

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DEL RITMO CIRCADICO MOTOR DEL ACOCIL
Procambarus bouvieri (Ortmann)

TESIS QUE PARA OPTAR AL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA JOSE ASCENCION VICCON PALE

1 9 7 8



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

En el oleaje de la vida, en el torbellino de la acción, ondulo subiendo y bajando, me agito de un lado a otro. Nacimiento y muerte, - un océano sin fin, una actividad cambiante, una vida febril: así trabajo yo en el zumbador telar del tiempo tejiendo el viviente ropaje de la Divinidad.

Goethe.

Con amor

A mi madre

A mi padre

Ernestina Pale M.

José Viccon C.

Mi gratitud y cariño a la Dra. Beatriz Fuentes Pardo por su dirección que me ha conducido a los aciertos del presente trabajo y de mi formación profesional.

Quiero decirles a María Angélica, a
la Sra. Soledad López Díaz, a la -
Sra. Carolina Rondero y al M. en C.
Avedis Aznavurian A.

Muchas gracias por todo.

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
Introducción.....	1
Material y Métodos.....	17
resultados.....	25
Discusión.....	28
Conclusiones.....	34
Referencias Bibliográficas.....	47

I N T R O D U C C I O N

"El ritmo circádico es un fenómeno ampliamente generalizado entre los sistemas vivos: los organismos más diversos, vegetales y animales y las respuestas espontáneas o provocadas en ellos han permitido poner de manifiesto esta característica de la materia viviente de presentar cambios que se repiten con una periodicidad aproximada de veinticuatro horas". (Fuentes-Pardo 1977).

En una excelente revisión que hizo Bünning en 1960, cita al astrónomo De Mairan, como el iniciador del estudio de los ritmos circádicos por sus trabajos que en 1729 lo llevaron a comprobar que algunas plantas puestas en condiciones constantes de obscuridad y temperatura presentaban cambios periódicos en el movimiento de las hojas. Asimismo Duhamel y Zinn en el siglo XVIII y De Candolle, Dutrochet, Sachs y Hofmeister en el siglo XIX son autores que contribuyeron a sentar las bases para el estudio sistemático de los fenómenos periódicos.

Un lugar importante entre los estudiosos del fenómeno que nos ocupa es el reservado para Pfeffer

(1873, 1875 y 1915), quien trabajó en hojas de Phaseolus y flores de Caléndula, poniendo de manifiesto la importancia de la influencia de los cambios ambientales sobre las modificaciones cíclicas de estas estructuras.

Ya en el siglo XX los estudios sobre fenómenos periódicos se extienden a los animales, destacando en las primeras décadas los de Kalmus (1938) sobre el sentido del tiempo de la abeja, los de Welsh (1939 y 1941), sobre los pigmentos de Crustáceos, y los de Blunring (1958b), sobre la actividad motriz de los Ortópteros.

Por otra parte se conoce desde hace muchos años, que algunos animales presentan mayor actividad a ciertas horas del día, lo que les ha conferido el calificativo de "diurnos" o "nocturnos". Entre estos últimos se encuentra el acecil sobre cuya actividad motriz se encuentran estudios que datan del siglo XIX. Así, Vulpian en 1866, encontró que la sección del cordón nervioso, justamente en la región anterior al primer ganglio abdominal provocaba un movimiento continuo y rítmico de las patas natatorias, aunque en el animal íntegro no hubiera habido movimiento. Ward en 1879, detec-

tó que el corte de las comisuras circunnesofágicas produce un "ritmo natatorio" en los pleópodos. Al dividir el cerebro por la línea media, Bethe, en 1897 tuvo como resultado una actividad motriz ininterrumpida, a pesar de que los animales íntegros suelen moverse sólo por la noche. Huxley en 1880 pretende explicar la periodicidad en el movimiento aduciendo la intolerancia de los organismo a la iluminación intensa y a las temperaturas elevadas. (Citado por Schallek, 1942).

En 1903, Chidester en el laboratorio y en las orillas de estanques, con la asistencia de Hodge y Miller observó el comportamiento de la especie Cambarus bartoni bartoni Fabr., Chidester dice: "pienso, a la luz de estas observaciones, que los acociles en las tranquilas aguas del acuario se comportan normalmente". Observa también que se alimentan durante la noche, aunque menciona que la alimentación puede ocurrir también durante el día. Sus observaciones le permiten afirmar que la gran actividad de estas especies ocurre al caer la obscuridad y al alba. "Bohn (1903-09), tuvo el mérito de haber descubierto que los ritmos de actividad que se producen en muchos animales por la repetición regular de condiciones externas tales como la

alternancia del día y la noche, y los períodos de baja y alta marea, pueden persistir por algún tiempo después de que los animales se ven liberados de la influencia directa de los cambios periódicos externos". Holmes (1911). "Bohn también introduce el término nictámero... que es el adjetivo que se aplica a un período - que consiste de una fase nocturna y una fase diurna. El término nictámero, es equivalente a la expresión - "ciclo día-noche". Roberts (1944).

Sólo hasta 1932 puede hablarse de cambios circádicos en la actividad motriz del cecíl, (aún cuando el término circádico no se había acuñado todavía). Ello fue debido a los estudios de Kalmus en la especie Potamobius astacus en los que puso de manifiesto que la remoción de los tallos oculares determinaba la desaparición en poco tiempo de los patrones temporales de actividad que caracterizaban al animal antes de la extirpación. En 1936, el mismo autor observa las modificaciones inducidas sobre la actividad motriz del cangrejo por la lesión o remoción de algunas estructuras del sistema nervioso presentes en los tallos oculares y que se caracterizan por tener carácter neurosecretor. (Fuentes-Pardo, 1977).

Años después de Kalmus, Schalleck, (1942) menciona algunas características del ritmo diario de actividad motora de los decápodos estudiados por él: "persistía por lo menos durante cinco semanas en obscuridad constante; cerca de la mitad de los animales presentaban un ritmo unimodal y la otra mitad, bimodal; los picos de actividad de los animales unimodales generalmente se presentaban al medio día o a la media noche, mientras que los de los animales bimodales ocurrían usualmente al amanecer y al anochecer... El ritmo diario de todos los animales puestos en obscuridad constante desaparecía después de que se les quitaban los tallos oculares. La actividad se mantenía en un nivel de pico durante varias semanas... Pareciera que la presencia de los tallos oculares inhibiera la actividad locomotora de los Cambarus. Por otra parte el decremento del nivel de actividad de estos animales no era significativo cuando se les inyectaba extracto de glándula sinusal y tampoco había diferencia entre aquellos a los que se les inyectaba glándula sinusal y los controles... Pareciera que la glándula sinusal no ejerciera ninguna influencia directa sobre la actividad de los acociles. Todos los animales a los que se les cortaba

el nervio óptico presentaban un incremento de actividad comparable que presentan aquellos a los que se les quitaban los tallos oculares. De ello pudiera concluirse que las fibras que se encuentran en el nervio óptico - inhibieran la actividad motriz de los Cambarus... Cuando los acociles destallizados se exponían a condiciones normales de luz y obscuridad, presentaban una inversión en el patrón temporal de la actividad motriz, con respecto al de los normales, volviéndose más activos en el día que en la noche. El corte del cordón abdominal, justamente en la región anterior a los fotoreceptores del sexto ganglio abdominal eliminaba la diferencia de actividad entre el día y la noche... Todos estos experimentos sugieren que los acociles normalmente están activos, y que esta actividad está inhibida durante el día por la acción de centros nerviosos localizados en los tallos oculares: la actividad de las patas es inhibida por fibras que forman parte del nervio óptico y que atraviesan la línea media del cerebro donde se provoca la inhibición de la actividad motriz".

