para los atrasos de fase de 3.7 y 1.73 hrs. respectivamente. Calculamos el área bajo la curva de la zona de atrasos con un valor de 48 y para la zona de los adelantos con un valor de 52. La relación at/ad fue de 0.92, es decir, con un predominio para el área de los adelantos de fase (Fig. 13).

Todos los estímulos de luz amarilla aplicados sobre el 6o. ganglio abdominal, a estas diferentes horas circadianas estudiadas, fueron capaces de provocar cambios de fase, cuya magnitud y sentido dependió del momento en el que fueron aplicados. Es importante mencionar que, aunque en algunos experimentos no se presentaron estados transitorios, si se observaron cambios de fase en el estado estable. Por ejemplo, en dos de nuestros experimentos, uno en donde el estímulo luminoso se aplicó a las 6 y otro a las 12 hc, no se presentaron estados transitorios. Sin embargo en el estado estable del ritmo, se presentaron adelantos de fase de 2.48 y 1.38 hrs. respectivamente (Cuadro 5).

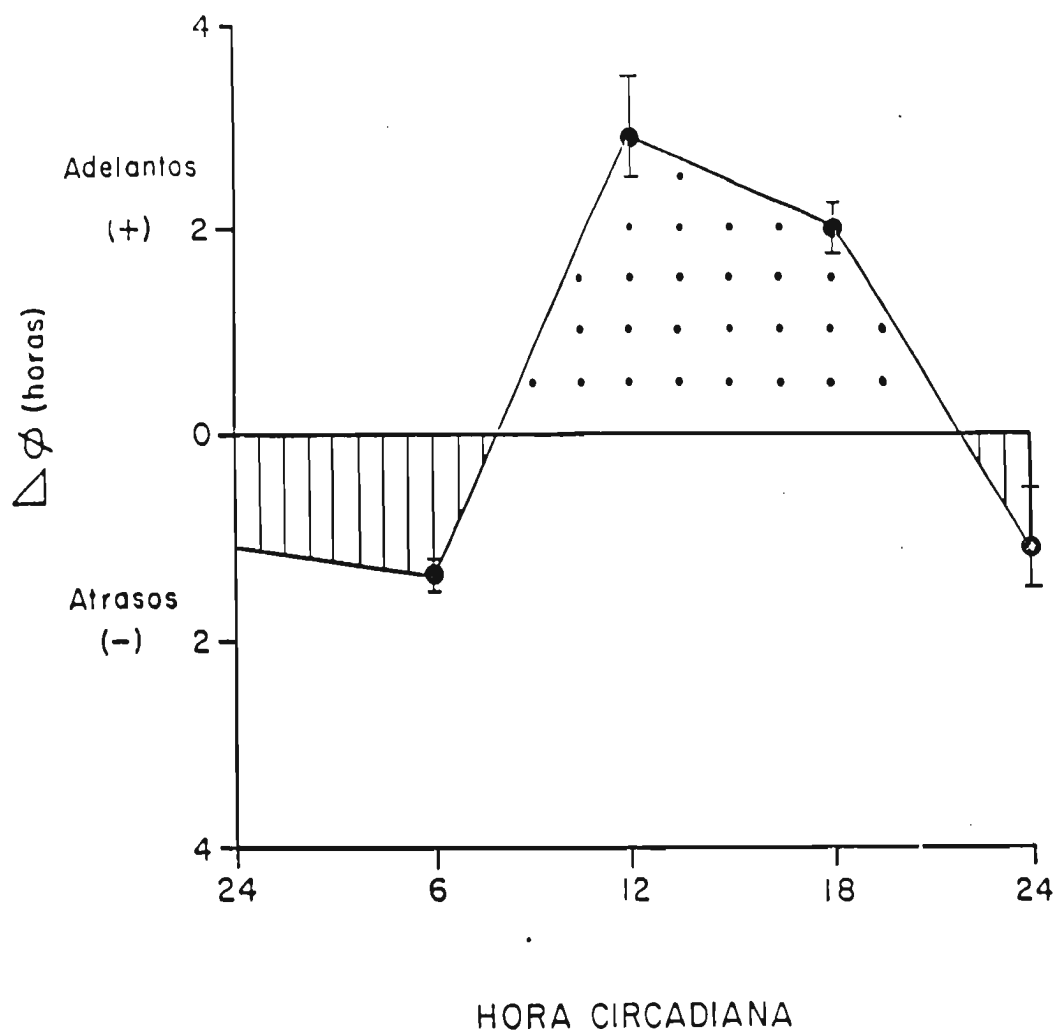


Fig. 12.- En esta gráfica se presenta la curva de respuesta de fase transitoria (CRFt) obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase , 24 horas después de aplicado el estímulo único de luz amarilla de 589.6 nm sobre el 6o. ganglio abdominal a cuatro diferentes horas circadianas. En esta gráfica se observa un comportamiento bimodal con una relación At/Ad de 0.62 (n=4).

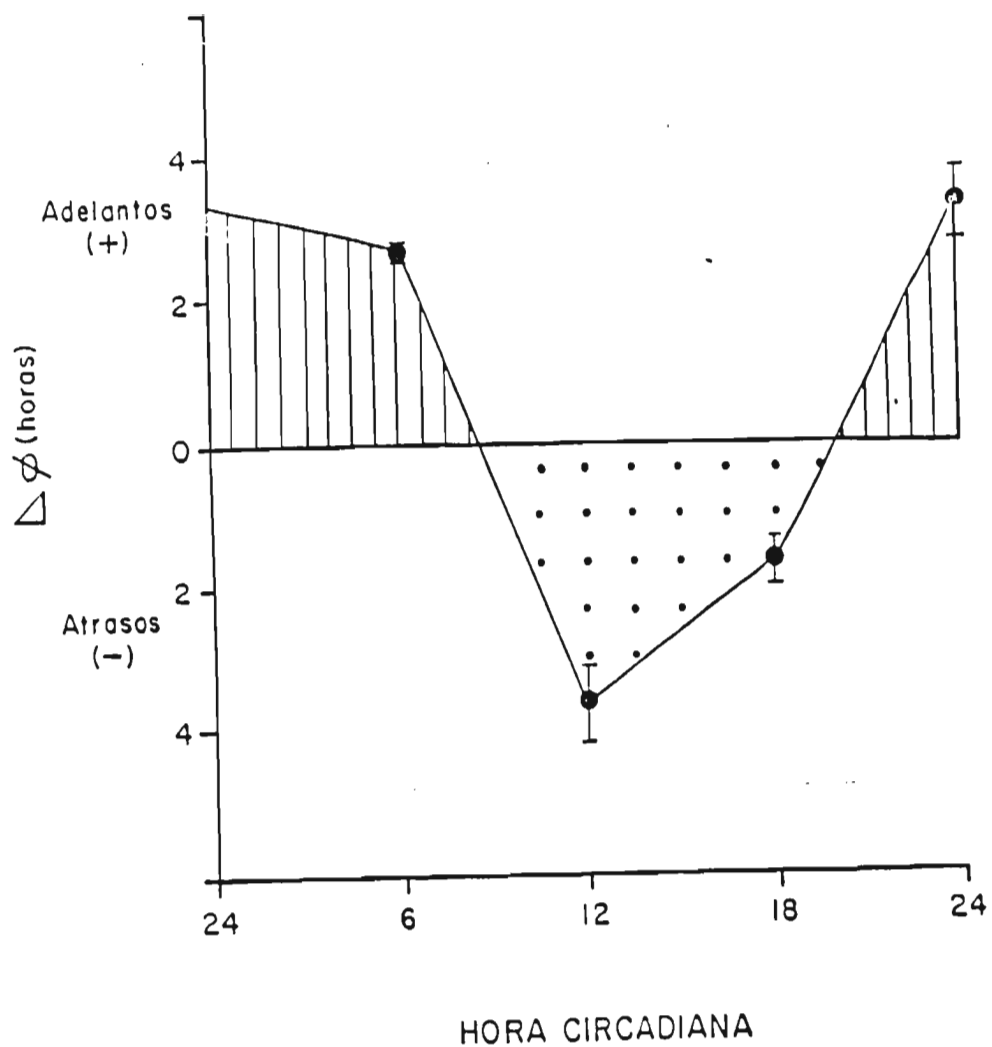


Fig. 13.- En esta gráfica se muestra la curva de respuesta de fase estable (CRFe) obtenida al graficar la magnitud de los cambios de fase provocados en el ritmo circadiano ERG al aplicar estímulos luminosos únicos de luz amarilla de 589.6 nm (60 min. de duración y 400 lux de intensidad) sobre el 6o. ganglio abdominal, a cuatro diferentes horas circadianas (6, 12, 18 y 24). La gráfica muestra un comportamiento bimodal con un ligero predominio del área de los adelantos con respecto a los atrasos, con una relación $At/Ad = 0.92$ ($n=4$).

Hora circadiana	Cambio de fase estable ($\Delta\theta$) (horas)	Cambio de fase transitorio ($\Delta\theta$) (horas)
6	+ 3.7 + 2.4 + 2.4 + 2.0	- 1.6 - 1.2 - + 0.8
12	- 3.0 - 4.8 - 6.0 - 3.6 - 1.4	+ 1.5 + 1.9 - 4.5 + 5.2 -
18	- 1.5 + 1.5 - 1.4 - 2.3	+ 0.75 + 1.8 + 0.92 + 5.0
24	+ 4.55 + 3.3 + 1.7 + 3.5	- 0.82 - 0.82 - 2.0 + 4.1

Cuadro 5.- Magnitud de los cambios de fase en el estado estable y transitorio del ritmo circadiano ERG, provocados por la aplicación de luz monocromática de 589.5 nm sobre el 6o. ganglio abdominal.

DISCUSION

Dos de los parámetros que participan de manera importante en la modulación de los ritmos circadianos, son los cambios en la intensidad y la longitud de onda de la luz ambiental. La imposición de los ciclos de luz artificial con diferentes duraciones en la fase luz-oscuridad, así como la aplicación de estímulos luminosos únicos en diferentes momentos del ciclo, son una de las mejores herramientas para analizar y evaluar algunas de las propiedades de los ritmos circadianos (Pittendrigh, 1993).

