

00381

6
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CAMBIOS RÍTMICOS EN EL CONTENIDO DE SEROTONINA
DEL CEREBRO Y TALLOS OCULARES DEL ACOCIL
DURANTE EL DESARROLLO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(B I O L O G Í A)

P R E S E N T A

M. EN C. OSCAR CASTAÑÓN CERVANTES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA LUISA FANJUL PEÑA

MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999
273137



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.

**CAMBIOS RÍTMICOS EN EL CONTENIDO DE SEROTONINA
DEL CEREBRO Y TALLOS OCULARES DEL ACOCIL
DURANTE EL DESARROLLO**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de la Facultad de Ciencias de la U.N.A.M. y en el Laboratorio de Bioquímica de la Visión del Whitney Laboratory, Universidad de Florida, bajo la dirección de la Dra. María Luisa Fanjul Peña. Parte de este trabajo recibió apoyo de PAEP 2316, PAPIIT IN-209397, NSF IBN 9631565 y de CONACyT a través de la beca con No. de registro 86214.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

En este momento, no tengo certeza sobre tu existencia en el futuro. Aún no sé si este trabajo llegará finalmente a formar parte de tus acervos como lo que hasta ahora has sido...*la Universidad*". Quiero pensar que con todas las limitaciones que tiene, y desde luego, toda proporción guardada, esta tesis representa lo que realmente es o fue la UNAM. Ciertamente es que muchos te han usado y se han servido de ti para mancharte, humillarte y quizá incluso, para liquidarte. Son tus propios hijos, aquellos que hace años acogiste en tus aulas para enseñarles a escuchar la voz del espíritu, los que te han traicionado. No sé si has podido sobrevivir, quiero pedirte perdón por no haber sabido defenderte y quiero dedicarte este trabajo como tributo a tantos años de enseñanza. Tú sabes que aprecio en todo lo que vale la educación que de ti he recibido y que, como yo, hay muchos y muchas más que para siempre llevaremos con orgullo tu nombre. Aunque ya no existas, aunque te hayan convertido en un títere más, te amaremos y honraremos siempre con nuestro trabajo. Con el sentimiento más profundo de amor y respeto te dedico esta tesis, pues la enseñanza laica, crítica, y científica que me has otorgado sólo puede valorarse realmente cuando a cambio no me has exigido nada.

Muchas gracias a todas y todos aquellos que me han brindado ayuda, críticas, y sobre todo, a aquellos que tratan de ofrecerme su amistad sincera a pesar de mis obvios descuidos de trato. Por favor, de veras, perdonen si en algún momento (más bien siempre ¿verdad?) he sido duro o he parecido grosero. ¡Mil gracias por siempre!

El apoyo del jurado revisor de este trabajo me permitió enriquecerlo, a todos ellos, y sobre todo a Ma. Luisa Fanjul, muchas gracias por el apoyo recibido durante estos años vitales en mi formación profesional. Igualmente, no puedo dejar de agradecer las enseñanzas de la ciencia y de la vida a la Dra. Barbara Battelle.

Gracias también, al CONACyT, por el apoyo que a través de becas, me ha brindado durante mis estudios de posgrado, y también, al Dr. León Cintra, por ese apoyo fraterno de ayer, hoy y mañana.

En particular, gracias a Margarita, mi única fuente de inspiración durante muchos años. Gracias Mamá por haber hecho lo que hiciste, por haber sido como eres y por estar conmigo en todo momento, en los hechos, en la mente y en el corazón. Un besote muy especial al resto de mi familia, y un pensamiento de mucha ternura y amor para Cibeles, Carlitos y Rodrigo por ayudarme a sonreír siempre.

Susana: Sin tu paciente apoyo no hubiera terminado nunca este trabajo. Gracias por llegar y quedarte conmigo, por amarme y dejarte amar, porque al llegar a mi vida abriste un lugar que no conocía en mi corazón....¡Te amo!

¡A todas, a todos, de verdad, muchas gracias por ayudarme a ser feliz haciendo lo que me gusta!



Oscar Castañón Cervantes
1999.

CONTENIDO

I.	Resumen	3
II.	Antecedentes	5
	1. El reloj biológico: Una adaptación para medir el tiempo	5
	2. Ontogenia de los sistemas circadianos en los invertebrados	6
	3. Ontogenia de dos ritmos circadianos en el acocil	8
	4. Cambios en el ritmo de sensibilidad visual durante el desarrollo	8
	5. Cambios en el ritmo de actividad locomotora durante el desarrollo	10
	6. Identificación de neuronas serotoninérgicas en el acocil	12
	7. El papel de la serotonina en la expresión de ritmos circadianos	13
III.	Planteamiento del problema	18
IV.	Hipótesis	19
V.	Objetivos	19
VI.	Materiales y métodos	20
	1. Animales	20
	2. Protocolo experimental	20
	a) Grupo en condiciones de sincronización	20
	b) Grupo en condiciones de oscilación espontánea	21
	3. Neuroquímica y cuantificación de serotonina	23
	4. Análisis de datos	24

VII. Resultados	25
1. Identificación de serotonina en los extractos	25
2. Cambios en el contenido de serotonina durante el desarrollo	27
3. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil PO2	28
a) Ciclos luz-oscuridad	28
b) Luz constante	32
4. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil juvenil	36
a) Ciclos luz-oscuridad	36
b) Luz constante	39
5. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil adulto	43
a) Ciclos luz-oscuridad	43
b) Luz constante	46
6. Síntesis de resultados	50
VIII. Discusión	52
1. Identificación de serotonina en los extractos	52
2. Cambios en el contenido de serotonina durante el desarrollo	52
3. Relación entre diversos ritmos endógenos durante el desarrollo	55
4. Posibles ritmos de proteínas totales y peso húmedo	57
IX. Conclusiones	59
X. Perspectivas	60
XI. Referencias	61
XII. Apéndice. Publicación en revista internacional arbitrada	66

I. RESUMEN

En este trabajo se investigaron los cambios circadianos en el contenido de 5-hidroxitriptamina (Serotonina, 5-HT) durante el desarrollo del acocil *Procambarus clarkii*, en dos estructuras propuestas como marcapaso: el ganglio cerebroide y los tallos oculares. Acociles ($N=298$) de tres estados de desarrollo fueron divididos en dos grupos: 1) Animales sincronizados a ciclos luz-oscuridad 12:12 durante 10 días; 2) animales sincronizados del mismo modo y enseguida expuestos a 72 h de iluminación continua tenue. Los animales de ambos grupos fueron sacrificados a diferentes horas del día y enseguida se extrajeron los tallos oculares y el cerebro de cada uno. En ambas estructuras se cuantificó el contenido de 5-HT por Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC) con detección electroquímica. En todos los estados de desarrollo, el contenido de 5-HT (expresado por peso húmedo como $\mu\text{g g}^{-1}$) mostró variaciones diarias en ambas estructuras analizadas. El contenido de 5-HT también fue expresado por estructura y en función del contenido de proteínas totales. Los ritmos detectados oscilaron libremente bajo condiciones constantes. En general, el contenido de 5-HT fue mayor en el cerebro ($\bar{x} \pm \text{EEM}$, $0.655 \pm 0.039 \mu\text{g g}^{-1}$) que en los tallos oculares ($0.337 \pm 0.021 \mu\text{g g}^{-1}$). Al avanzar el desarrollo, los resultados sugieren que variaciones ultradianas de 5-HT se encuentran sobrepuestas en un componente circadiano de baja amplitud que no fue fácilmente detectado. Se discute la relación entre el ritmo de 5-HT y los ritmos circadianos de sensibilidad visual y actividad locomotora. Existen cambios diarios en el contenido de proteínas totales que merecen ser estudiados. Se concluye que los ritmos de 5-HT observados son de naturaleza endógena, siendo la expresión de al menos, un oscilador o grupo de osciladores relacionado con el sistema serotoninérgico que es funcional desde el segundo estado postembrionario.

ABSTRACT

The current study reports developmental circadian changes in the content of 5-hydroxytryptamine (Serotonin, 5-HT) in two structures proposed to contain pacemakers in crayfish *Procambarus clarkii*: the cerebral ganglion and the eyestalks. Crayfish ($N=298$) from three developmental stages were divided into two groups: (1) animals entrained to 12 h :12 h light: dark cycles for 10 days; (2) animals entrained as described above, then exposed to 72 h of continuous dim light. Crayfish from both groups were sacrificed at different times of day, and the cerebral ganglion and the eyestalks of each were assayed for 5-HT by reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with electrochemical detection. In all stages of development, 5-HT content (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ tissue wet mass) showed daily variations in both structures analyzed. The 5-HT content was also expressed per structure and per protein content. Rhythms continued to free-run under constant illumination, and total 5-HT content was higher in the brain ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $0.655 \pm 0.039 \mu\text{g g}^{-1}$) than in the eyestalks ($0.337 \pm 0.021 \mu\text{g g}^{-1}$). As development proceeded, results indicated that pulsatile variations in 5-HT content are superimposed in a very damped circadian component not easily detected in this work. The relationship between the 5-HT rhythm and electroretinogram and motor activity rhythms during development is discussed. There are daily changes in protein content which deserve further studies. It is concluded that the rhythms of 5-HT content observed, emerge endogenously from the expression of at least one pacemaker oscillator coupled to the serotonergic system, and functional from the second postembryonic stage.

II. ANTECEDENTES

1. *El reloj biológico: Una adaptación para medir el tiempo*

Los ritmos biológicos son la expresión de un sistema complejo de osciladores que interaccionan para proveer a los seres vivos de un medio eficaz para medir el tiempo. Este sistema, también conocido como reloj biológico, ha evolucionado en íntima relación con los cambios diarios del ambiente en el que se ha desarrollado la vida en la Tierra.

De entre los cambios diarios del ambiente, el ciclo luz-oscuridad (LO) es la principal referencia temporal con que el reloj biológico ajusta cotidianamente sus oscilaciones, las cuales son generadas endógenamente. De esta forma, el reloj biológico es capaz de mantener una adecuada correspondencia entre el tiempo de las funciones internas y el tiempo externo, fenómeno conocido como sincronización.

Por lo anterior, es evidente que la función adaptativa del reloj biológico sólo puede entenderse a partir de su interacción cotidiana con los ciclos del ambiente; pues sin éstos, las oscilaciones circadianas (aquellas que completan un ciclo aproximadamente cada 24 h), no podrían asegurar que los diversos procesos fisiológicos ocurrieran en los tiempos más adecuados para el organismo.

De lo anterior se deduce que la evolución de los ritmos circadianos tiene una importancia fundamental en la historia de la vida en la Tierra. La ritmicidad circadiana está presente a lo largo de toda la escala filogenética. Evidentemente, una característica tan conservada es muy importante para la vida (Castañón-Cervantes, 1996). Por lo tanto, la ritmicidad circadiana ha sido el campo de estudio preferido para investigar el funcionamiento del sistema biológico de medición de tiempo. Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos que pudieran explicar cómo funciona el reloj biológico es todavía limitado.

La cronobiología, es una disciplina relativamente reciente y ha sido muy difícil pasar de la simple descripción de fenómenos rítmicos a la estructuración de modelos que expliquen los mecanismos implicados en el funcionamiento de este sistema complejo de osciladores en permanente interacción con los ciclos del ambiente.

Tradicionalmente, un estudio fisiológico que intenta abordar el problema del origen de las oscilaciones circadianas, intenta identificar estructuras específicas responsables de las oscilaciones en algún lugar dentro del organismo (Reinberg y

Smolensky, 1993). Estas estructuras, identificadas como el reloj, son capaces de generar las oscilaciones endógenas, transmitir las señales de tiempo a otras partes del organismo (función de marcapaso), y además, sincronizarlo con el ambiente (Aguilar-Roblero, 1993). Con esta aproximación, en los vertebrados por ejemplo, estructuras como la retina (Tosini y Menaker, 1998), el complejo pineal (Underwood, 1989, 1992; Tosini y Menaker, 1995; 1998) y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972) han sido descritas como relojes biológicos independientes, capaces de generar ritmos circadianos en condiciones de aislamiento del resto del organismo y libres de señales temporales externas.

La identificación de estas estructuras, ha comenzado a dar luz sobre los mecanismos que determinan el funcionamiento del reloj biológico. Sin embargo, para comprender mejor cómo funciona este sistema, es necesario complementar las aproximaciones experimentales anteriores. Esto es posible a través del estudio del desarrollo de los sistemas circadianos, que como se dijo, son los sistemas más estudiados. Partiendo del conocimiento de las estructuras descritas como relojes circadianos, y a través del estudio del desarrollo de los sistemas donde estas estructuras funcionan, es posible investigar cómo el sistema biológico de medición de tiempo (varios osciladores) trabaja coordinadamente y cómo esta coordinación va evolucionando durante la ontogenia.

2. Ontogenia de los sistemas circadianos en los invertebrados

La ontogenia de los sistemas circadianos, se refiere al conjunto de procesos anatómicos, neurofisiológicos y neuroendocrinos implicados en el desarrollo y activación de estructuras y funciones que proveen al organismo de un sistema de *organización temporal durante su ciclo vital*. Incluye los medios por los cuales las partes del sistema surgen y se organizan, los mecanismos que guían esta emergencia, así como las causas y efectos de la pérdida de organización con la edad (Davis, 1981). Las distintas funciones de cualquier ser vivo se van organizando y manifestando a través del tiempo, es decir, todo el sistema biológico emerge y comienza a comunicarse poco a poco hasta alcanzar su grado de madurez, tanto en estructura como en función (Castañón-Cervantes, 1996).

Para estudiar la forma en que surge una función ampliamente conservada como la ritmicidad circadiana, es importante elegir modelos biológicos que permitan abordar los problemas que buscan resolverse. Los invertebrados, son animales menos complejos estructuralmente, con sistemas nerviosos más pequeños y con menos neuronas que los vertebrados. En los invertebrados, también diversas estructuras como el ojo de *Aplysia californica* (Eskin, 1979), el cerebro de *Limulus polyphemus* (Barlow y Chamberlain, 1980), y el lóbulo óptico de *Procambarus*

clarkii (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Larimer y Smith, 1980), han sido caracterizadas como posibles sitios de localización de relojes biológicos. Por lo tanto, estos animales representan una buena opción para la investigación de los mecanismos que van derivando en el funcionamiento coordinado del reloj biológico durante el desarrollo de un organismo.

En el estudio de la ontogenia de los sistemas circadianos de los invertebrados, un aspecto importante se refiere a la relación entre la aparición de un ritmo y el desarrollo del oscilador que lo controla. En general, se ha comprobado que la capacidad del oscilador para generar ritmos, antecede a la capacidad de sincronización de éstos (Davis, 1981). Es durante el desarrollo, que las vías de acoplamiento entre las diferentes partes del sistema van madurando y entrando en contacto entre sí para funcionar finalmente de manera adecuada. Si aceptamos que el sistema circadiano cambia durante el desarrollo, cabe ahora preguntarse, ¿qué es lo que causa estos cambios?; ¿qué determina la estructura específica del sistema?; por ejemplo, ¿qué determina que como adulto, un animal sea diurno o nocturno?. ¿Podemos asumir que la organización temporal de un adulto es propiedad emergente de un sistema determinado genéticamente, o acaso, el ambiente también influye al darle forma?. Al igual que ocurre con el desarrollo anatómico, es claro que ambas partes dan forma final al sistema, ya que hasta cierto punto, cambios en el ambiente pueden alterar el desarrollo de un reloj o marcapaso circadiano. Por ejemplo, en la cucaracha *Leucophea maderae*, la expresión de ritmicidad circadiana, no requiere exposición previa de los animales a ciclos LO de 24 h, sin embargo, si durante la etapa larvaria, el sistema es expuesto a ciclos LO diferentes de 24 h, el periodo del ritmo en oscilación espontánea dependerá de las condiciones de iluminación a las cuales haya estado expuesto durante el desarrollo (Page y Barret, 1989).

En muchos animales, pero particularmente en los invertebrados, una característica importante es la adquisición de independencia locomotora prácticamente desde el momento del nacimiento. Debido a que es relativamente sencillo detectarla, esta conducta ha sido ampliamente investigada en el estudio del desarrollo de los sistemas circadianos. En este sentido, se han descrito algunas características de la ontogenia del ritmo locomotor del grillo (Tomioka y Chiba, 1982), la cucaracha (Page y Block, 1980; Page, 1990), el caracol (Blanc, 1993) y del acocil (Fanjul-Moles *et al.*, 1996; Miranda-Anaya *et al.*, 1997; Fanjul-Moles *et al.*, 1998). Este último, ha sido un modelo tradicionalmente empleado en cronobiología. En años recientes, dos ritmos circadianos en el acocil: el de amplitud del electroretinograma y el de actividad locomotora, han sido objeto de amplias investigaciones tendientes a esclarecer el funcionamiento del sistema circadiano de este animal durante el desarrollo. Son precisamente éstos y otros estudios relacionados, los antecedentes más importantes de este trabajo.

3. Ontogenia de dos ritmos circadianos en el acocil

Durante el desarrollo del acocil *Procambarus clarkii*, diferentes ritmos circadianos se expresan con diferente curso temporal. Los ritmos del electroretinograma y actividad locomotora se manifiestan en diferentes etapas del desarrollo y algunos parámetros, por ejemplo, el período y las relaciones de fase que se establecen con los ciclos LO son muy diferentes entre ambos ritmos. Por lo tanto, es probable que estos dos ritmos con tiempos de maduración distintos, sean la expresión de relojes o marcapasos circadianos diferentes; o bien, que el acoplamiento entre el oscilador y los elementos efectores de cada ritmo requiera de tiempos distintos para madurar (Castañón-Cervantes *et al.* 1999). Algunas de las investigaciones más recientes sobre la ontogenia del ritmo circadiano del electroretinograma y del ritmo locomotor (Escamilla-Chimal *et al.* 1998; Fanjul-Moles, 1998) han sugerido que el funcionamiento del oscilador o los osciladores subyacentes, podría ser modificado por la presencia de neurohormonas y/o neuromoduladores.

4. Cambios en el ritmo de sensibilidad visual durante el desarrollo

El ritmo circadiano de sensibilidad visual del acocil adulto se puede registrar mediante los cambios en la amplitud del electroretinograma (Aréchiga y Wiersma, 1969; Aréchiga y Fuentes, 1970). Durante la ontogenia, el electroretinograma de *P. clarkii* cambia. Durante las primeras semanas de edad (Fig. 1A), los animales manifiestan un ritmo con frecuencia ultradiana con períodos de entre 15 minutos y 4 horas. Al avanzar el desarrollo, y cerca de los 60 días de edad (Fig. 1B), ya es evidente un ritmo manifiesto con características circadianas, aunque aún distinto al del un animal de aproximadamente 140 días de edad (Fig. 1C), que presenta un ritmo circadiano típico de un animal de hábitos nocturnos (Fanjul-Moles *et al.* 1987).

En el adulto, los mecanismos neuroendocrinos que determinan la expresión del electroretinograma son complejos (Aréchiga *et al.* 1993). Se ha propuesto que la secreción circadiana de diferentes neurohormonas podría afectar la sensibilidad del ojo a la luz (Aréchiga *et al.* 1990; Garfias *et al.* 1995). La amplitud del electroretinograma de un animal adulto depende de las características fisiológicas de tres tipos de estructuras: 1) cambios en la ganancia de los fotorreceptores retinianos; 2) cambios en la posición del pigmento proximal; y 3) cambios en la posición del pigmento distal. El movimiento circadiano de estos pigmentos actuando como una pseudo pupila, modifica directamente la entrada de luz a los fotorreceptores, y por lo tanto, es esencial para determinar los cambios en la respuesta eléctrica del ojo. Se ha reportado que distintos neurotransmisores

procedentes del cerebro y/o del mismo tallo ocular, como la 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) (Aréchiga *et al.* 1990) y la hormona concentradora de eritróforos (Gaus y Stieve, 1992; Garfias *et al.* 1995), modifican directamente la amplitud del electroretinograma y favorecen el movimiento de los pigmentos retinianos accesorios. Lo anterior sugiere que la expresión tardía del ritmo de amplitud del electroretinograma podría estar relacionada con la maduración del complejo órgano X – glándula sinusal. Esta glándula se encuentra entre la medulla externa y terminallis del lóbulo óptico, y contiene fibras procedentes del cerebro (Fanjul-Moles *et al.* 1987; Fuentes-Pardo *et al.* 1992). Algunas de estas fibras contienen 5-HT (Sandeman *et al.* 1990), y se ha sugerido que en los cambios observados durante el desarrollo del ritmo de sensibilidad visual, esta amina podría jugar un papel importante (Escamilla-Chimal *et al.* 1998).

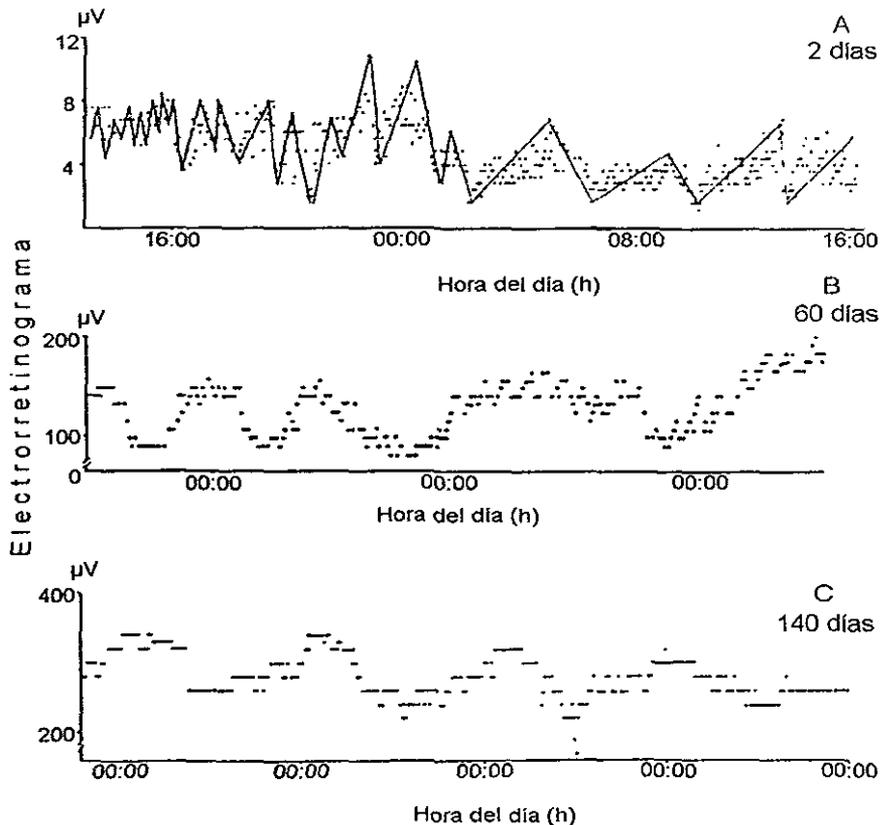


Figura 1. Desarrollo del ritmo de amplitud del electroretinograma durante la ontogenia del acocil. El ritmo cambia de ultradiano a partir de la eclosión (A) a circadiano en el juvenil de diferentes edades (B, C). La edad en días de cada animal se indica a la derecha de cada panel. Modificado de Fanjul-Moles *et al.* 1987.

5. Cambios en el ritmo de actividad locomotora durante el desarrollo

A partir de la adquisición de independencia locomotora, el acocil *P. clarkii* manifiesta un ritmo circadiano de actividad. Bajo condiciones de oscilación espontánea (aislado de señales externas de tiempo), este ritmo circadiano es unimodal, y se expresa desde el inicio de la ontogenia. Bajo condiciones de sincronización el ritmo locomotor es bimodal, manifestando un pico endógeno y uno exógeno, este último, aparece o no, dependiendo del grado de madurez del ojo del animal (Fanjul-Moles *et al.* 1996; Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fanjul-Moles *et al.* 1998). Probablemente el cambio más importante durante el desarrollo de este ritmo, es el aumento en la capacidad de sincronización. Aunque ésta se manifiesta desde la eclosión, los animales más jóvenes, tienen menor probabilidad de que este ritmo sea sincronizado por ciclos de luz (Fig. 2A), y además, tienen menor probabilidad de expresar un ritmo locomotor evidente. Al avanzar el desarrollo aumenta la probabilidad de manifestación de ritmo circadiano y de sincronización del mismo a ciclos LO (Fig. 2B). Estos ciclos pueden ser tan asimétricos como por ejemplo, ciclos LO 20:4 (Fanjul-Moles *et al.* 1998).

En el acocil adulto, y en estudios durante el desarrollo, la evidencia experimental ha sugerido que el posible reloj circadiano responsable del control del ritmo locomotor se encuentra en el protocerebro del ganglio cerebroide del animal (Barrera-Mera y Block, 1990; Fanjul-Moles, 1998). El papel de otras estructuras en este ritmo, como los tallos oculares, parece limitarse a la acción de alguna secreción o neurotransmisor que pudiera inhibir tónicamente la actividad de las extremidades ambulatorias, ya que la ablación de los tallos oculares ocasiona un incremento de la actividad locomotora, que no obstante, sigue manifestando un ritmo circadiano por varios días (Page y Larimer, 1976). Sin embargo, el control rítmico de la locomoción del acocil es mucho más complejo. Otras estructuras como los conectivos circunesofágicos (Gordon *et al.* 1977; Page y Larimer, 1975), los fotorreceptores del sexto ganglio de la cadena nerviosa ventral (Prosser, 1934; Page y Larimer, 1976) y los fotorreceptores extrarretinianos del ganglio cerebroide reportados en otra especie (Sandeman *et al.* 1990) parecen estar involucrados en diversos grados en el control de la actividad locomotora. Page y Larimer (1975) demostraron que al aislar los centros torácicos motores del cerebro por medio de la sección de los conectivos circunesofágicos, el ritmo locomotor de *P. clarkii* desaparece. Estos autores han propuesto que el posible reloj circadiano del ritmo de actividad se encuentra en el cerebro, y que se acoplaría a los centros locomotores torácicos a través de axones en los conectivos circunesofágicos.