En 1944, Roberts, hace un estudio muy amplio acerca de la posible influencia que pueden tener facto-

res internos y externos sobre la locomoción de Cambarus virilis. Entre otras cosas encuentra que cuando la luz natural fluctúa normalmente, la actividad de Cambarus virilis, es mucho mayor en la noche, aunque la temperatura varíe o permanezca constante. Cuando los acociles son colocados en obscuridad continua, la actividad se presenta principalmente durante la noche en los primeros días; después se torna irregular con gran número de picos durante el día. Estos hechos indican que el nocturnalismo es regulado, al menos en parte, por un mecanismo endógeno que tiende a sincronizar el ritmo locomotor con la ocurrencia del día y la noche naturales... Y que la influencia directa de la luz es responsable en buena parte de la aparición de los picos locomotores nocturnos. Cuando los animales son mantenidos en obscuridad constante durante algunos días, los picos de actividad, comúnmente se presentan a intervalos de 10 a 40 horas (con un promedio de 23.8 hrs.). Los acociles a los que se les quitan los tallos oculares, permanecen en actividad continua mientras se les suministran alimento y agua fresca. Algo similar se observa en acociles colocados en obscuridad continua o expuestos a las fluctuaciones naturales de luz.

Si se ligan los tallos oculares la locomoción se incrementa y usualmente se mantiene a un nivel alto, tanto en los acociles colocados en obscuridad continua como en los expuestos a iluminación natural. La explicación que propuso el autor, se basa en la acción de una hormona inhibitoria de la locomoción, normalmente liberada por los tallos oculares dentro del cuerpo cuando los acociles están sujetos a iluminación brillante. Cuando se cortan las comisuras circuensofágicas, los acociles operados permanecen quietos hasta que se les aplica un golpe vigoroso u otro tipo de estimulación. Después de que la locomoción se inicia, generalmente continúa hasta que se encuentran con un obstáculo en ángulo recto; a partir de este momento el animal no vuelve a moverse a no ser que se le aplique una estimulación física fuerte desde el exterior. Todos estos resultados apoyan la idea de que el ganglio cerebroide está normalmente involucrado en la iniciación de la locomoción, y que los impulsos nerviosos del ganglio cerebroide no están necesariamente involucrados en el mantenimiento, inhibición o suspensión de la locomoción. La inyección de extracto de tallos oculares a acociles destallizados produce un decremento ligero

de la locomoción, aproximadamente en el 60% de los animales inyectados. El incremento de la locomoción durante la noche puede muy bien explicarse con base en un decremento del tigmotropismo, debido a un cambio en las condiciones del sistema nervioso, dependientes quizá de secreciones provenientes de los tallos oculares, reguladas por las condiciones de iluminación".

Guyselman (1957), diseñó un experimento que le permitió "determinar el patrón seguido por la actividad locomotora en C. virilis así como examinar la relación que guarda la misma con los cambios de presión barométrica." Encontró que "los animales, expuesto a las fluctuaciones normales de presión atmosférica presentan un patrón solar (24 hrs.) con una actividad máxima entre las 7:00 y 10:00 p.m.... Los animales sujetos a una presión constante presentan en cambio un patrón de tipo bimodal, en el cual los máximos ocurren de 2:00 a 4 a.m. y de 4:00 a 8:00 p.m."

En 1966, Aschoff encuentra que "independientemente de la considerable variabilidad que existe entre los patrones temporales de diferentes individuos, hay siempre un patrón discernible propio de la especie. Algunas especies pueden presentar únicamente un pico de

actividad en 24 hrs. y tres o más picos en las 24 hrs. como ocasionalmente ocurre. Sin embargo, el patrón más común es, con mucho, aquel en el que se observan dos picos de actividad por día. Los resultados de este autor demuestran que el ciclo largo (período), así como el patrón bigémino están determinados endógenamente, o lo que es lo mismo, no dependen de los cambios recurrentes de las condiciones ambientales".

En 1969 Aréchiga y Wiersma hicieron registros en el accion de la frecuencia de descarga en tres tipos de las llamadas "fibras de acción sostenida" (Wiersma y Yamaguchi, 1958), las que se caracterizan por reaccionar tónicamente a los cambios en la iluminación. Estos registros se hicieron continuamente durante períodos de, aproximadamente 8 semanas. Se encontró que los animales colocados en obscuridad continua, presentan cambios circádicos en la frecuencia de descarga de estas fibras tanto en la actividad espontánea como en la respuesta a destellos de intensidad y duración conocidas.

La descarga máxima se produce durante la noche subjetiva del animal con una reducción abrupta durante el amanecer. La amplitud del electroretinograma, la frecuencia de descarga de fibras mecanorreceptoras

y de actividad (estas últimas activadas directa o indirectamente por los movimientos del cuerpo del animal), presentan también períodos cercanos a las veinticuatro horas que sugieren la presencia de un "reloj" común modulado por acciones humorales.

En 1972 Page y Larimer presentaron los resultados que obtuvieron de estudiar el papel de los ojos y del fotorreceptor caudal en la sincronización del ritmo circádico locomotor del acocil. Este trabajo puede resumirse de la siguiente forma: cuando los acociles de la especie Procambarus clarkii son colocados en un ciclo de 12 horas de luz -12 horas de oscuridad (LD 12:12), se presenta un claro ritmo bimodal de actividad. El pico asociado con el encendido de la luz se sincroniza con el encendido y el pico asociado con el apagado de la luz se presenta poco después de que la luz se apaga. Si estos animales se colocan en oscuridad constante (DD), se puede comprobar que hay un ritmo circádico unimodal con el único pico de actividad asociado con el apagado. Si se remueve o aísla el sexto ganglio abdominal (lugar donde se localizan los fotorreceptores caudales), no se presentan cambios en el ritmo circádico, lo que excluye a esta estructura como

posible sitio para la iniciación o la sincronización del ritmo. La remoción de las omatidias de ambos ojos o la sección de los lóbulos ópticos entre la lámina ganglionar y la médula externa, provoca la extinción del pico dependiente del encendido, pero no afecta en algo la sincronización de la respuesta al apagado. Esto significa que si bien la retina provee la condición necesaria para que se genere el pico de encendido, no es requerida para que se lleve a cabo la sincronización del otro. Finalmente, la ablación conjunta del ganglio caudal y de la retina no afecta en nada la capacidad de sincronización, por lo que puede concluirse que el acocil posee fotorreceptores extrarretinales y extracaudales, suficientes para que se lleve a cabo el fenómeno de la sincronización.

En 1974, Fuentes Pardo e Inclán presentaron los primeros resultados sobre la posible correlación entre dos ritmos circádicos del acocil: el electroretinográfico y el motor. Las autoras encuentran que si bien cada ritmo presenta sus máximos a diferentes horas del nictámero, es posible proponer un mecanismo encargado de mantener siempre el mismo desfase entre ambos ya que la diferencia entre los máximos de cada ritmo se

mantiene constante en los animales íntegros y parece depender del azar en los animales gangliectomizados.

En 1975, Page y Larimer presentan otra serie de resultados, obtenidos, de otro de sus estudios sobre el ritmo circádico motor del acocil. En él registran la actividad locomotriz y el movimiento de algunas patas ambulatorias. Los registros fueron obtenidos de animales íntegros y de animales en los que se habían practicado diferentes tipos de lesiones quirúrgicas. Al seccionar las comisuras circunoesofágicas, desaparece el ritmo circádico del primero y cuarto pares de patas ambulatorias, mientras que la sección del cordón nervioso entre el tercero y el cuarto par de ganglios torácicos hace desaparecer la ritmicidad únicamente en el cuarto par de patas. La ablación bilateral de los tallos oculares da lugar a un gran incremento del movimiento total y pone al animal en continua actividad; sin embargo la medición cuantitativa de esta actividad revela que el ritmo circádico de actividad persiste durante 6 a 12 días después de la remoción de los tallos oculares. Estos resultados sugieren que la oscilación circádica del ritmo locomotor se origina en el ganglio supraesofágico y se acopla a los centros locomotores

torácicos por vía axónica en las comisuras circunesofágicas. El ritmo de actividad de los animales destallizados puede ser sincronizada por ciclos de luz, aún después de la ablación del fotorreceptor caudal; sin embargo, se alteraron algunas características de la sincronización después de la alteración del sexto ganglio abdominal. Los autores concluyen que si bien los tallos oculares no se requieren para que se genere la ritmicidad circádica locomotora sí son indispensables para que pueda llevarse a cabo la sincronización del ritmo.