La luz es una de las señales ambientales más importantes para los sistemas circadianos y sus efectos sobre éstos han sido ampliamente estudiados, desde organismos unicelulares hasta organismos más complejos como el humano. En este sentido es importante mencionar, que en condiciones normales, el oscilador u osciladores circadianos están sincronizados por las fluctuaciones nictamerales del ambiente y es la luz, la modalidad de energía que más poderosamente influye sobre la ritmicidad y sobre aquellos procesos orientados a la adaptación del individuo a su nicho temporal. De ahí que sean los fotorreceptores y las vías entre estos y los osciladores, los sistemas aferentes mejor estudiados hasta ahora. Por ejemplo, en algunos mamíferos como la rata, son los fotorreceptores retinianos, los transductores de la información sobre la iluminación ambiental y en varias especies, se ha logrado establecer, que la enucleación de los globos oculares desacopla la ritmicidad endógena con respecto al nictámero (Moore, 1995). En invertebrados, en tanto que el ritmo locomotor de la cucaracha es modulado mediante fotorreceptores retinianos (Nishiitsutsuji-Uwo y Pittendrigh, 1967), en otros insectos como la polilla, el ritmo de eclosión depende de fotorreceptores extrarretinianos (Truman, 1970) y en moluscos, aún no está del todo definida la participación de la retina en la modulación de la ritmicidad en una gran cantidad de funciones biológicas (Block y cols., 1995).

En crustáceos, el ritmo de la locomoción (Page y Larimer, 1972; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987), como el de migración del pigmento retiniano distal (Aréchiga, 1992) parecen estar bajo la influencia de receptores extrarretinianos. Sabemos que en el caso particular del acocil, está bien descrito el papel que desempeña el 6o. ganglio abdominal como fotorreceptor extrarretiniano, desde los trabajos de Prosser (1934), quién encontró que la iluminación del 6o. ganglio abdominal del acocil *Procambarus clarkii*, producía cambios en el patrón de descarga de los potenciales de acción registrados en el tejido conectivo. Trabajos posteriores demostraron la existencia de un par de neuronas fotorreceptoras en este mismo ganglio (Kennedy, 1963; Kondoh y Hisada, 1986) cuyas características espectrales sugieren que el fotopigmento involucrado en la

la intensidad de la luz se aumenta. El ajuste específico del valor del periodo a los diferentes niveles de intensidad han sido atribuidos a las características de respuesta de fase del marcapaso del organismo en estudio (velocidad de respuesta) (Daan y Pittendrigh, 1976a). A este respecto se ha observado que en *Gonyaulax*, el valor del periodo en el ritmo de bioluminiscencia puede alargarse o acortarse, al aumentar la intensidad de la luz, así como también dependiendo de las características espectrales de la luz. Incrementando la intensidad de la luz azul o la luz blanca (<400 nm) se acorta el valor del periodo, mientras que el valor del periodo se alarga con intensidades altas de luz roja o amarilla (Roenneberg y Hastings, 1991). En el acocil *Procambarus*, el valor del periodo del ritmo ERG en oscilación libre depende del estado fisiológico del organismo, de las condiciones ambientales (intensidad de la luz, temperatura), de la historia previa de iluminación y podríamos incluir de la composición espectral de la luz, ya que por ejemplo el valor del periodo obtenido con luz roja aplicada de manera continua sobre los ojos es mayor que el encontrado cuando se aplica luz azul (Inclán-Rubio, 1988). Hubiera sido interesante trabajar en nuestros experimentos con diferentes intensidades de luz amarilla y observar si en esta especie de acocil, ocurre algo similar a lo reportado para *Gonyaulax*, aunque este es un organismo unicelular. De igual manera será necesario observar lo que ocurre al ritmo ERG, cuando se aplique diferentes longitudes de onda sobre sistemas fotorreceptores extrarretinianos y conocer su capacidad sincronizadora, sobre este ritmo. Así como la luz ambiental participa en la modulación del valor del periodo en la ritmicidad circadiana, también se ha demostrado la participación de factores genéticos. Por ejemplo en mutantes de *Drosophila melanogaster*, se ha visto la existencia de un gen denominado *per*, que a través de la síntesis de la proteína del mismo nombre modula el valor de la longitud del τ (Sehgal y cols., 1995).

Con respecto a la relación α/σ , observamos que éste parámetro se modificó para todas las horas circadianas estudiadas. En general podemos hablar de un aumento en la duración de la fase de actividad con relación al reposo (Fig. 8). Sin embargo en 2 experimentos, uno en donde el estímulo se aplicó a las 6 y otro a las 18 hc, mostraron el efecto inverso (cuadro 1). El desconocimiento de los procesos generadores de la relación α/σ nos impiden que se expliquen con claridad los hechos anteriormente descritos.

Con relación al nivel de oscilación, que es un parámetro que también se modificó en forma importante por la aplicación de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal, observamos cambios que se presentaron cuando los estímulos se aplicaron a las 6 y las 24 hc, en tanto que no se presentaron cambios en este parámetro, cuando los estímulos se aplicaron a las 12 y 18 hc (cuadro 2). Creemos que estos cambios son debido a la sensibilidad circadiana del sistema, ya que estos animales son de hábitos nocturnos, la respuesta a estímulos sensoriales se encuentra

transducción de la señal es una clase de rodopsina, muy similar a la que media la fotorrecepción en el ojo de este tipo de acociles (Bruno y Kennedy, 1962), con una sensibilidad espectral máxima situada en la longitud de onda para el color rojo (Block y cols., 1974).

El ERG que obtuvimos del ojo compuesto del acocil *Procambarus*, presenta características circadianas de un animal nocturno, con la presencia de una acrofase durante la noche y otra mínima durante el día (figs. 7, 8, 9 y 10). Estos resultados se asemejan a los reportados por otros autores (Aréchiga y Fuentes-Pardo, 1970; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1981). De acuerdo a nuestros objetivos, en los cuales nos propusimos estudiar la participación de los fotorreceptores caudales en la modulación del ritmo ERG por la aplicación de estímulos de luz amarilla, observamos que cuando ésta se aplica sobre el 6o. ganglio abdominal se presentan modificaciones sobre todos los parámetros que conforman el ritmo ERG. Así y dependiendo de la hora circadiana en la que realizamos nuestros experimentos, el análisis de los datos demuestra cambios muy interesantes que detallaremos a continuación.

Si bien es cierto que nuestros experimentos no explican por sí mismo el fenómeno conocido como sincronización, apoyan la hipótesis de la existencia y participación de elementos fotorreceptores extrarretinianos que pueden participar en la modulación del ritmo circadiano ERG. Estos efectos sobre las modificaciones del ritmo ante la aplicación de un estímulo luminoso único habían sido observados anteriormente como efectos propios de la capacidad sincronizante del estímulo (Pittendrigh y Daan, 1976a).

En nuestros resultados, el valor del periodo no se modificó, aunque es importante mencionar que los acociles eran mantenidos, bajo fotoperiodo 12/12 y con temperatura constante (<19°C). Sabemos que entre los factores ambientales que modifican el valor del periodo (τ), destaca su independencia a las condiciones de iluminación ambiental. En forma general los principales efectos se resumen en las "reglas de Aschoff" (Aschoff, 1984) y de acuerdo con Pittendrigh (1993), cuando un organismo se encuentra bajo condiciones de sincronización como lo es con un fotoperiodo 12/12, su periodo en oscilación espontánea, será igual a la duración de periodo completo manejado, es decir 24 horas, como lo fue el caso de nuestros experimentos. (cuadro 2; fig. 7). Este fenómeno provee a los sistemas biológicos de un mecanismo por el cual estos son capaces de reconocer la hora local, propiedad sin la cual, esto no tendría relevancia adaptativa.

En muchos organismos, la longitud del valor del periodo (τ) bajo condiciones constantes, depende de la intensidad de la luz (Aschoff, 1979), acortándolo o alargándolo cuando

aumentada durante las horas de la noche, es decir alrededor de las 24 horas, mientras que a las horas del día, la actividad se encuentra disminuida, como ocurre en nuestros resultados (*fig. 9*). Sin embargo en vista de que una gran cantidad de mecanismos responsables de la generación y manutención de los ritmos circadianos aún no se conocen, sólo nos limitamos a observar algunas características y propiedades consideradas propias del oscilador u osciladores responsables.

Otra de las características que se evaluaron en el ritmo ERG al estimular el 6o. ganglio abdominal con esta longitud de onda, tanto en registros a largo (*fig. 10*), como a corto plazo (*fig. 11 y cuadro 3*), fue el valor de la amplitud. Se pudo comprobar que en ambos grupos experimentales, hay una disminución importante en el valor de la amplitud, la que sigue un curso temporal diferente al que se observa cuando la aplicación de la luz se hace sobre los fotorreceptores visuales (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987), ya que en este caso no sólo el valor de la disminución es mayor, sino que requiere de una latencia menor para manifestarse. Estas diferencias parecerían triviales si tomamos en cuenta el sustrato anatómico en el que se basa cada una de las interacciones en este efecto. La estimulación luminosa del sistema visual desencadena un reflejo neuroendócrino que se inicia desde los fotorreceptores visuales hacia el ganglio óptico y de ahí hasta un centro integrador que puede ser el ganglio cerebroide (Fuentes-Pardo y García, 1979; Serrato y cols., 1996). En tanto que la estimulación de los fotorreceptores caudales probablemente provocaría la activación de una vía aferente mucho más larga desde estos fotorreceptores, hasta hacer sinapsis en el ganglio cerebroide (Hermann, 1972; Inclán-Rubio, 1991). Desde este sitio se activaría el sistema neuroendócrino, con las consecuencias efectoras que esto implica, es decir, la activación de la migración de los pigmentos retinianos accesorios hacia una posición de adaptación a la luz, por la hormona dispersora del pigmento distal (HDPD), almacenada en el sistema órgano x-glándula sinusal (Aréchiga, 1993; Fanjul-Moles y cols., 1991). Finalmente la consecuente disminución en la sensibilidad a la luz de los fotorreceptores visuales, que se manifiesta por una reducción en el valor de la amplitud del ERG, (Fuentes-Pardo y García, 1979) sea en los fotorreceptores visuales o en los caudales (Inclán-Rubio, 1991). Como lo que ocurrió en nuestros resultados en el grupo experimental a largo plazo (*Fig. 10 y cuadro 3*).