Los fotorreceptores circadianos y las vías de sincronización involucradas en la expresión rítmica del movimiento también han sido investigados extensamente en el acocil adulto. Page y Larimer (1976), demostraron que los fotorreceptores que participan en la sincronización no están localizados en la retina, sino en el cerebro.

Además, estos autores han propuesto que los elementos neurosecretores del tallo ocular no son requeridos para la expresión del ritmo locomotor, pero podrían intervenir en la sincronización del ritmo por ciclos de luz (Page y Larimer, 1975).

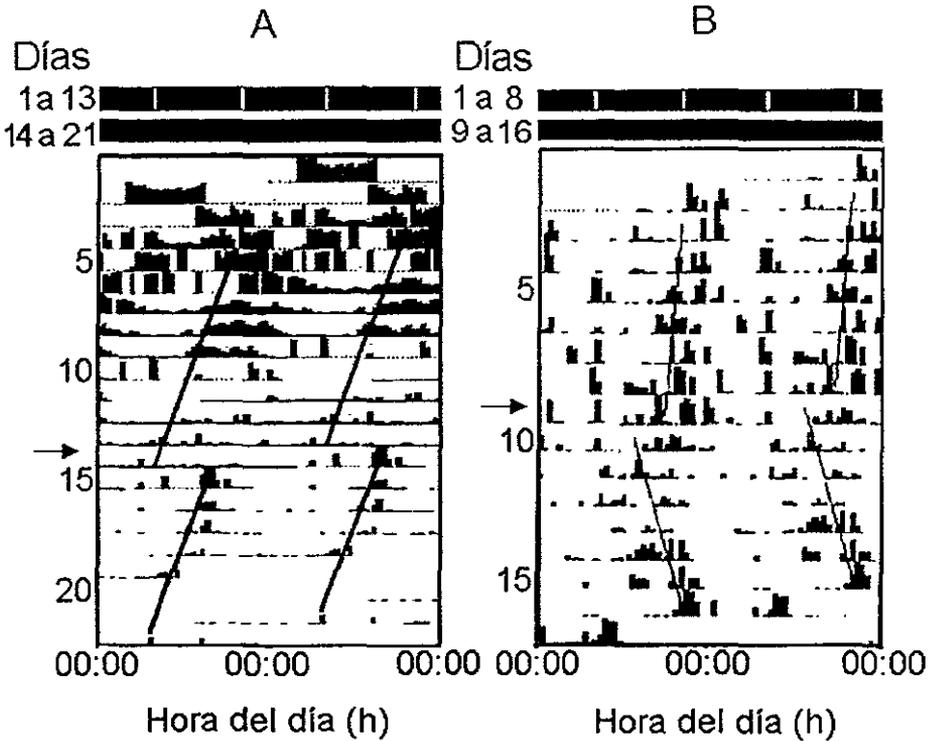


Figura 2. Desarrollo del ritmo circadiano de actividad locomotora durante la ontogenia del acocil. A) Ritmo locomotor de un animal en el segundo estado postembrionario que es circadiano pero no sincroniza a un fotoperiodo esqueleto. B) Ritmo locomotor de un animal juvenil que sincroniza expresando dos componentes de actividad. Sólo uno de ellos endógeno, pues éste permanece en condiciones de oscilación espontánea (flechas). Modificado de Fanjul-Moles *et al.* 1998.

En los vertebrados, se ha demostrado la correlación entre el ritmo de actividad locomotora y cambios circadianos en los niveles de diversos neurotransmisores como la 5-HT (Redfern, 1996). En este caso, la 5-HT no es causa de estos cambios circadianos, sino solamente un elemento del sistema capaz de afectar la fase y periodo de estos ritmos. En los invertebrados, y particularmente en

el acocil, es probable que estructuras del tallo ocular y ganglio cerebroide, en donde neuronas serotoninérgicas han sido identificadas en diversos crustáceos (Sandeman *et al.* 1988; Aréchiga *et al.* 1990; Benton *et al.* 1997; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997), estén involucradas de forma similar en la expresión temporal de la actividad locomotora y que éste sea un factor que afecte el curso temporal de su sincronización durante el desarrollo (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fanjul-Moles, 1998).

6. Identificación de neuronas serotoninérgicas en el acocil

La 5-HT es una amina biogénica que ha sido identificada como neurohormona y neurotransmisor de gran variedad de funciones en diversas estructuras del sistema nervioso de los crustáceos (Fingerman, *et al.* 1974; Fingerman y Fingerman, 1977, Aréchiga *et al.* 1990; Fingerman y Nagabhushanam, 1992; Kulkarni y Fingerman, 1992; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997).

El desarrollo ontogenético del grupo de neuronas serotoninérgicas identificadas en el cerebro de *Cherax destructor* ha sido ampliamente investigado (Sandeman y Sandeman, 1990; Helluy *et al.* 1993). Por otro lado, en *P. clarkii*, mucha de la información sobre el sistema serotoninérgico del tallo ocular y cerebro se refiere al animal adulto.

Por ejemplo, en el acocil australiano *C. destructor* (Helluy *et al.* 1993), y en *P. clarkii* (Escamilla-Chimal *et al.* 1998; Fanjul-Moles, 1998), el desarrollo postembrionario del animal, estudiado en condiciones de laboratorio, es corto o directo y pasa a través de dos estados postembrionarios (PO1 y PO2), durante los cuales, los animales se alimentan de restos de vitelo y permanecen adheridos a la madre. Después de la segunda muda postembrionaria, emerge el juvenil, sexualmente inmaduro, conocido como estado AD1, el cual se alimenta en el fondo del estanque y se mantiene protegido por la madre. Es hasta la tercer muda postembrionaria, que el animal adquiere total independencia locomotora. Durante este proceso ontogenético la 5-HT parece jugar un papel muy importante como modulador del desarrollo. Particularmente, en el cerebro de algunos crustáceos como la langosta, se han identificado en el deutocerebro neuronas dorsales gigantes (NDG) que sintetizan y liberan grandes cantidades de esta amina, modulando el desarrollo de otra serie importante de estructuras cerebrales (Benton *et al.* 1997).

Cuando se ha llevado a cabo aproximadamente el 72% (entre 4 y 5 semanas) del desarrollo embrionario de *C. destructor*, técnicas inmunocitoquímicas revelan por primera vez, la presencia de 5-HT en neuronas dorsales gigantes del deutocerebro, lóbulos olfatorios y accesorios, protocerebro medio, tritocerebro, ganglios circunesofágicos y subesofágicos (Helluy *et al.* 1993). En *P. clarkii*,

estructuras homólogas, que han sido propuestas como posibles relojes circadianos y que al parecer tienen un desarrollo ontogenético similar, podrían ser importantes para entender los cambios en la expresión temporal de los ritmos circadianos del electroretinograma y locomotor.

Por ejemplo, en *P. clarkii* se ha descrito la presencia de fibras nerviosas serotoninérgicas que se dirigen hacia la retina, haciendo contacto con los fotorreceptores (Aréchiga *et al.* 1990). Algunas de estas fibras se dirigen también al conjunto de células neurosecretoras del complejo órgano x – glándula sinusal, donde la 5-HT podría modular la expresión de varias funciones (Rodríguez-Sosa *et al.* 1997). Recientemente, se ha reportado que desde los primeros estados postembrionarios en *P. clarkii*, células de la retina manifiestan la existencia de inmunoreactividad a 5-HT (Escamilla-Chimal *et al.* 1998). Estos autores pudieron identificar la presencia de células inmunopositivas a la enzima de síntesis de la 5-HT, triptofano hidroxilasa, lo que indica que la síntesis de esta amina ocurre en la retina desde el inicio del desarrollo. Toda la evidencia experimental señalada anteriormente, sugiere que en *P. clarkii* la 5-HT está de alguna forma involucrada en la expresión de diversos ritmos circadianos. Sin embargo, aún no es del todo claro cuál es su papel y cómo cambia durante el desarrollo.

7. El papel de la serotonina en la expresión de ritmos circadianos

La 5-HT ha sido involucrada en los cambios rítmicos de coloración, el movimiento circadiano de pigmentos retinianos, el control de los niveles de glucosa en la hemolinfa, la modulación del desarrollo ontogenético, la expresión de la actividad locomotora, etcétera; y por lo tanto, es objeto de amplias investigaciones.

En este sentido, la 5-HT ha sido propuesta como un modulador del movimiento del pigmento proximal durante la adaptación del ojo a la oscuridad (Aréchiga *et al.* 1990). Además, se ha sugerido que la 5-HT induce la liberación de varias neurohormonas, como la hormona hiperglicémica en el acicil *Orconectes limosus* (Keller y Beyer, 1968); las hormonas dispersoras de los pigmentos rojo y negro en el cangrejo *Uca pugilator* (Fingerman y Nagabhushanam, 1992) y la hormona estimulante de las gonadas en *P. clarkii* (Sarojini *et al.* 1995). La 5-HT involucrada en éstas y otras funciones rítmicas podría ser sintetizada en las neuronas serotoninérgicas localizadas en el tallo ocular (Aréchiga *et al.* 1990; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997; Escamilla-Chimal *et al.* 1998), o bien, en el cerebro (Sandeman y Sandeman, 1990).

Se ha identificado y cuantificado 5-HT en estructuras consideradas como posibles relojes circadianos en el sistema nervioso de crustáceos. Fingerman *et al.* (1974) cuantificaron niveles de entre 7.38 y 7.63 μg de 5-HT por g de peso húmedo

en los tallos oculares y de entre 2.77 y 3.38 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el cerebro del cangrejo *Uca pugilator*. En esta misma especie, Fingerman y Fingerman (1977), determinaron que el contenido de 5-HT en el tallo ocular varía siguiendo un patrón circadiano, donde los niveles máximos se encuentran durante la noche y los mínimos durante el día.

Particularmente en diferentes especies de acocil, la 5-HT también se ha identificado como neurotransmisor, y su contenido, se ha cuantificado en varias estructuras. Elofsson *et al.* (1982), determinaron los niveles de esta amina en diferentes regiones del sistema nervioso central de *Pacifastacus leniusculus* con concentraciones entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g g}^{-1}$. Posteriormente, Kulkarni y Fingerman (1992), empleando HPLC con detección electroquímica, determinaron niveles de 5-HT de entre 0.054 y 0.168 $\mu\text{g g}^{-1}$ en diversas regiones del sistema nervioso de *P. clarkii*. Estos investigadores describieron el mayor contenido de 5-HT en el cerebro, seguido en orden decreciente por los ganglios torácicos, el ganglio subesofágico, tallos oculares y cordón nervioso ventral. En este trabajo también se reportan incrementos significativos en los niveles de 5-HT cuando los animales fueron expuestos a tres días de luz continua en un entorno color blanco. Finalmente, Rodríguez-Sosa *et al.* (1997), cuantificaron el contenido de 5-HT en los diferentes neuropilos del tallo ocular del acocil adulto *P. clarkii* e identificaron fibras serotoninérgicas que se dirigen hacia las células neurosecretoras del órgano x, proponiendo que esta amina pueda jugar un papel importante como neurohormona y neuromodulador de una multiplicidad de funciones.

Como se mencionó, el curso temporal de los ritmos del electrorretinograma y locomotor de *P. clarkii* es diferente. Sin embargo, en ambos casos, se ha sugerido que la 5-HT, podría modificar la expresión temporal de estos ritmos, ya que, como se ha visto modula la función de algunas estructuras directamente involucradas en éstos. Por ejemplo, se mencionó que el movimiento rítmico de los pigmentos retinianos accesorios, es muy importante para la expresión del ritmo del electrorretinograma (Fig. 3). El movimiento del pigmento proximal es disparado como una respuesta directa de fotorreceptores retinianos a la luz y a la oscuridad. Tanto en animales adultos íntegros, como en tallo ocular aislado, se ha visto que la 5-HT aumenta la amplitud del electrorretinograma en animales o tallos oculares previamente adaptados a la luz y al mismo tiempo, favorece la retracción del pigmento proximal a su posición de adaptación a la oscuridad, sin tener ningún efecto sobre la posición del pigmento distal (Aréchiga *et al.* 1990).

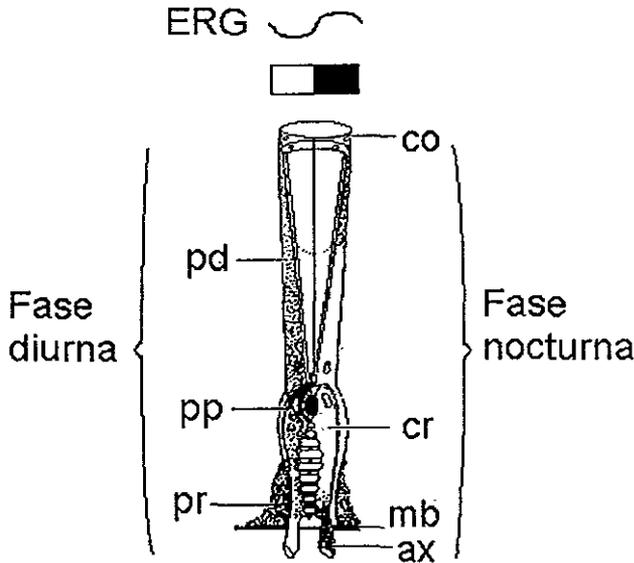


Figura 3. Contribución de los pigmentos retinianos al electroretinograma (ERG) del acocil adulto. La barra superior blanco-negro representa el ciclo luz-oscuridad. En la fase diurna, el pigmento proximal (pp) y distal (pd) se dispersa, blindando de la luz a los fotorreceptores y el ERG cae. En la fase nocturna, ambos pigmentos se retraen, la captura de fotones por los fotorreceptores aumenta y el ERG sube. Pigmento reflector (pr), célula retinular (cr), córnea (co), membrana basal (mb), axón (ax). Modificado de Garfias *et al.* 1995.

Los movimientos circadianos del pigmento distal parecen ser el resultado de reflejos neuroendocrinos. El primer reflejo, es disparado por la luz, actuando a través de fotorreceptores extrarretinianos que resulta en la liberación de un neuropéptido, la hormona dispersora del pigmento distal, cuya acción tiene como consecuencia la adaptación del ojo a la luz. El segundo reflejo sería disparado por la oscuridad, mediado por la liberación de otro neuropéptido, la hormona concentradora de eritróforos, que favorece la retracción del pigmento distal, y por lo tanto, la adaptación del ojo a la oscuridad. Al igual que la 5-HT en la regulación del movimiento del pigmento proximal, la hormona concentradora de eritróforos parece actuar en la modulación de la sensibilidad de la retina en la fase nocturna del electroretinograma. Recientemente se ha demostrado que este péptido muestra un ritmo circadiano en tallo ocular aislado (Rodríguez-Sosa *et al.* 1994) mediante el

cual ejerce una acción moduladora en la sensibilidad de los fotorreceptores y en la retracción de los gránulos del pigmento distal (Garfías *et al.* 1995).

Además de un posible papel en la génesis de ritmos circadianos, la 5-HT podría participar en los mecanismos de sincronización. Por ejemplo, se ha sugerido que los marcapasos del ritmo de amplitud del electroretinograma podrían ser de dos tipos: el lóbulo óptico del tallo ocular para la sincronización unilateral y el ganglio cerebroide para la sincronización bilateral (Aréchiga *et al.* 1993). Puesto que los tallos oculares están conectados al ganglio cerebroide a través del nervio óptico, una serie de experimentos de ablación y corte (Barrera-Mera, 1976; Larimer y Smith, 1980), parecen apoyar la hipótesis de que la supresión de la acción del ganglio cerebroide destruye el componente del ritmo del electroretinograma dependiente del pigmento distal, mientras se preservan los componentes del ritmo del pigmento proximal y de los fotorreceptores retinianos. Estos elementos son capaces de mantener sus propias señales circadianas, aunque haya un cambio de periodo y la oscilación sea de menor amplitud, es decir, parece persistir el marcapaso del lóbulo óptico en condiciones *in vitro* (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977), pero se requiere de la acción integradora y sincronizadora bilateral del ganglio cerebroide para mantener sincronía entre ambos ojos.

Se han sugerido dos posibles vías de sincronización bilateral: una vía hormonal que posiblemente exista en el animal adulto intacto, puesto que los dos pigmentos accesorios señalados anteriormente responden a agentes hormonales (Aréchiga *et al.* 1993), y una vía neural, la cual se evidencia por la presencia de fibras que corren a través del nervio óptico a la retina y hacen contacto con los axones de los fotorreceptores retinianos. Algunos de estos axones contienen 5-HT (Aréchiga *et al.* 1990). Además, se ha reportado la presencia de 5-HT y de su enzima de síntesis, triptofano hidroxilasa en células de la retina de *P. clarkii* (Escamilla-Chimal *et al.* 1998). Estas evidencias sugieren que la 5-HT podría estar involucrada como neurohormona y además como neurotransmisor de esta vía.

Las estructuras y neuronas serotoninérgicas ya identificadas en *P. clarkii* y en otra especie (Sandeman y Sandeman, 1990) podrían estar involucradas también en el curso temporal de la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora. Se conoce la participación de fotorreceptores extrarretinianos que pudieran ser también, fotorreceptores circadianos, en la expresión de diversas respuestas locomotoras. La evidencia experimental más reciente sugiere que en los mecanismos de origen y sincronización del ritmo locomotor durante la ontogenia de *P. clarkii*, están involucrados fotorreceptores extrarretinianos (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fanjul-Moles *et al.* 1998; Fanjul-Moles, 1998). Los fotorreceptores extrarretinianos en el cerebro del acocil *C. destructor* que no se han localizado en *P. clarkii* podrían ser, fotorreceptores circadianos. Como se señaló, en regiones identificadas del protocerebro, se encuentran grandes neuronas serotoninérgicas que

juegan un papel muy importante como moduladores durante el desarrollo (Benton *et al.* 1997). En *P. clarkii*, una serie de experimentos con lesiones electrolíticas sobre las regiones del cerebro donde podrían encontrarse estos posibles fotorreceptores circadianos (Fig. 4), ocasionaron cambios en la expresión del ritmo locomotor así como su abolición en animales juveniles (Fanjul-Moles, 1998). Por lo tanto, es probable que los mecanismos de sincronización del ritmo locomotor, o simplemente, los mecanismos de generación de patrones rítmicos de movimiento en *P. clarkii* estén regulados por la acción de neuronas serotoninérgicas similares, o bien, por posibles fotorreceptores circadianos extrarretinianos presentes en el protocerebro

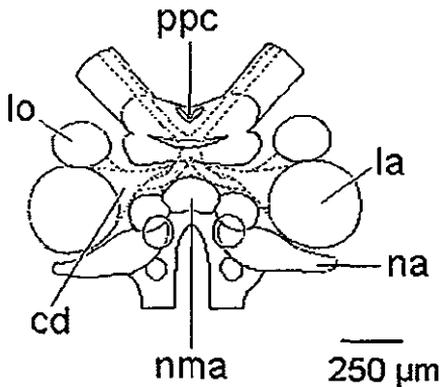


Figura 4. Representación del ganglio cerebroide (cerebro) del acocil adulto. Lesiones electrolíticas en diversas regiones del cerebro (principalmente cercanas al ppc), ocasionaron cambios en la expresión del ritmo locomotor y en algunos casos, la abolición del ritmo en animales juveniles. Puente protocerebral (ppc), lóbulo accesorio (la), lóbulo olfatorio (lo), neuropilo antenal (na), neuropilo medio antenular (nma), comisura deutocerebral (cd). Modificado de Sandeman *et al.* 1988.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De lo mencionado anteriormente, puede inferirse que el curso temporal distinto de estos ritmos circadianos (amplitud del electroretinograma y actividad locomotora), tanto en su génesis, como en las características de sincronización, evidencia la expresión de al menos dos posibles relojes circadianos con diferentes tiempos de maduración (Fanjul-Moles, 1996), o bien, que las discrepancias temporales reportadas son consecuencia de tiempos de maduración distintos entre un sólo reloj y las vías de acoplamiento entre los diversos ritmos.

El ritmo de sensibilidad visual de *P. clarkii* surge gradualmente como un ritmo ultradiano con mayor sensibilidad a la luz durante el día, que cambia durante la ontogenia para volverse circadiano y con mayor sensibilidad a la luz durante la noche (Fanjul-Moles *et al.* 1987). En contraste, el ritmo de actividad locomotora se manifiesta como un ritmo circadiano desde la eclosión del animal (Fanjul-Moles *et al.*, 1998), pero su capacidad de sincronización a ciclos LO parece madurar durante el desarrollo.

Existen regiones inmunorreactivas a 5-HT tanto en el cerebro (Sandeman y Sandeman, 1990, 1994, 1998) como en el tallo ocular de *P. clarkii* (Aréchiga *et al.* 1990; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997; Escamilla-Chimal *et al.* 1998), dos de las estructuras propuestas como posibles relojes circadianos de los ritmos del electroretinograma y locomotor. Adicionalmente, un trabajo anterior de nuestro laboratorio (Escamilla-Chimal *et al.* 1998), describió cambios rítmicos durante el desarrollo en la inmunoreactividad a la 5-HT en la retina y en algunas estructuras del cerebro (no reportado). Estos cambios se presentaron a diferente hora del día en el cerebro y el tallo ocular, coincidiendo aparentemente, con los cambios temporales en la génesis del ritmo del electroretinograma reportados anteriormente (Fanjul-Moles *et al.* 1987). Además, estos cambios podrían estar relacionados con las variaciones reportadas durante el desarrollo en la sincronización del ritmo locomotor (Fanjul-Moles *et al.* 98), ya que lesiones electrolíticas sobre estructuras que probablemente contienen fotorreceptores extrarretinianos circadianos y vías serotoninérgicas involucradas en la sincronización del ritmo locomotor, modifican fuertemente su expresión y capacidad de sincronización.

Con las evidencias anteriores se ha propuesto que la sincronización interna de los posibles relojes del tallo ocular y cerebro, sea mediada por alguna de las neurohormonas o neurotransmisores presentes en estas estructuras. Se ha comprobado experimentalmente que la 5-HT participa directamente en la

modulación de algunos de los ritmos circadianos posiblemente generados en estas estructuras (Aréchiga, *et al.* 19990). Por lo tanto, un ritmo endógeno de 5-HT podría ayudar a entender algunos de los cambios descritos durante la ontogenia de ambos ritmos circadianos y podría al mismo tiempo, dar información sobre el papel de esta amina en el acoplamiento entre los dos posibles relojes circadianos de este sistema.

IV. HIPÓTESIS

En *P. clarkii*, los ritmos circadianos de amplitud del electroretinograma y actividad locomotora son modulados, entre otros factores por la acción circadiana de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos. Ambos ritmos presentan cambios durante el desarrollo previamente reportados, que pudieran ser similares a variaciones rítmicas en el contenido de 5-HT durante el desarrollo en los posibles relojes circadianos del organismo.

La evidencia experimental existente, sugiere que durante el desarrollo de *P. clarkii*, el acoplamiento de los posibles relojes circadianos se lleva a cabo por la acción sincronizadora y cíclica de algún neurotransmisor o neurohormona. Si existen variaciones rítmicas durante el desarrollo de un probable ritmo circadiano de 5-HT en el cerebro y los tallos oculares, estos cambios pueden arrojar información preliminar sobre el posible papel de esta amina durante el desarrollo como acoplador de estas estructuras.

V. OBJETIVOS

1. Cuantificar las variaciones diarias en el contenido de 5-HT en los tallos oculares y el cerebro de *P. clarkii* en el animal adulto y durante el desarrollo (estado postembrionario 2 y juvenil) bajo ciclos LO 12:12 e iluminación continua.
2. Describir la dinámica temporal del contenido de 5-HT del cerebro y tallos oculares durante el desarrollo y describir si ésta presenta cambios similares a los reportados durante la ontogenia de los ritmos descritos en los antecedentes.
3. Analizar si las posibles variaciones rítmicas en las estructuras estudiadas pueden dar información acerca del papel de la 5-HT como acoplador de estos posibles relojes circadianos.

modulación de algunos de los ritmos circadianos posiblemente generados en estas estructuras (Aréchiga, *et al.* 19990). Por lo tanto, un ritmo endógeno de 5-HT podría ayudar a entender algunos de los cambios descritos durante la ontogenia de ambos ritmos circadianos y podría al mismo tiempo, dar información sobre el papel de esta amina en el acoplamiento entre los dos posibles relojes circadianos de este sistema.

IV. HIPÓTESIS

En *P. clarkii*, los ritmos circadianos de amplitud del electroretinograma y actividad locomotora son modulados, entre otros factores por la acción circadiana de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos. Ambos ritmos presentan cambios durante el desarrollo previamente reportados, que pudieran ser similares a variaciones rítmicas en el contenido de 5-HT durante el desarrollo en los posibles relojes circadianos del organismo.

La evidencia experimental existente, sugiere que durante el desarrollo de *P. clarkii*, el acoplamiento de los posibles relojes circadianos se lleva a cabo por la acción sincronizadora y cíclica de algún neurotransmisor o neurohormona. Si existen variaciones rítmicas durante el desarrollo de un probable ritmo circadiano de 5-HT en el cerebro y los tallos oculares, estos cambios pueden arrojar información preliminar sobre el posible papel de esta amina durante el desarrollo como acoplador de estas estructuras.