La caracterización del ritmo circádico motor del acocil Procambarus bouvieri, fue hecha por Fuentes Pardo (1977) y por Viccon Pale y Fuentes Pardo (1977). Para ello sometían a sus animales de experimentación a diferentes condiciones de luz y temperatura y veían el efecto que estos factores tenían sobre la duración del período circádico, la relación entre los períodos de actividad y reposo (relación α/p), la amplitud del ritmo y el nivel de actividad. Pudieron constatar que al cambiar la cantidad de luz el ritmo motor se modifica según lo esperado de la regla circádica de Aschoff (Aschoff, 1960) aplicada a animales nocturnos y que

Los cambios de temperatura no afectan importantemente el período circádico, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de "compensación de la temperatura" (Pittendrigh, 1965) responsable de que no se observen diferencias atribuibles a este factor. Estos resultados se resumen en la tabla No. 1.

De los antecedentes que se han presentado, resulta evidente que el estudio sobre el ritmo circádico motor del acocil ha sido abordado desde dos puntos de vista, que si bien es cierto no están totalmente desligados, pueden diferenciarse claramente: el que va dirigido a la caracterización del ritmo como tal y el que pretende explicar su origen.

Evidentemente que este último punto de vista resulta de suyo más complejo que el otro, lo que permite explicarnos el por qué los autores no logran ponerse de acuerdo sobre aspectos básicos como son el decidir si las estructuras responsables del ritmo son una o varias. Sin embargo se ha propuesto que el ganglio circunesofágico y/o los tallos oculares, serían las estructuras responsables por lo menos del mantenimiento del ritmo motor gracias a la comunicación que establecen con otras estructuras, lograda mediante mensajes

enviados por vía axónica y/o humoral. Los resultados experimentales que han sido presentados para apoyar estas proposiciones no han sido, sin embargo, lo suficientemente contundentes como para eliminar alguna otra posibilidad.

Por otra parte, Winfree propuso en 1967 un modelo, mediante el cual logra generar oscilaciones de la frecuencia deseada debido a la interacción de grupos de osciladores de características conocidas; estos hechos lo llevaron a proponer que la oscilación circádica es el resultado de la oscilación sincronizada de múltiples elementos, aún cuando hay que aclarar que el autor no presenta ni sugiere trabajos experimentales que permitan aceptar o rechazar la validez de su modelo.

El propósito del presente trabajo es estudiar el origen del ritmo circádico motor del acocil con un enfoque particular: el análisis del estado funcional de las distintas estructuras involucradas en él, particularmente las que configuran la "salida" del sistema, es decir: las fibras nerviosas motoras (excitatorias e inhibitorias), la sinapsis neuromuscular y el músculo abductor del dactilopodito. (Para desarrollar como tra

bajo de tesis sólo hemos incluido el estudio de esta última estructura). La hipótesis que se propone es la siguiente: Si, efectivamente, el ritmo circádico motor es la manifestación de la interacción de diferentes os ciladores, éstos deben localizarse en los elementos responsables de la función motora, por lo tanto, el es tudio de la excitabilidad de estos elementos a lo largo del nictámero, permitirá establecer, si existe una relación de causalidad, entre los cambios de sensibili dad de cada estructura y un ciclo circádico motor.

MATERIAL Y METODOS

Los experimentos en los que está basado el presente trabajo se pueden dividir en dos grandes grupos: los de corto y los de largo plazo; se han llamado así porque aquéllos tienen una duración aproximada de una hora mientras que éstos requerían un registro no menor de una semana.

Experimentos a corto plazo.

En estos experimentos se utilizaron acociles de ambos sexos de la especie Procambarus bouvieri (Ort-

man), procedentes de Uruapan, Mich. Al llegar al laboratorio eran colocados en condiciones adecuadas de temperatura y oxigenación, lo que permitía que se mantuvieran vivos por meses, si era necesario. De estos lotes eran obtenidos los especímenes para ser estudiados a lo largo del nictámero. Los registros se hicieron cada dos horas, con un número no menor de 5 animales en cada hora del día.

La preparación biológica se obtuvo siguiendo la técnica de Robbins y Van Der Kloot (1958), modificada. Para ello se separaba un quelípodo cortándolo lo más próximo posible a la base. Se quitaba el exoesqueleto de la superficie ventral del meropodito haciendo el corte a lo largo de los bordes. Con el objeto de evitar que el músculo aductor siguiera funcionando se cortaba su unión con el dactilopodito sin quitar el exoesqueleto, lo que se lograba insertando un pequeño escapelo o unas tijeras de cutícula a través de la membrana de la articulación y cortando en el punto de inserción del dactilopodito. Se cortaba también la punta del propodito. Hecho esto se colocaba el quelípodo sujeto con una pinza dentro de una caja de plástico de tal forma que el dactilopodito quedaba hacia abajo. una aguja conec

tada a través de una manguera con llave a un matraz Erlenmeyer que contenía solución de Van Harreveld (Van Harreveld, 1936), se introducía a la pata a través de la punta cortada del propodito. Por otro lado la punta del dactilopodito era sujeta con un hilo mediante el cual se conectaba a una palanca ligera, la que permitía obtener los trazos de los acortamientos musculares, registrados en un quimógrafo (Palmer). El recipiente de plástico se llenaba con solución de Van Harreveld hasta cubrir el segmento del meropodito en el que se localizan las fibras nerviosas.

El haz nervioso que contenía las fibras excitatorias del músculo abductor se montaba sobre un electrodo monopolar de platino el cual estaba conectado a un estimulador Grass (modelo 540). Otro electrodo monopolar de platino, también conectado al estimulador, se introducía en la solución hacia un extremo del recipiente, con objeto de cerrar el circuito de estimulación. (Fig. No. 1).

Para estimular se empleaban pulsos cuadrados, de un milisegundo de duración y a la frecuencia de sesenta pulsos por segundo.

Una vez montada la preparación y ajustado el estimulador a los parámetros mencionados, se perfundía durante cinco minutos con la solución de van Harreveld. Inmediatamente después se procedía a determinar el voltaje umbral. Obtenido éste, se estimulaba durante tres segundos y se suspendía durante cinco segundos para volver a estimular durante tres segundos más. Esta secuencia se repetía hasta obtener el total de cuatro contracciones que conforman cada serie. Posteriormente se volvía a perfundir durante otros cinco minutos, al término de los cuales, se repetía el mismo procedimiento para obtener la segunda serie. Se perfundía durante quince minutos más y se obtenía la tercera serie. En cada caso se utilizaba el voltaje mínimo requerido para obtener la contracción. (Fig. No. 2).

Debido a que el tamaño de los períodos utilizados en cada experimento no era siempre el mismo, hubo necesidad de determinar hasta qué punto los resultados que se obtenían se veían afectados por la longitud y el grosor de la pata. Sin embargo, unos cuantos experimentos bastaron para poner de manifiesto que el factor importante no era el tamaño sino la distancia

existente entre las dos puntas de la pinza cuando ésta estaba completamente abierta.

Se hizo entonces una serie de experimentos en los que se utilizaban patas con diferentes aberturas máximas y se medía el desplazamiento provocado en cada caso como consecuencia de la aplicación de un voltaje unbral del mismo valor.

Todos los experimentos se hicieron a la misma hora solar.

Con los datos obtenidos, se alimentó un programa de una computadora PDP/11 40, con el objeto de determinar qué curva se ajustaba mejor a ellos. Los resultados de este ajuste se presentan en la gráfica que se incluye en la Fig. No. 3.

Otro grupo de experimentos con los que se pretendía poner de manifiesto la importancia que tiene para la obtención de un cierto desplazamiento el voltaje aplicado, se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente diseño: patas de la misma abertura máxima, eran trabajadas a la misma hora del día midiéndose el voltaje que se había requerido para obtener la respuesta correspondiente. Los datos fueron metidos al programa

que permitía encontrar la curva que mejor se ajustaba a ellos obteniéndose los resultados que se presentan en la Fig. No. 4.