Debido a que en nuestros resultados a corto plazo, observamos que el valor de la amplitud del ERG disminuía a las 6 y 24 hc, pero tenían dispersion de los valores, es decir, tanto aumentos como disminuciones a las 12 y 18 hc (*fig. 11*). Es importante analizar como se lleva acabo la integración de la señal luminosa hasta el ganglio cerebroide cuando la luz llega através de los fotorreceptores visuales y lo que se conoce acerca del mecanismo de transducción de la señal luminosa a través del fotorreceptor caudal. En la respuesta a la intensidad luminosa a través del

nervio óptico del acocil *Procambarus clarkii*, participan 14 neuronas visuales, conocidas como fibras de acción sostenida. Estas neuronas tienen una frecuencia de descarga de manera fásica-tónica, proporcional a la intensidad luminosa y con una duración igual a la del estímulo (Wiersma y Yamaguchi, 1966). Cada una de las 14 neuronas del grupo pueden ser diferenciadas por su campo sensorial definido en la retina. Su soma está localizada en la médula interna (Kirk y cols., 1982) y sus axones viajan a través del nervio óptico hacia el ganglio cerebroide, donde establecen conexiones con interneuronas visuales descendentes (Wood y Glantz, 1980) y con interneuronas locales (Okada y Yamaguchi, 1988).

Serrato y cols. (1996) estudiaron la vía visual del acocil *Procambarus* con estímulos de luz monocromática y registraron la actividad eléctrica en tres niveles: en el ojo (ERG), en el trayecto de la vía visual entre la médula externa y la médula interna, y en el lóbulo óptico del ganglio cerebroide. Sus resultados sugieren que el procesamiento de las señales visuales se lleva a cabo en diferentes circuitos dentro del ganglio cerebroide. Esto iría de acuerdo con lo ya sugerido por Bullock y Horridge, desde 1965, donde se menciona que la estimulación de receptores sensoriales periféricos provoca cambios en la actividad eléctrica y esta actividad llega hacia el ganglio cerebroide a través de vías específicas, no determinadas hasta ahora. Los estudios de Serrato y cols. también mostraron que la morfología del ERG dependía de la longitud de onda aplicada, por ejemplo, estímulos de longitud de onda corta (475 nm) así como de onda larga (675 nm) manifestaban ERGs con amplitud pequeña y con latencias largas. En tanto que, estímulos de longitud de onda intermedia (575 nm) provocaban ERGs con amplitud mayor y con latencias cortas. Estos estímulos luminosos de diferente longitud de onda son capaces de estimular diferentes combinaciones de fotorreceptores que generan una actividad eléctrica caracterizada como “trenes de espigas”. Esta característica fue utilizada para localizar la región a lo largo de la vía visual donde se pudiera llevar a cabo la integración, reportando que comienza en el tallo ocular, a nivel entre la médula externa y la médula interna.

Quizás uno de los hallazgos más significativos de estos experimentos es que el número de “espigas” y el intervalo de presentación entre ellas, no es el mismo para cada longitud de onda aplicada. Sus resultados sugieren que las espigas generadas por diferente longitud de onda viajan por circuitos neuronales diferentes hacia el ganglio cerebroide, apoyando la hipótesis de la “línea marcada”. Otra posibilidad sugerida por los autores es que exista una mayor sensibilidad para unas longitudes de onda que para otras, para el comienzo de la actividad eléctrica. La posibilidad de que el sistema nervioso de los crustáceos analice señales sensoriales por un mecanismo como lo es la “línea marcada” puede tener sus bases anatómicas en el pequeño número de células dedicadas a estas tareas. El acocil tiene cerca de 70,000 neuronas en el ganglio

cerebroide, de esta manera es posible que esta hipótesis sea la mejor utilizada, por simple que pareciera.

En el caso de nuestros experimentos, es posible sugerir que las señales sensoriales luminosas captadas por el 6o. ganglio abdominal utilicen esta hipótesis para llevar la información hacia el ganglio cerebroide y de ahí a los efectores correspondientes, como lo serían los pigmentos retinianos accesorios. Sabemos que las neuronas localizadas en el 6o. ganglio abdominal responden a luz con un incremento en la frecuencia de disparo (Wilkens y Larimer, 1972; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987). Aunque se conoce poco acerca del mecanismo de transducción de la luz a nivel molecular en este tipo de receptores, trabajos llevados a cabo por Kruszewska y Larimer (1993) apoyan la existencia de un sistema de segundos mensajeros implicados en éste fenómeno. Estos estudios se fundamentan en el hecho de que la respuesta a la luz en el fotorreceptor extrarretiniano del acocil *Procambarus*, se caracteriza por presentar una gran latencia, aumento en la frecuencia de descarga y una gran amplificación de la respuesta. En estos experimentos se reporta que la inyección intracelular de diversos mensajeros conocidos, como el IP₃, Ca⁺ y GTP, muestran un aumento en la actividad celular, similar a las respuestas que se originan cuando se aplican estímulos luminosos. Recientemente, Golombeck y Ralph (1995) proponen a una proteína quinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina (CaM quinasa II) como una molécula que puede participar en la transducción de señales en respuesta a estímulos luminosos, por lo menos en el núcleo supraquiasmático de mamíferos. Quizás esta molécula también se encuentre en el fotorreceptor caudal del acocil, participando en la transducción de la señal.

Una descripción morfológica de los fotorreceptores caudales ha sido posible gracias a las técnicas de tinción para células individuales, por ejemplo, el amarillo fluorescente. En realidad, las arborizaciones dendríticas de estos fotorreceptores parecen familiares y la estructura de éstas células ha sido reportada repetidamente y en diferentes contextos de investigación de las interneuronas del 6o. ganglio abdominal (Reicher y cols., 1983). Por su parte Nagayama y Newland (1993), marcaron las arborizaciones de los fotorreceptores caudales a todo lo largo de la cadena ganglionar abdominal, de acuerdo a la respuesta eléctrica atribuida a los fotorreceptores. Las arborizaciones dendríticas son pequeñas en el ganglio abdominal torácico, pero más extensas en los ganglios sub y supraesofágicos. De esta manera, estos fotorreceptores tienen una secuencia de 12 dendritas espaciadas regularmente.

Edwards (1984) encontró que la iluminación del telson del acocil produce flexión del abdomen seguido de un inicio del reflejo de huida. Además la estimulación intracelular de estos

fotorreceptores induce la excitación de las neuronas que participan en la actividad locomotora, en específico en el caminar (Simon y Edwards, 1990). Se ha visto que cuando el 6o. ganglio es iluminado, la respuesta de las motoneuronas es similar a la que es producida por estimulación de las neuronas que inician el caminar hacia atrás (Kovac, 1974). Sin embargo, la latencia para estos efectores es más lenta en animales imposibilitados para captar señales luminosas en retinas cubiertas (Edwards, 1984), apoyando la idea de que los fotorreceptores retinianos y extrarretinianos participan en la respuesta de retirada (Fernández de Miguel y Aréchiga, 1992).

El significado adaptativo de los fotorreceptores abdominales aún se desconoce. Se ha propuesto que tal vez el animal utiliza este sistema sensorial como un dispositivo de alarma, de alguna manera se pone en alerta cuando la cola está expuesta ante estos estímulos, principalmente de tipo lumínico. Sin embargo la respuesta bajo circunstancias naturales es mucho más compleja que la estudiada bajo condiciones de laboratorio experimental y por este motivo se ha estudiado el papel que desempeñan los fotorreceptores caudales en el comportamiento del animal, por video-monitoreo, el cual es analizado por técnicas de computación asistida. En estos estudios se menciona la existencia de una comunicación o conexión directa con las vías nerviosas que controlan la actividad locomotora. Se ha reportado que las vías eferentes de los fotorreceptores caudales, que provienen del ganglio cerebroide pueden tener otros efectos conductuales, tales como los movimientos coordinados de las antenas, así como también cambios en los movimientos posturales del abdomen (Tautz, 1987). En *Procambarus clarkii*, los animales en reposo, adoptan una posición inclinada, esta posición es casi insensible a cualquier tipo de estimulación visual. Estas consideraciones de mecanismos funcionales implicados en la mecanosensibilidad incluyen la sugerencia de que el sistema visual y el caudal trabajan en conjunto (Wilkins, 1988).

Por otra parte, en nuestros resultados encontramos que las horas circadianas en las que el sistema ERG fue más sensible, fueron a las 6 y las 12 hc (Cuadro 4, fig. 11). Encontramos que la aplicación de la luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal es capaz de provocar una disminución en el valor de la amplitud del ERG y la intensidad de este efecto depende de la hora del día en que se aplicó el estímulo. Es muy interesante hacer notar que el valor de las latencias también se modifica dependiendo la hora del día, siendo estas más cortas a la hc 6 y 18 que a las 12 y 24. Es importante mencionar que la duración de la estabilización después de aplicado el estímulo, igualmente presentó cambios con respecto a la hora del día. Observe en la figura 11, que mientras los experimentos de la hc 24 se estabilizan en aproximadamente una hora, para las otras hc estudiadas (6,12 y 18) esto se lleva a cabo inclusive cuatro horas después, como por ejemplo a la hc 18, e inclusive en los experimentos de la hc 12 estos no se llegan a estabilizar durante el tiempo que duró el registro. Es probable que estos cambios sean debidos a la

sensibilidad circadiana de por lo menos tres factores fisiológicos que participan en la modulación del ritmo ERG. El primero de ellos es la movilización del pigmento retiniano distal, debido a la acción de la HDPD, liberada en forma rítmica desde la glándula sinusal. El segundo factor fisiológico es la movilización del pigmento retiniano proximal, el cual muestra un ritmo circadiano de migración independiente de cualquier influencia hormonal y finalmente la sensibilidad a la luz del propio receptor, que se presenta en forma independiente de la presencia de los pigmentos retinianos accesorios y que también varía en forma circadiana. De la interrelación de estos tres factores depende la amplitud de las variaciones circadianas de la respuesta a la luz por parte de los fotorreceptores visuales. Es posible que la aplicación sobre el 6o. ganglio abdominal de la luz amarilla de 589.6 nm que utilizamos en nuestros experimentos, provoque la activación de la interneuronas fotosensibles en este ganglio estimulando una vía aferente, la cual hace sinapsis con el ganglio cerebroide. Esta activación desencadena un reflejo neuroendocrino que libera a la HDPD.