V. OBJETIVOS

1. Cuantificar las variaciones diarias en el contenido de 5-HT en los tallos oculares y el cerebro de *P. clarkii* en el animal adulto y durante el desarrollo (estado postembrionario 2 y juvenil) bajo ciclos LO 12:12 e iluminación continua.
2. Describir la dinámica temporal del contenido de 5-HT del cerebro y tallos oculares durante el desarrollo y describir si ésta presenta cambios similares a los reportados durante la ontogenia de los ritmos descritos en los antecedentes.
3. Analizar si las posibles variaciones rítmicas en las estructuras estudiadas pueden dar información acerca del papel de la 5-HT como acoplador de estos posibles relojes circadianos.

modulación de algunos de los ritmos circadianos posiblemente generados en estas estructuras (Aréchiga, *et al.* 19990). Por lo tanto, un ritmo endógeno de 5-HT podría ayudar a entender algunos de los cambios descritos durante la ontogenia de ambos ritmos circadianos y podría al mismo tiempo, dar información sobre el papel de esta amina en el acoplamiento entre los dos posibles relojes circadianos de este sistema.

IV. HIPÓTESIS

En *P. clarkii*, los ritmos circadianos de amplitud del electroretinograma y actividad locomotora son modulados, entre otros factores por la acción circadiana de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos. Ambos ritmos presentan cambios durante el desarrollo previamente reportados, que pudieran ser similares a variaciones rítmicas en el contenido de 5-HT durante el desarrollo en los posibles relojes circadianos del organismo.

La evidencia experimental existente, sugiere que durante el desarrollo de *P. clarkii*, el acoplamiento de los posibles relojes circadianos se lleva a cabo por la acción sincronizadora y cíclica de algún neurotransmisor o neurohormona. Si existen variaciones rítmicas durante el desarrollo de un probable ritmo circadiano de 5-HT en el cerebro y los tallos oculares, estos cambios pueden arrojar información preliminar sobre el posible papel de esta amina durante el desarrollo como acoplador de estas estructuras.

V. OBJETIVOS

1. Cuantificar las variaciones diarias en el contenido de 5-HT en los tallos oculares y el cerebro de *P. clarkii* en el animal adulto y durante el desarrollo (estado postembrionario 2 y juvenil) bajo ciclos LO 12:12 e iluminación continua.
2. Describir la dinámica temporal del contenido de 5-HT del cerebro y tallos oculares durante el desarrollo y describir si ésta presenta cambios similares a los reportados durante la ontogenia de los ritmos descritos en los antecedentes.
3. Analizar si las posibles variaciones rítmicas en las estructuras estudiadas pueden dar información acerca del papel de la 5-HT como acoplador de estos posibles relojes circadianos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron 298 acociles (*Procambarus clarkii*) en tres estados de desarrollo: Adulto, juvenil y postembrionario 2 (PO2). Los animales adultos fueron colectados en el estado Mexicano de Chihuahua, mientras que los animales juveniles y PO2 nacieron en el laboratorio a partir de acociles adultos colectados en la misma localidad y mantenidos bajo ciclos LO 12:12 con líneas de oxigenación del agua independientes. La división en los tres grupos de edad señalados arriba, siguió criterios establecidos previamente (Sukô, 1953; Sademan y Sandeman, 1990; Escamilla-Chimal *et al.* 1998). Estos criterios fueron: 1) **PO2**: acocil de 10 a 14 días de edad, de longitud total menor a 11.8 mm. 2) **Juvenil**: animal de 1 a 3 meses de edad, de longitud total menor a 33.9 mm. 3) **Adulto**: acocil sexualmente maduro y no menor a 55 mm de longitud total.

Antes del inicio de los experimentos, todos los animales fueron instalados en acuarios con filtro biológico bajo ciclos LO 12:12 y fueron alimentados tres veces por semana con vegetales cocidos. Todos los adultos y juveniles fueron aclimatados a estas condiciones durante diez días, mientras que los PO2 eclosionaron de madres así aclimatadas y permanecieron bajo estas condiciones hasta el inicio del protocolo experimental.

2. Protocolo experimental

a) Grupo en condiciones de sincronización.

Del total de 298 animales, un grupo de 147 (48 PO2, 41 juveniles y 58 adultos), fue instalado en acuarios de 60 litros en número no mayor a 10 animales por acuario. Se colocaron lámparas de luz blanca de 9 wats a 30 cm del fondo del acuario. El encendido y apagado de estas lámparas era controlado por un reloj interruptor automático (Micronta, mod. E10694). La intensidad de la luz medida en el fondo del acuario por medio de un fotómetro (Licor, LI 189; LI 193SA, Lincoln, Nebraska) fue de 100 lx.

Los animales fueron separados en dos grupos: 1) Acociles sincronizados a ciclos LO 12:12 (encendido de la luz a las 07:00 h). 2) Acociles también sincronizados a ciclos LO 12:12, pero 180° desfasados con respecto al primero, es decir, la luz se encendía a las 19:00 h. Los animales, fueron expuestos a estos ciclos de luz durante 10 días y posteriormente fueron sacrificados a las 08:00, 12:00 y 16:00 h, tiempo que para los animales del grupo 2, que tenían fotoperiodo invertido, corresponde a las 20:00, 00:00 y 04:00 h. Las disecciones de los animales con fotoperiodo invertido se llevaron a cabo en un cuarto oscuro empleando una lámpara con luz roja. Con este diseño se cubrió el ciclo de 24 horas para analizar los cambios en el contenido de 5-HT del cerebro y los tallos oculares.

b) Grupo en condiciones de oscilación espontánea.

Del total de 298 animales, los 151 restantes (55 PO2, 41 juveniles y 55 adultos), fueron instalados en acuarios bajo las mismas condiciones señaladas arriba. Nuevamente se separó a los animales en dos grupos y se les sincronizó a ciclos LO 12:12 (normal e invertido) durante 10 días. Transcurrido este periodo de *sincronización*, se expuso a los acociles a 72 horas de luz constante tenue (100 lx) para enseguida ser sacrificados a las 08:00, 12:00 y 16:00 h del cuarto día en LL, tiempo que para los animales del grupo en fotoperiodo invertido, correspondió a las 20:00, 00:00 y 04:00 h. Estas 72 horas de iluminación constante se contaron a partir del último encendido de la luz; es decir, a partir de las 07:00 del undécimo día en LO 12:12 normal, y a partir de las 19:00 del décimo día en LO 12:12 invertido. El esquema de la Figura 5 sintetiza el protocolo experimental.

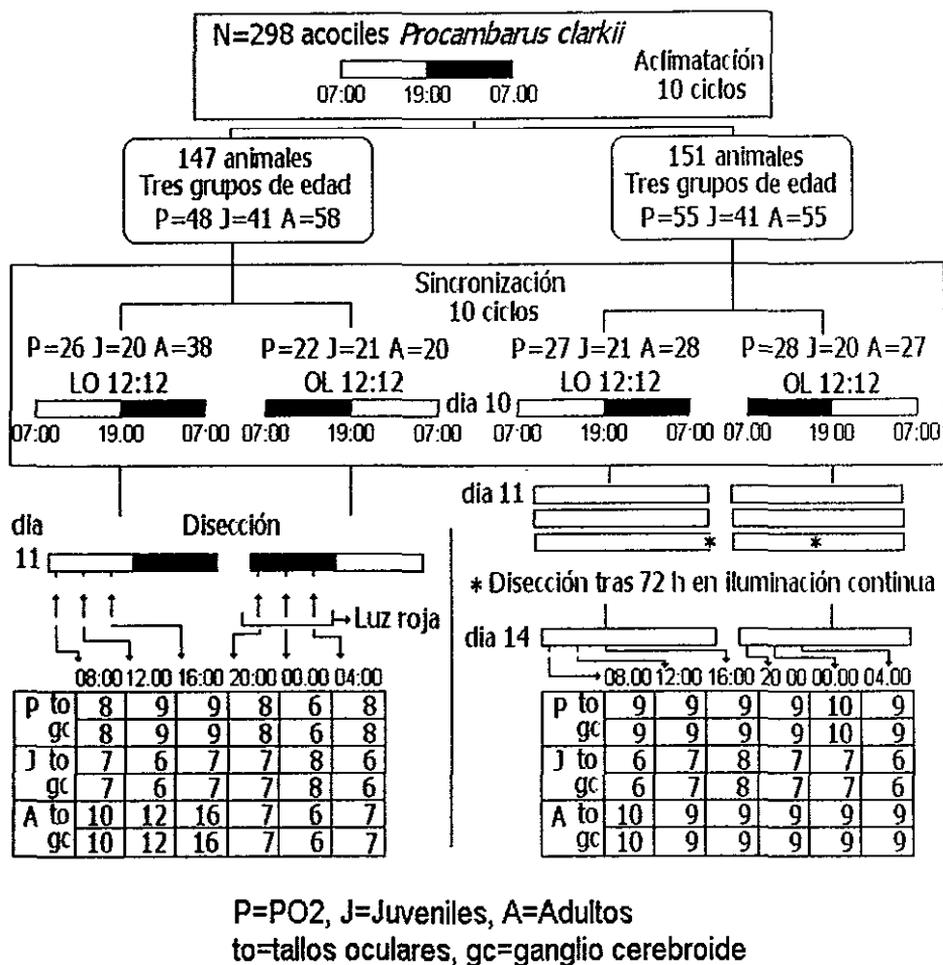


Figura 5. Protocolo experimental. Los diferentes números en el esquema indican cuántos animales de cada grupo de edad fueron incluidos en este estudio. Nótese que de cada animal, se extrajeron siempre dos estructuras: tallos oculares y cerebro.

Después de sacrificar a los animales por decapitación, se extrajeron los tallos oculares (retina y lóbulos ópticos) y el ganglio cerebroide o supraesofágico (cerebro). La disección de ambas estructuras se llevó a cabo en solución salina helada (Van Harreveld, 1936), y particularmente en el caso de los tallos oculares, fue necesario remover cuidadosamente el exoesqueleto, los músculos oculomotores y varias capas de tejido conectivo. Después de la disección se determinó el peso húmedo de las estructuras que fueron inmediatamente congeladas a -20°C para posterior análisis del contenido de 5-HT por HPLC con detección electroquímica. Los dos tallos oculares de cada animal fueron pesados y analizados juntos.

3. Neuroquímica y cuantificación de serotonina

Una vez extraídas y pesadas, las estructuras fueron colocadas en 200 μl (Adultos) ó 100 μl (Juveniles y PO2) de solución buffer de extracción que consistió de ácido acético al 8%, ácido fórmico al 1.76% y 1mM de cisteína en agua desionizada. El contacto de esta solución con el tejido permitió que éste se descongelara rápidamente. Una vez en la solución de extracción, las muestras fueron homogeneizadas manualmente con un homogeneizador de plástico-teflón, siempre manteniéndolas en hielo y protegidas de la luz. Enseguida fueron centrifugadas por 15 minutos a 12800 x g. La pastilla fue suspendida en 100 μl de NaOH 1M, colocada en el horno a 60°C durante una hora y analizada posteriormente para cuantificar el contenido de proteínas totales por estructura de acuerdo con Lowry *et al.* (1951). Los sobrenadantes fueron colectados y filtrados a través de microconcentradores de 0.45 μm (MWCO 3k) y se determinó el contenido de 5-HT por medio de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC por sus siglas en inglés) con detección electroquímica.

El sistema de cromatografía empleado consistió de un inyector manual Rheodyne con un asa de inyección de 20 μl , una columna analítica (Supelcosil LC 18 con partículas de 5 μm) de 100 x 4.6 mm, conectada a una precolumna de 30 x 4.6 mm (Supelcosil LC 18, 5 μm). La fase móvil fue modificada de Marsden y Joseph (1986) y consistió de 0.15 M NaH_2PO_4 , 0.1 mM Na_2EDTA , 0.5 mM de ácido octano-sulfónico (sal de sodio) y metanol al 14% en agua grado HPLC (reactivos adquiridos de SIGMA). El pH se ajustó a 3.4 con ácido fosfórico. El flujo de la fase móvil se mantuvo uniforme a una tasa de 1 ml por minuto por medio de una bomba LaChrom-Hitachi L-7100.

El contenido de 5-HT se cuantificó por medio de un detector electroquímico (Mod. LC4C, Bioanalytical Systems) utilizando un electrodo de trabajo de carbón vidriado que aplica un potencial de +0.6V contra un electrodo de referencia Ag/AgCl. El pico de 5-HT en el extracto de tejido fue identificado comparando los

tiempos de elución de los picos del extracto con el tiempo de elución de 5-HT estándar (Sigma, 5-HT creatinine sulfate). Para cuantificar el contenido de la amina en el extracto se midió la altura del pico identificado y se comparó con la altura de picos de 5-HT estándar de concentración conocida preparados y analizados el mismo día (Engbertson y Battelle, 1987). La identidad y el contenido de 5-HT en las muestras fueron doblemente verificados en cada inyección, ya que una vez inyectada cada muestra, ésta fue mezclada con una cantidad conocida de 5-HT estándar. Esto con la finalidad de observar si era posible obtener un pico simétrico que apareciera al mismo tiempo que la 5-HT estándar y al mismo tiempo que la 5-HT de la muestra, y que además tuviera una altura, y por lo tanto una concentración, correspondiente con el valor esperado derivado de la mezcla preparada.

4. Análisis de datos

El contenido de 5-HT se determinó normalizando sus valores de la siguiente forma: 5-HT por g de peso húmedo; 5-HT por estructura y 5-HT por mg de proteína. Se construyeron cronogramas con los valores promedio por grupo \pm un error estándar de la media (EEM). En cada estado de desarrollo se determinó si el curso temporal desplegado en el cronograma correspondía a un patrón circadiano. Debido a que el interés prioritario en este estudio fue determinar la posible naturaleza endógena de los ritmos de 5-HT observados, sólo los datos de los cronogramas obtenidos bajo condiciones de iluminación continua fueron analizados por el método de cosinor simple (Halberg *et al.* 1977; Nelson *et al.* 1979) empleando el programa de cómputo DISPAC (Digital Analysis Applied to Chronobiology), desarrollado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Aguilar-Roblero *et al.* 1997). Con base en un periodo de prueba (τ), el análisis de cosinor ajusta los datos a una curva sinusoidal y permite probar si la amplitud de la oscilación observada difiere de cero; es decir, si el ritmo puede o no ser validado (bondad de ajuste). El análisis de cosinor incluye la descripción de algunos parámetros del ritmo (acrofase, mesor, amplitud y porcentaje de ritmicidad) que permiten analizar el nivel de ajuste de los datos a la curva sinusoidal a partir del periodo de prueba asumido. Por lo tanto, con este método de análisis es posible evaluar objetivamente la hipótesis que sugiere que la amplitud difiere de cero empleando para ello varios periodos de prueba. Para este trabajo se aplicó el análisis de cosinor simple a los valores del contenido de 5-HT por peso húmedo y 5-HT por proteínas totales bajo condiciones de iluminación continua en todos los grupos de edad. En todos los casos, se probaron diferentes valores de periodo para analizar si los perfiles temporales observados en los diferentes cronogramas eran o no circadianos.

VII. RESULTADOS

1. Identificación de serotonina en los extractos

El análisis de los extractos obtenidos del cerebro y los tallos oculares del acocil en diferentes estados de desarrollo, reveló la presencia de una sustancia que fue separada en la columna analítica, y que se oxidó ante el potencial aplicado por el electrodo de trabajo (0.6 V). Esta oxidación fue detectada como una elevación en el trazo del integrador que fue proporcional al contenido de la sustancia oxidada. Esta sustancia fue detectada al mismo tiempo que la 5-HT estándar preparada el mismo día de cada análisis. El tiempo de elución promedio de estas sustancias fue de 9.36 minutos.

Adicionalmente, la identidad de la 5-HT en los extractos se verificó al agregar concentraciones conocidas de 5-HT estándar a cada muestra. La Figura 6 ejemplifica este procedimiento, que se llevó a cabo con cada extracto. Como se observa en la figura, con este método se obtuvo un sólo pico simétrico, detectado al mismo tiempo que la 5-HT estándar y cuya concentración, calculada a partir de la altura del pico obtenido, corresponde adecuadamente con el valor esperado. El cromatograma A de la Figura 6 (izquierda), corresponde a la elución de una corrida de 5-HT estándar (2ng); en el cromatograma B (centro), se observa el perfil obtenido a partir de un extracto de los tallos oculares de un acocil adulto. Entre los 9 y 10 minutos de este trazo aparece una elevación que corresponde en tiempo con el pico del cromatograma A. Con base en el valor de amperaje derivado de la oxidación de 2ng de 5-HT estándar (1.39nA) se calculó, que el pico del cromatograma B, de 0.43 nA correspondería a 0.618 ng de 5-HT en los 20 μ l inyectados a la columna. Para comprobar que esta sustancia es, efectivamente 5-HT, el cromatograma C (derecha), muestra que cuando el extracto previamente analizado fue mezclado con 1 ng de 5-HT estándar, se obtuvo un pico detectado nuevamente al mismo tiempo que en A y B, y que además es la suma aproximada del amperaje de la 5-HT estándar (1 ng; 0.695 nA) más la supuesta 5-HT del extracto (0.618 ng; 0.43 nA). Teóricamente, esta suma debiera resultar en un valor de amperaje de 1.125 nA, correspondiente a 1.62 ng de 5-HT. El valor real obtenido, y calculado a partir del pico observado en C es de 1.15 nA, es decir, 1.65 ng. Basados en todos estos criterios, estos picos fueron identificados como 5-HT.

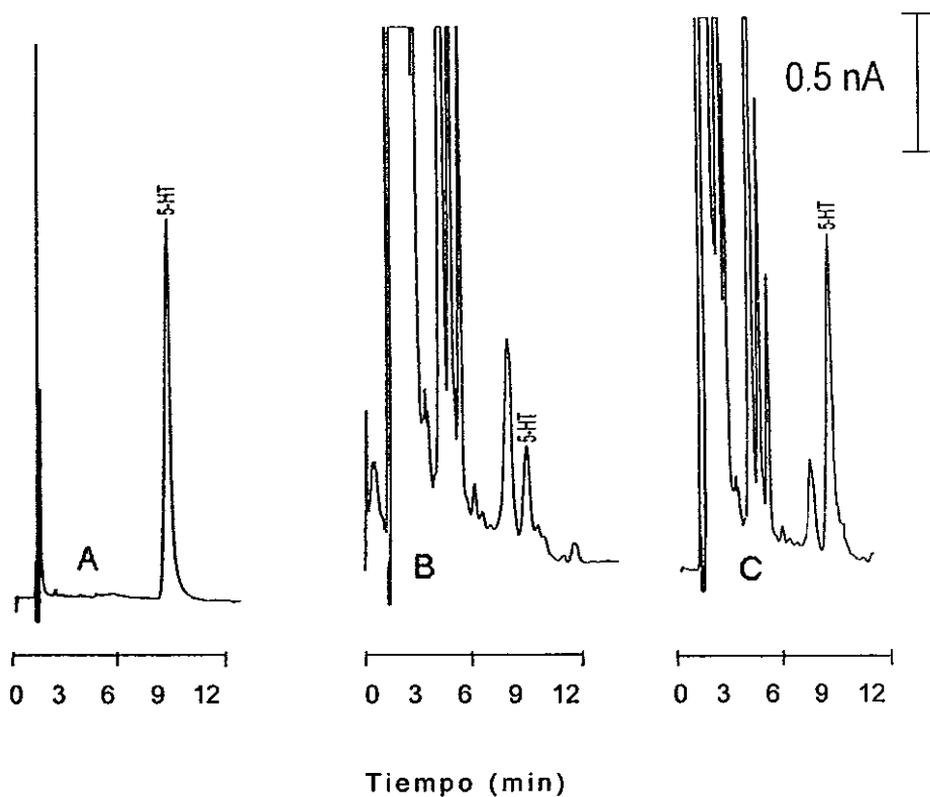


Figura 6. A) Cromatograma correspondiente a la separación de 2ng de 5-HT estándar. B) Separación de un extracto ácido de los tallos oculares de un acocil adulto. C) Separación del mismo extracto ácido, pero mezclado con 1ng de 5-HT estándar. El pico señalado en los tres cromatogramas fue identificado como 5-HT.

2. Cambios en el contenido de serotonina durante el desarrollo

El contenido de 5-HT en los tallos oculares y el cerebro de *P. clarkii* varía durante el ciclo de 24 horas, estos cambios ocurren en condiciones de sincronización y persisten en condiciones constantes. Además, las características de esta variación en el contenido de 5-HT también son diferentes en cada estado de desarrollo analizado. Los resultados presentados a continuación, están expresados como contenido de 5-HT por estructura (pmol); por gramo de peso húmedo ($\mu\text{g g}^{-1}$), y por miligramo de proteínas totales (pmol mg^{-1}). En general, el curso temporal del contenido de 5-HT es similar independientemente de la forma de presentar los resultados. Por lo tanto, y para facilitar la comparación de los resultados obtenidos, la mayoría de las interpretaciones y análisis de los resultados que aquí se expresan están basados en el contenido de 5-HT por peso húmedo y por proteínas totales \pm error estándar (EEM).

Independientemente de la edad, el contenido de 5-HT por unidad de peso húmedo, es mayor en el cerebro ($N=298$, $\bar{x}=0.655\pm 0.039 \mu\text{g g}^{-1}$) que en los tallos oculares ($N=298$, $\bar{x}=0.337\pm 0.021 \mu\text{g g}^{-1}$). Sin embargo, las condiciones de iluminación parecen modificar significativamente el contenido de esta amina, si se agrupan las diferentes edades puede observarse claramente el efecto de la iluminación continua sobre el contenido de 5-HT. Así, en los tallos oculares la cantidad promedio de 5-HT bajo ciclos LO fue de $0.273\pm 0.019 \mu\text{g g}^{-1}$. Este valor aumentó a $0.399\pm 0.036 \mu\text{g g}^{-1}$ en luz continua. En el cerebro el efecto fue similar ya que la cantidad promedio de 5-HT bajo ciclos LO fue de $0.579\pm 0.041 \mu\text{g g}^{-1}$. Este valor aumentó a $0.728\pm 0.065 \mu\text{g g}^{-1}$ en luz continua.

La Tabla 1 desglosa estos resultados por grupo de edad. En general se observó que el contenido de 5-HT es mayor en el cerebro que en los tallos oculares en todos los grupos de edad.

En los animales PO2 el contenido de 5-HT aumenta bajo condiciones de luz continua en ambas estructuras, en los juveniles aumenta en los tallos oculares y disminuye en el cerebro y en los adultos, disminuye en ambas estructuras.

Con excepción del cerebro en condiciones de sincronización, el contenido de 5-HT por unidad de peso es mayor en los animales más jóvenes independientemente de la estructura y de las condiciones de iluminación.

Tabla 1. Efecto de las condiciones de iluminación sobre el contenido de 5-HT por peso húmedo expresado en $\mu\text{g g}^{-1} \pm \text{EEM}$. Valores promedio por estado de desarrollo.

ESTRUCTURAS		LO 12:12	LUZ CONSTANTE	
PO2	TALLOS	0.3332 \pm 0.030	0.6083 \pm 0.064	*P<0.05
	OCULARES	N=48	N=55	
		0.3242 \pm 0.055	1.1417 \pm 0.143	*P<0.01
	CEREBRO	N=48	N=55	
		P>0.05	*P<0.01	
JUVENIL	TALLOS	0.2022 \pm 0.023	0.3624 \pm 0.082	*P<0.05
	OCULARES	N=41	N=41	
		0.8234 \pm 0.092	0.5053 \pm 0.0716	*P<0.05
	CEREBRO	N=41	N=41	
		*P<0.01	*P<0.05	
ADULTO	TALLOS	0.2723 \pm 0.036	0.2195 \pm 0.026	P>0.05
	OCULARES	N=58	N=55	
		0.619 \pm 0.056	0.4812 \pm 0.063	*P<0.05
	CEREBRO	N=58	N=55	
		*P<0.05	*P<0.05	

*Diferencias significativas (t de Student)

3. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil PO2

a) Ciclos luz-oscuridad.

En el animal PO2, el contenido de 5-HT en los tallos oculares y el cerebro cambia durante el ciclo de 24 horas, manifestando ritmos ultradianos y circadianos. Bajo condiciones de sincronización, en los tallos oculares (Fig. 7A, 7B, 7C) pueden observarse variaciones bimodales del contenido de esta amina. Bajo estas condiciones, el primer pico de 5-HT se presenta a las 20:00 h, es decir, cerca del inicio del periodo de oscuridad. En general, los niveles de esta amina son altos durante la noche y bajos durante el día. Cuando el contenido de 5-HT se expresa por mg de proteína (Fig. 7C), se observa un segundo pico durante la noche a las 04:00 h.

Es importante señalar los cambios observados en los valores de peso húmedo de los tallos oculares, pues a las 20:00 y 04:00 h hay incrementos significativos en peso (Fig. 7D). Sin embargo, estos cambios no afectan la expresión temporal del contenido de 5-HT que se observa en la Figuras 7A y 7C, ya que el contenido de 5-HT se normalizó con los valores de peso húmedo y proteínas totales. Igualmente, durante las 24 horas se observa un ritmo circadiano de baja amplitud en el contenido de proteínas totales en los tallos oculares del acocil PO2 (Fig. 7D).

Bajo las mismas condiciones de sincronización, el cerebro de los animales PO2 también expresa variaciones de los niveles de 5-HT (Figs. 8A, 8B y 8C). En el cerebro existe un ritmo circadiano de 5-HT por proteínas totales que alcanza el nivel máximo a las 12:00 h (Fig. 8C). Los niveles de 5-HT en esta estructura parecen mantenerse altos durante el día y disminuir gradualmente durante la noche. Estos cambios son muy similares independientemente de la forma de expresarlos. No existe coincidencia evidente entre los tallos oculares y el cerebro de los mismos animales bajo ciclos LO 12:12, pues al comparar los paneles A, B y C de las Figuras 7 y 8, es evidente que el curso temporal de los ritmos de 5-HT en ambas estructuras es diferente. En los tallos oculares (Fig. 7) los niveles de 5-HT son bajos durante el día y altos durante la noche, mientras en el cerebro (Fig. 8) son máximos durante el día y bajan durante la noche.