Pudo comprobarse que tanto la distancia entre los extremos de la pinza como el voltaje requerido para la obtención de la respuesta, guardan una relación inversa con el desplazamiento provocado. Ello llevó a establecer que la cantidad de desplazamiento es el resultado de la interacción de, por lo menos, estos dos factores por lo que no puede ser tomado como índice del estado de sensibilidad del sistema. De ahí que se haya empleado un "coeficiente de respuesta", el que con base en los resultados expuestos en los párrafos anteriores se calculó de la siguiente manera:

$$CRS = \frac{Dp}{At + Vu}$$

donde: CR = coeficiente de respuesta

Dp = desplazamiento de la pajilla

At = abertura total de la pinza

Vu = voltaje umbral

Por otra parte, se observó que la estructura no sólo tiene una cierta capacidad de respuesta a la estimulación, sino que también presenta la capacidad de recuperarse. Este hecho nos pareció particularmente interesante debido a que se pudo comprobar con algunos de los experimentos preliminares que la relación entre las magnitudes de las respuestas obtenidas entre la primera y la segunda, la segunda y la tercera o la primera y la tercera series solía presentar diferencias importantes, por lo que se adoptó como criterio de medida de la sensibilidad del sistema, además de los CRS, lo que se designó como capacidad de recuperación - (CRc). La forma de calcularla se basó en la obtención del recíproco de la suma algebraica de los valores de los CRS de una serie con el de otra obteniéndose así, de cada experimento las tres medidas de caída o incremento de la respuesta que resultan de comparar la 1a. con la 2a., la 2a. con la 3a., y la 1a. con la 3a. series.

Una vez obtenida la medida del cambio de sensibilidad de cada serie experimental se promediaban los valores para cada experimento y se obtenía el recíproco como la medida final de sensibilidad del sistema.

Experimentos a largo plazo.

Aún cuando muchos de los experimentos a largo plazo utilizados para este trabajo fueron desarrollados por Fuentes rardo (1977), hubo necesidad de montar algunos de ellos con el objeto de corroborar algunos hechos.

La técnica consistió en lo siguiente: acociles sin distinción de sexo y edad, eran colocados dentro de un recipiente con agua y sujetos del caparazón por medio de un corcho fijado al animal con cemento acrílico. Esto permitía mantenerlos sumergidos todo el tiempo que durara el experimento, el que en ningún caso fue menor de 7 días. El recipiente era colocado dentro de una caja en la que se mantenían las condiciones deseadas de iluminación y temperatura. Los cuatro pares de patas ambulatorias eran sujetos por medio de hilos, los que llegaban hasta un transductor de fuerza Grass (Modelo FTU3), cuya señal era registrada ininterrumpidamente en un polígrafo Grass (Modelo 7). El análisis de cada experimento consistía en la medición del número de veces que el animal provocaba con su movimiento que se generara la señal del transductor en un intervalo de tiempo conocido (20 minutos). Al grafi-

car estos valores contra el tiempo transcurrido se obtenían gráficas como la que se muestra en la Fig. No. 5. De esas gráficas se calculaban los valores del período (), el coeficiente que relaciona los períodos de actividad y de reposo. (relación α/e) y el nivel de actividad, lo que permitió la caracterización del ritmo motor. Como con mucha frecuencia los registros que se obtienen de la manera descrita no permiten visualizar claramente la periodicidad del fenómeno, fue necesario implementar un programa para la computadora PDP/1140 que permitiera hacer un análisis exhaustivo de las frecuencias presentes en el registro con el objeto de obtener el valor del o de los períodos que tuvieran mayor significado estadístico. Este programa se basó en el análisis de frecuencias que propone Enright (1965) modificado para el caso que aquí interesaba. (Fuentes Pardo y Vargas, 1977).

RESULTADOS

En la tabla número 2 se han resumido los resultados obtenidos de los experimentos a corto plazo. Cada valor anotado corresponde al promedio de 5 medidas.

En la primera columna se anotó la hora del día a la que se llevaron a cabo los experimentos. En las siguientes columnas (2a., 3a. y 4a.) se incluyen los valores del coeficiente de respuesta CRs, calculado según se detalló en la sección de material y métodos, de cada una de las series. En las columnas 5a., 6a. y 7a., se presentan los valores de los coeficientes de caída calculados al comparar las diferencias del CRs entre cada serie (CC). La octava y novena columnas incluyen los promedios de los CRs y CC y, finalmente, en la décima columna se presenta el recíproco del promedio de las CC (CRc). Puede notarse que hay diferencias significativas entre los valores obtenidos a ciertas horas del día.

Para poner más claramente de manifiesto las diferencias a lo largo del nictámero, se construyeron las gráficas que forman las figuras 6 y 7. En la figura 6 puede comprobarse que al relacionar el coeficiente de respuesta CRs contra el tiempo en el que se hicieron los experimentos se presentan dos picos de actividad máxima a las 01 y a las 11 horas y dos puntos donde la respuesta es mínima y que corresponden a las 7 y a las 23 horas. En la figura 7, por otra parte, se incluyen

los valores promedios de los coeficientes de recuperación, CRC, contra las horas del día a las que se hicieron los experimentos. Resultan evidentes dos picos de capacidad de recuperación máxima obtenidos a las 01 y a las 07 horas y un pico de capacidad de recuperación mínima a las 17 horas.

En la figura 8, puede verse un ejemplo de período grama que se generó en la computadora alimentada con los datos de diferentes experimentos a largo plazo en los que se medía la actividad motora obtenida a intervalos de 20 minutos en condiciones constantes de ilumi nación y temperatura. Puede comprobarse que la función generada alcanza su valor máximo en el punto 75 lo que corresponde a un período de 22 horas 30 minutos ya que el tiempo transcurrido entre cada punto es de 20 minutos.

Finalmente en la figura No. 9 pueden observarse los resultados de establecer una correlación temporal entre un ciclo circádico cuyos valores de amplitud relativa y período fueron calculados por la computadora mediante la técnica del períodograma y los promedios de los CRs y los CRC respectivamente, obtenidos a lo largo del ciclo nictameral. Puede observarse que a las

01 horas hay una clara coincidencia entre los máximos de cada función.

D I S C U S I O N

El estado de excitabilidad de una estructura puede analizarse de diferentes maneras, si bien todas ellas indirectas. Debido a esto en este trabajo se emplearon dos criterios para detectar la sensibilidad del sistema fibra eferente-sinapsis-músculo del quelípedo del acocil: uno basado en la reactividad de las estructuras a la aplicación de estímulos de características determinadas (CRS) y otro, mediante el cual se juzgó la capacidad de recuperación de las estructuras medida a través de la magnitud de la respuesta a una siguiente estimulación aplicada después de intervalos de tiempo conocidos (CRc).

Los resultados que se presentan en la figura No. 6, ponen de manifiesto que el CRS alcanza su máximo valor a las 11 y a la 01 horas con un pico no despreciable a las 15 horas, mientras que a las 07 y a las 23 horas, se presentan los valores más bajos. La interpre

tación que se desprende de estos resultados es que - las estructuras involucradas en esta respuesta, modifican su reactividad a los estímulos de una manera sincrónica lo que permite que se detecten claramente las altas y las bajas a lo largo del ciclo nictameral.

Por lo que respecta a la CRC, la interpretación de los resultados que se incluyen en la figura No. 7, apuntan en la misma dirección señalada en el párrafo anterior ya que como puede observarse hay una mayor capacidad de recuperación también a las 01 horas, si - bien el segundo pico máximo se presenta a las 07 y no a las 11 horas y los puntos que corresponden a una capacidad de recuperación reducida sólo subrayan la terminación de las fases de respuesta máxima. Al relacionar los cambios en el CRS, con un ciclo de actividad circádica (Fig. No. 9) puede constatarse que el pico de las 01 horas y el pico de las 11 horas, coinciden con los dos ciclos de actividad motora que hacen que el ritmo circádico tenga carácter bimodal (Fuentes-Pardo, 1977; Fuentes-Pardo y Viccon Pale 1977).

Si, por otra parte, se comparan los cambios nictamerales que se observan en los valores de la CRC con

el mismo ciclo circádico motor, se puede comprobar que a las 01 horas vuelve a presentarse una coincidencia de máximos, lo que no sucede tratándose del segundo pico de cada función ya que entre ellos hay una diferencia de fase de dos horas.