Así como lo han reportado otros autores (Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987; Wilkens, 1988), la frecuencia de disparo de los fotorreceptores caudales, también presenta un patrón circadiano y al mismo tiempo provoca una disminución en el valor de la amplitud del ERG. Esta disminución es más pronunciada durante las horas de la noche, que de las del día y apoyan la idea de que el 6o. ganglio es un oscilador capaz de propiciar o modular la sincronización por luz monocromática del ritmo circadiano ERG. También Inclán Rubio y Fuentes-Pardo (1987) demostraron la existencia de la comunicación funcional entre estos dos sistemas de fotorreceptores, al aplicar luz blanca sobre el 6o. ganglio abdominal y evaluar los cambios en el tamaño de la pseudopupila en el acocil *Procambarus*, observaron que la movilización de los pigmentos retinianos accesorios, dependía no sólo de la entrada de luz a través de los ojos, sino también de la entrada de señales luminosas por los fotorreceptores caudales del 6o. ganglio abdominal. Además también analizaron los cambios en el valor de la amplitud del ERG, como en el caso de nuestros experimentos. Las autoras reportan que la participación del 6o. ganglio abdominal en los cambios de la posición de los pigmentos retinianos accesorios es mayor durante la noche que durante el día. Sin embargo, en nuestros experimentos encontramos que esta sensibilidad cambia para la luz amarilla (589.6 nm), reportando mayor sensibilidad para las 12 y 18 hc. Es posible que los cambios de amplitud sobre el ERG que provoca la estimulación del 6o. GA se logre teniendo como efectores finales a los pigmentos retinianos accesorios (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987). Probablemente la señal luminosa que transduce el 6o. ganglio va primero por la cadena ganglionar abdominal y después por la cadena torácica, para integrarse en el ganglio cerebroide. De aquí las señales nerviosas modifican el estado funcional de la glándula sinusal y así cambia la posición de los pigmentos retinianos accesorios. También consideramos la participación

de la HDPD en la movilización de los pigmentos hacia una posición de adaptación a la luz y es factible proponer que la descarga de los fotorreceptores caudales por la luz amarilla, implique la activación de algunas regiones específicas del ganglio cerebroide, las cuales están relacionadas tanto en la síntesis como en la liberación de la HDPD. La estructura implicada en este proceso es también la glándula sinusal, la cual contiene axones neurosecretorios que vienen del ganglio óptico (Andrew y cols., 1978) y probablemente del ganglio cerebroide (Aréchiga, 1992).

Las vías involucradas en esta modulación se desconocen. En roedores por ejemplo, se ha descrito la conexión entre la retina y el núcleo supraquiasmático (Moore, 1995), pero en ningún otro sistema se ha identificado la vía específica entre los fotorreceptores y el oscilador u osciladores. Las vías nerviosas mediante las cuales el oscilador impone su ritmo a otras estructuras, ha sido motivo de muchos estudios. En los vertebrados, la ritmicidad en los órganos blanco del eje hipotálamo-hipófisis, no deja lugar a duda sobre la existencia de una etapa hormonal de acoplamiento entre el oscilador y los efectores. Lo mismo puede afirmarse acerca de un gran número de órganos en invertebrados, cuya única vía de modulación es humoral (Aréchiga y cols., 1985; Aréchiga, 1993). El verdadero problema, reside en aquellos niveles de acoplamiento, en los que el oscilador recibe influencias tanto por vía humoral, como por conexiones axónicas, y ello sucede básicamente en los ritmos que afectan a la actividad del sistema nervioso. A este respecto, la información existente es muy escasa.

En invertebrados, la vía hormonal ha sido confirmada en el caso del ritmo de eclosión de la polilla (Truman, 1970), pero es dudosa en el ritmo locomotor de la cucaracha (Brady, 1974) y en la lombriz de tierra (Bennet, 1970). Este último autor proporcionó datos sugerentes de que la ritmicidad se transmite por vía puramente axónica. En crustáceos, Kelmholz, desde 1975, menciona que el material sintetizado por el OX es transportado intraaxonalmente hacia la glándula sinusal para su posterior secreción. Además en acósciles desde los receptores sensoriales hasta las motoneuronas, manifiestan una ritmicidad en fase a lo largo del ciclo de 24 horas (Aréchiga y Mena, 1975; Aréchiga, 1993), lo cual sugiere al ganglio cerebroide como un agente sincronizador común.

Sabemos que la curva de respuesta de fase (CRF) refleja el estado de los osciladores que regulan un ritmo circadiano (Enright, 1965). Es importante conocer de que manera se establecen relaciones apropiadas en un sistema de osciladores múltiples, ya que es de este acoplamiento de lo que dependerán las características de un sistema circadiano. La existencia de sistemas de osciladores múltiples que participan en el control de los ritmos circadianos, han sido propuestos en vertebrados e invertebrados (Binkley, 1993). La sincronización por luz se ha demostrado para organismos íntegros

y para organismos aislados (Menaker y Wisner, 1984), obteniéndose en algunos casos la CRFe correspondiente.

Es importante mencionar que se han construido CRF para estímulos de luz blanca o luz monocromática aplicada sobre los ojos, pero no aplicada sobre los fotorreceptores caudales. Estas CRF muestran características diferentes entre cada una de ellas. Por ejemplo Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal (1983) obtuvieron la CRFe para estímulos de luz blanca (200 lux de intensidad y 15 min. de duración) sobre el ritmo circadiano ERG en el acocil *Procambarus bouvierii*, reportaron que la CRFe resultante es unimodal con las siguientes características: a) El día subjetivo (0-12 hc) muestra la mayor sensibilidad a la luz, en tanto que en la noche subjetiva (12-24) la sensibilidad es menor; b) Los atrasos de fase se presentaron cuando los estímulos de luz blanca se aplicaron al final de la noche subjetiva y en la primera mitad del día subjetivo; c) Los adelantos de fase se presentaron cuando los estímulos son aplicados en la segunda mitad del día subjetivo y, d) Hay predominio de la zona de adelantos (Ad) sobre la zona de atrasos (At), con una relación At/Ad de 0.635.

Inclán-Rubio (1991), estudió la capacidad que tienen los estímulos únicos de luz monocromática, aplicados sobre los fotorreceptores visuales del acocil *Procambarus*, para provocar cambios de fase en el ritmo circadiano ERG a diferentes horas circadianas, construyendo la CRFe y la CRFt para cada longitud de onda. Sus resultados muestran que la CRFe obtenida con λ de 465 nm y 565 nm, provocan fundamentalmente adelantos. Sin embargo, para la luz azul (465nm) el máximo cambio de fase ocurre durante la noche subjetiva (13-24 hc), en tanto que para la luz de color verde, ocurre durante el día subjetivo (01-12 hc). La luz de 630 nm provoca fundamentalmente atrasos. Las funciones de sensibilidad espectral encontradas en este estudio al utilizar la técnica electrorretinográfica correspondieron a la presencia de dos fotopigmentos: la rodopsina y la porfirropsina. Las respuestas situadas en λ de 570 y 440 nm se deben a la rodopsina (Wald, 1968; Kong y Goldsmith, 1977), en tanto que la porfirropsina permite absorber λ mayores a 600 nm por tener al 3-dehidroretinal como cromóforo (Susuki y cols., 1985). Sus resultados mostraron dos grupos de fotorreceptores funcionales que responden selectivamente a dos longitudes de onda diferentes y que en la mayoría de los casos provocan cambios de fase con signos opuestos, mientras que la luz roja provoca atrasos, cuando se aplica a las 2, 6, 12 y 20 hc, a esas mismas horas circadianas (a excepción de la hora circadiana 20) la luz verde genera adelantos.

Los cambios de fase provocados en los diferentes momentos circadianos, nos permitieron construir la CRFe obtenida por estímulos únicos de luz amarilla aplicada sobre el 6o. GA, generalizando lo siguiente:

a) Es bimodal.

- b) Los estímulos aplicados a las 6 y 24 hc provocan adelantos de fase.
- c) Los estímulos aplicados a las 12 y 18 hc provocan sólo atrasos de fase.
- d) En la CRF el área de los adelantos de fase (Ad) es mayor (52) con relación al área de los atrasos (46). La relación At/Ad fue de 0.92.

En nuestros resultados la CRFe presenta una zona de adelantos y una zona de atrasos. De la observación de las CRF obtenidas en diversas especies, desde los organismos unicelulares hasta el hombre, resulta aparente que salvo pequeñas diferencias, todas presentan el mismo patrón común (Pittendrigh, 1993). Esta preservación de la CRF a lo largo de la filogenia sugiere, que el origen de los osciladores circadianos fue un evento muy temprano en la evolución y se ha mantenido a pesar de la diversificación en otros fenómenos elementales. El encontrar una CRFe con características diferentes a las reportadas para las CRFe, cuando los estímulos luminosos se aplican en el sistema visual, probablemente implique la participación de múltiples osciladores localizados a todo lo largo de la cadena ganglionar, en la modulación del ritmo circadiano ERG. La captación de la luz amarilla por los fotorreceptores caudales y las modificaciones del ritmo ERG que pueden resumirse en la CRFe y la CRFt apoyan la hipótesis de la participación del 6o. GA en la sincronización de éste ritmo, tal y como lo han descrito otros autores (Wilkins, 1988; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987).

De acuerdo con Daan y Pittendrigh (1976b) la estabilidad de la relación de fase puede ser explicada por el modelo de sincronización no paramétrica (en este tipo de sincronización sólo se afecta la fase del oscilador en las transiciones del inicio y fin del estímulo). Donde dicha estabilidad depende de la diferencia entre τ y T, de la variación entre τ y la forma de la CRF, así como la exposición del oscilador a las transiciones del ciclo luz/oscuridad que son detectadas como pulsos discretos de luz. En primer término, de acuerdo a este modelo, las diferencias entre τ y T, es decir la naturaleza "circa" del oscilador, no es el resultado de una aproximación tolerable en la adaptación del organismo a la situación ambiental, sino el resultado de una estrategia encaminada a favorecer la estabilidad de la relación de fase. Esta hipótesis explicaría la observación de que la variación en τ de ciclos sucesivos disminuye conforme τ se acerca a 24 horas. Por otra parte, la correspondencia entre τ y la forma de la CRF y en particular la relación At/Ad, explicaría en forma adecuada las "reglas de Aschoff" (1984), ya que de acuerdo a Pittendrigh (1993), la asimetría en la CRF determinaría cual transición del ciclo luz/oscuridad favorece la estabilidad de la relación de fase y por lo tanto, si el comportamiento del organismo es diurno o nocturno.