El contenido de proteínas por estructura que se observa en la Figura 8D aumenta durante la noche, pero es importante observar que a las 04:00 h, el contenido de proteínas por estructura aumenta, mientras el peso húmedo baja. Cuando se normaliza el contenido de proteínas (μg) con los valores de peso húmedo (g), se puede observar una curva que aproximadamente, sigue el mismo curso que el contenido de proteínas por estructura. Esto significa que estos cambios persisten a pesar de las variaciones en peso húmedo y que, por lo tanto, existen cambios reales en el contenido de proteínas totales en el cerebro de los animales PO2 (Fig. 8D).

En síntesis, bajo condiciones de sincronización, en los tallos oculares de los animales PO2, existe un ritmo bimodal en el contenido de 5-HT con un pico máximo a las 20:00 h. En el cerebro, este ritmo es unimodal y alcanza valores máximos a las 12:00 h. En ambas estructuras se observaron cambios rítmicos en el contenido de proteínas totales por mg de peso.

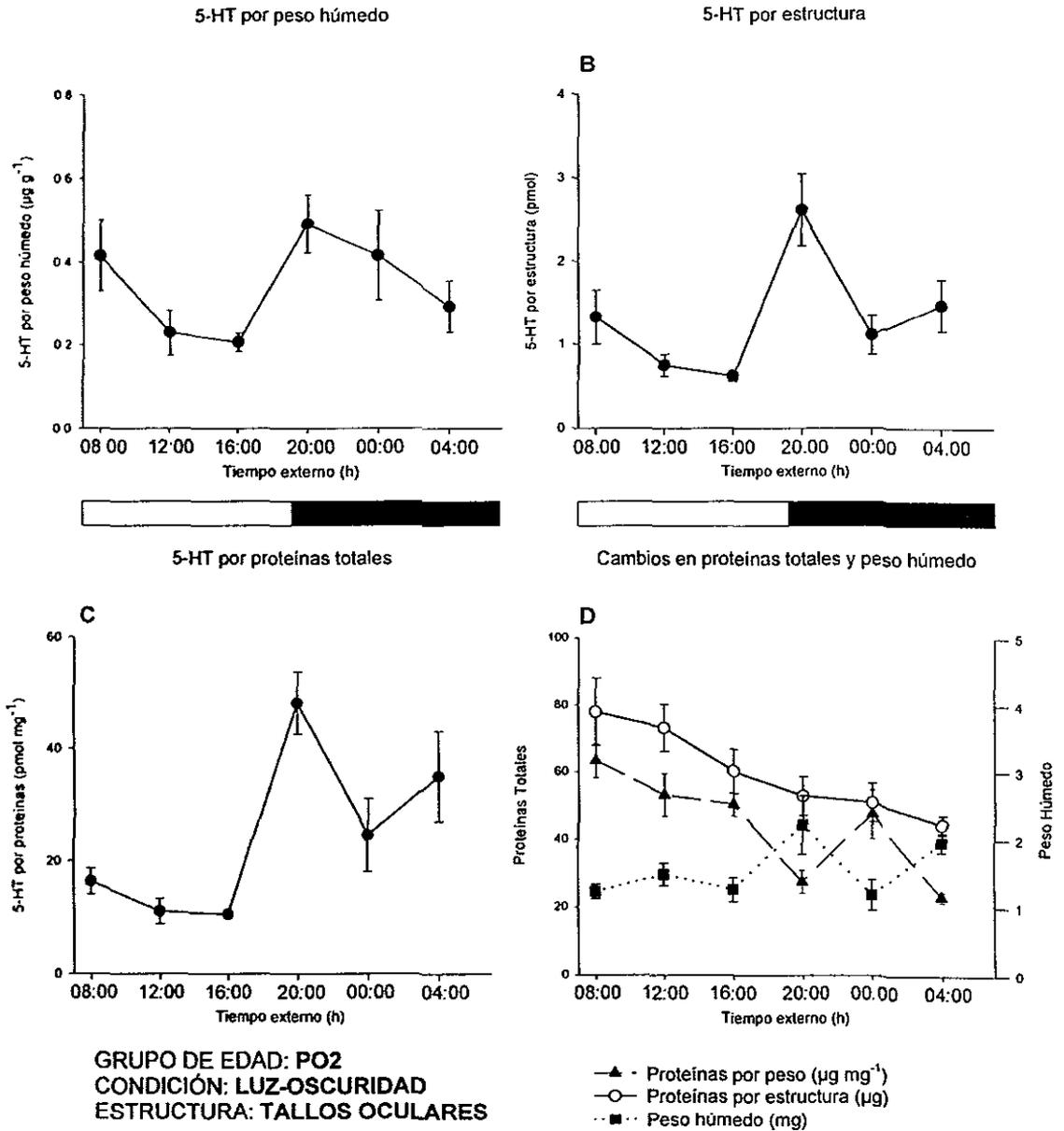


Figura 7. Cronogramas que ilustran los cambios rítmicos del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en los tallos oculares de acociles PO2 bajo ciclos LO 12:12. Los valores representan medias \pm EEM.

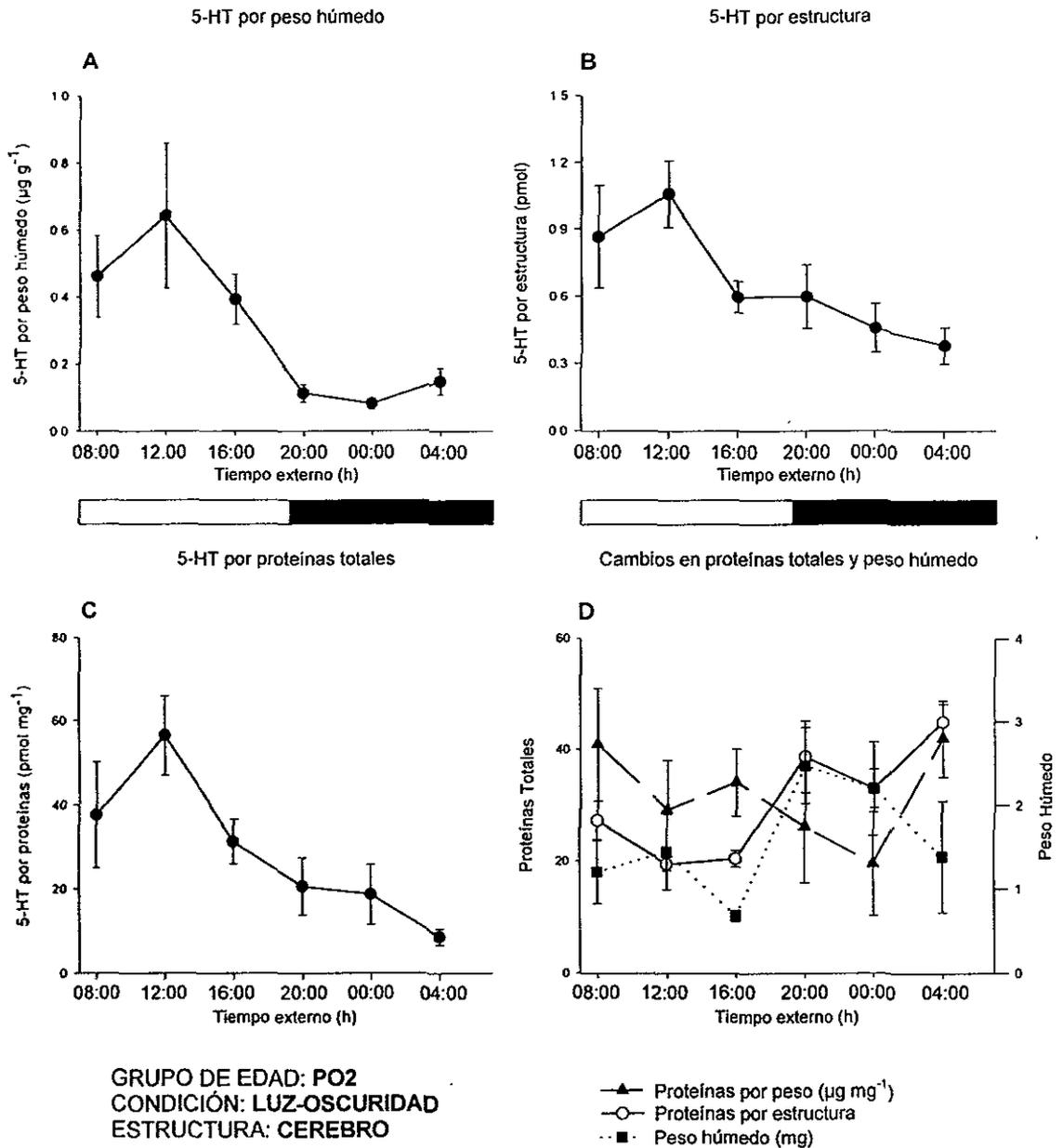


Figura 8. Cambios rítmicos del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el ganglio cerebroide de aciciles PO2 bajo ciclos LO 12:12. Los valores representan la media aritmética \pm EEM.

b) Luz constante.

En los tallos oculares, después de 72 horas en luz constante, el ritmo bimodal del contenido de 5-HT observado durante la sincronización persiste y oscila libremente. El curso temporal de esta oscilación es similar cuando es expresado por peso húmedo (Fig. 9A), por estructura (Fig. 9B) y por proteínas totales (Fig. 9C).

El análisis de cosinor aplicado a los valores de 5-HT por peso húmedo y 5-HT por proteínas totales, confirma la bimodalidad del ritmo (Ver Tabla 2). El análisis de la serie de tiempo de la Fig. 9A (contenido de 5-HT por g de peso húmedo), reveló el mejor ajuste de los datos a una curva sinusoidal con un periodo de prueba (τ) de 12.4 h. El grado de ajuste de los datos a la función, medida a través del porcentaje de ritmo (PR) fue en este caso del 88.7%. La amplitud de esta oscilación difiere significativamente de cero ($F=13.240$; $P<0.05$). La serie de tiempo de la Fig. 9C (contenido de 5-HT por mg de proteína), se ajustó mejor (PR = 66.3%) como un ritmo bimodal con un periodo de 12.5 h. Sin embargo, en este caso, la amplitud no fue significativamente diferente de cero. El resto de los parámetros analizados por cosinor se presenta en la Tabla 2.

TABLA 2. Análisis de cosinor de los cronogramas del contenido de 5-HT en tallos oculares y cerebro de acociles PO2 tras 72 horas de exposición a condiciones de iluminación continua.

	Estructura	Fig.	Contenido de 5-HT	Periodo τ (h)	Mesor	Amplitud	Acrofase (h)	PR (%)		
PO2	Tallos oculares	9A	$(\mu\text{g g}^{-1})$	12.4	0.61 ± 0.04	0.297*	2.23	88.7		
				24	0.61 ± 0.12	0.013	8.09	0.2		
	Cerebro	9C	(pmol mg^{-1})	12.5	37.73 ± 3.49	13.512	1.88	66.3		
				24	37.73 ± 5.59	5.330	8.29	13.1		
				10A	$(\mu\text{g g}^{-1})$	13	1.15 ± 0.23	0.572	12.49	30.7
						23.3	1.15 ± 0.13	0.622*	9.97	77.6
10C	(pmol mg^{-1})	13	77.47 ± 12.45	41.844	12.30	46.4				
		23.5	77.47 ± 11.46	32.860	9.59	54.5				

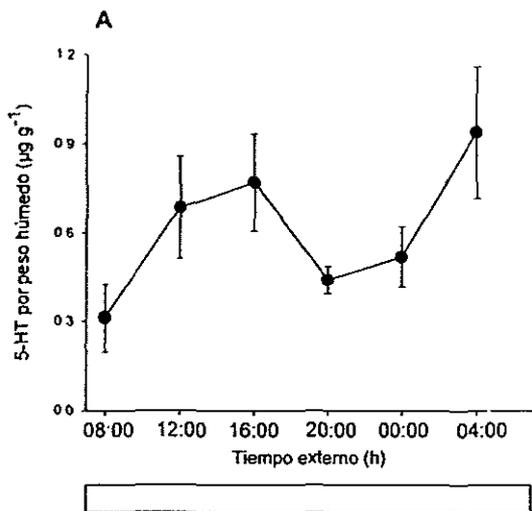
La amplitud difiere significativamente de cero: * $F = 13.240$, $P<0.05$; * $F = 5.854$, $P<0.1$. PR = Porcentaje de ritmo.

Con respecto a los cambios observados en el contenido de proteínas totales durante la sincronización, en la Fig. 9D puede observarse que bajo condiciones de luz constante, persiste un ritmo del contenido de proteínas totales por peso húmedo (Fig. 9D) con un ligero incremento a las 00:00 h, y otro de muy baja amplitud a las 08:00 h. Estos cambios siguen aproximadamente el mismo curso temporal del contenido de proteínas totales por estructura.

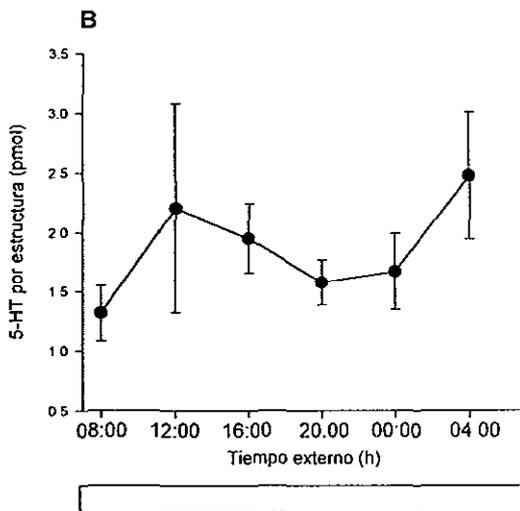
En el cerebro de los animales PO2, bajo condiciones de luz constante persiste un ritmo circadiano del contenido de 5-HT con características similares al observado durante la sincronización. Es decir, se trata de un ritmo unimodal (Figs. 10A, 10B y 10C) con un pico máximo a las 12:00 h y mínimo a las 20:00 h. Es importante señalar, que en este caso, no pudo observarse un desplazamiento temporal tras 72 horas en oscilación espontánea, pues si se comparan los paneles A, B y C de las figuras 8 y 10, se observa que en todos los casos, el punto máximo de las curvas ocurre a la misma hora (12:00 h). Es probable que el corrimiento temporal esperado bajo condiciones constantes no haya sido observado debido al intervalo de muestreo empleado en este trabajo.

El análisis de cosinor confirmó que el contenido de 5-HT por g de peso y por mg de proteína varía de acuerdo a un patrón circadiano. En el caso de la Fig. 10A, el análisis reveló que cuando se ajusta a un periodo circadiano $\tau=23.3$ h (PR=77.6%), la amplitud de la oscilación observada difiere significativamente de cero ($F=5.854$; $P<0.1$). El ajuste de la curva de 5-HT por proteínas totales (Fig. 10C) fue mejor a un periodo circadiano $\tau=23.5$ h (PR=54.5%) con acrofase a las 9.59 h. La amplitud de este ritmo no fue significativa.

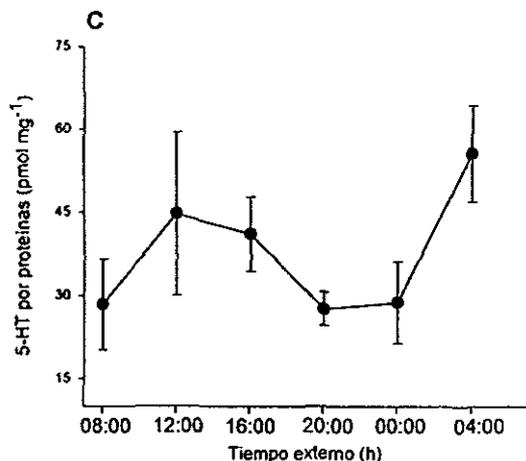
5-HT por peso húmedo



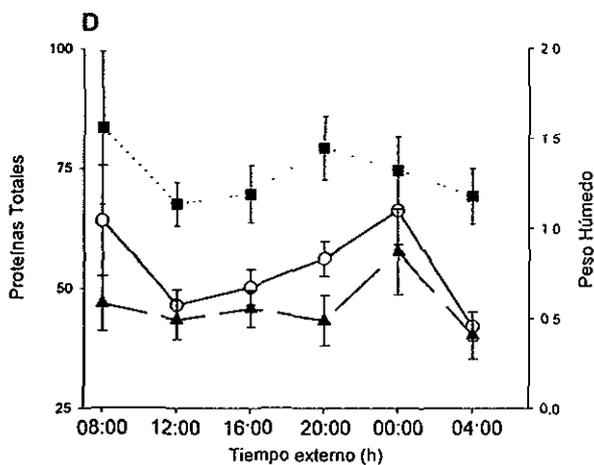
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo

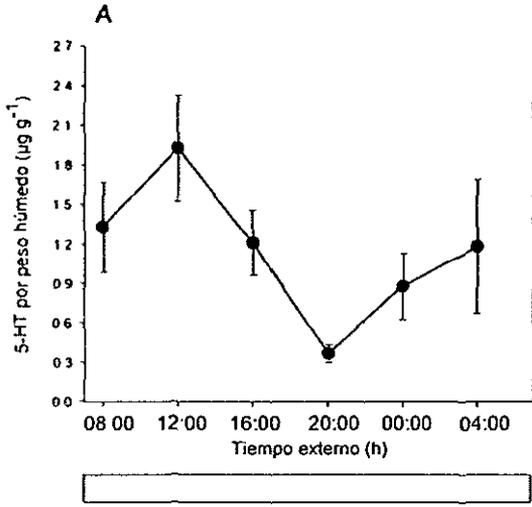


GRUPO DE EDAD: PO2
CONDICIÓN: LUZ CONSTANTE
ESTRUCTURA: TALLOS OCULARES

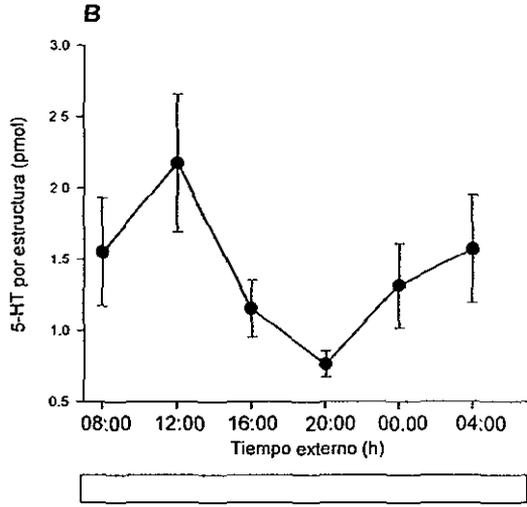
▲ Proteínas por peso ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
○ Proteínas por estructura (μg)
■ Peso húmedo (mg)

Figura 9. Cambios rítmicos del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el tallo ocular de acociles PO2 después de a 72 horas de luz constante.

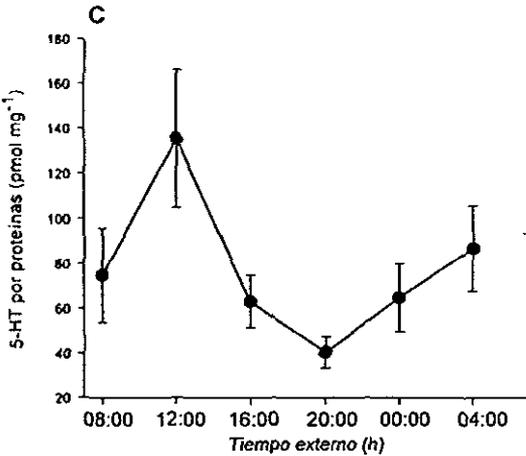
5-HT por peso húmedo



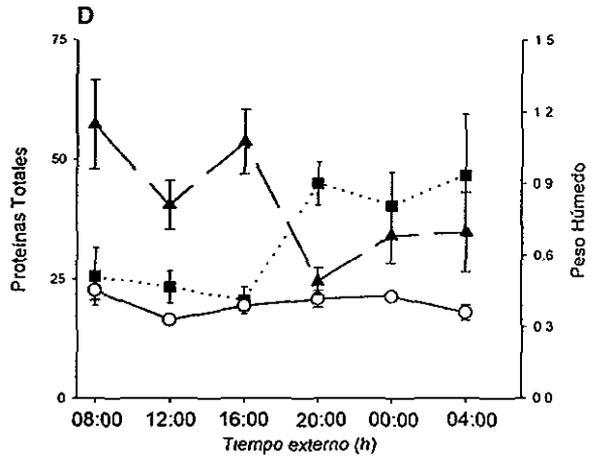
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo



GRUPO DE EDAD: PO2
 CONDICIÓN: LUZ CONSTANTE
 ESTRUCTURA: CEREBRO

—▲— Proteínas por peso (µg mg⁻¹)
 —○— Proteínas por estructura (µg)
 ···■··· Peso húmedo (mg)

Figura 10. Cronograma que muestra las variaciones del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo en el ganglio cerebroide de acociles PO2 después de 72 horas de iluminación continua.

4. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil juvenil

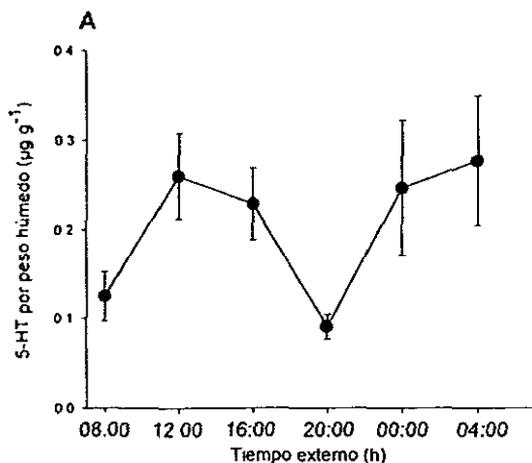
a) Ciclos luz-oscuridad.

En los tallos oculares del juvenil en condiciones de sincronización, se expresa un ritmo bimodal del contenido de 5-HT. Sin embargo, este ritmo es diferente al observado bajo las mismas condiciones de iluminación en los tallos oculares del animal PO2. En este caso, el contenido más alto de 5-HT ocurre a las 00:00 y 12:00 (Fig. 11C). Este ritmo es bimodal, y presenta un pico durante el periodo de iluminación y otro durante el periodo de oscuridad. Evidentemente, es importante señalar que las diferencias temporales observadas entre los diferentes paneles de la Figura 11, están influenciadas por los cambios cíclicos que pudieron detectarse en las variables con que se normalizó el contenido de 5-HT, y que se ilustran en la Figura 11D.

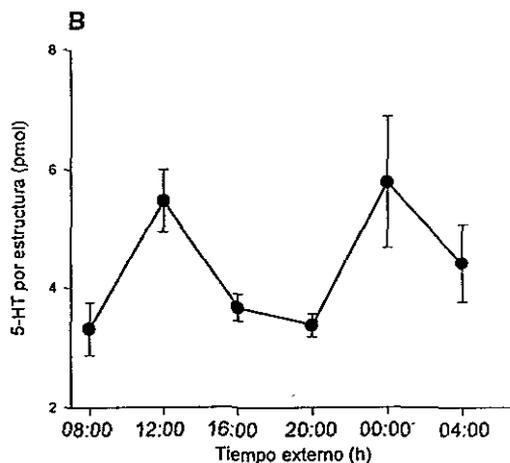
En condiciones de sincronización, aparece por primera vez un ritmo bimodal del contenido de 5-HT en el cerebro de los animales juveniles (Fig. 12). Debe recordarse que en el grupo de edad anterior (PO2), este ritmo era circadiano. El ritmo bimodal que se observa en la Figura 12 tiene características temporales similares al señalado anteriormente en los tallos oculares, por lo que es probable que ambas estructuras se encuentren acopladas. Nuevamente se observan dos picos, uno durante el día y otro durante la noche. Cuando el contenido de 5-HT se expresa por proteínas totales (Fig. 12C) el pico diurno ocurre a las 16:00 h, y el nocturno que es el mayor, ocurre a las 00:00 h.

En este caso, también se detectó un ritmo de baja amplitud en el contenido de proteínas totales por peso (Fig. 12D). Este ritmo presenta un par de elevaciones a las 12:00 y 20:00 h, siendo esta última de menor amplitud que la primera. No se encontraron cambios importantes en los valores de peso húmedo.