Si se considera que el CRS es una medida de la excitabilidad del sistema y que el valor de la CRC efectivamente es un índice de la capacidad de recuperación del mismo, se puede proponer que a la una de la mañana el sistema formado por el nervio motor, la sinapsis neuromuscular y el músculo abductor se encuentran en un estado funcional óptimo, lo que le permite al sistema motor presentar un máximo de actividad a esa hora o, lo que es lo mismo, que la causa de que el acicil se comporte como corresponde a un animal nocturno, se basa en el aumento de sensibilidad durante ese lapso, de las estructuras involucradas en el movimiento. En el mismo contexto podemos interpretar el segundo pico circádico, como la manifestación de un aumento de la capacidad de responder a la estimulación por parte de las estructuras motoras. Sin embargo, esta capacidad no se ve aumentada a las 11 horas como lo está a las 01 horas. A este hecho habrá que añadir -

que la capacidad de recuperación de las estructuras no está aumentada en esos momentos, lo que da como resultado que el segundo pico de actividad, sólo alcance el 35% del valor del pico de la una de la mañana. La presencia de un segundo aumento en el índice de recuperación a las 07 horas, genera una situación difícil de explicar dentro del marco teórico que se está proponiendo. Sin embargo, es posible que como el CRS está muy reducido en esos momentos, el sistema se pueda recuperar muy fácilmente debido a que el consumo de energía en cada respuesta es sumamente bajo. (Fig. No. 9).

Nuestros resultados ponen de manifiesto un hecho particularmente interesante: los cambios que dependen de la hora del día no requieren de la integridad del organismo para manifestarse. Este punto de vista coincide con las ideas expresadas por distintos autores quienes han descrito cambios circádicos en estructuras aisladas: Sweeney (1960), demostró que el ritmo fotosintético del dinoflagelado Gonyaulax persiste en un organismo unicelular aislado. Thorp y Folk (1964), pusieron de manifiesto la persistencia de un ritmo diario en la frecuencia de latido de células aisladas de miocardio de mamífero. Strumwasser (1965), detectó

la existencia de un ritmo diario en la actividad eléctrica espontánea de neuronas del ganglio visceral de Aplysia. También en segmentos multicelulares aislados de organismos complejos, han sido detectados cambios circádicos: Enderle (1951) observa la persistencia de un ritmo diario en la turgencia en fragmentos de zanahoria. Bünning (1958), muestra cómo hay cambios periódicos en la contracción del intestino aislado del hámster. Andrews y Folk (1963), registran la persistencia de actividad rítmica en la expulsión de CO₂ de mesofilos aislados. Sánchez y Fuentes-Pardo (1977) describen la persistencia de un ritmo circádico en la respuesta a la luz de tallos aislados de acocil.

En algunos de estos trabajos se puede leer entre líneas la preocupación de los autores por entender los mecanismos responsables de que se genere una oscilación circádica. Evidentemente que muchos de estos experimentos apoyan la idea de que el ritmo circádico es el resultado de la interacción de osciladores cuya frecuencia de oscilación puede ser o no circádica. Particularmente interesante en este sentido resulta el planteamiento que hizo Winfree en el modelo electrónico que elaboró en 1967 con el que pretende explicar el o-

rigen de la ritmicidad circádica. En este trabajo se pone de manifiesto que de la interacción de osciladores cuya gama de frecuencia es tan amplia como el autor desea, se puede obtener una frecuencia de oscilación más baja que la de cada uno de los osciladores incluidos. La condición necesaria para que esto suceda es que haya acoplamiento entre los osciladores lo que es probable que se deba a la resonancia de las moléculas del medio. En los sistemas biológicos el autor propone que el acoplamiento entre los hipotéticos osciladores responsables de que se genere el máximo de una cierta función cada veinticuatro horas se deba a la presencia de sustancias del metabolismo, hormonas, señales eléctricas, etc. Cualquiera que sea el caso, los resultados que hemos presentado, apoyan la posibilidad de que las distintas estructuras involucradas en la respuesta mecánica del músculo modifican su sensibilidad a lo largo del día, por lo que estarían realmente actuando como osciladores. La inferencia válida que podría obtenerse de estos hechos, sería la de que al acoplarse, estos osciladores mediante señales procedentes del sistema nervioso y/o humoral, se generaría el ritmo circádico locomotor del acocil.

CONCLUSIONES

1.- Se obtuvieron registros de la respuesta mecánica del músculo abductor del dactilodito de acocil a la estimulación eléctrica aplicada al nervio excitatorio correspondiente, en preparaciones de pata aislada y durante las veinticuatro horas del día.

2.- Se analizaron registros de la actividad circádica motora del acocil obtenidos en condiciones constantes de iluminación y temperatura y por períodos no menores de 7 días. El análisis incluía la obtención del periodograma correspondiente.

3.- Se calcularon los llamados índice del coeficiente de respuesta (CRs) e índice de la capacidad de recuperación (CRc), los que se utilizaron como medidas de la sensibilidad del sistema.

4.- Se estableció la correlación temporal entre un ciclo circádico motor y el grado de sensibilidad de las estructuras motoras del sistema y se encontró coincidencia entre los máximos de ambos eventos. Se discuten las posibles causas de la correlación.

5.- Se propone una relación de causalidad entre

el estado de excitabilidad de las estructuras motoras
y la intensidad de la respuesta motora en el animal in
tegro.

TABLA No. 1

Duración	Luz	Oscuridad	Temp.
del período	26 h. 30 min.	23 h. 6 min.	19°C
Hora en que se presenta el punto máximo de actividad.	1 h.	1 h.	19°C
Duración del período de actividad.	7 h. 36 min.	9 h. 30 min.	19°C
Duración del período de reposo.	18 h. 54 min.	13 h. 35 min.	19°C
Relación α/e	.4	.7	19°C

En la presente tabla se muestran los resultados promedio, de los experimentos a largo plazo realizados para caracterizar el ritmo circádico motor, del acocíl Procambarus bouvieri. (Ver explicación en el texto).

TABLA No. 2

Hora	CRs 1a. Serie	CRs 2a. Serie	CRs 3a. Serie	CC1 CRs1- CRs2	CC2 CRs2- CRs3	CC3 CRs1- CRs3	Prome- dios CRs	Prome- dios CC	CRc
09	.87	.59	.51	.27	.08	.36	.65	.23	4.3
11	1.34	1.03	.85	.31	.17	.48	1.07	.32	3.1
13	.95	.80	.65	.15	.15	.30	.79	.19	5.2
15	1.21	.96	.73	.32	.23	.55	.99	.36	2.7
17	1.11	.72	.37	.38	.35	.74	.73	.48	2.0
19	.95	.72	.69	.22	.03	.25	.78	.17	5.8
21	.79	.71	.67	.08	.03	.11	.72	.07	14.2
23	.53	.46	.50	.06	.03	.03	.49	.02	50
01	1.09	1.07	1.07	.02	.00	.01	1.07	.01	100
03	.87	.91	.81	.03	.10	.06	.86	.04	25
05	1.02	.75	.77	.27	.02	.25	.85	.16	6.2
07	.36	.22	.33	.14	.11	.03	.30	.01	100

Se presentan los resultados de los experimentos agudos para determinar el grado de sensibilidad del sistema: nervio-sinapsis-músculo, a diferentes horas del día. (Ver explicación en el texto).