Tal y como ha sido observado por otros autores cuando se desorganiza la actividad circadiana por aplicación de luz blanca (Pittendrigh y Bruce, 1957; Enright, 1970) nuestros registros muestran que después de la aplicación del estímulo de luz amarilla sobre el 6o. GA, en el ritmo ERG,

se presentó un estado transitorio, en donde la duración del valor del periodo y la amplitud, se desorganizan por completo. Las características de esta etapa, dependen de manera fundamental del momento circadiano en el que se aplicó el estímulo, pero también de la intensidad y del tipo de estímulo (longitud de onda, estímulo químico o alimentario, etc.). A este respecto los estudios realizados por Hoffman (citado por Pittendrigh, 1993), mostraron que cuando ocurre un cambio súbito en la fase del estímulo sincronizador, particularmente el ciclo luz-oscuridad, la fase del ritmo endógeno se ajusta progresivamente, perdiéndose así la relación de la fase estable con el ciclo ambiental, hasta que se reestablece una relación de fase constante entre ambos fenómenos. Durante los ciclos en los cuales ocurre el ajuste de fases, el periodo del ritmo cambia en forma breve, a estos ciclos los llamo Hoffman transitorios. De acuerdo con este autor los atrasos y los adelantos de fase del sincronizador menores de 9 horas inducen transitorios cuyo cambio de fase sigue al del sincronizador (retrasos y adelantos, respectivamente). Los cambios de fase del sincronizador mayores a 9 horas, pueden inducir transitorios cuyos cambios de fase sean de dirección opuesta. Es decir, que ante un atraso del sincronizador de 11 horas, los ciclos transitorios se reajustan mediante avances de fase de 13 horas. El mayor determinante para que este último fenómeno ocurra parece ser la longitud del periodo en oscilación espontánea, de tal forma que individuos con periodo corto, se ajustan por transitorios en avance, mientras que sujetos con periodo largo se ajustan por retrasos. Finalmente, el número de transitorios necesarios para alcanzar una relación de fase constante entre el ritmo manifiesto y el sincronizador, es decir la "velocidad aparente de resincronización", depende de la dirección de los ajustes de fase (si son avances o retrasos), así como también de si el periodo endógeno del oscilador es mayor o menor de 24 horas. De tal forma que las aves diurnas se resincronizan más rápidamente por avances de fase, mientras que los mamíferos nocturnos como la rata lo hacen más rápidamente por retrasos de fase. En invertebrados esto no se ha comprobado y nuestros resultados difieren de lo reportado por Hoffman, ya que aún cuando los cambios de fase son menores de 9 horas y presentan en la mayoría de los casos transitorios (*cuadro 5*), el reajuste de fases no se lleva a cabo como lo menciona este autor. De hecho nosotros construimos la CRFt (*Fig. 12 y cuadro 5*), en la cual se pueden observar las siguientes características:

- a) Estímulos que provocan un cambio de fase transitorio considerable en el primer día (de 1.7 a 4.55 horas), pero un cambio muy pequeño en la fase estable, como a la hc 24.
 - b) Estímulos que provocaron un cambio de fase transitorio con sentido opuesto (atrasos-adelantos o adelantos-atrasos) que el cambio de fase estable (este hecho lo encontramos para todas las hc estudiadas).
- Estos resultados muestran una CRFt con una "imagen en espejo" de la CRFe (*Fig. 13*), donde se presentan adelantos de fase a las 12 y 18 hc y atrasos de fase a las 6 y 24 hc.
- c) El área de los adelantos de fase (Ad) es mayor que la de atrasos, con una relación At/Ad de 0.62.

Como se puede observar en nuestros resultados, para esta CRFt, la mayor sensibilidad se encuentra a las 12 y 18 hc, con cambios de fase (adelantos) que van de 0.92 a 5 horas. Nuestros resultados muestran un comportamiento diferente a las observaciones realizadas por otros autores cuando utilizaron luz blanca como sincronizador (Pittendrigh y Bruce, 1957). Los mismos autores han propuesto que los ciclos transitorios indican que la oscilación es el resultado del trabajo de cuando menos dos osciladores que normalmente están acoplados entre sí, pero que son brevemente perturbados por el estímulo luminoso. De acuerdo a nuestras observaciones es posible sugerir que los cambios de fase transitorios dependen del momento circadiano de aplicación del estímulo, de la longitud de onda utilizada (*fig. 12*) y reflejan la desorganización de múltiples osciladores, probablemente localizados a todo lo largo de las estructuras donde se integra la sincronización. Es importante señalar que en nuestro laboratorio se está trabajando en la construcción de las CRF para otras dos longitudes de onda (632 y 469 nm), los resultados preliminares muestran una tendencia similar en la CRFe para las tres longitudes de onda, lo que nos permitirá proponer que por lo menos es el mismo oscilador, localizado quizás en los fotorreceptores caudales, involucrado en la sincronización del ritmo circadiano ERG (Inclán-Rubio y Borgonio-Aguilar, 1996.).

Por otra parte, además de proporcionar información sobre la recuperación del oscilador, después de la aplicación del estímulo, las CRFt han sido utilizadas para tratar de conocer la estructura interna de un oscilador biológico. Con la CRFt desarrollada y ampliamente estudiada por Winfree (1970a), podemos clasificar a los organismos en dos grupos. Aquellos en los que la curva presenta una pendiente cercana a 0 y aquellos en que la pendiente es cercana a 1. Cuando se correlaciona la CRFe con la CRFt, se observa que los organismos que presentan una pendiente cercana a 0, presentan cambios de fase hasta de 12 horas, mientras que en aquellos cuya pendiente en la CRFt es cercana a 1 presentan cambios de fase menores de 8 horas, como lo que reportamos para nuestros experimentos. En base a estas observaciones, se clasifica a la sincronización en tipo 0 ó 1, respectivamente.

Por su parte Winfre (1970b) y Pavlidis (1973) defmieron matemáticamente las CRF obtenidas con estímulos intensos y débiles y llegaron a la conclusión de que ambos tipos de CRF, representaban un sistema dinámico bidimensional simple. Con respecto al modelo de Pavlidis, propuesto desde 1967, predice el efecto de la luz sobre un ritmo circadiano particular: el de la eclosión de *Drosophila*. El carácter circadiano en la eclosión de las larvas, así como los cambios de sensibilidad del sistema a lo largo del tiempo circadiano (CT) fueron puestos de manifiesto, gracias a los trabajos de Pittendrigh y Bruce (1959). Basándose en estos trabajos, el autor elaboró un modelo que le permitía reproducir el efecto que tiene un cambio luminoso de intensidad constante, duración conocida y aplicado en un cierto CT sobre el ritmo de eclosión de las larvas, la primera parte del desarrollo matemático que

hace el autor, le permitió encontrar las condiciones necesarias para que un estímulo pudiera actuar como sincronizador y en la segunda parte, utilizar ciertas propiedades del sistema para construir un modelo analítico que representara el efecto de los pulsos luminosos de corta duración sobre el sistema oscilante.

El modelo de Winfree (1970b) analiza también el fenómeno de la sincronización, tomando como punto de partida oscilaciones autosostenidas disipativas (esto es, que presentan un ciclo límite), lo que hace que la medida de la fase sea suficiente para definir el estado del sistema, aunque sólo sea de manera aproximada. La conclusión que obtiene el autor es que la fase de un ritmo sincronizado, depende tanto de la diferencia entre el periodo original y el periodo del estímulo, como de la forma que tengan la función de sensibilidad y el estímulo. A diferencia de lo propuesto por Pavlidis, el de Winfree es muy general, y hasta ahora, resulta poco aplicable a situaciones biológicas conocidas. Por lo que Kawato (1981) examinó la posibilidad de obtener mayor información o restricción, mediante otro modelo matemático que describe un oscilador biológico, utilizando el estado estable y transitorio de las CRF. Este autor propone, con base en un análisis tanto analítico, como topológico y además basándose en las características particulares de las CRFt, que el oscilador circadiano en la mosca *Drosophila* no está formado por un sólo oscilador de dos variables.

Siguiendo con estos estudios y con el objetivo de entender el fenómeno de la sincronización y la participación de un oscilador u osciladores involucrados en esta, Pittendrigh y Daan (1976b) propusieron un modelo con la participación de dos osciladores para ritmos circadianos en roedores nocturnos, basándose en los cambios de fase transitorios. Cuando en ciertas fases de actividad del ritmo, se presentan pulsos simples de luz u oscuridad, se puede provocar un cambio de fase de los dos osciladores propuestos como responsables para este ritmo, esto debido a alteraciones en su relación mutua de fase. Los autores mencionan que la ocurrencia de los transitorios puede reflejar una serie de cambios de fase para uno o ambos osciladores que gradualmente recuperan sus formas de relación de fase.

La participación que tienen los fotorreceptores del 6o. ganglio abdominal en la captación de luz monocromática, juega un papel muy importante para sincronizar al sistema circadiano ERG en el acocil. Este sistema de fotorreceptores extrarretinianos está influenciado a su vez, por las condiciones ambientales de su hábitat. Sabemos que estos crustáceos son acuáticos y en el agua hay una gran variedad de propiedades ópticas. Por ejemplo, en la superficie, el color del agua está determinado por un reflejo del cielo, pero debajo de la superficie, el agua llega a ser coloreada y el color puede variar desde un azul oscuro del agua del océano a un color rojo-café en el agua de los lagos, pantanos y riveras. El agua por sí sola es clara y transparente, con el reflejo del color del cielo

se observa de color azul, esto se debe en parte a la absorción y en parte a la dispersión de los rayos de luz. El verde del fitoplactón puede tener una importante influencia en las aguas ricas en estos nutrientes, especialmente en el verano, cuando las temperaturas son altas y los días largos. En el proceso de descomposición estos vegetales dan tonalidades amarillas. En pequeñas cantidades, estas sustancias amarillas en combinación con el azul del agua pura, imparten el color verde. En altas concentraciones y con el movimiento de la tierra por la corriente de agua, se puede llegar a transmitir a longitudes de onda largas, cercanas al infra-rojo (Muntz y Mouat, 1984).