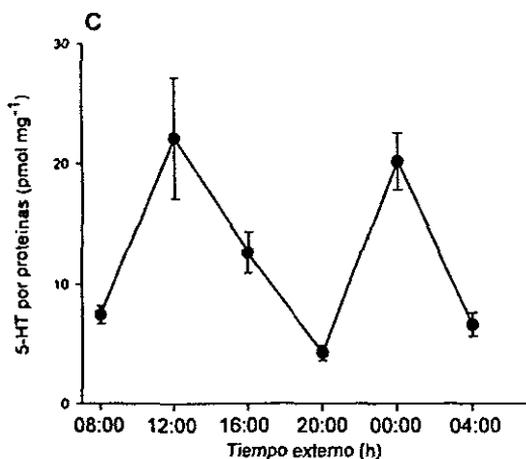
5-HT por peso húmedo



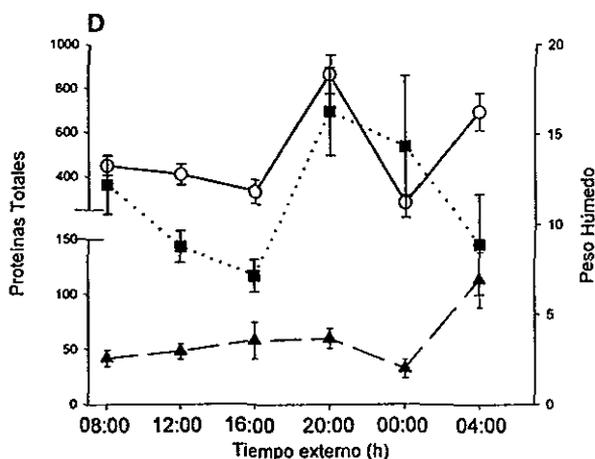
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo

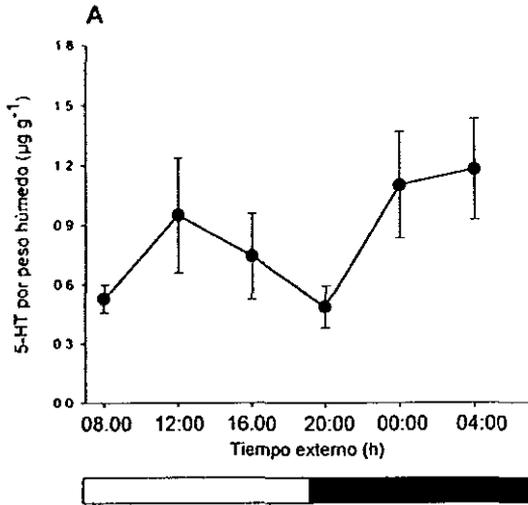


GRUPO DE EDAD: JUVENIL
 CONDICIÓN: LUZ-OSCURIDAD
 ESTRUCTURA: TALLOS OCULARES

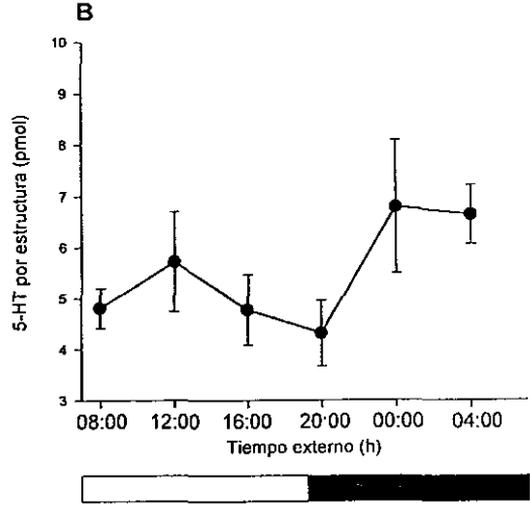
▲ - Proteínas por peso (µg mg⁻¹)
 ○ - Proteínas por estructura (µg)
 ■ - Peso húmedo (mg)

Figura 11. Cambios del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en los tallos oculares de acociles juveniles bajo ciclos LO 12:12. Las barras centrales indican las condiciones de iluminación.

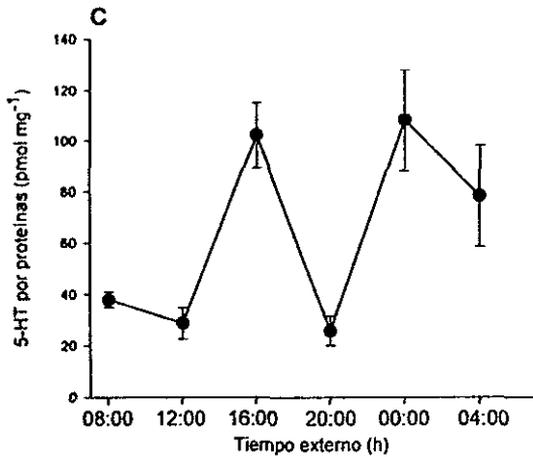
5-HT por peso húmedo



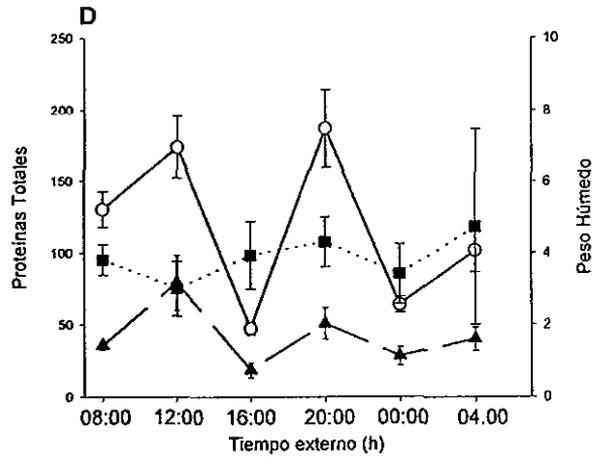
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo



GRUPO DE EDAD: JUVENIL
CONDICIÓN: LUZ-OSCURIDAD
ESTRUCTURA: CEREBRO

▲ Proteínas por peso (µg mg⁻¹)
○ Proteínas por estructura (µg)
■ Peso húmedo (mg)

Figura 12. Cambios rítmicos del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el ganglio cerebroide del acocil juvenil bajo condiciones de sincronización.

b) Luz constante.

Bajo condiciones de iluminación continua, el contenido de 5-HT en los tallos oculares del juvenil continúa oscilando libremente. Sin embargo, el ritmo bimodal que pudo observarse en esta estructura bajo condiciones de sincronización desaparece, y únicamente permanece un ritmo circadiano del contenido de 5-HT. Estos cambios rítmicos, pueden observarse en las Figuras 13A, 13B, y 13C. El ritmo de 5-HT en los tallos oculares del juvenil tiene características temporales muy similares independientemente de la variable con que se normalicen los resultados. Por ejemplo, cuando el contenido de esta amina es expresado en función contenido de proteínas totales (Fig. 13C), alcanza valores máximos a las 08:00 h, cae gradualmente hacia las 16:00 h y permanece en los niveles mínimos hasta las 04:00 h. El análisis de cosinor aplicado a esta serie de tiempo (5-HT por proteínas totales) donde se observa un ligero incremento en los niveles de 5-HT alrededor de las 20:00 h ajustó mejor los datos a un periodo ultradiano $\tau=11.9$ h (PR=54.1%) con acrofase a las 8.82 h. Sin embargo, parece que el ritmo no es estadísticamente significativo. El resto de los parámetros de la serie de tiempo analizados por cosinor puede consultarse en la Tabla 3.

TABLA 3. Análisis de cosinor de los cronogramas del contenido de 5-HT en tallos oculares y cerebro de acociles juveniles tras 72 horas de exposición a condiciones de iluminación continua.

Estructura	Fig.	Contenido de 5-HT	Periodo τ (h)	Mesor	Amplitud	Acrofase (h)	PR (%)
Juvenil Tallos Oculares	13A	$(\mu\text{g g}^{-1})$	12	0.37 ± 0.13	0.202	9.28	29.8
			25.7	0.37 ± 0.08	0.307	10.33	71.3
	13C	(pmol mg^{-1})	11.9	20.52 ± 4.55	12.053	8.82	54.1
25			20.52 ± 4.87	10.501	9.40	47.6	
Cerebro	14A	$(\mu\text{g g}^{-1})$	11.4	0.51 ± 0.06	0.125	9.52	42.7
			24	0.51 ± 0.08	0.093	13.04	20.3
	14C	(pmol mg^{-1})	7	83.19 ± 13.43	$63.808 \blacklozenge$	6.39	63.3
			12	83.19 ± 19.33	26.539	7.92	23.9

La amplitud difiere significativamente de cero: $\blacklozenge F = 5.640$, $P < 0.1$. PR = Porcentaje de ritmo.

Tal y como ocurrió bajo condiciones de sincronización, en este grupo de edad también se observó una ligera variación del contenido de proteínas por unidad de peso en los tallos oculares tras 72 horas de iluminación continua (Fig. 13D). En este caso, no existen cambios importantes en el peso de las estructuras a lo largo del día.

Como ocurrió con el primer grupo de edad (PO2), las variaciones cíclicas del contenido de 5-HT en el cerebro observadas durante la presencia de ciclos LO 12:12, continuaron después de exponer a los animales juveniles a tres días de luz constante tenue. Bajo estas condiciones, el ritmo observado (Fig. 14), continúa siendo bimodal y mantiene características similares a las observadas durante la sincronización. En esta ocasión, es posible observar que los cambios en el contenido de 5-HT en el cerebro del juvenil bajo condiciones constantes son ligeramente distintos al ilustrar los resultados normalizados por peso húmedo (Fig. 14A, estructura (Fig. 14B), y proteínas totales (Fig. 14C). Sin embargo, en todos los casos, existe un pico a las 20:00 h, y en las Figuras 14A y 14C, también coincide un primer pico de 5-HT a las 12:00 h. Es importante señalar la aparición por primera vez, de una tercera elevación del contenido de 5-HT que puede observarse al expresar los resultados en función del contenido de proteínas totales en el cerebro (Fig. 14C).

En el caso de la Fig. 14C, fue posible ajustar esta oscilación por cosinor, utilizando un periodo de prueba de 7 h ($PR=63.3\%$); es decir, confirmando la existencia de un ritmo de 5-HT endógeno de tres elevaciones en 24 h. Adicionalmente, el análisis reveló que en este caso, la amplitud de la oscilación difiere significativamente de cero ($F=5.640$; $P<0.1$).

El ritmo bimodal de baja amplitud del contenido de proteínas descrito en el cerebro del juvenil bajo ciclos LO continúa oscilando libremente en condiciones de iluminación continua (Fig. 14D). En este caso la amplitud del ritmo de proteínas aumenta y la forma de la curva es muy similar al expresar los datos como proteínas por estructura y como proteínas por unidad de peso.

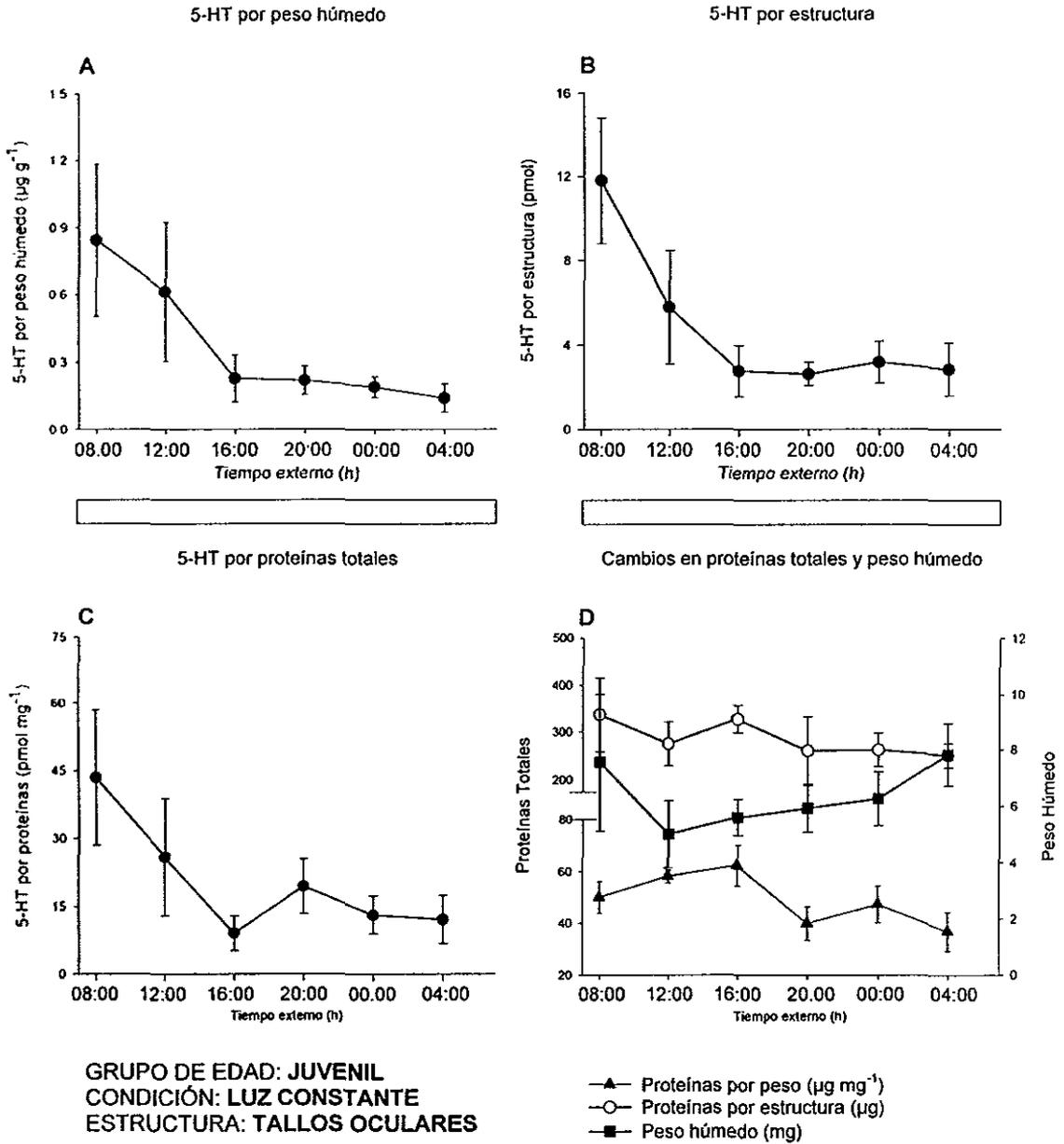
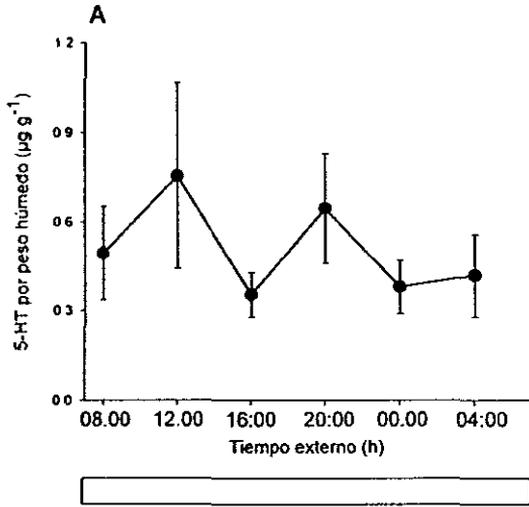
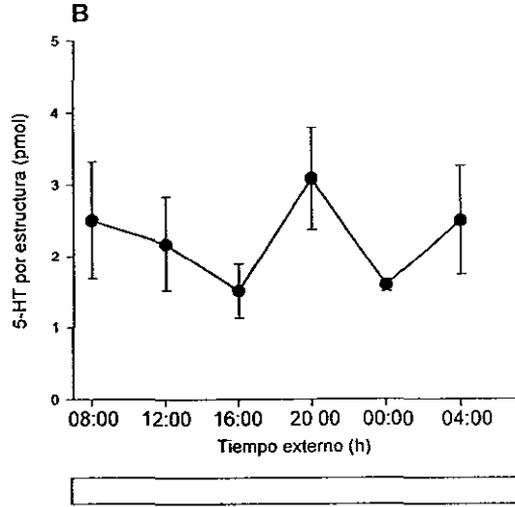


Figura 13. Variaciones rítmicas del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en los tallos oculares de acociles juveniles después de 72 horas en luz continua. Los puntos representan la media \pm EEM.

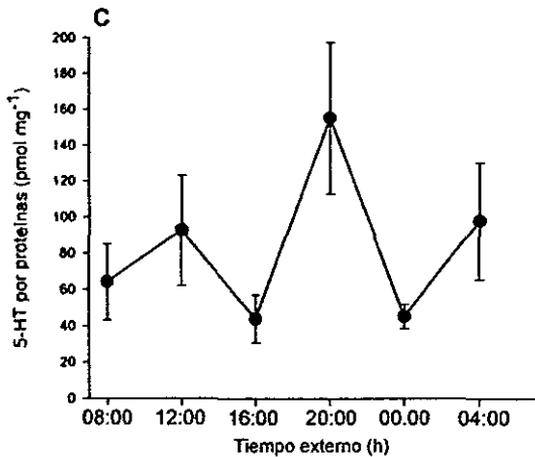
5-HT por peso húmedo



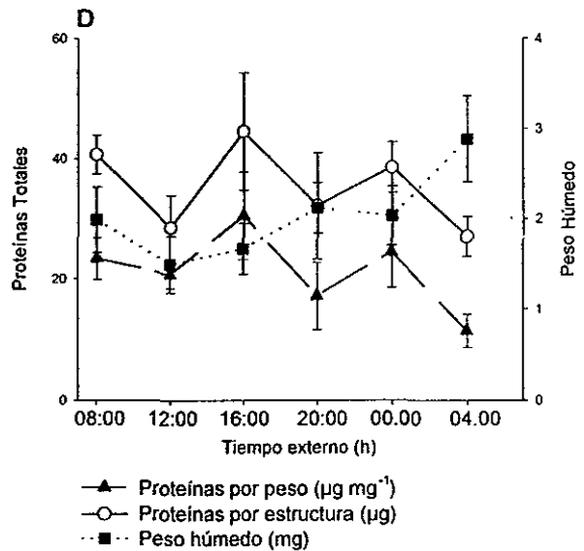
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo



GRUPO DE EDAD: JUVENIL
CONDICIÓN: LUZ CONSTANTE
ESTRUCTURA: CEREBRO

Figura 14. Cronograma del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el ganglio cerebroide de acociles juveniles en condiciones de luz continua.

5. Variaciones del contenido de serotonina en el acocil adulto

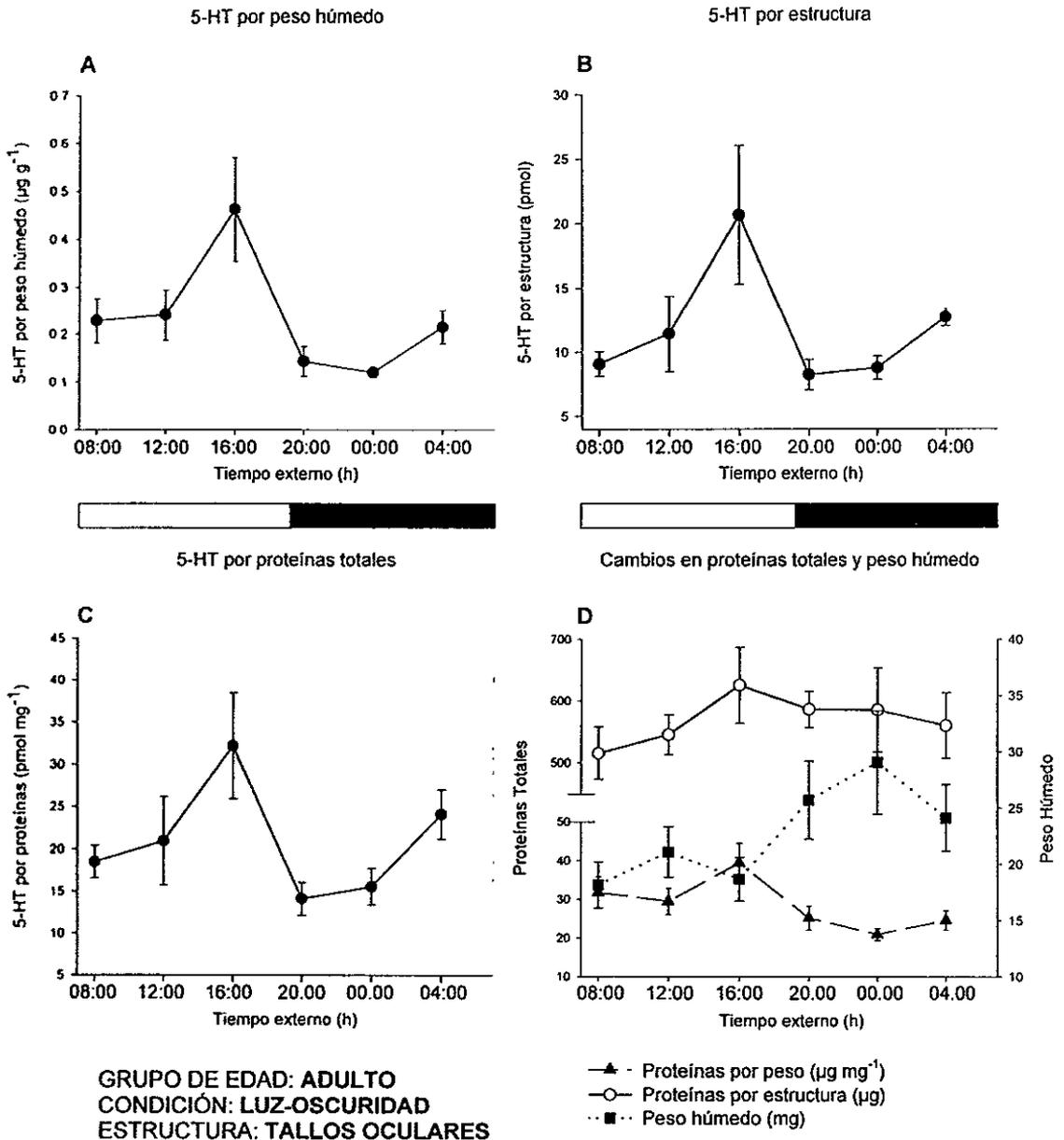
a) Ciclos luz-oscuridad.

En el acocil adulto y bajo condiciones de sincronización, existe un ritmo diario del contenido de 5-HT en los tallos oculares. Este ritmo, que se ilustra en la Figura 15, tiene un curso temporal muy similar en los paneles A, B y C de dicha figura, donde el contenido de 5-HT se relaciona con las variables que se han medido en este trabajo. Este ritmo diario presenta una clara elevación del contenido de 5-HT a las 16:00 h, con un segundo pico a las 04:00 h (Fig. 15C). Por lo tanto, y comparando los tres grupos de edad aquí analizados, los resultados indican que desde el inicio del desarrollo, existe en esta estructura un ritmo bimodal de 5-HT. En el animal juvenil y en el adulto bajo condiciones de sincronización este ritmo presenta un pico durante el día y otro durante la noche.

En el animal adulto, existe además una ligera variación del contenido de proteínas por estructura y por peso húmedo (Fig. 15D). Estos cambios en el contenido de proteínas también aparecen desde el inicio del desarrollo aunque son de mayor amplitud en el animal PO2.

En el cerebro del acocil adulto bajo ciclos LO, ocurre, como se observó desde el estado PO2, un ritmo diario del contenido de 5-HT. El ritmo unimodal observado al inicio del desarrollo, que posteriormente en el juvenil ya tenía características bimodales permanece en esta estructura, y sigue presentando dos elevaciones, una durante el día y otra en la noche. En los diferentes paneles de la Figura 16, puede observarse este ritmo bimodal del contenido de 5-HT en el cerebro de animales adultos bajo condiciones de sincronización expresado por peso húmedo (Fig. 16A), por estructura (Fig. 16B) y por proteínas totales (Fig. 16C). El contenido de 5-HT en el cerebro del acocil adulto, presenta variaciones bimodales en función del contenido de proteínas (Fig. 16C). El primer pico que es el de menor amplitud, ocurre a las 12:00 h, y el segundo, cerca del final del periodo de oscuridad, se presenta a las 04:00 h.

Aunque la amplitud de las variaciones es baja, el contenido de proteínas totales por estructura y por peso húmedo (Fig. 16D) también está cambiando durante el día.

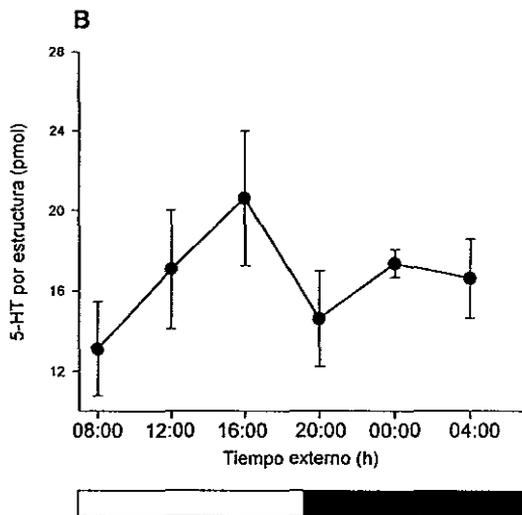
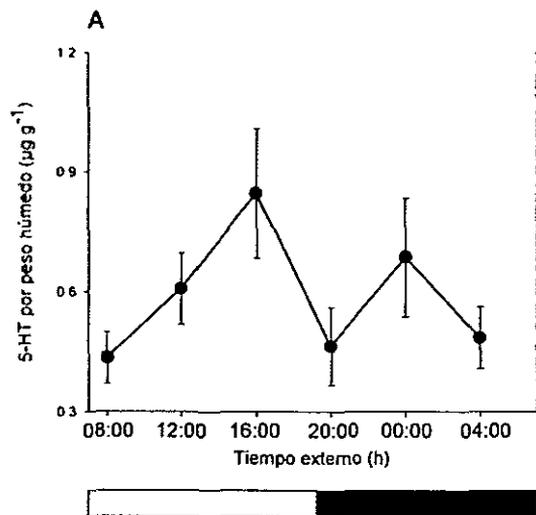


GRUPO DE EDAD: ADULTO
CONDICIÓN: LUZ-OSCURIDAD
ESTRUCTURA: TALLOS OCULARES

Figura 15. Cronograma que ilustra el contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) de tallos oculares de acociles adultos bajo ciclos LO 12:12.