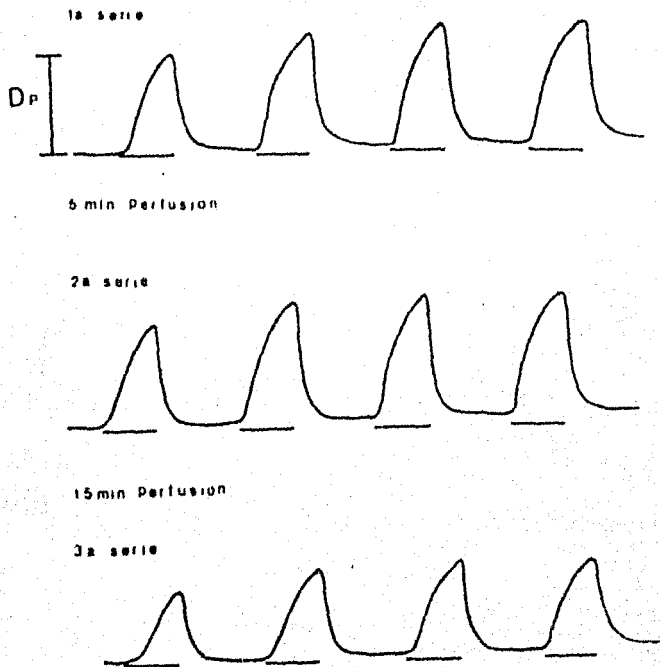


Figura No. 2.- Trazos tomados directamente del registro quimográfico, durante un experimento a corto plazo. Cada una de las tres series, se obtuvo con la aplicación de estímulos de las mismas características de intensidad, duración y frecuencia. La barra vertical corresponde a un desplazamiento (en cms.) de la pajilla. Las barras horizontales representan la duración del estímulo eléctrico.

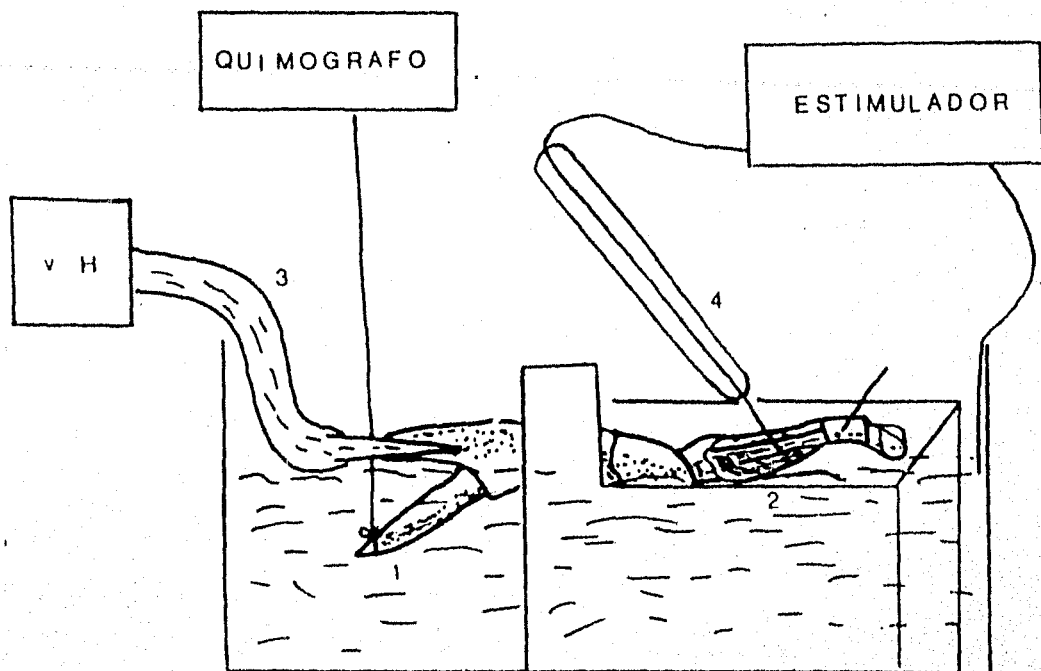


Figura No. 1.- Diagrama que representa la preparación biológica, sistema de estimulación y sistema de registro utilizados en los experimentos a corto plazo. 1.- Dactilopodito. 2.- Fibra nerviosa excitatoria del músculo abductor. 3.- Sistema de perfusión. 4.- Electrodo de estimulación.

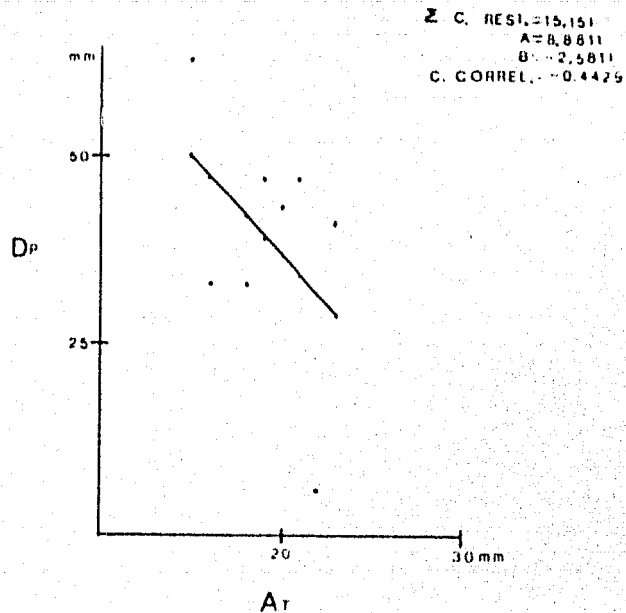


Figura No. 3.- Relación entre la abertura total (A_r) de la pinza y el desplazamiento de la pajilla (D_p) - provocado por un estímulo de características constantes. Al alimentar un programa de computadora con estos datos se obtuvo la curva cuya ecuación es la de una recta ($Y=BX+A$). Los valores de la pendiente y del intercepto, así como el Co. Correl se incluyen en el recuadro de la figura.

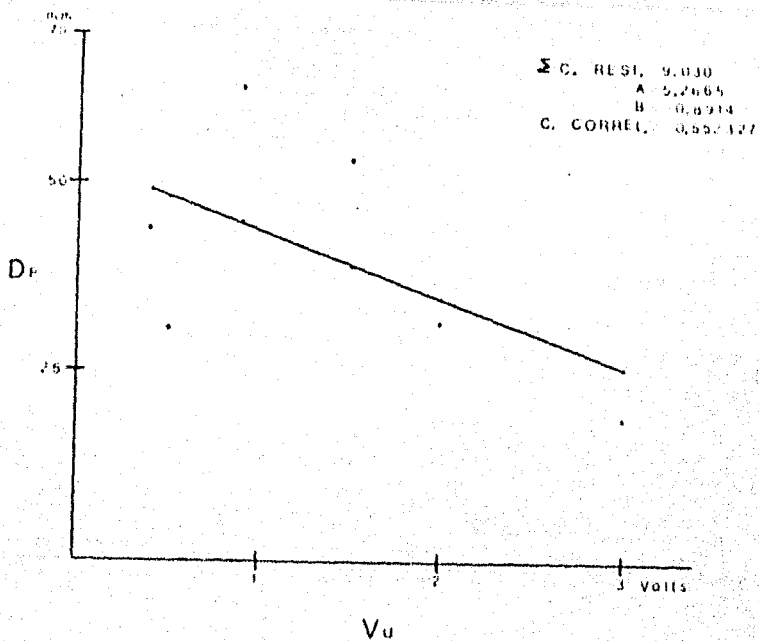


Figura No. 4.- Relación entre el voltaje umbral (V_u) y el desplazamiento de la pajilla (D_p), provocado al estimular ocreiopodos de la misma abertura total (A_t). Al alimentar un programa de computadora con estos datos se obtuvo la curva cuya ecuación es la de una recta ($Y=BX+A$). Los valores de la pendiente y del intersección, así como el coeficiente de correlación, se incluyen en el recuadro de la figura.

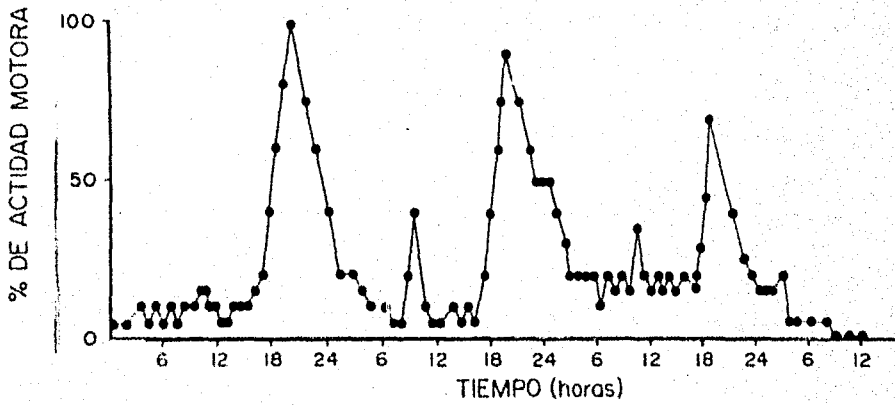


Figura No. 5.- Registro de la actividad motora obtenido en condiciones constantes de luz y temperatura. Notese que hay un ritmo circádico de tipo bimodal con el pico máximo cerca de la una A.M. y el segundo pico alrededor de las 11 hrs.