Lythgoe (1980) formuló la predicción de que los peces de mar profundo que viven en ambientes visualmente coloreados de azul intenso pueden tener un pigmento visual sensible al azul. La situación similar fue observada en peces de agua dulce, excepto que su transmisión máxima ocurre a longitudes de onda mayores, entre los 530 y 650 nm. En el año de 1984, este autor establece que la mayoría de los conos sensibles al rojo que contienen porfirropsina de 620-625 nm han sido encontrados solamente en peces que viven en aguas relativamente ricas en luz roja. Recientemente Archer y cols. (1995) ha reportado que los conos de los fotorreceptores, sensibles al rojo en la retina de la anguila europea (*Anguilla anguilla*), cambian su absorbancia espectral máxima durante su maduración sexual, inducida por luz artificial. Estos cambios en la maduración sexual, inducen un cambio de absorbancia de la longitud de onda máxima de aproximadamente 523 nm, al intercambiar un cromóforo de A2 por A1, seguido por un cambio a 482 nm por el reemplazo de una opsina. Este cambio de un pigmento visual más sensible a la luz verde, típico de conos de animales terrestres y de peces que viven en ambientes con poca profundidad, a un pigmento visual más sensible a la luz azul, representa una clara adaptación de la visión escotópica de las anguilas y coincide con la migración que realizan de las aguas de las costas a las aguas oceánicas. Evidencias microespectrofotométricas, sugieren que los cambios en la sensibilidad del pigmento visual, son debidas a un cambio en la expresión del gene de la opsina y la incorporación de este nueva opsina a los fotorreceptores existentes (Wood y Partridge, 1993).

Heinermann y cols (1989), en dos lagos del Canadá, realizaron mediciones del patrón espectral encontrado a un metro de profundidad, con una temperatura de 18°C, encontrando un pico de transmisión máxima de luz en 620 nm a las 13 horas, y otro de 660 nm tanto en el amanecer (5:30 horas), como en el anochecer (20:00 horas). De acuerdo con nuestros resultados, con los cuales podemos sugerir que los fotorreceptores extrarretinianos del 6o. ganglio, no sólo tienen una comunicación funcional con el sistema visual, sino tienen un comportamiento circadiano, ya que el mismo estímulo luminoso, provocó diferentes efectos en el valor de la amplitud en el ritmo ERG, dependiendo de la hora de aplicación, esto nos puede indicar la participación de estos fotorreceptores en la sincronización de este ritmo. Por otra parte, sabemos que los responsables de los cambios

periódicos en la movilización de los pigmentos retinianos accesorios, son osciladores que muy factiblemente se encuentren a lo largo de la cadena ganglionar, y que al ser afectados, provocan a su vez, cambios en la posición de estos pigmentos y por consiguiente en el ritmo circadiano ERG, repercutiendo en los mecanismos adaptativos del acocil en su medio ambiente. Estos fenómenos cuya relevancia se comienza apenas a entender, no son una simple "curiosidad biológica", es posible que futuros avances en el concepto de orden temporal interno y sus mecanismos de regulación, coloquen a la cronobiología en el umbral de una nueva época para las ciencias en general.

CONCLUSIONES

- 1.- El registro de la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales (electrorretinograma, ERG) en condiciones de fotoperiodo 12/12 y temperatura constante, pone de manifiesto cambios periódicos en el valor de la amplitud del ERG que siguen un patrón de carácter circadiano.

- 2.- La aplicación de un estímulo único de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal del acocil *Procambarus* provoca cambios en el ERG que se manifiestan por la aparición de un transitorio después del cual hay una recuperación de las características del valor de la amplitud y el periodo originales, con un cambio de fase que depende del momento circadiano en el que se aplicó el estímulo (adelantos a las 12 y 18 y atrasos a las 6 y 24 hc).

- 3.- Los registros de la amplitud de la respuesta ERG, tanto a corto como a largo plazo, después de la aplicación de un estímulo único de luz amarilla sobre el 6o. ganglio abdominal, ponen de manifiesto una comunicación funcional entre los dos sistemas de fotorreceptores en el acocil *Procambarus*. Además esta respuesta se presenta con un patrón circadiano que depende del momento en que se aplicó el estímulo luminoso.

- 4.- Es posible que el 6o. ganglio abdominal participe como un sincronizador interno que modula la actividad circadiana ERG en el ojo compuesto del acocil *Procambarus*.

- 5.- Es posible que el efecto que provoca la luz amarilla aplicada sobre el 6o. ganglio abdominal y que es evaluado a través del sistema ERG, active una vía neuroendocrina que se integra en el ganglio cerebroide, y que contribuye en la modulación del ritmo ERG.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, K. (1970). The role of extraoptic photoreceptor in Amphibian rhythms and orientation. A review. *J. Herpetology*. 4 (3-4) : 99.
- Andrew, R.D., Orchard, I. y Saluddin, A.S.M. (1978). Structure and innervation of a cell neurosecretory cell. *Canadian J. Zool.* 56. 423.
- Archer, S. , Hope, A. y Partridge, J.C. (1995). The molecular basis for the green-blue sensitivity shift in the rod visual pigments of the *European eel*. *Proc. R. Soc. Lond.B.* 262: 289-295.
- Aréchiga, H. (1993). Circadian rhythms. *Current Opinion in Neurobiology*. 3: 1005-1010.
- Aréchiga, H., Cortés, J.L. y Rodríguez-Sosa, L.. (1985). Neuroendocrine correlates of circadian rhythmicity in crustaceans. *American Zool.* 25: 265-274.
- Aréchiga, H. y Fuentes-Pardo, B. (1970). Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *The Physiologist*. 13: 137.
- Aréchiga, H., Fuentes-Pardo, B. y Barrera-Mera, B. (1973). Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta Physiol. Latin. Am.* 24: 601.
- Aréchiga, H. y A. Huberman.(1980). Hormonal modulation of circadian rhythmicity in crustaceans. En: *Comparative aspects of Neuroendocrine control of Behavior*. (Ed.) S. Karger, AG Basel. pp:16-34.
- Aréchiga, H. y Mena F. (1975). Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem Physiol.* 52(A): 581-584.
- Aréchiga, H. y Wiersma C.A.G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1: 71
- Aréchiga, H., Fernández-Quiroz, F., Fernández de Miguel, F. y Rodríguez-Sosa, L.(1992). The circadian system of crustaceans. *Chronobiology Internat.* 9 (6): 001.
- Arrignon, J. (1985). Cría del cangrejo de río . En: *Acribia* (Ed.) Zaragoza. España.
- Aschoff, J. (1981). Annual rhythms in man. En: Aschoff, J. Ed. *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol.4. London:Plenum Press, pp.475-487

- Aschoff, J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harbor Symp on Quan Biol. 25: 11-28.
- Aschoff, J. (1967). Adaptative cycles: their significance for defining environmental hazards. International J. Biometerology. 11: 255.
- Aschoff, J. (1979). Circadian rhythm: influences of internal and external factors on the period measured under constant conditions. Z. Tierpsychol. 49:225-249.
- Aschoff, J. (1984). Freerunning and entrainment circadian rhythm. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 4. (Jurgen Aschoff, Ed) Plenum Press. New York. pp. 81-93.
- Barrera-Mera, B. (1976). Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of crayfish. *Physiol. Behav.* 17: 59.
- Barnes, R.D. (1984). *Zoología de los invertebrados*. Interamericana (4a. Ed), México, D.F.
- Bennet, M.F. (1970). Bilateral symmetry in the mediation of circadian differences in earth worm. *Z. Vergl. Physiol.* 69: 1-5.
- Binkley, S. (1993). Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. *Experientia* 49: 648.
- Bliss, E. D. (1982). Embriology, morphology and genetics. En: *The biology of crustacea*. Vol. II (Lawrence, G. A. Ed.) Academic Press. U.S.A.
- Block, G. D. , D.J. Hudson y M.E. Lickey (1974). Extraocular photoreceptors can entrain the circadian oscillator in the eye of *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 89: 237.
- Block, G.D. y M.E. Lickey (1973). Extraocular photoreceptors and oscillators can control the circadian rhythm of behavioral activity in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 84: 367.
- Block, G.D., Geusz, S., Khalsa, S., Michel, S. y Whitmore, D. (1995). *Circadian clocks and their adjustment*. Wiley Chichester (Ciba Foundation Symposium 183) pp.51-66.
- Brady, J. (1974). The physiology of insect circadian rhythms. *Advances in insect physiology*. 10: 1-115.
- Brown, F.A. (1961). Retinal pigment rhythm in crustacea. En: *The physiology of crustacea*. T.H. Waterman (Ed.)II. New York. Academic Press. pp.401-430.
- Brown, J. E. Rubin, L. J., Ghalayini, A. , Tarver, A.P., Irvine, R.F. Berridge, M.J. y Anderson, R.E: (1984). Myo-inositol polyphosphate may be a messenger for visual excitation in *Limulus* photoreceptor. *Nature*. 311: 160-162.

- Bruno, M.S. y Kennedy, D. (1962). Spectral sensitivity of photoreceptor neurons in the sixth ganglion of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 6: 41-46.
- Bullock, G.E y Horridge G.A. (1965). *Structure and function of the nervous systems of invertebrates*. Vol. II. W.H. Freeman & Company (Ed.) San Francisco, U.S.A.
- Bünning, E. (1967). *The physiological clock*. Bünning, E. (Ed.) Berlin and New York. Spring Verlag. pp.75-150.
- Carlisle, D.B. y Knowles, F. G. W. (1953). The x-organ of crustacea. *Nature*. 171: 1070.
- Cronin, T. W. y Goldsmith, T.H. (1984). Dark regeneration of rhodopsin in crayfish photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 84: 63.
- Cummins, D. y Goldsmith, T.H. (1981). Cellular identification of the violet receptor in the crayfish eye. *J. Comp. Physiol.* 142: 199.
- Daan, S. y Pittendrigh, C.S.(1976a). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. Heavy water and constant light: homeostasis of frequency?. *J Comp. Physiol A Sens Neural Behav Physiol.* 106: 267-290.
- Daan, S. y Pittendrigh, C.S. (1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J. Comp. Physiol.* 106: 253-266.
- Edwards, D.H. (1984). Crayfish extraretinal photoreception. I. Behavioral and motoneuronal responses to abdominal illumination. *J. Exp. Biol.* 109: 291-306.
- Enright, J.T. (1965). Entrainment of a tidal rhythm. *Science*. 147: 864.
- Enright, J. T. (1970). Plasticity in an Isopod's clockworks: shaking shapes form and effects phase and frequency. *J Comp. Physiol.* 107: 13.
- Fanjul-Moles, M.L., Miranda-Anaya, M y B. Fuentes-Pardo. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem Physiol.* 102A (1): 99.
- Fanjul-Moles, M.L., Prieto-Sagredo, J. y Bernal-Moreno, A. (1991). *The sixth abdominal ganglion shows a circadian response to light in vitro*. 21 st Annual Meeting of the Society for Neuroscience. New Orleans, Louisiana. Nov. 1991. Res. 490:12.
- Fernández, de-Miguel, F. y Aréchiga, H. (1992). Sensory inputs mediating two opposite behavioural responses to light in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp. Biol.* 164: 153-169.
- Fernández, H. R. y Nicker, E.E. (1976). Ultrastructural and molecular characteristics of crayfish photoreceptor membranes. *J. Cell. Biol.* 69: 721.