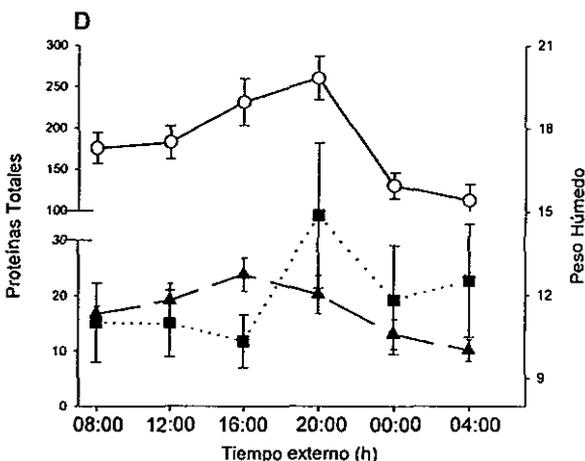
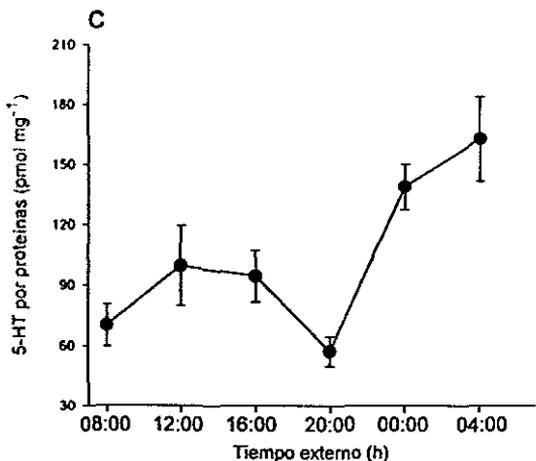
5-HT por peso húmedo

5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales

Cambios en proteínas totales y peso húmedo



GRUPO DE EDAD: ADULTO
CONDICIÓN: LUZ-OSCURIDAD
ESTRUCTURA: CEREBRO

—▲— Proteínas por peso (µg mg⁻¹)
—○— Proteínas por estructura (µg)
····■···· Peso húmedo (mg)

Figura 16. Cambios del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el ganglio cerebroide de acociles juveniles en condiciones de sincronización.

b) Luz constante.

En los tallos oculares del acocil adulto, persiste un ritmo del contenido de 5-HT bajo condiciones de iluminación constante. Lo anterior puede apreciarse en los paneles A, B y C de la Figura 17. Cabe recordar que bajo condiciones de sincronización se había observado que este ritmo era bimodal. A pesar de la variabilidad en los datos, en la Figura 17 es posible distinguir que el contenido de 5-HT en los tallos oculares del adulto continúa oscilando al ser liberado de señales de tiempo y que estos cambios persisten y tienen un curso temporal similar independientemente de cómo se expresen. Por ejemplo, al ser expresados como contenido de 5-HT por mg de proteína (Fig. 17C), pueden verse dos elevaciones de amplitud muy similar que aparecen a las 16:00 y 00:00 h. El análisis de cosinor confirmó el mejor ajuste como un ritmo bimodal $\tau=11.4$ h (PR=41.7%). Sin embargo, este análisis indica que la amplitud de esta oscilación no es significativa. El resto de los parámetros obtenidos de los diferentes análisis de cosinor aplicados a éstos y otros resultados se encuentra en la Tabla 4.

TABLA 4. Análisis de cosinor de los cronogramas del contenido de 5-HT en tallos oculares y cerebro de acociles adultos tras 72 horas de exposición a condiciones de iluminación continua.

	Estructura	Fig.	Contenido de 5-HT	Periodo τ (h)	Mesor	Amplitud	Acrofase (h)	PR (%)
Adulto	Tallos oculares	17A	($\mu\text{g g}^{-1}$)	11.3	0.22 ± 0.03	0.060	4.51	26.7
		17C	(pmol mg^{-1})	11.4	14.47 ± 1.95	4.380	4.33	41.7
				24.3	14.47 ± 2.17	3.519	21.55	27.5
Cerebro	18A		($\mu\text{g g}^{-1}$)	9.2	0.48 ± 0.12	0.256	7.18	19.7
				23.9	0.48 ± 0.08	0.242	0.45	58.4
	18C		(pmol mg^{-1})	9.1	42.13 ± 9.99	20.560	7.23	15.4
				23.6	42.13 ± 6.65	20.739	0.09	62.5

En todos los casos la amplitud no difiere significativamente de cero. PR = Porcentaje de ritmo.

Cabe señalar que bajo condiciones constantes en los animales PO2, existe en los tallos oculares un ritmo bimodal del contenido de 5-HT. En el juvenil, sólo persiste como un ritmo circadiano y sin embargo, vuelve a manifestarse como bimodal en el animal adulto.

A pesar de haber observado variaciones durante la presencia de ciclos LO, no fue posible detectar cambios en el contenido de proteínas totales en los tallos oculares del acocil adulto bajo condiciones de iluminación continua (Fig. 17D). Estos cambios que habían sido detectados desde el inicio del desarrollo, parecen desaparecer bajo condiciones constantes en los tallos oculares del adulto.

Por otro lado, como se ha señalado, el contenido de 5-HT en el cerebro también varía durante el día. En el animal PO2 estos cambios ocurren bajo condiciones constantes y se manifiestan como un ritmo circadiano que cambia a bimodal en el juvenil y vuelve a ser unimodal en el adulto. En la Figura 18 se observa que en el cerebro de animales adultos expuestos a 72 horas de iluminación constante, persisten cambios rítmicos del contenido de 5-HT por proteínas totales (Fig. 18C). En este caso el nivel máximo de 5-HT se presenta a las 00:00 h. Cabe recordar que durante la sincronización, este ritmo en el cerebro del adulto manifestó un curso temporal bimodal.

A pesar de la ligera elevación en los niveles de 5-HT que se observa en las Figs. 18A y 18C a las 16:00 h, sugiriendo un aparente ritmo bimodal, el análisis de cosinor ajusta estos ritmos a periodos circadianos de 23.9 h (PR=58.4%) y 23.6 h (PR=62.5%) respectivamente. Sin embargo, con este análisis, la amplitud de estos ritmos no fue significativa.

Finalmente, el contenido de proteínas totales por unidad de peso en cerebro, que durante la sincronización presentó un ritmo diario de muy baja amplitud, parece mantenerse bajo condiciones constantes (Fig. 18D). No obstante, debe señalarse que en cada punto de estas curvas hay gran variabilidad y en general, estos cambios son de baja amplitud.

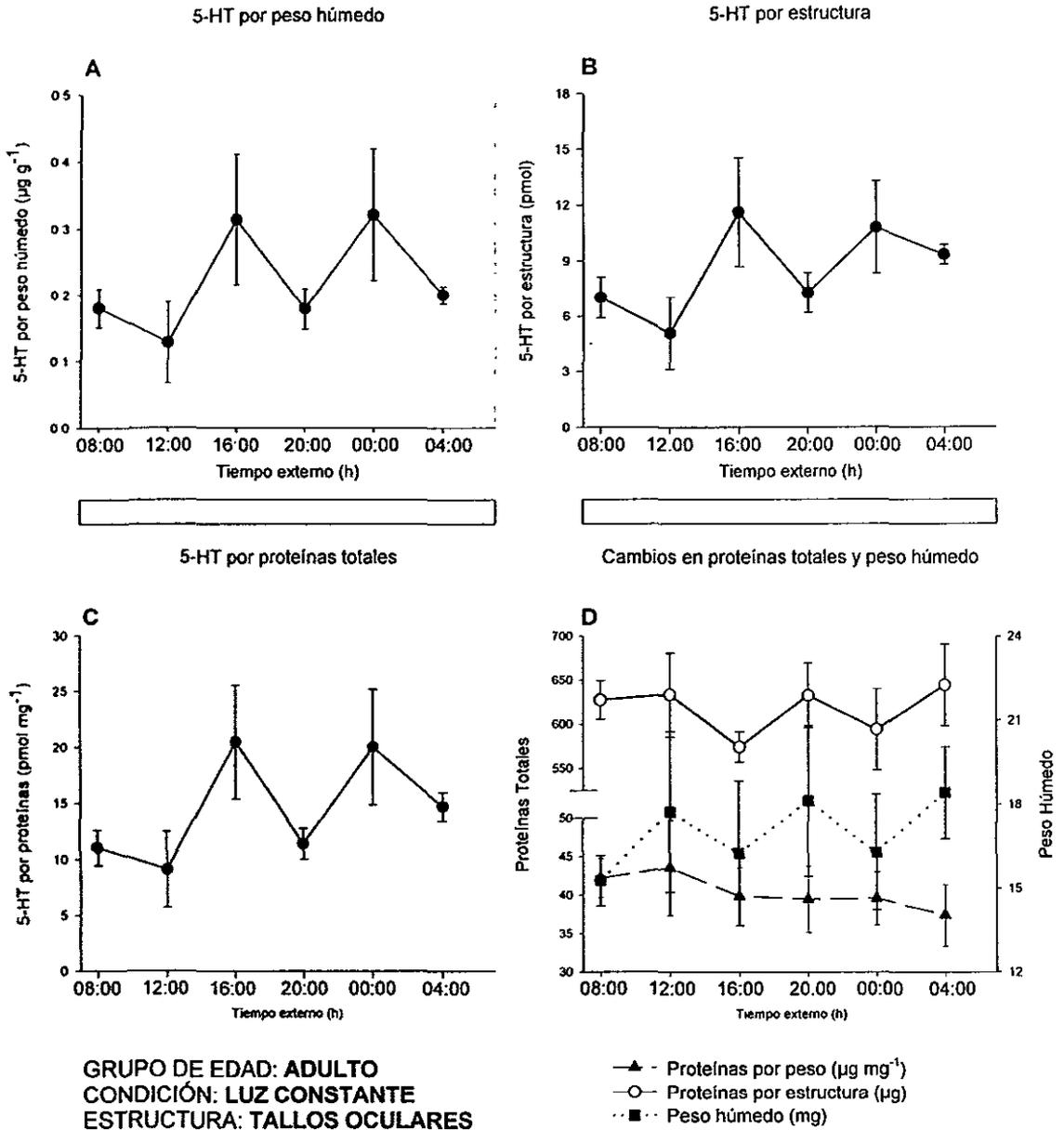
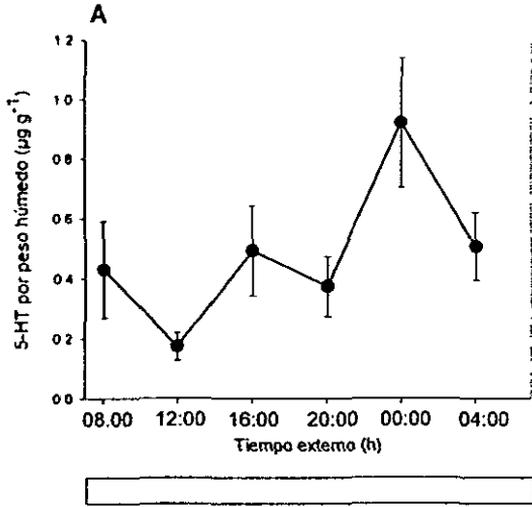
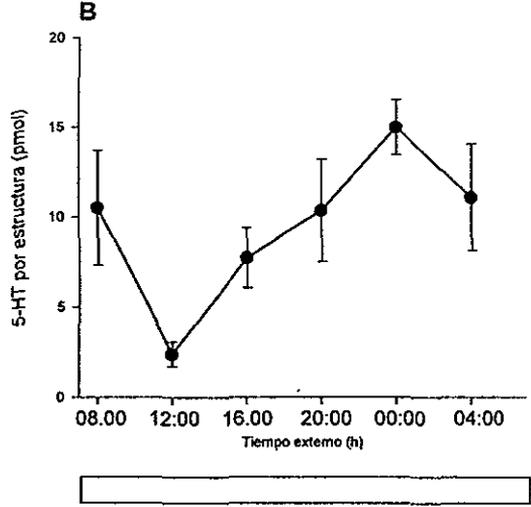


Figura 17. Cambios rítmicos del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en los tallos oculares de acociles adultos bajo condiciones de oscilación espontánea.

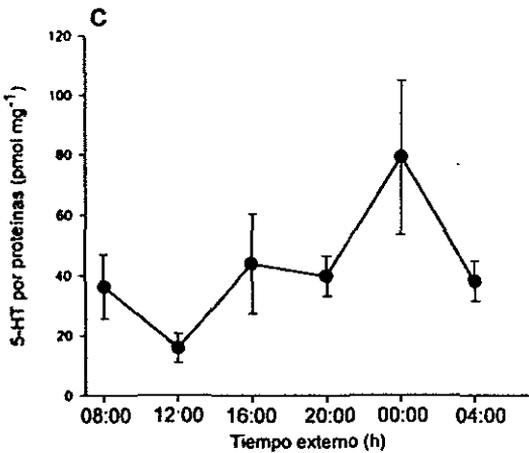
5-HT por peso húmedo



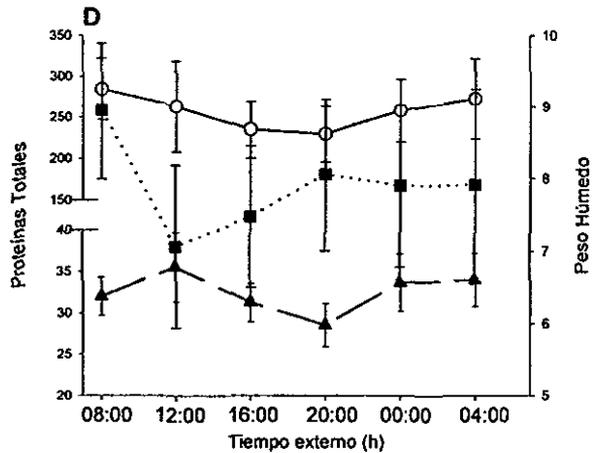
5-HT por estructura



5-HT por proteínas totales



Cambios en proteínas totales y peso húmedo



GRUPO DE EDAD: ADULTO
CONDICIÓN: LUZ CONSTANTE
ESTRUCTURA: CEREBRO

—▲— Proteínas por peso (µg g⁻¹)
—○— Proteínas por estructura (µg)
···■··· Peso húmedo (mg)

Figura 18. Variaciones rítmicas del contenido de 5-HT (A,B,C), proteínas totales y peso húmedo (D) en el ganglio cerebroide de acociles adultos bajo condiciones de oscilación espontánea.

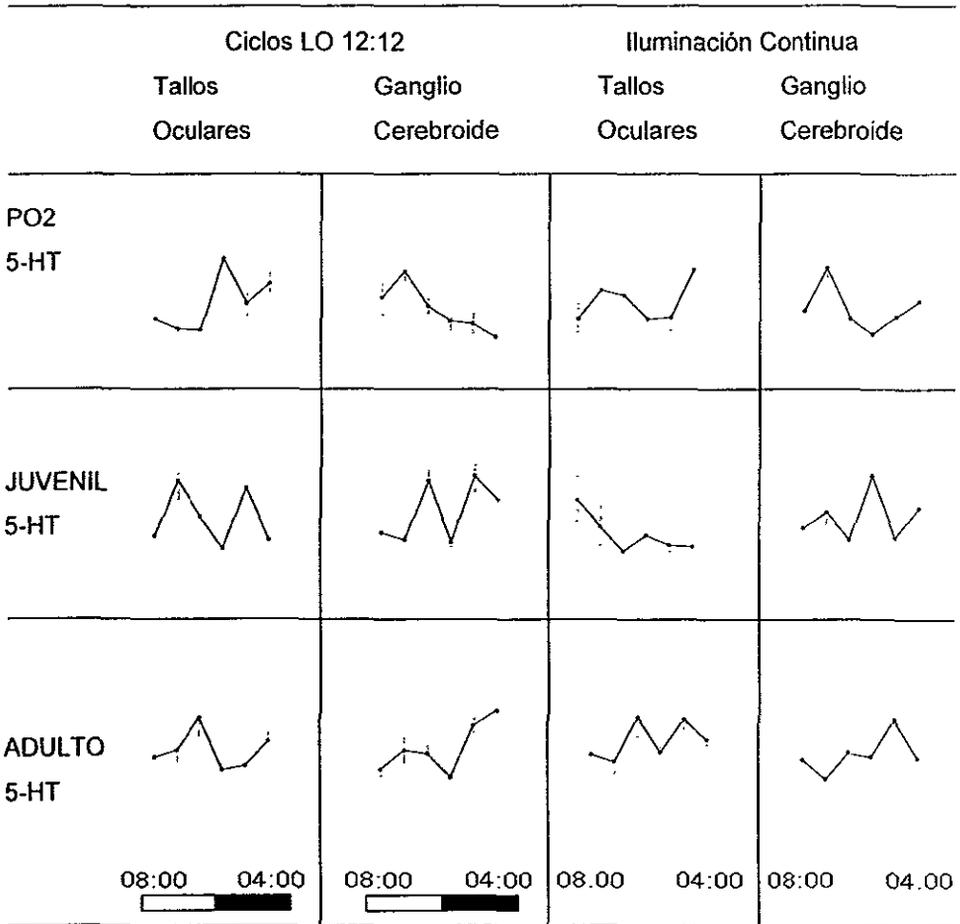
6. Síntesis de resultados

Como se señaló, los resultados indican que desde el inicio del desarrollo, existen variaciones circadianas y ultradianas del contenido de serotonina en los tallos oculares y el cerebro de *P. clarkii*. Estos cambios se manifiestan en condiciones de sincronización y de iluminación continua. La Tabla 5 presenta un resumen de los aspectos más importantes de los resultados de este trabajo. En general, parece que independientemente de la edad, bajo condiciones de sincronización, en los tallos oculares siempre existe un ritmo bimodal de 5-HT. En el animal PO2 y dependiendo de la forma de normalizar los resultados, este ritmo parece presentar ambas elevaciones durante el periodo de oscuridad, y a partir del juvenil, siempre ocurre un pico de 5-HT en el día y otro durante la noche (Tabla 5). Ahora bien, la permanencia de bimodalidad bajo condiciones de iluminación constante en todos los grupos de edad confirma el carácter endógeno de estas oscilaciones. Sólo en un caso, el análisis de cosinor aplicado a los datos, sugiere que en el juvenil, el ritmo observado en los tallos oculares en luz continua, puede ajustarse mejor a una curva con periodo circadiano.

En el cerebro, las oscilaciones del contenido de 5-HT también aparecen desde el inicio del desarrollo. Bajo condiciones de luz-oscuridad, el cerebro de los animales PO2 presenta un ritmo unimodal de 5-HT con máximo diurno. A partir del juvenil y hasta el adulto, este ritmo se transforma en bimodal, y como sucede en los tallos oculares, también en el cerebro presenta un pico diurno y otro nocturno (Tabla 5). Sin embargo, bajo iluminación constante, no siempre permanecen las características de estos cambios. En el cerebro del animal PO2 persiste el ritmo unimodal observado bajo condiciones de sincronización; pero en el juvenil, el ritmo bimodal observado bajo ciclos LO cambia a trimodal al expresarlo como 5-HT por proteínas totales. Finalmente, en el adulto, bajo condiciones de iluminación continua, existe un ritmo circadiano de 5-HT en el cerebro, que bajo condiciones de sincronización era bimodal (Tabla 5). No obstante, en la mayoría de los casos, el análisis estadístico seleccionado para estos resultados indica que la amplitud de estas oscilaciones no es significativa.

Además de los cambios antes descritos, se observó la existencia de cambios rítmicos en el contenido de proteínas totales y peso húmedo de las estructuras estudiadas, aunque el carácter endógeno de estas variaciones no ha sido plenamente demostrado.

Tabla 5. Cambios rítmicos en el contenido de 5-HT en los tallos oculares y el ganglio cerebroide del acocil *P. clarkii* bajo diferentes condiciones de iluminación durante el desarrollo.



08:00 04:00

08:00 04:00

08.00 04:00

08:00 04.00

CONTENIDO DE 5-HT POR mg DE PROTEÍNA.

VIII. DISCUSIÓN

1. Identificación de serotonina en los extractos.

A partir del análisis de los extractos obtenidos de los tallos oculares y cerebro, es claro que en efecto, la sustancia presente en ellos, y que se oxidó a 0.6V es 5-HT. El tiempo de elución promedio, tanto de los extractos como de la 5-HT estándar (9.36 minutos), es similar al reportado en otros estudios cuando se utiliza la fase móvil empleada en este trabajo (Marsden y Joseph, 1986). El tiempo de elución de una sustancia separada por HPLC depende entre otros factores de la longitud de la columna, el pH de la fase móvil, la concentración de metanol en el disolvente, la composición y características físicas de la fase estacionaria, la tasa de flujo, etc. A pesar de lo anterior, es posible comparar los tiempos de elución que han sido reportados al cuantificar el contenido de 5-HT en extractos ácidos en trabajos anteriores. Por ejemplo, Kulkarni y Fingerma (1992), reportaron que la 5-HT presente en distintas estructuras del sistema nervioso de *P. clarkii* eluye entre 8.8 y 8.9 minutos después de inyectar la muestra. Chamberlain *et al.* (1986), empleando una columna analítica de 25 cm y con una fase móvil diferente, reportaron que la 5-HT presente en extractos del ojo lateral y cerebro de *Limulus polyphemus* eluyó entre 18 y 20 minutos. Otros autores (Rodríguez-Sosa *et al.* 1997), empleando la misma técnica, han reportado tiempos de retención tan largos como 34.6 minutos. Sin embargo, en todos los casos, la 5-HT se encuentra presente en los extractos y ha sido posible detectarla y cuantificarla con gran sensibilidad por medio de la técnica utilizada en este trabajo.

Como se señaló, y pudo observarse en la Figura 6, el método de doble comprobación para detectar objetivamente el pico de 5-HT (1. comparación de tiempos de retención de la 5-HT estándar y el presunto pico del extracto. 2. Adición de 5-HT estándar al extracto), permite afirmar que efectivamente, la sustancia cuantificada, y que presenta variaciones circadianas y ultradianas a través del tiempo, es 5-HT.

2. Cambios en el contenido de serotonina durante el desarrollo

Los resultados de este trabajo demuestran cambios diarios y de alta frecuencia en la concentración de 5-HT en los tallos oculares y cerebro del acocil *P. clarkii* que ocurren al menos desde el segundo estado postembrionario, y permanecen hasta el estado adulto. Sin embargo, las características de estos cambios presentan variaciones durante el desarrollo que en ocasiones se manifiestan por la aparición de picos que modifican la posible periodicidad de los ritmos descritos. Los cambios cíclicos en la concentración de 5-HT en los tallos oculares y cerebro aquí descritos, ocurrieron en presencia de ciclos LO 12:12 y continuaron cuando los

animales fueron expuestos a condiciones de luz continua durante tres días. Esto indica, que los ritmos observados son de naturaleza endógena, siendo la expresión de al menos, un oscilador marcapaso acoplado al sistema serotoninérgico y que es funcional desde el estado PO2.

El desarrollo de inmunorreactividad a 5-HT en diferentes partes del cerebro del acocil *Cherax destructor* ha sido ampliamente estudiado (Sandeman y Sandeman, 1990; Helluy *et al.* 1993). Estos autores reportaron que cuando emerge el animal PO2, la mayoría de las características del sistema serotoninérgico del adulto ya están presentes. En este trabajo se ha demostrado que en *P. clarkii* la 5-HT también está presente en ambas estructuras del sistema nervioso desde el estado PO2. En un estudio previo (Escamilla-Chimal *et al.* 1998), se reportó la existencia de cambios diarios en la inmunorreactividad a 5-HT durante el desarrollo en la retina de *P. clarkii* bajo ciclos LO 12:12. Los resultados bioquímicos presentados aquí, parecen confirmar y extender el trabajo previo. Sin embargo, es importante señalar que el trabajo anterior se vio limitado al analizar únicamente las variaciones en la presencia de inmunorreactividad a 5-HT a tres diferentes horas del día, por lo que no fue posible el análisis de la posible periodicidad de estos cambios, además de no haber llevado a cabo el análisis bioquímico de los mismos.

En general, el contenido de 5-HT expresado en función del peso húmedo y del contenido de proteínas totales es mayor en los animales más jóvenes. Se ha demostrado, que la 5-HT tiene un papel primordial como regulador de la diferenciación de diversas estructuras del cerebro de algunos invertebrados (Goldberg y Kater, 1989). Como se señaló, en este trabajo se ha mostrado que en el cerebro y los tallos oculares del animal PO2 el contenido de 5-HT tiene características diferentes por lo que podría estar involucrado en diversas funciones asociadas no sólo con el mantenimiento del orden temporal, sino además, con la regulación de la diferenciación durante el desarrollo. En la langosta por ejemplo, un grupo de neuronas serotoninérgicas en el cerebro, las neuronas dorsales gigantes juegan un papel importante en el desarrollo de estructuras cerebrales (Benton *et al.* 1997).

La 5-HT se encuentra presente en distintas estructuras del sistema nervioso de algunos decápodos, y ha sido previamente identificada y cuantificada empleando distintos métodos (Fingerman *et al.* 1974; Fingerman y Fingerman, 1977; Elofsson *et al.* 1982; Sandeman *et al.* 1988; Kulkarni y Fingerman, 1992; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997). Por ejemplo, en el cangrejo *Uca pugilator*, Fingerman *et al.* (1974), cuantificaron niveles de entre 7.38 y 7.63 $\mu\text{g g}^{-1}$ (contenido de 5-HT por g de peso húmedo) en los tallos oculares y de entre 2.77 y 3.38 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el cerebro. Más adelante, Fingerman y Fingerman (1977) reportaron por primera vez, la existencia de un ritmo circadiano de 5-HT en los tallos oculares de *Uca pugilator*, donde reportaron valores que oscilaron entre 3.8 y 9.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Métodos más precisos

aplicados en años más recientes, han permitido mejorar estas determinaciones. En el acocil *Pacifastacus leniusculus*, Elofsson *et al.* (1982) empleando HPLC con detección electroquímica determinaron que en diferentes estructuras del sistema nervioso, el contenido de 5-HT se encuentra entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g g}^{-1}$. En el acocil adulto *P. clarkii*, Kulkarni y Fingerman (1992) y Rodríguez-Sosa *et al.* (1997), midieron el contenido total de 5-HT en estructuras del sistema nervioso. Empleando la misma técnica utilizada en el presente trabajo, estos autores reportaron niveles de 5-HT de entre 0.054 y 0.168 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los valores promedio reportados en el presente trabajo (cerebro, $0.655 \pm 0.039 \mu\text{g g}^{-1}$; tallos oculares, $0.337 \pm 0.021 \mu\text{g g}^{-1}$) son superiores a los encontrados por Kulkarni y Fingerman (1992) y Rodríguez-Sosa *et al.* (1997). Sin embargo, son similares a los reportados por otros autores (Elofsson *et al.* 1982).