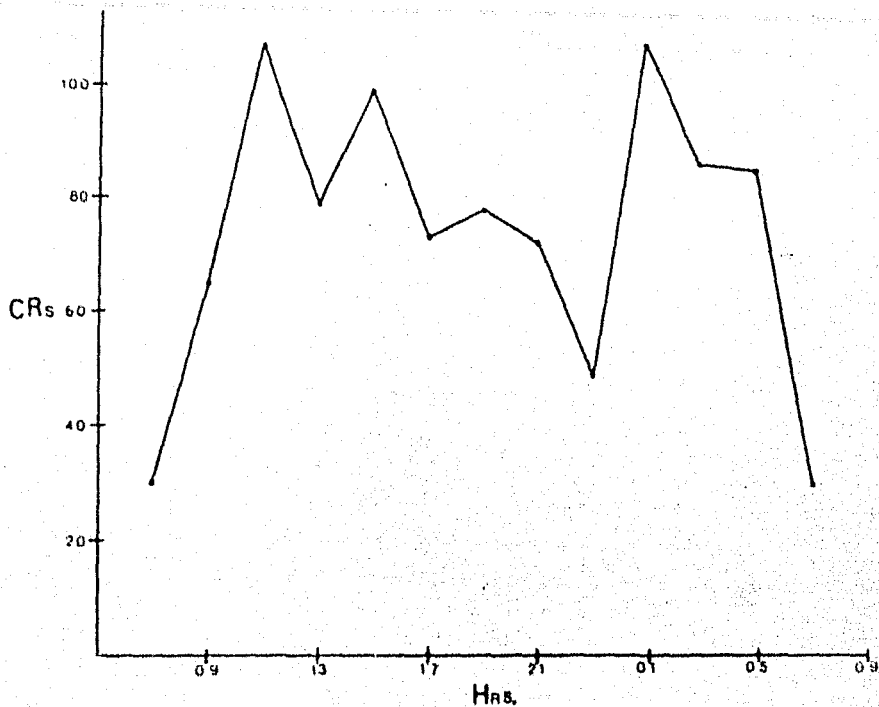


Figura No. 6.- Relación entre la hora del día y la sensibilidad del sistema formado por el nervio-sinapsis-músculo abductor, juzgada por los valores del coeficiente de respuesta CRs. Nótese que la máxima sensibilidad se presenta a las 11 y a las 01 A.M.

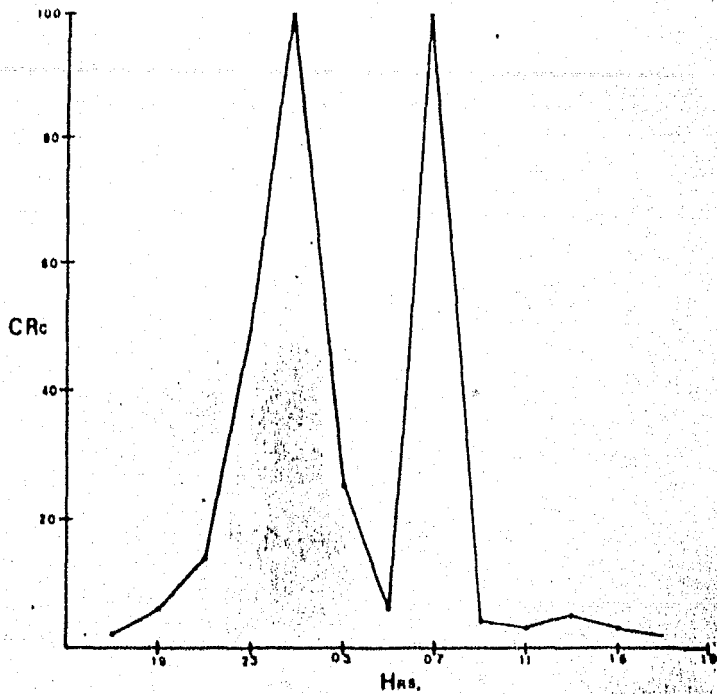


Figura No. 7.- Relación entre la hora del día y la sensibilidad del sistema formado por el nervio-sinapsis-músculo abductor, juzgada por los valores del coeficiente de recuperación (CRc). Nótese que la máxima sensibilidad se presenta a las 07 y 01 hrs.

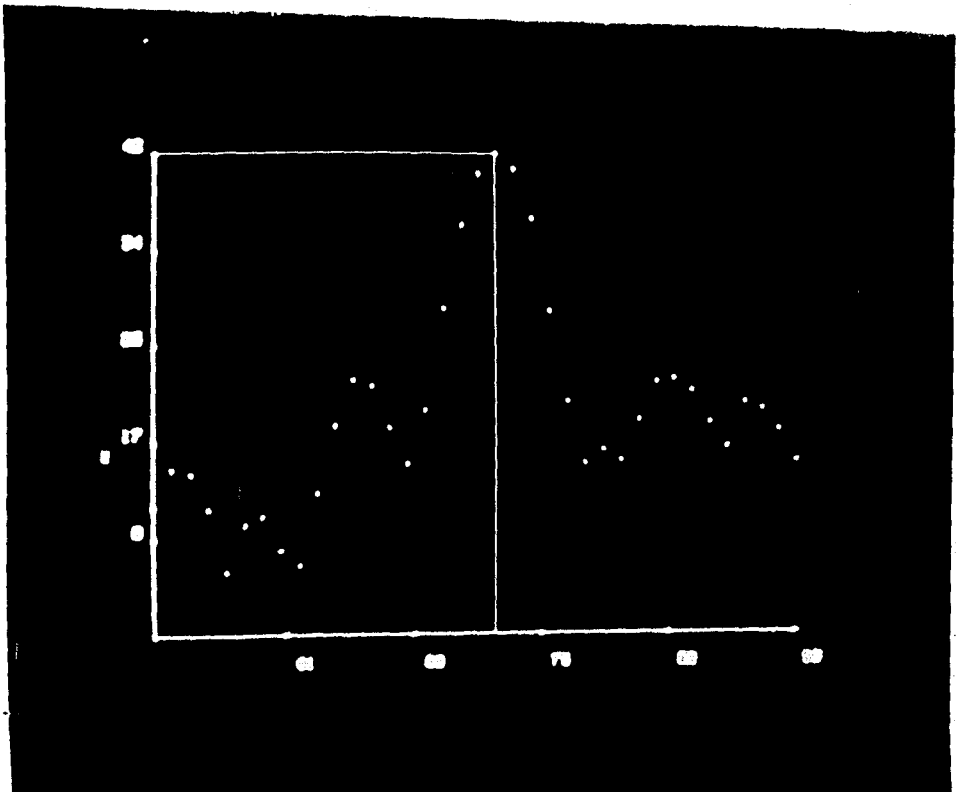


Figura No. 8.- Fotografía de un periodograma obtenido de la computadora al ser alimentada con los valores de cantidad de movimiento durante intervalos de 20 minutos.- Nótese que la frecuencia de períodos más alta corresponde al punto 75, lo que equivale a una duración del período circádico de 22 horas 30 minutos.