- Fuentes-Pardo, B. y García, M.C. (1979). Effect of the light deprivation on the neurohumoral activity of the visual system of the crayfish. *Comp. Biochem Physiol.* **64A**: 549-555.
- Fuentes-Pardo, B. e Inclán-Rubio, V. (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem. Physiol.* **86A** (3):523.
- Fuentes-Pardo, B. e Inclán-Rubio, V.(1981). Correlation between motor and electroretinographic circadian rhythms in the crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann). *Comp. Biochem. Physiol.* **68(A)**: 477.
- Fuentes-Pardo, B. y Ramos-Carbajal, J. (1983). The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**: 711.
- Fujimoto, F. , Yanase, T. y Ishizuka, I. (1966). The visual substance of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Mem. Osaka Gakugei Univ. B.* **15**: 109.
- Goldsmith, T. H. (1972). The natural history of invertebrate visual pigments. En: *Handbook of sensory physiology*. Dartnall (Ed.), vol. VII/1. Spronger-Heidelberg. 685.
- Goldsmith, T. H. y Fernández, H. R. (1968). Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. *Z. Vergl. Physiol.* **60** :156.
- Goldsmith, T.H. (1977). Photoreceptor processes: some problems and perspectives. *J. Exp. Zool.* **194**: 89.
- Goldsmith, T.H. (1986). Interpreting transretinal recordings of spectral sensitivity. *J. Comp. Physiol. A.* **159**: 481.
- Golombek , D.A. y Ralph, M.R. (1995). Circadian responses to light: the calmodulin connection. *Neuroscience letters.* **192**: 101-104.
- Gordon, S.A. y Brown, G.A. (1971). Observations on spectral sensitivities for the phasing of circadian temperature rhythms in *Perognatus penicillatus*. En: *Menaker, M.* (Ed.) *Biochemistry Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Hafner, G.S. y Tokarski, T.R. (1978). Evidence for putative photoreceptor axon terminals in the medulla externa of the crayfish. *Cell. Tiss. Res.* **195**: 331.
- Halberg, F. (1959). Physiological 24-hours periodicity:general and proceddural considerations with references to the adrenal cycle. *Z. vitamin. hormon. Fermentforsch.* **10**: 225.
- Hama, K. (1961). Photoreceptor-like structure in the ventral nerve cord of the crayfish *Cambarus virilis*. *Anat. Rec.* **140**: 329.

- Hanna, W.J. B., Horne, J.A. y G.H. Renniger. (1988). Circadian photoreceptor organs in *Limulus*. II. The telson. *J. Comp. Physiol. A.* 162: 133.
- Heinermann, P.H. y Ali, M.A. (1989). The photic environment and scotopic visual pigments of the creek chub, *Semotilus atromaculatus* and white sucker, *Catostomus commersoni*. *J. Comp. Physiol. A.* 164: 707-716.
- Hermann, H.T. y L. Stark (1963). Prerequisites for a photoreceptor structure in the crayfish tail ganglion. *Comp. Biochem. Physiol.* 147: 209.
- Hermann, H.T. (1972). Analysis of the properties of the crayfish caudal photoreceptor (PRU-Photoreceptor unit). *Exp. Physiol and Biochem.* 5: 155-192.
- Herrera-León, J.L. (1990). *Efecto de la aplicación de luz roja sobre el ritmo circádico electrorretinográfico del acocil (cambio de fase)*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán, Cuatitlán Izcalli Edo. de Mexico.
- Hope, G.M. y Bhatnagar, K.P. (1979). Electrical response of bat retina to spectral stimulations comparasion of four microchiropteran species. *Experientia* 35: 1189.
- Inclán-Rubio, V. (1988). *Mecanismos involucrados en la sincronización del ritmo circádico electrorretinográfico del acocil (Sincronización por luz monocromática)*. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. UNAM.
- Inclán-Rubio, V. (1991). Shifting phase on electroretinogram circadian rhythm induced by monochromatic light timulus in crayfish *Procambarus bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A (3): 301.
- Inclán-Rubio, V. y Borgonio-Aguilar, A. (1996). Coupling between two photoreceptor systems throughout monochromatic light in crayfish *Procambarus*. 26th Annual Meeting. Society for Neuroscience. Washington, D.C. 551-7.pp. 1398.
- Inclán-Rubio, V y Fuentes-Pardo, B. (1987). Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. II.- Functional relationships between caudal and visual photoreceptors. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A (3): 529.
- Johnson, C. H. (1990). *An atlas of phase responses curves for circadian and circatidal rhythms*. Department of Biology. Vanderbilt University, Nashville. TN.
- Joshi, D. y Chandrashekar, M.K. (1985). Spectral sensitivity of the photoreceptors responsible for phase shifting the circadian rhythm of activity in the bat *Hipposideros speoris*. *J. Comp. Physiol. A.* 156: 189.
- Kawato, M. (1981). Transients and steady state phase response curves of limit cycles oscillators. *J. Mathematical Biology.* 12: 13.
- Kennedy, D. (1958). Responses from the crayfish caudal photoreceptor. *Amer. J. Opht.* 46: 19.

- Kennedy, D. (1963). Physiology of photoreceptor neurons in the abdominal nerve cord of the crayfish. *J. Gen Physiol.* **46**: 551.
- Kennedy, D. y J.B. Preston (1960). Activity patterns of interneurons in the caudal ganglion of the crayfish. *J. Gen. Physiol.* **43**: 655.
- Kirk, M.D., Waldrop, B. y Glantz, R. (1982). The crayfish sustaining fibers. *J. Comp. Physiol.* **146**: 175-179.
- Kleinholz, I. H. (1975). Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity. *Nature.* **258**: 256.
- Knowles, A. y Dartnall, H.J.A. (1977). Habitat and visual pigments in "the eye". En: *The photobiology of vision*. Ed. by H. Davidson. vol. 2b. Academic Press, New York. U.S.A. 581.
- Knowles, F.G.W. (1950). The control of retinal pigment migration in *Leander serratus*. *Biol. Bull.* **98**: 66.
- Knüll, F. (1976). Zeitgebers for animals in the continuous day-light of high arctic summer. *Oecologia* **24**: 149.
- Kondoh, Y y Hisada, M. (1986). Neuroanatomy of the terminal (sixth abdominal) ganglion of the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). *Cell Tissue Res.* **243**: 273.
- Kong, K.L. y Goldsmith, T.H. (1977). Photosensitivity of reticular cells in white-eyed crayfish (*Procambarus clarkii*). *J. Comp. Physiol.* **122**: 273.
- Kovac, M. (1974). Abdominal movement during backward walking in the crayfish. I. Properties of the motor program. *J. Comp. Physiol.* **95**: 61-78.
- Kruszevska, B. y Larimer, J.L. (1993). Specific second messengers activate the caudal photoreceptor of crayfish. *Brain Research.* **618**: 32-40.
- Lythgoe, J. N. (1980). Vision in Fish: ecological adaptations. En: *Environmental physiology of fishes* (Edited by Ali. M.A.) Plenum press. New York.
- Lythgoe, J.N. (1984). Visual pigments and environmental light. *Vision Res.* **24**: 1539-1550.
- Mc Guire, R.A., Rand, W.M. y Wurtman, R.J. (1973). Entrainment of the body temperature rhythm in rats: effect of color and intensity of environmental light. *Science* **181**: 956.
- Menaker, M., Takahashi, J. y Ekin, A. (1978). The physiology of circadian pacemakers. *Ann Res Physiol.* **40**: 501-525.

- Mote, M.I. y Black, K.R. (1981). Action spectrum and threshold sensitivity of entrainment of circadian running activity in the cockroach *Periplaneta americana*. *Photochem Photobiol* **34**: 257.
- Moore, R.Y. (1995). Organization of the mammalian circadian system. *Circadian clocks and their adjustment*. Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 183) pp. 88-106.
- Moore, R.Y. y Lenn, N.J. (1972). A retinohypotalamic projection in the rat. *J. Comp Neurol*. **146**: 1-14.
- Muntz, W.R.A. y Mouat, G.S.V. (1984). Annual variation in the visual pigments of brown trout inhabiting lochs providing different light environments. *Vision Res.* **24**: 1575-1580.
- Nagayama, T. y Newland P.L. (1993) A sensory map based on velocity threshold neurones from a chordotonal organ in the tailfan of the crayfish. *J Comp. Physiol A.* **172**: 7-15.
- Nagayama, T. y Sato, M., (1993). The organization of exteroceptive information from the uropod to ascending interneurons of the crayfish. *J. Comp. Physiol. A.* **172**: 281.
- Naka, K. y Kuwabara, M. (1959). Two components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.* **36**: 51.
- Nässel, D.R. (1976). The retina and retinal projection on the lamina ganglionaris of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *J. Comp. Neurol.* **167**: 341.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J. y Pittendrigh, C.S. (1967). Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. II. The pathway of light signals that entrain the rhythm. *Z. Vergl. Physiol.* **58**: 14-46.
- Nogueron, I. y H. Aréchiga. (1987). Ritmo circádico de sensibilidad a la luz en la retina aislada del acocil. *Bol Est. Med Biol Mex.* **35**: 165.
- Nuboer, J.F.W., Nuys, W.M. van, y Steenbergen, J.C. van (1983). Colour changes in a light regimen as synchronizers of circadian activity. *J. Comp. Physiol.* **151**: 359.
- Nunnemacher, R. F., Camougis, G. y Mc Alear, J. H. (1962). *The fine structure of the crayfish nervous system*. 5th Congress Elect. Microsc. (2), N-11.
- Okada, Y. y Yamaguchi, T. (1988). Nonspiking giant interneurons in the crayfish brain: morphological and physiological characteristics of the neurones postsynaptic to visual interneurons. *J. Comp. Physiol A.* **162**: 705-714.
- Olivo, R.F. y Larsen, M.E. (1978). Brief exposure to light initiates screening pigment migration in retinula cells of the crayfish *Procambarus*. *J. Comp. Physiol.* **125**: 91.
- Page, T.L. y J.L. Larimer (1976). Extraretinal photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythm. *Photochemistry and photobiology.* **23**: 245.