En trabajos anteriores (Elofsson *et al.* 1982; Kulkarni y Fingerman, 1992) se ha reportado que el contenido de 5-HT es mayor en el cerebro que en cualquier otra estructura del sistema nervioso y que la iluminación incrementa sus niveles de concentración. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman lo anterior, pues independientemente de la edad, el contenido de 5-HT por peso húmedo es siempre mayor en el cerebro. Además, las condiciones de iluminación modifican significativamente el contenido de 5-HT en ambas estructuras dependiendo de la edad, pues parece haber un cambio durante el desarrollo en el efecto de la luz sobre el ritmo de 5-HT, ya que en los animales más jóvenes éste aumenta con la luz, y al avanzar el desarrollo disminuye (Ver Tabla 1).

En general, en los tallos oculares de los animales más jóvenes mantenidos bajo ciclos LO, el nivel más alto de 5-HT se presentó durante el periodo de oscuridad, mientras que al avanzar el desarrollo en el adulto, el nivel más alto ocurrió durante la fotofase. Es decir, durante la ontogenia, parece haber un cambio en la relación que se establece entre las condiciones de iluminación y los cambios en el contenido de 5-HT. En vertebrados diurnos, se ha reportado que la concentración de 5-HT aumenta durante la noche y disminuye durante el día, mientras ocurre lo contrario en animales nocturnos (Campagnan y Inouye, 1994). Por lo tanto, los cambios que ocurrieron durante el desarrollo en los tallos oculares de los animales sometidos a condiciones de sincronización podrían estar relacionados con cambios en el nicho temporal que ocuparía *P. clarkii* durante la ontogenia. Es decir, parece que al igual que ocurre con el ritmo de sensibilidad visual, en los tallos oculares el ritmo de 5-HT cambia su fase máxima durante el desarrollo de diurna a nocturna.

Fanjul-Moles *et al.* (1987) han reportado que la sensibilidad del ojo del acocil medida a través de cambios en la amplitud del electrorretinograma, cambia durante el desarrollo. Los animales más jóvenes presentan mayor sensibilidad visual durante el día (lo que correspondería a un animal diurno), mientras que como adultos, el electrorretinograma revela que la mayor sensibilidad visual ocurre durante la noche

(como corresponde a un animal nocturno). Es decir, este ritmo invierte la fase durante el desarrollo y además, es capaz de sincronizarse a ciclos de luz (Fuentes *et al.* 1992). La 5-HT juega un papel muy importante en la modulación de la sensibilidad visual de *P. clarkii*, ya que además de incrementar la amplitud del electroretinograma, modifica directamente el movimiento del pigmento proximal durante su fase nocturna (Aréchiga *et al.* 1990).

Los cambios rítmicos que ocurrieron en los cerebros de animales PO2 bajo ciclos LO 12:12 son similares a los reportados en el cerebro y núcleo supraquiasmático de ratas (Campagnan y Inouye, 1994), donde los niveles más altos de 5-HT fueron medidos durante el periodo de iluminación, y los más bajos durante la oscuridad. En los animales PO2, los ritmos de 5-HT del cerebro y los tallos oculares en condiciones de sincronización se encuentran aproximadamente 180° desfasados entre sí.

Al avanzar el desarrollo, el curso temporal del ritmo de 5-HT en el cerebro de juveniles y adultos bajo ciclos LO cambió a un patrón bimodal, similar al observado en cada grupo de edad en los tallos oculares, por lo que es posible especular que en presencia de ciclos LO, a partir del juvenil, los ritmos de 5-HT de ambas estructuras se acoplan entre sí, o bien, que el ciclo LO es capaz de acoplar el ritmo de 5-HT de ambas estructuras.

3. Relación entre diversos ritmos endógenos durante el desarrollo

Los cambios rítmicos en el contenido de 5-HT aquí reportados podrían ayudar a dilucidar el papel de la inervación serotoninérgica del ganglio cerebroide en *P. clarkii* (Sandeman y Sandeman, 1990; 1998), que posiblemente contiene uno o varios relojes circadianos (Page y Larimer, 1975; Barrera-Mera y Block, 1990). Además, existen cuerpos celulares y axones serotoninérgicos en los cuatro neuropilos de los tallos oculares (Elofsson, 1983; Rodríguez-Sosa *et al.* 1997) y estudios que han demostrado la existencia de inmunorreactividad a la enzima de síntesis de la 5-HT (triptofano-hidroxilasa) en la retina (Escamilla-Chimal *et al.* 1998). El papel de todas estas estructuras en el mantenimiento de la organización temporal del animal, podría estar relacionado con los cambios rítmicos reportados en este trabajo. Sin embargo, aún no hay evidencias de esta posible correlación.

En los vertebrados, se ha reportado correlación entre el ritmo de actividad locomotora y un ritmo circadiano en la concentración de 5-HT (Redfern, 1996). Los resultados del presente trabajo sugieren esta correlación en el acocil. El desarrollo y las características temporales de los ritmos de 5-HT aquí presentados son similares a las del ritmo circadiano de actividad locomotora descritas anteriormente (Fanjul-Moles *et al.* 1996, 1998; Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997). Los animales PO2,

juveniles y adultos muestran ritmos de actividad unimodales que oscilan libremente bajo condiciones constantes, y que son capaces de sincronizarse a diferentes ciclos LO presentando dos picos, uno endógeno y otro exógeno. La aparición de este último parece depender del desarrollo del ojo (Fanjul-Moles *et al.* 1998). Por lo anterior, es posible especular que el pico endógeno del ritmo circadiano de actividad locomotora esté relacionado con el pico endógeno de 5-HT en el cerebro que aparece desde el inicio del desarrollo. Así, este ritmo endógeno de 5-HT podría reflejar cambios en la actividad de neuronas serotoninérgicas del cerebro relacionados con las pautas conductuales del acocil. Se ha reportado que la estimulación eléctrica de neuronas serotoninérgicas favorece la liberación de 5-HT (Rodríguez-Sosa *et al.* 1997) y que además, en otra especie, estas neuronas presentan cambios cíclicos de actividad eléctrica (Sandeman y Sandeman, 1994; Sandeman *et al.* 1995a).

Por su parte, el desarrollo temporal del ritmo de amplitud del electrorretinograma podría estar relacionado con la aparición de ritmos bimodales y trimodales de 5-HT observados en tallos oculares y cerebro. En el animal adulto, existen mecanismos neuroendocrinos complejos involucrados en el origen y/o sincronización del ritmo de sensibilidad visual (Aréchiga *et al.* 1993). Por lo tanto, la secreción circadiana de diferentes neurohormonas parece afectar la sensibilidad del ojo. En algunos casos, estos ritmos endocrinos presentan la acrofase durante la noche, mientras en otros, se presenta durante el día; pero en ambos casos, estas variaciones cíclicas podrían ser moduladas por 5-HT. La relación entre 5-HT, luz y algunas de estas neurohormonas ha sido documentada (Fingerman y Fingerman, 1977; Kulkarni y Fingerman, 1992; Fingerman y Nagabhushanam, 1992). Se ha propuesto que la maduración gradual del ritmo de sensibilidad visual depende de la maduración de diversas estructuras del complejo órgano x – glándula sinusal (Fanjul-Moles *et al.* 1987; Fuentes-Pardo *et al.* 1992).

Otra hipótesis sugiere que la melatonina, también podría estar relacionada con el ritmo del electrorretinograma. La síntesis de 5-HT a partir de 5-hidroxitriptofano es un paso fundamental para la síntesis posterior de melatonina. Recientemente, se han reportado ritmos circadianos de melatonina y 5-HT-N-acetiltransferasa en los tallos oculares de *P. clarkii* (Agapito *et al.* 1995). En el acocil, aún no se ha investigado la relación entre 5-HT, melatonina y el ritmo de sensibilidad visual. Sin embargo, estudios durante la ontogenia sobre el ritmo de melatonina en vertebrados revelaron que la función cronométrica en el núcleo supraquiasmático, es el primer elemento del sistema en desarrollarse, y que, la capacidad de la glándula pineal para transformar n-acetilserotonina en melatonina es uno de los últimos elementos en ponerse en marcha (Klein, 1993).

En el acocil, es posible que la síntesis de melatonina ocurra en la retina y/o en el complejo órgano x – glándula sinusal (Agapito *et al.* 1995; Balzer *et al.* 1997). En un estudio anterior se reportó la presencia de inmunorreactividad a triptofano-

hidroxilasa (enzima de síntesis de 5-HT) en la retina de *P. clarkii* (Escamilla-Chimal *et al.* 1998). Además, existen neuronas serotoninérgicas procedentes del cerebro que inervan la medulla terminalis cerca del órgano x, donde células similares a pinealocitos han sido reportadas (Eloffson y Lake, 1971). Lo anterior sugiere nuevos estudios que intenten dilucidar las interacciones temporales entre la 5-HT y los diferentes ritmos endocrinos ya conocidos durante la ontogenia del acocil, lo que permitiría profundizar en el conocimiento de los mecanismos que determinan el desarrollo gradual del ritmo de amplitud del electroretinograma.

Durante el desarrollo, los cambios observados en el curso temporal que sigue el contenido de 5-HT en ambas estructuras parece ser distinto. Por ejemplo, en el animal PO2, el ritmo más significativo (en el cerebro) tuvo un periodo circadiano de 23.3 h ($P < 0.1$). En el juvenil en cambio, este ritmo circadiano podría comportarse como bimodal o incluso, trimodal; pues el ritmo más significativo tuvo un periodo ultradiano de 7 h ($P < 0.1$). Sin embargo, el cerebro del animal adulto vuelve a manifestar un ritmo circadiano de 5-HT tal y como ocurrió en el animal PO2. Por lo anterior, los resultados sugieren que en el cerebro de *P. clarkii* ocurre la aparición progresiva de componentes ultradianos de baja amplitud formando parte de un ritmo circadiano muy amortiguado no fácilmente detectado con el método de muestreo y el análisis estadístico utilizado. En los tallos oculares, estos componentes ultradianos son de mayor amplitud que en el cerebro, y aparecen desde el estado PO2. Si esta interpretación es correcta, lo anterior podría ser resultado de la acción de un oscilador circadiano actuando sobre mecanismos centrales que podrían determinar cambios periódicos en la síntesis, almacenamiento, liberación y metabolismo de 5-HT; o bien, resultado de variaciones rítmicas en la respuesta de órganos blanco (p. ej. los tallos oculares), como ha sido propuesto para algunos ritmos neuroendocrinos en mamíferos (Haus *et al.* 1998). Estudios posteriores podrían dirigirse a esclarecer algunos de estos mecanismos.

4. Posibles ritmos de proteínas totales y peso húmedo

Como se señaló, los resultados de este trabajo indicaron cambios en el contenido de proteína y en el peso húmedo de ambas estructuras del sistema nervioso. Durante el día, los cambios observados en el peso húmedo de tallos oculares y cerebro podrían representar variaciones en el contenido de agua en los tejidos en anticipación a cambios cíclicos en las condiciones del ambiente (Battelle, comunicación personal). En general, la amplitud de estos cambios es mayor en los animales PO2 y juvenil que en el adulto. En particular, los cambios en proteínas totales por peso húmedo analizados por cosinor (análisis no mostrado), no evidenciaron que la amplitud fuera significativamente diferente de cero. Adicionalmente, debido quizá al alto nivel de variabilidad de los resultados, este método de análisis que se basa fundamentalmente en la presencia de variaciones

significativas de la amplitud a través del tiempo no permitió establecer plenamente el carácter endógeno de estas variaciones. Aún así, es importante señalar que estos cambios continúan bajo condiciones de iluminación continua en ambas estructuras. Será necesario implementar otro tipo de análisis y quizá otro tipo de estudios que se enfoquen directamente a investigar estas observaciones.

IX. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo muestran cambios circadianos y ultradianos en la concentración de 5-HT en los tallos oculares y cerebro del acocil *P. clarkii* que ocurren al menos desde el segundo estado postembrionario, y permanecen hasta el estado adulto.
2. Los ritmos observados son de naturaleza endógena, siendo la expresión de al menos, un oscilador circadiano acoplado al sistema serotoninérgico y que es funcional desde el estado PO2.
3. En general el contenido de 5-HT es mayor en el cerebro que en los tallos oculares, y dependiendo de la edad las condiciones de iluminación causan un aumento o disminución en sus niveles en ambas estructuras.
4. El contenido de 5-HT es mayor en los animales más jóvenes independientemente de la estructura y de las condiciones de iluminación con excepción del cerebro en condiciones de sincronización.
5. Los cambios en el contenido de proteína y peso húmedo de ambas estructuras del sistema nervioso aquí reportados, persisten bajo condiciones de iluminación continua, sin embargo, aún no es posible establecer claramente que la amplitud de estos cambios sea significativa.

X. PERSPECTIVAS

1. Parece probable que el ritmo endógeno de 5-HT aquí descrito, esté relacionado con los cambios reportados en los ritmos circadianos de amplitud del electroretinograma y actividad locomotora. Con la finalidad de investigar lo anterior existe la posibilidad de correlacionar los resultados experimentales de este trabajo con los registros de ambos ritmos que a través de la ontogenia se tienen ya en nuestro laboratorio.
2. La segunda parte de este estudio podría incluir la cuantificación del contenido de 5-HT en el cerebro y tallos oculares de acociles en condiciones de cultivo *in vitro*. Lo anterior, ayudaría a esclarecer si es una o ambas estructuras el sitio de origen del ritmo de 5-HT y si ésta, efectivamente cumple la función de acoplador de estos posibles marcapasos. Por otra parte, este tipo de experimentos permitiría investigar algunos de los mecanismos de acción de esta amina sobre los ritmos circadianos estudiados, ya que podrían medirse cambios periódicos en la síntesis, liberación y metabolismo de 5-HT que serían correlacionados con los cambios durante el desarrollo de los ritmos antes descritos.
3. De investigarse la farmacología de los receptores a 5-HT involucrados en estos procesos, un siguiente paso de la investigación consistiría en utilizar antagonistas de dichos receptores y sustancias como la reserpina que ocasionan la disminución de los niveles del neurotransmisor. Esta manipulación del sistema serotoninérgico del acocil durante diferentes etapas del desarrollo, permitiría determinar el papel de la 5-HT en el surgimiento gradual del ritmo del electroretinograma y su posible función en la sincronización interna del organismo.
4. Finalmente, es necesario explorar si las variaciones rítmicas observadas en el contenido de proteínas totales, especialmente en los animales más jóvenes, son efectivamente de naturaleza endógena. Si es así, podría procederse a la caracterización de aquella(s) proteína(s) que presentara(n) cambios cíclicos, y eventualmente a su aislamiento, purificación y secuenciación.

XI. REFERENCIAS

- Agapito, M. T., Herrero, B., Pablos, M. I., Miguel, J. L. y Recio, J. M. (1995). Circadian rhythms of melatonin and serotonin-N-acetyltransferase activity in *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, 179-185.
- Aguiar-Roblero, R., Salazar-Juárez, A., Rojas-Castañeda, J., Escobar, C. y Cintra, L. (1997). Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am. J. Physiol.* 273, R1321-R1331.
- Aguiar-Roblero, R. (1993). Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 2, 121-132.
- Aréchiga, H. y Wiersma, C. A. G. (1969). Circadian rhythm of responsiveness in crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1, 71-85.
- Aréchiga, H., Bañuelos, E., Frixione, E., Picones, A. y Rodríguez-Sosa, L. (1990). Modulation of crayfish retinal sensitivity by 5-hydroxytryptamine. *J. Exp. Biol.* 150, 123-143.
- Aréchiga, H., Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel, F. y Rodríguez-Sosa, L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* 10, 1-19.
- Aréchiga, H. y Fuentes, B. (1970). Correlative changes between retinal shielding pigments position and electroretinogram in crayfish. *Physiologist* 13, 137.
- Balzer, I., Espinola I. R. y Fuentes-Pardo, B. (1997). Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish. *Biol. Cell.* 89, 539-543.
- Barlow, R. B. Jr. y Chamberlain, S. C. (1980). Light and a circadian clock modulate structure and function in *Limulus* photoreceptors. En: *The effects of constant light on visual processes*. (eds. T.P. Williams y B.H. Baker), pp. 247-269. New York: Plenum Press.
- Barrera-Mera, B. (1976). Effects of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. Behav.* 17, 59-64.
- Barrera-Mera, B. y Block, G. D. (1990). Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* 522, 241-245.
- Benton, J., Huber, B., Ruchhoeft, M. y Betz, B. (1997). Serotonin depletion by 5,7-dihydroxytryptamine alters deutocerebral development in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Neurobiol.* 33, 357-373.
- Blanc, A. (1993). Ultradian and circadian rhythmicity of behavioral activities in the young snail *Helix aspersa maxima* (Gastropoda, Helicidae). *Can. J. Zool.* 71, 1506-1510.
- Campagnan F. R. A. y Inouye S.-Ct. (1994). Diurnal and circadian changes of serotonin metabolism in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and endogenous pacemaker. *Brain Res.* 123, 175-179.
- Castañón-Cervantes, O. (1996). Mecanismos de sincronización no paramétrica del ritmo circadiano de actividad locomotora del acocil durante la ontogenia. Tesis de maestría. pp. 77. México, D.F. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Castañón-Cervantes, O., Battelle, B.-A. y Fanjul-Moles, M. L. (1999). Rhythmic changes in the serotonin content of the brain and eyestalk of crayfish during development. *J. Exp. Biol.* 202, 2823-2830.
- Chamberlain, S. C., Pepper, J., Battelle, B.-A., Wyse, G. A. y Lewandowsky, T. J. (1986). Immunoreactivity in *Limulus*. II. Studies of serotoninlike immunoreactivity, endogenous

- serotonin, and serotonin synthesis in the brain and lateral eye. *J. Comp. Neurol.* **251**, 363-375.
- Davis, F. C. (1981). Ontogeny of circadian rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 4. Biological Rhythms.* (ed. J. Aschoff). pp. 257-274. New York. Plenum Press.
- Elofsson, R. (1983). 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Cell Tissue Res.* **232**, 221-236.
- Elofsson, R. y Lake, P. S. (1971). On the cavity receptor organ (X-organ or organ of Bellonci) of *Artemia salina* (Crustacea, Amostraca). *Z. Cell. Forsch.* **121**, 319-326.
- Elofsson, R., Laxmyr, L., Rosengren, L. y Hansson, C. (1982). Identification and quantitative measurements of biogenic amines and DOPA in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol.* **71C**, 195-201.
- Engbretson, G. A. y Battelle, B.-A. (1987). Serotonin and dopamine in the retina of a lizard. *J. Comp. Neurol.* **257**, 140-147.
- Escamilla-Chimal, E. G., García-Rivera, C. C., Aguilar-Morales, M., Romero-Díaz, V. y Fanjul-Moles, M. L. (1998). The retina of crayfish *Procambarus clarkii* during development shows serotonin and tryptophan hydroxylase-like immunoreactivity daily changes. *Biol. Rhythm Res.* **29**, 471-479.
- Eskin, A. (1979). Circadian system of the *Aplysia* eye: properties of the pacemaker and mechanisms of its entrainment. *Fed. Proc.* **38**, 2573-2579.
- Fanjul-Moles, M. L. (1998). Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: clock pacemaker and entrainment. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* **5**, 153-160.
- Fanjul-Moles, M. L., Castañón-Cervantes, O. y Prieto-Sagredo, J. (1998). Effect of skeleton photoperiods upon the circadian locomotor activity rhythm during the development in crayfish *Procambarus clarkii*. *Biol. Rhythm Res.* **29**, 427-441.
- Fanjul-Moles, M. L., Miranda-Anaya, M. y Prieto, J. (1996). Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol. Int.* **13**, 15-26.
- Fanjul-Moles, M.L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, M. y Fuentes-Pardo, B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **88A**, 213-219.
- Fingerman, M., Julian, W. E., Spirtes, M. A. y Kostrzewa, R. M. (1974). The presence of 5-hydroxytryptamine in the eyestalks and brain of the fiddler crab *Uca pugilator*, its quantitative modification by pharmacological agents, and possible role as a neurotransmitter in controlling the release of red pigment-dispersing hormone. *Comp. Gen. Pharmac.* **5**, 299-303.
- Fingerman, M. y Nagabhushanam, R. (1992). Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp. Biochem. Physiol.* **102C**, 343-352.
- Fingerman, S. W. y Fingerman, M. (1977). Circadian variation in the levels of red pigment-dispersing hormone and 5-hydroxytryptamine in the eyestalks of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* **56C**, 5-8.
- Fuentes-Pardo, B., Fanjul-Moles, M. L., y Moreno-Sáenz, E. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **102A**, 99-106.
- Garfias, A., Rodríguez-Sosa, L. y Aréchiga, H. (1995). Modulation of crayfish retinal function by red pigment concentrating hormone. *J. Exp. Biol.* **198**, 1447-1454.

- Gaus, G. y Stieve, H. (1992). The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*. *Z. Naturforsch.* **47**, 300-303.
- Goldberg, J. I. y Kater S. B. (1989). Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous system. *Dev. Biol.* **131**, 483-495.
- Gordon, W. H., Larimer, J. L. y Page, T. L. (1977). Circumesophageal interneurons required for reflexive and circadian locomotor behaviors in crayfish. *J. Comp. Physiol.* **116**, 227-238.
- Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. y Katinas G. S. (1977). Glossary of chronobiology. *Chronobiologia* **4**, 1-189.
- Haus, E., Lakatua, D. J., Sackett-Lundeen, L., Dumitriu, L., Nicolau, G., Petrescu, E., Plinga, L. y Bogdan, C. (1998). Interaction of circadian, ultradian and infradian rhythms. En: *Biological Clocks. Mechanisms and Applications* (ed. Y. Touitou), pp. 141-150. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Helluy, S., Sandeman, R., Beltz, B. y Sandeman, D. (1993). Comparative brain ontogeny of the crayfish and clawed lobster: implications of direct and larval development. *J. Comp. Neurol.* **335**, 343-354.
- Keller, R. y Beyer, J. (1968). Zur hyperglykämischen wirkung von serotonin and augenstielextrakt beim flusskrebs *Orconectes limosus*. *Z. Vergl. Physiol.* **59**, 78-85.
- Klein, D. C. (1993). The mammalian melatonin rhythm generating system. En: *Light and biological rhythms in man*. (ed. L. Wetterberg), pp. 55-71. Oxford, New York, Seoul, Tokyo: Pergamon Press.
- Kulkarni G. K. y Fingerman, M. (1992). Quantitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* **182**, 341-347.
- Larimer, J. L. y Smith, J. T. F. (1980). Circadian rhythm of retinal sensitivity in crayfish: modulation by the cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* **136**, 313-326.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marsden, C. A. y Joseph, M. H. (1986). Biogenic amines. En: *HPLC of Small Molecules, a Practical Approach* (ed. C. K. Lim), pp. 29-47. Oxford, Washington DC: IRL Press.
- Miranda-Anaya, M. y Fanjul-Moles, M. L. (1997). Non-parametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiol. Int.* **14**, 25-34.
- Moore, R. Y. y Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **42**, 201-206.
- Nelson, W., Liang-Tong, Y., Lee, J.-K. y Halberg, F. (1979). Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* **6**, 305-323.
- Page, T. L. (1990). Circadian rhythm of locomotor activity in cockroach nymphs: free running and entrainment. *J. Biol. Rhythms* **5**, 273-289.
- Page, T. L. y Barret, R. K. (1989). Effects of light on circadian pacemaker development II. Responses to light. *J. Comp. Physiol. A* **165**, 51-59.
- Page, T. L. y Block, G. D. (1980). Circadian rhythmicity in cockroaches: effects of early postembryonic development and aging. *Physiol. Entomol.* **5**, 271-281.
- Page, T. L. y Larimer, J. L. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* **97**, 59-80.