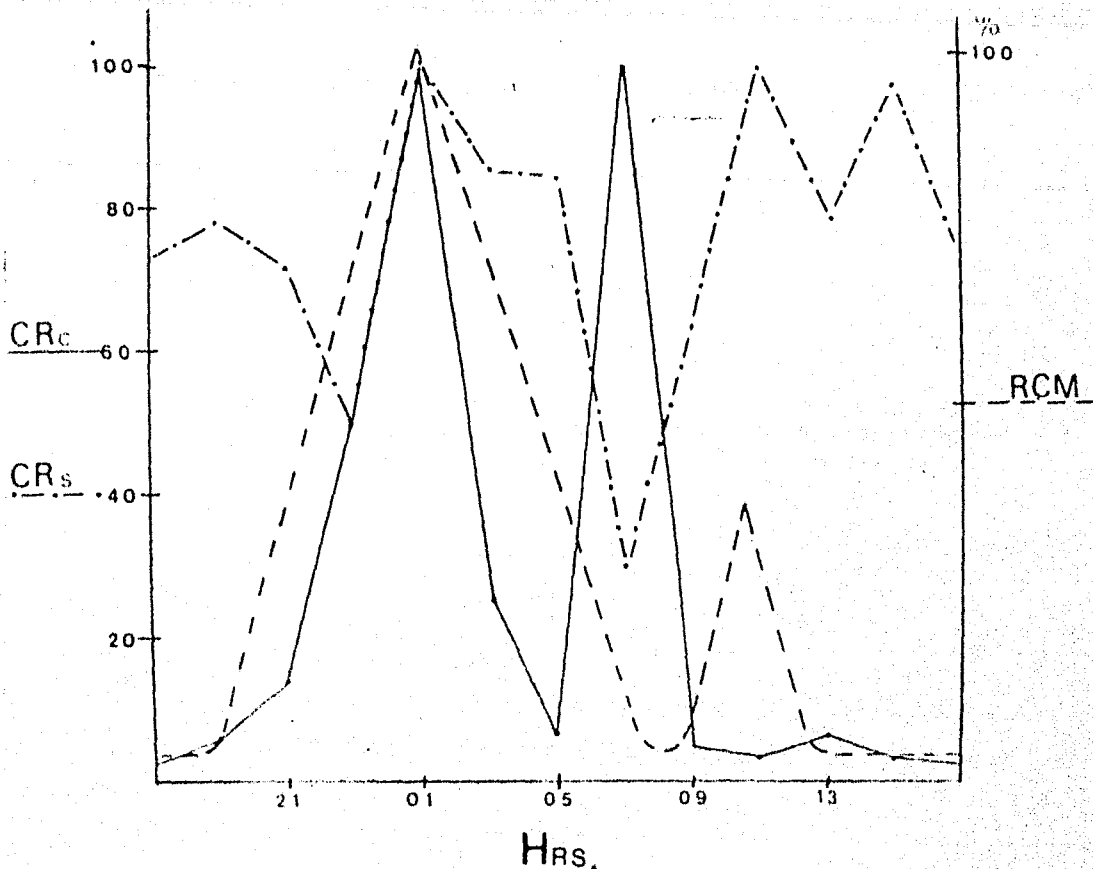


Figura No. 9.- Correlación temporal entre los fenómenos registrados a corto plazo ($CR_c^{(-)}$ y $CR_s^{(-)}$) que son índice de la sensibilidad del sistema fibra nervioso sinapsis-músculo abductor y un ciclo circádico motor⁽⁻⁻⁻⁾. Nótese la coincidencia entre los máximos de los fenómenos, así como la falta de coincidencia entre el 2o. pico circádico y el 2o. pico de la CRc. (ver explicación en el texto).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Aréchiga, H. & Wiersma, C. A. G., 1969. Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.*, 1: 71-85.
- 2.- Aschoff, J. 1960. Exogenous Components in Circadian Rythms. In: *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor. Symposium on Quantitative Biology., 25: 11-28.
- 3.- Aschoff, J., 1966. Circadian Activity pattern with two peaks. *Ecology*, 47: 657-662.
- 4.- Bünning, E., 1958b. Das Weiterlaufen der "Physiologischen Uhr" im Sängerdarm ohne zentrale Steuerung. *Naturwiss.*, 45: 68-77.
- 5.- Bünning, E., 1960. Opening adress: Biological clocks. Cold. Spring Harbor Symp. - quant. Biol. *Biological Clocks*, 25:1-9.
- 6.- Ellis, C. H., Thienes, C. H. & Wiersma, C. A. G., 1942. The influence of certain drugs on the crustacean nerve-muscle system. *Biol. Bull. Woods Hole*, 33: 334-351.
- 7.- Enderle, W., 1951. Tagesperiodische Wachstums und Turgorschwankungen an Gewebekulturen. *Planta*, 39: 590-588.
- 8.- Enright, J. T., 1965b. The search for rhythmicity in biological time series. *J. Theoret. Biol.*, 8:426-468.
- 9.- Fuentes-Pardo, B., & Inclan-Rubio, V., 1974. Analysis of the correlation between two circadian rhythms in the crayfish. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.* XI:26: 1123.

- 10.- Fuentes-Pardo, B. y Vargas-Ortega, E., 1977. El empleo de las matemáticas en el estudio de los ritmos circádicos. res. - XIII Congreso Lat. de Ciencias Fisio. y XX Congreso Nal. de Ciencias Fisio., p:
- 11.- Guyselman, J. B., 1957. Solar and lunar rhythms of locomotor activity in the crayfish Cambarus virilis. Physiol. Zool., 30: 70-87.
- 12.- Kalmus, H., 1938a. Das Aktogramm des flusskreb ses und seine Beeinflussungsdurch Organextrakte. Z. vergl. Physiol., 25: 798-802.
- 13.- Page, T. L. & Larimer, J. L., 1972. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. J. Comp. Physiol., 78: 107-120.
- 14.- Page, T. L. & Larimer, J. L. 1975. Neural Control of Circadian rhythmicity in the Crayfish, J. Comp. Physiol., 97:59-80
- 15.- Pfeffer, W., 1873. Physiologische Untersuchungen. Leipzig. Citado por Bünning (1960).
- 16.- Pfeffer, W., 1875. Die periodischen Bewegungen der Blattoorgane. Leipzig. Citado por Bünning (1960).
- 17.- Pfeffer, W., 1915. Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Schlafbewegungen. Abhandl. Math. Phys. Kl. Kön. Sächs. Ges. d. Wiss., 34:1-154. Citado por Bünning (1960).
- 18.- Pittendrigh, C. S., 1965. On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In: Circadian clocks North Holland publishing Co., Amsterdam.

- 19.- Roberts, T. W., 1944. Light, eyestalk chemical, and certain other factors as regulators of community activity for the crayfish, Cambarus virilis Hagen. Ecol. Monogr., 14: 360-392.
- 20.- Robbins, J. and W.G. Van der Kloot, 1958. The effect of Picrotoxin on peripheral inhibition in the Crayfish. J. Physiol. 143: 541-552.
- 21.- Sánchez, J. A. & Fuentes-Pardo, B., 1976. Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 56:601-605.
- 22.- Schallek, W., 1942. Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. J. Exp. Zool., 91: 155-166.
- 23.- Strumwasser, F., 1965. The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neuron. In: Circadian Clocks ed.: J. Aschoff, Amsterdam, North-Holland, pp. 442-462.
- 24.- Sweeney, B. M., 1960. The photosynthetic rhythm in single cells of Gonyaulax polyedra. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25:165-148.
- 25.- Thorp, G. D. & Folk, G. E., 1964. Rhythmic changes in rate of the mammalian heart cells during prolonged isolation. Comp. Biochem. Physiol., 14:255-273.
- 26.- Van, Harreveld, A., 1936. A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 34:428-432.
- 27.- Van Harreveld, A. & Wiersma, C.A.G., 1937. The triple innervation of crayfish muscle and its function in contraction and inhibition. J. Exptl. Biol., 14: 448-461.

- 28.- Viccon-Pale, J. A. y Fuentes-Pardo, B., 1977. Cambios de excitabilidad durante un ciclo circádico motor en el acocil Procambarus bouvieri Res. XIII Congreso Lat. de Ciencias Fisio. y XX Congreso Nal. de Ciencias Fisio., p: 260
- 29.- Welsh, J. H., 1939. The action of eyes talk extracts on retinal pigment migration in the crayfish Cambarus bartoni. Biol. Bull., 77:119-123.
- 30.- Welsh, J. H., 1941. The sinus glands and 24-hours cycles of retinal pigment migration in the crayfish. J. Exp. Zool., 86: 35-49.
- 31.- Winfree, A. T., 1967. Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. J. Theoret. Biol., 16: 15-42.