- Page, T.L. y J.L. Larimer (1972). Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in the crayfish. *J. Comp. Physiol.* **78**: 107-120.
- Pavlidis, T. (1967). A mathematical model for the light affected system in the *Drosophila* eclosion rhythm. *Bull Math. Biophysics.* **29**: 291-310.
- Parker, G.H. (1903). The skin and eyes as receptive organs in the reactions of frogs to light. *Amer. J. Physiol.* **10**: 28.
- Pavlidis, T. (1973). *Biological oscillators: their mathematical analysis*. Pavlidis, T. (Ed.) New York. Academic Press. pp. 159-186.
- Pearse, A.S. (1910). The reactions of amphibians to light. *Proc. Amer. Acad. Arts. Sci.* **45** : 161.
- Piekos, B.W. (1986). The role of reflecting pigment cells in the turnover of crayfish photoreceptor. *Cell Tissue Res.* **244**: 645-654.
- Pittendrigh, C.S. y Bruce, V.C. (1957). An oscillator model for biological clocks. In: *Rhythms and synthetic process in growth*. I. Rudnick (Ed.). Princeton Univ. Press. pp.75-109.
- Pittendrigh, C.S. y Bruce, V.C. (1959). Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. En: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals* (R.B. Withrow, de.) Pub. 55. pp. 475-505.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and circadian organization of living system. Cold Spring Harbor. *Symp. on Quant. Biol.* **25**: 159.
- Pittendrigh, C.S. y Caldarola, P.C. (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 2697.
- Pittendrigh, C.S. (1984). Circadian Systems Entrainment. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol.4 (Jurgen Aschoff, Ed.) Plenum Press, New York. pp. 95-124.
- Pittendrigh, C.S. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Ann Rev. Physiol.* **55**:17-54.
- Pittendrigh, C.S. y Daan, S. (1976a). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. *J. Comp. Physiol.* **106**: 223.
- Pittendrigh, C.S. y Daan, S. (1976b). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: pacemakers as clock. *J. Comp. Physiol.* **106**: 291.
- Preston, J.B. y Kennedy, D. (1960). Integrative synaptic mechanisms in the caudal ganglion of the crayfish. *J. Comp. Physiol.* **43**: 671.

- Prosser, C.L. (1934). Action potentials in the nervous system of the crayfish. II. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. *J. Cell Comp.* **4**: 363.
- Provencio, I. y R. G. Foster. (1993). Vitamin A2-based photopigments within the pineal gland of a fully terrestrial vertebrate. *Neuroscience Letters.* **155**: 223.
- Reichert, H., Plummer, M.R. y Wine, J.J. (1982). Local interneurons in the terminal abdominal ganglion of the crayfish. *J. Comp. Physiol.* **149**: 145.
- Reichert, H., Plummer, M.R. y Wine, J.J. (1983). Identified nonspiking local interneurons mediate nonrecurrent, lateral inhibition of crayfish mechanosensory interneurons. *J. Comp. Physiol.* **151**: 261-276.
- Roenneberg, T. y Hastings J.W.(1991). Are the effects of light on the phase and period on the *Gonyaulax polyedra* clock mediated by different pathways?. *Photochem Photobiol* **53**: 525-533.
- Rusak, B. y l Zucker(1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* **59**. 449-526.
- Sánchez, J. y Fuentes-Pardo, B. (1977). Circadian Rhythm in the amplitude of electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem and Physiol.* **56(A)**: 601.
- Sandeman, D.C., Sandeman, R.E. y H.G. de Couet. (1990). Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiology.* **21** (4): 619.
- Serrato, J.,Hernández, H.O. y Ramon, F. (1996). Integration of visual signals in the crayfish brain: multiunit recording in eyestalk and brain. *Comp. Biochem. Physiol.* **114A(3)**: 211-217.
- Sehgal,A. , Rothenfluh-Hifilker, A., Hunter-Ensor, M. , Chen, T., Myers, M. y Young, M.W. (1995). Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science.* **270**: 808-810.
- Simon, T.W. y D.H.Edwards (1990). Light-evoked walking in crayfish: Behavioral and neuronal responses triggered by the caudal photoreceptor. *J Comp. Physiol A.* **166**: 745.
- Skinner, K. (1985). The structure of the fourth abdominal ganglia of the crayfish *Procambarus clarkii*. I. Tracts in the ganglionic core. *J. Comp. Neurol.* **234**: 168.
- Spillman, L.y Werener, J. S. (1990). *Visual perception.* The neurophysiological foundations. Academic Press.(Ed.) New York. U.S.A. pp. 317.
- Susuki, T., Arikawa, K. y Eguchi, E. (1985). The effects of light and temperature on the rodopsin-porphyrin visual system of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool. Scienc.* **2**: 455.

- Susuki, T., Maeda, Y.T. y Eguchi, E. (1988). Retinyl and 3-dehydroretinyl esters in the crayfish retina. *Vision Res.* **28** (10): 1061-1070.
- Susuki, T. , Makino-Tasaka y Eguchi, E. (1984). 3-dehydroretinal (Vitamin A2 aldehyde) in crayfish eye. *Vis. Res.* **24**: 783.
- Susuki, T., y Miyata, S.(1991). 3-Hidroxyretinol in the rhodopsin-porphyrin retina of an invertebrate (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem. Physiol.* **99 B** (2) : 307.
- Susuki, T., Terakita, A. y Tsui, A. (1993). Retinoid metabolism and conversion of retinol to dehydroretinol in the crayfish (*Procambarus clarkii*) retina. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B** (2): 257.
- Tautz, J. (1987). Water vibration elicits active antennal movements in the crayfish *Orconectes limosus*. *Anim. Behav.* **35**: 748-754.
- Treviño, D.L. y Larimer, J.L. (1970). The response of one class of neurons in the optic tract of crayfish (*Procambarus*) to monochromatic light. *Z. Verg. Physiol.* **69**: 139.
- Truman, J.W. (1970). Neuroendocrine control of ecdysis in Silkworms. *Science.* **167**: 1624-1626.
- Von Frisch, K. (1911). *Beiträge zur physiologie der pigmentzellen in der fischhaut.* *Plügers Arch. Ges.* **38**: 319. Citado por Adler, 1970.
- Wald, G. (1962). Visual Pigments of the freshwater crayfish. *Fed. Proc.* **21**:344.
- Wald, G. (1967). Visual pigments of crayfish. *Nature (Lond.)*. **215**: 1131.
- Wald, G. (1968). Single and multiple visual systems in arthropods. *J. Gen. Physiol.* **51** (2):125.
- Waterman , T.H. , Wiersma, C.G.A. y Bush, B.M.H. (1982). Afferent visual response in the optic nerve of the crab *Podophthalmus*. *J. Cell.Comp. Physiol.* **63**: 135.
- Waterman, T. H. (1961). Light sensitivity and vision. En Waterman T.H. (Ed.): *The physiology of crustacean*. Vol.II. pp. 1-64. Academic Press. New York. U.S.A.
- Waterman, T.H. (1977). The bridge between visual input and central programming in crustaceans. In: *Identified neurons and behavior at arthropods*. G. Hoyle (Ed.)U.S.A.
- Waterman, T.H. y Fernández , H.R. (1970). E-vector and wavelength discrimination by reticular cells of the crayfish *Procambarus*. *Z. vergl. Physiol.* **68** : 154.
- Waterman, T.H., Fernández, H. R. y Goldsmith, T.H. (1969). Dichroism of sensitive pigment in rhabdoms of the crayfish *Orconectes*. *J. Gen. Physiol.* **54**: 415.

- Welsh, J. H. (1930). Diurnal rhythms of the distal pigment cells in the eyes of the certain crustaceans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **16**: 386.
- Wiersma, C.A.G. y Yamaguchi, T. (1966). The neural components of the crayfish as studied by single unit analysis. *J. Comp. Neurol.* **128**: 333.
- Wiersma, C.A.G. (1974). Behavior of neurons. En: *The Neurosciences Third Study Program*. F.O. Schmitt, et al. (Ed.) MIT Press Cambridge. pp. 419-431.
- Wilkens, L.A. (1988). The crayfish caudal photoreceptor: advances and questions after the first half century. *Comp. Biochem. Physiol.* **91C** (1): 61-68.
- Wilkens, L.A. y J.L. Larimer (1972). The CNS photoreceptor of crayfish: Morphology and synaptic activity. *J. Comp. Physiol.* **80**: 389.
- Wilkens, L.A. y J.L. Larimer (1976). Photosensitivity in the sixth abdominal ganglion of decapods crustaceans: A comparative study. *J. Comp. Physiol.* **106**: 69.
- Winfree, A.T. (1970a). The temporal morphology of a biological clock. En: *Lectures on math. in the Life Sci.* Vol.2 M. Gerstenhaber (Ed.). Providence, R.I. Amer. Math. Soc. pp.111-150.
- Winfree, A. T. (1970b). Integrated view of resserting a circadian clock. *J Theor. Biol.* **28**: 327-374.
- Wood, H.L. y Glantz, R.M.(1980). Distributed processing by visual interneurons of crayfish brain. I. Response characteristics and synaptics interactions. *J. Neurophysiol.* **43**: 729-740.
- Wood, P. y Partridge, J.C. (1993). Opsin substitution induced in retinal rods of the eel (*Anguilla anguilla*): a model for G-protein linked receptors. *Proc. R. Soc. Lond.B.* **254**: 227-232.
- Woodcock, A.E.R. y Goldsmith, T.H. (1970). Spectral response of sustaining fibers in the optic tracts of crayfish (*Procambarus*). *Z. Verg. Physiol.* **69**: 117.