- Page, T. L. y Larimer, J. L. (1976). Extraretinal photoreception in entrainment in crustacean circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.* **23**, 245-251.
- 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. Physiol.* **4**, 363-377.
- Redfern, P. T. (1996). Biological rhythms and signal transduction. En: *From the Biological Clock to Chronopharmacology* (ed. F. Blemmer), pp. 46-56. Stuttgart: Medphar Scientific Publishers.
- Reinberg, A. y Smolensky, M. H. (1993). Introduction to chronobiology. En: *Biological rhythms and medicine.* (ed. A. Reinberg y M. Smolensky), pp. 1-21. Nueva York, Springer-Verlag.
- Rodríguez-Sosa, L., De la Vega M. T. y Aréchiga, H. (1994). Circadian rhythm of red pigment-concentrating hormone in the crayfish eyestalk. *Comp. Biochem. Physiol.* **109C**, 101-108.
- Rodríguez-Sosa, L., Picones, A., Calderón-Rosete, G., Islas, S. and Aréchiga, H. (1997). Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk. *J. Exp. Biol.* **200**, 3067-3077.
- Sánchez, J. A. y Fuentes-Pardo, B. (1977). Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **56A**, 601-605.
- Sandeman, D. C. y Sandeman R. E. (1994). Electrical responses and synaptic connections of giant serotonin-immunoreactive neurons in crayfish olfactory and accessory lobes. *J. Comp. Neurol.* **341**, 130-144.
- Sandeman, D. C. y Sandeman, R. E. (1998). Orthodromically and antidromically evoked local field potentials in the crayfish olfactory lobe. *J. Exp. Biol.* **201**, 1331-1344.
- Sandeman, D. C., Beltz, B. y Sandeman, R. E. (1995a). Crayfish brain interneurons that converge with serotonin giant cells in accessory lobe glomeruli. *J. Comp. Neurol.* **352**, 263-279.
- Sandeman, D. C., Sandeman, R.E. y Covet, H. G. (1990). Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* **21**, 619-629.
- Sandeman, D.C., Sandeman, R. E. y Aitken A. R. (1988). Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish, *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* **269**, 465-478.
- Sandeman, R. y Sandeman D. C. (1990). Development and identified neural systems in the crayfish brain. En: *Frontiers in Crustacean Neurobiology* (ed. K. Wiese, W. D. Krenz, J. Tautz, H. Reichert and B. Mulloney), pp. 498-508. Basel: Birkhäuser.
- Sandeman, R. E., Watson, A. D. H. y Sandeman, D. C. (1995b). Ultrastructure of the synaptic terminals of the dorsal giant serotonin-IR neuron and deutero cerebral commissure interneurons in the accessory and olfactory lobes of the crayfish. *J. Comp. Neurol.* **361**, 617-632.
- Sarojini, R., Nagabhusanam, R., Devi, M. y Fingerman, M. (1995). Dopaminergic inhibition of 5-hydroxytryptamine-stimulated testicular maturation in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol.* **111C**, 287-292.
- Stephan F. K. y Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**, 1583-1586.
- Sukô, T. (1953). Studies on the development of the crayfish. I. The development of secondary sex characters in appendages. *Sci. Rep. Saitama. Univ.* **1**, 77-96.

-
- Tomioka, K. y Chiba, Y. (1982). Post embryonic development of circadian rhythm in cricket *Grillus bimaculatus*: a rhythm reversal. *J. Comp. Physiol.* **147**, 299-304.
- Tosini, G. y Menaker, M. (1995). Circadian rhythm of body temperature in an ectotherm (*Iguana iguana*). *J. Biol. Rhythms* **10**, 248-255.
- Tosini, G. y Menaker, M. (1998). Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, *Iguana iguana*. *J. Neurosci.* **18**, 1105-1114.
- Underwood, H. (1989). The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* **45**, 914-922.
- Underwood, H. (1992). Endogenous rhythms. En: *Biology of the reptilia*. Vol. 18. Hormones, brain and behavior. (ed. C. Gans y D. Crew), pp. 229-297. Chicago: University of Chicago Press.
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological solution for fresh water crustaceans *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34**, 428-432.

XII. APÉNDICE

Publicación internacional en revista arbitrada

Ante la sociedad contemporánea, con frecuencia un científico es un tipo raro, introvertido, desaliñado y sobre todo, muy preocupado por explicar cosas que parece que sólo a él y a algunos de sus colegas interesan y entienden. Efectivamente, muchos científicos son así, y han cometido el gran error de transmitir a la gente la idea de que el científico cree saberlo todo, no tiene capacidad de asombro, y no cree en nada que no se haya obtenido por medio del riguroso método científico. Por todo esto, pero también por la falta de curiosidad (digámoslo así) de muchas personas, frecuentemente la gente describe al científico como un ente soberbio y muy distante de la realidad (¡claro! Realidad que cada cual percibe como la entiende). Yo creo, que hoy en día, los científicos tienen la obligación de acercarse a la sociedad para tratar de convencerla del valor fundamental de la ciencia para todas las personas, pero también, creo que las personas deben acercarse a la ciencia si quieren conocerla, entenderla y entonces sí, creer o no en ella.

Me pregunto, ¿quién será más soberbio, quién podrá estar más cerca de la verdad?, ¿Acaso será más humilde quien piensa que sólo somos materia estelar, producto de miles de millones de años de evolución química y biológica, o lo será quien está seguro, muy seguro, que fue creado especialmente y que su especie ocupa un lugar "superior" que merece un sitio especial en el universo?, ¿Hay sitio para alguna posibilidad que esté entre las dos anteriores?

No lo sé, no soy tan presumido como para intentar responder.

Tú... ¿te atreverías a responder?

O.C.C.
17/OCT/1999

RHYTHMIC CHANGES IN THE SEROTONIN CONTENT OF THE BRAIN AND EYESTALK OF CRAYFISH DURING DEVELOPMENT

OSCAR CASTAÑÓN-CERVANTES¹, BARBARA-ANNE BATTELLE² AND MARÍA LUISA FANJUL-MOLES^{1,*}

¹Lab. Neurofisiología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-371, CP 04510, México City, DF México and ²Whitney Laboratory and Department of Neuroscience, University of Florida, St Augustine, FL 32086, USA

*Author for correspondence (e-mail: mlfm@hp.fciencias.unam.mx)

Accepted 28 July; published on WWW 30 September 1999

Summary

The present study investigated developmental circadian changes in the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in two structures proposed to contain pacemakers in crayfish *Procambarus clarkii*: the cerebral ganglion and the eyestalks. Crayfish ($N=260$) from three developmental stages were divided into two groups: (1) animals subjected to 12h:12h light:dark cycles for 10 days and (2) animals treated as described above, then exposed to 72h of continuous dim light. Crayfish from both groups were killed at different times of day, and the cerebral ganglion and the eyestalks of each were assayed for 5-HT by reversed-phase HPLC with electrochemical detection. In all stages of development, 5-HT content (expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ wet mass tissue) showed circadian variations in both

structures analyzed; rhythms continued to free-run under constant illumination, and total 5-HT content was higher in the brain ($0.581 \pm 0.36 \mu\text{g g}^{-1}$; mean \pm S.E.M.) than in the eyestalks ($0.299 \pm 0.15 \mu\text{g g}^{-1}$). As development advances, the percentage of the rhythm that shows periods of 24 h diminishes, while the percentage of the rhythm that shows periods of 9 to 12 h increases. This seems to indicate that pulsatile variations in 5-HT content are superimposed in a circadian component. The relationship between the 5-HT rhythm and electroretinogram and motor activity rhythms during development is discussed.

Key words: serotonin, crayfish, *Procambarus clarkii*, HPLC, circadian rhythm, development.

Introduction

During postembryonic ontogeny, the crayfish *Procambarus clarkii* displays different circadian rhythms at different developmental stages (Fanjul-Moles et al., 1987, 1996; Escamilla-Chimal et al., 1998). Two particular rhythms, those of retinal sensitivity and activity, have different periods of maturation, indicating either that the pacemaker responsible for these rhythms is not the same, or that the coupling between the clock and the rhythms requires different times to mature.

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) has been proposed as a circadian modulator for vertebrates. In the rat, the serotonergic system innervating the suprachiasmatic nucleus, which is the pacemaker in this animal, is not an essential part of the endogenous oscillation, but can affect the output of the clock (Garabatte et al., 1998).

In adult crayfish, serotonergic neurons innervate the protocerebrum (Sandeman et al., 1990) and eyestalk ganglia (Rodríguez-Sosa et al., 1997), two structures that have been proposed to act as pacemakers. In the crayfish, 5-HT may modulate the circadian clock in ways similar to those reported for vertebrates and influence both phase and period. Although the development of serotonergic neurons in crayfish is well documented (Sandeman and Sandeman, 1990; Helluy et al., 1993), rhythmic changes in 5-HT content during development,

which could influence the expression of the temporal order of the animal, have not been studied. The objective of the current work was to investigate, at two postembryonic stages and in adult crayfish, circadian changes in the content of 5-HT in the structures considered as putative pacemakers, the supraoesophageal ganglion and the eyestalks. Levels of 5-HT were measured in animals maintained under a 12h:12h light:dark (LD) regime and after being exposed to conditions of constant light (LL).

Materials and methods

Animals

Crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) of the second postembryonic stage (PO2) and juveniles utilized in the present study were hatched at our laboratory from mothers synchronized to a 12h:12h light:dark (LD 12:12) cycle. Adult animals of both sexes were field-collected and acclimated for 2 weeks to the laboratory. Crayfish ($N=260$) were grouped according to age and size into three developmental stages following established criteria (Sukó, 1953; Sandeman and Sandeman, 1990; Escamilla-Chimal et al., 1998) as follows: (1) PO2 animals ($N=100$), 10–14 days

old and less than 11.8 mm total length; (2) juvenile animals ($N=80$), 1–3 months old and less than 33.9 mm total length; and (3) adult animals ($N=80$), sexually mature and measuring 55 mm or more in total length. All animals were maintained in 12h:12h L:D cycles for 10 days before the beginning of the experiments.

Experimental design

Animals from the three developmental stages were divided into two groups: (1) crayfish subjected to 12h:12h L:D (lights on at 07:00h) for 10 days and (2) crayfish treated as described above, then exposed to 72h of continuous light (100lx). Animals from both groups were then killed at six different times of day (08:00, 12:00, 16:00, 20:00, 00:00 and 04:00 h), and the cerebral ganglion (brain) and eyestalks (retina and optic lobes) were removed into chilled saline solution (Van Harreveld, 1936). LD cycles that were 180° out of phase (i.e. lights on at 19:00h) were used to synchronize animals killed at 20:00, 00:00 and 04:00h. Dissection of the eyestalks required careful removal of exoskeleton, muscles and connective tissue layers. After the dissection, the wet mass of all structures was determined, and the two eyestalks from each animal were weighed and analyzed together.

Neurochemistry

Dissected and weighed tissues were placed in 200 μ l (adults) or 100 μ l (PO2 and juveniles) sample buffer consisting of 8% (v/v) acetic acid, 1.76% (v/v) formic acid and 1 mmol l⁻¹ cysteine in deionized water. Samples were manually homogenized with a Teflon-plastic homogenizer and centrifuged for 15 minutes at 12800 g. The supernatants were collected, filtered through 0.45 μ m microconcentrators (MWCO 3k), and analyzed for 5-HT by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection (LC-EC).

Quantitation of serotonin

The HPLC system consisted of a manual Rheodyne 7125 -20 μ l loop injector and a 5 μ m analytical column (100 mm \times 4.6 mm) with a 30 mm \times 4.6 mm guard column (Supelcosil LC 18, 5 μ m). The mobile phase, modified from Marsden and Joseph (1986), consisted of 0.15 mol l⁻¹ NaH₂PO₄, 0.1 mmol l⁻¹ Na₂EDTA, 0.5 mmol l⁻¹ octane sulphonic acid (sodium salt) and 14% (v/v) methanol in HPLC-grade water. The pH was adjusted to 3.4 with phosphoric acid. The flow rate was kept uniform at 1 ml min⁻¹ using a LaChrom-Hitachi L-7100 pump. 5-HT was detected amperometrically using an electrochemical detector (LC4C, Bioanalytical Systems) by means of a glassy carbon electrode with an applied potential of +0.6 V versus an Ag/AgCl reference electrode. The 5-HT peak in the tissue extract was identified by comparing elution times of peaks in the extract with the elution time of a 5-HT standard. The identity of the peak in each sample was further verified by mixing a known amount of the 5-HT standard with the tissue extract. A single symmetrical peak appeared that had the same elution time as the 5-HT standard and a height that

was equal to the height of the presumptive 5-HT peak in the sample plus the added 5-HT. The voltage-amperage curve generated by the presumptive 5-HT peak was also compared with that of the 5-HT standard. The 5-HT peak in the extract was quantified by measuring its height and comparing it with the peak heights obtained following injections of standard 5-HT prepared and analyzed the same day (Engbretson and Battelle, 1987).

Data analysis

5-HT content is reported per structure and per g wet mass tissue (μ g g⁻¹). Chronograms were constructed as group means \pm 1 S.E.M. To estimate the circadian rhythm for every developmental stage, a single cosinor analysis (Halberg et al., 1977; Nelson et al., 1979) was performed upon the groups of individual data. Only data obtained from animals exposed to continuous light were analyzed by cosinor. The software program DISPAC (Digital Analysis Applied to Chronobiology) developed at Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (Aguilar-Roblero et al., 1997) was used. On the basis of a test period (τ), cosinor analysis adjusts data to a sinusoidal curve and provides an objective test of whether the amplitude of the rhythm differs from zero, i.e. whether the rhythm is validated for an assumed τ . This method provides descriptive estimators for a number of different parameters of a rhythm, i.e. acrophase, mesor, amplitude and percentage of rhythmicity (PR). Acrophase is the crest time of the best-fitting mathematical function approximating the data; mesor (M) is the value about which oscillation occurs; when the interval of time between data sampling is constant it equals the arithmetic mean of the rhythmic oscillation. Hence in the present work it corresponds to the arithmetic mean of the rhythmic oscillation of 5-HT content over 24 h. The period is the duration of one complete cycle of the oscillation and it is expressed in units of time, hence the mesor is not the mean period nor it is the mean of amplitude of the cosine function. The formal definition of mesor is the rhythm-adjusted mean (Reinberg and Smolensky, 1983). In the cosinor method, amplitude (A) is equal to half the difference between the highest and lowest values of the oscillation, i.e. it is the crest-to-trough difference, and the percentage of rhythmicity (PR) is the percentage of the data included within the 95% confidence limits of the best-fitting cosine function (Reinberg and Smolensky, 1983). The cosinor test allows objective testing of the hypothesis that the rhythm amplitude differs from zero using different trial period lengths. Several periods were tested to analyze whether the temporal profiles observed in both structures studied under constant conditions were indeed circadian in all stages of development.

Results

Identity of serotonin

Analysis of the extracts of crayfish brain and eyestalks revealed the presence of a substance that oxidized at +0.6 V

and eluted at the same time as the 5-HT standard (mean elution time = 9.36 min). In addition, a single, symmetrical and additive peak was observed when an external standard of 5-HT was added to the acid extracts in each injection (Fig. 1). The voltage–amperage curve generated for the 5-HT standard and the presumptive peak in the sample were also identical. On the basis of these criteria, the peak was identified as 5-HT.

Changes in the content of serotonin during development

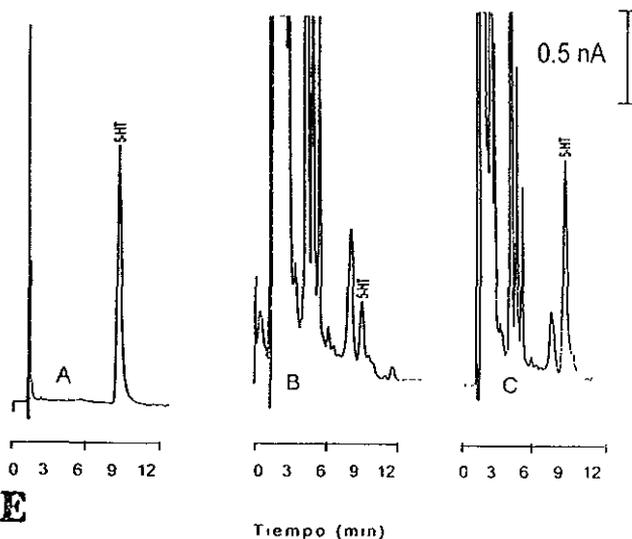
The amount of 5-HT in the tissues assayed changed over the course of a day, and the changes were similar whether the 5-HT content was expressed per structure or per g wet mass tissue. The results described here are usually given as 5-HT content per g wet mass tissue. 5-HT is present in both brain and eyestalks, at least from the second postembryonic stage, and circadian and ultradian changes in the content of this monoamine were observed under constant light conditions at all three stages of development. The 5-HT content of the brain (mean under LD and LL conditions = $0.581 \pm 0.36 \mu\text{g g}^{-1}$) was always higher than that of the eyestalks (mean under LD and LL conditions = $0.299 \pm 0.15 \mu\text{g g}^{-1}$).

In PO2 crayfish, 5-HT content fluctuates with a daily rhythm under both LD and LL conditions (Fig. 2). In the eyestalks (Fig. 2A), the time of maximal 5-HT content was found during the dark period at 20:00 h with a value of $0.491 \pm 0.07 \mu\text{g g}^{-1}$, while the peak in the brain occurred during the light period at 12:00 h ($0.642 \pm 0.21 \mu\text{g g}^{-1}$) (Fig. 2B). After 72 h of continuous dim light, the peak in 5-HT content in the eyestalks (Fig. 2C) moved to 16:00 h, suggesting that the rhythm runs free. Conversely, the peak in the brain (Fig. 2D) remained at 12:00 h, indicating a period (τ) very close or equal to 24 h (see Table 1). A slight shift in phase would not have been detected by the sampling method used in this study. Table 1 shows a single cosinor analysis of the oscillations in 5-HT content in the brain and eyestalks. This revealed that the clearest circadian

rhythm was in the brain of PO2 animals, and it easily fitted a 24 h period (percentage of rhythmicity 92.6 %). The acrophase of 11.66 h is very close to that seen in the chronogram. Interestingly, at this stage of development, the 5-HT peak in the brain always occurred before the peak in the eye, i.e. 8 h ahead under LD conditions and 4 h ahead under LL conditions. Cosinor analysis of the rhythm in the eye under constant light conditions revealed a bimodality with a period of 12 h and an acrophase at 4.71 h (Table 1).

Temporal changes in 5-HT content under different conditions of illumination in the eyestalks and brain of juvenile crayfish are shown in the chronograms in Fig. 3. Under LD conditions (Fig. 3A,B), both structures showed a clear rhythm in the amount of 5-HT present per g wet mass tissue. The 5-HT content underwent an initial rise during the light period, which is more evident in the eyestalks, peaking at 12:00 h then falling to minimal values by the onset of the scotophase at 20:00 h. During the night, 5-HT content rose again to reach a maximal value in both structures at 04:00 h. Maximal 5-HT content was $0.276 \pm 0.07 \mu\text{g g}^{-1}$ in the eyestalks (Fig. 3A) and $1.175 \pm 0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ in the brain (Fig. 3B). One of the two harmonic peaks seen under LD cycles in the eyestalks persisted under continuous illumination. Chronograms show the peak of 5-HT at 08:00 h with a maximal value of $0.453 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$ (Fig. 3C). Cosinor analysis suggests this oscillation has a rhythm with a period of 24.5 h (percentage of rhythmicity 63.1 %, acrophase in 10.87 h) (Table 1). Conversely, the chronogram of 5-HT content in the brain under LL conditions shows a clear bimodal rhythm with a peak at 12:00 h ($0.802 \pm 0.36 \mu\text{g g}^{-1}$) (Fig. 3D). The results of cosinor analysis confirmed the bimodal oscillation and suggested it has a period of 11 h (percentage of rhythmicity 39.2 %, acrophase in 9.77 h). Comparisons of the fluctuations of 5-HT in both structures reveal that under LD cycles, (Fig. 3A,B) the maximal 5-HT content was found at the same time of day

Fig. 1. (A) Chromatograms of 2 ng external standard, 5-hydroxytryptamine (5-HT). (B) HPLC of an acid extract of adult crayfish eyestalks. (C) Separation of the same acid extract mixed with 1 ng of external standard 5-HT. Arrows indicate time of injection; tops of peaks have been cropped in B and C. For details, see Materials and methods.



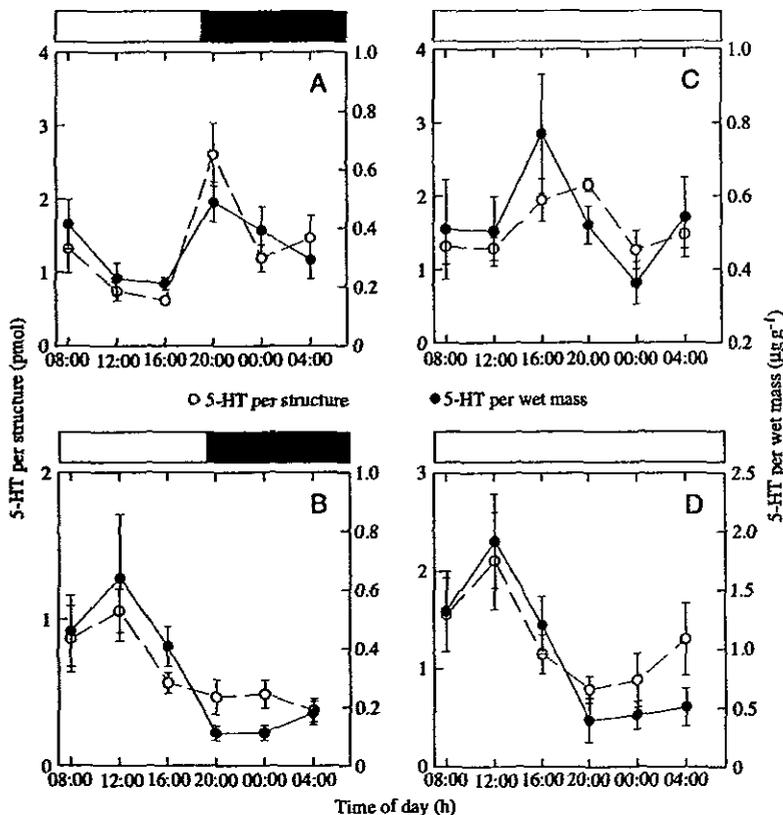


Fig. 2. Chronograms illustrating the daily rhythmic patterns of 5-hydroxytryptamine (5-HT) content in the second postembryonic stage crayfish. In this and the following figures, bars on top of each graph indicate illumination conditions (open, light; closed, dark). Values are means \pm S.E.M. ($N=7-9$ structures). (A,C) The unimodal rhythmic changes in 5-HT content in the eyestalks. (B,D) The rhythmic changes in 5-HT content in the brain. In both structures under continuous light conditions (C,D) a clear circadian pattern may be observed. Note that 5-HT content per g wet mass (filled circles) increases under continuous light conditions.

(04:00 h). The 5-HT content did not peak at the same time in the two structures under LL conditions (Fig. 3C,D).

Changes in 5-HT content in the eyestalks and brain of adult crayfish under LD are depicted in Fig. 4A,B. Maximal 5-HT content of both structures occurred in the light period, but the peak in the brain (12:00 h) occurs 4 h in advance of the peak in the eyestalks (16:00 h). Both structures show a second 5-HT peak during the scotoperiod. After 72 h of continuous illumination, oscillations persist in both structures (Fig. 4C,D), but a third peak of 5-HT concentration appears in the brain. The maximum concentration of 5-HT in the eyestalks and brain ($0.48 \pm 0.14 \mu\text{g g}^{-1}$ in the eyestalk and $0.8 \pm 0.39 \mu\text{g g}^{-1}$ in the brain) occurs at the same time of day (00:00 h) (Fig. 4C,D). The bimodal fluctuation in 5-HT content in the eye was confirmed by cosinor analysis (Table 1). The oscillations best fitted a period of 10.5 h (percentage of rhythmicity 64.8 %) with an acrophase of 4.48 h. Cosinor analysis of the brain chronogram showed the oscillations best fitted a trimodal rhythm with a period of 9.3 h (percentage of rhythmicity 71.2 %), and an acrophase of 6.68 h. The statistical significance of the fluctuations in 5-HT calculated by cosinor analysis was higher in PO2 animals ($P < 0.025$) and in adult animals ($P < 0.1$).

Discussion

The results of the current study demonstrate circadian changes in the concentration of 5-HT in the brain and the eyestalks of crayfish *Procambarus clarkii* from the second postembryonic instar through to adulthood. The rhythm appears to be endogenously driven, since it continues to run free under continuous light conditions. These observations indicate that a functional pacemaker coupled to the serotonergic system is active in crayfish at the time of hatching. The development of 5-HT immunoreactivity in different parts of the brain of the crayfish *Cherax destructor* has been studied (Sandeman and Sandeman, 1990). These authors reported that, by the second postembryonic stage, nearly all the features of the adult serotonergic system are present. Our biochemical findings indicate that 5-HT is also present in *Procambarus clarkii* at this age. Daily changes in 5-HT immunoreactivity in *Procambarus clarkii* eyestalks, maintained in 12 h:12 h L:D during development, have previously been reported (Escamilla-Chimal et al., 1998). The biochemical results reported here confirm and extend this earlier work.

The regional distribution and concentration of 5-HT in central nervous organs of adult crayfish from a different genus have been well studied (Elofsson et al., 1982; Kulkarni and

Table 1. Single cosinor analysis of chronograms of 5-HT levels in eyestalks and brain extracts from crayfish of different developmental stages after 72 hours of continuous illumination

	Figures		Period or τ (h)	Mesor ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Amplitude ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Acrophase (h)	PR (%)
PO2	2C	Eyestalks	12	0.535±0.045	0.130	4.71	58.3
			24	0.535±0.053	0.108	14.64	40.7
	2D	Brain	12	0.968±0.314	0.214	11.98	7.2
			24	0.968±0.088	0.768*	11.66	92.6
Juvenile	3C	Eyestalks	12	0.264±0.051	0.089	9.22	33.8
			24	0.264±0.039	0.119	10.60	60.6
			24.5	0.264±0.038	0.119	10.87	63.1
	3D	Brain	11	0.504±0.073	0.131	9.77	39.2
			12	0.504±0.080	0.123	10.47	28.6
			24	0.504±0.084	0.105	13.59	20.6
Adult	4C	Eyestalks	10.5	0.295±0.045	0.121	4.48	64.8
			12	0.295±0.059	0.117	1.66	39.6
			24	0.295±0.063	0.103	19.47	30.6
	4D	Brain	9.3	0.420±0.071	0.337**	6.68	71.2
			12	0.420±0.124	0.116	1.17	12.8
			24	0.420±0.128	0.079	0.42	5.9

Values are taken from data shown in Figs 2–4.

Amplitude differs significantly from zero: * $F=18.880$, $P<0.025$; ** $F=5.627$, $P<0.1$.

Mesor, arithmetical mean of the adjusted rhythm.

PR, percentage of rhythmicity.

Fingerman, 1992; Sandeman et al., 1988, 1995a,b). In the crayfish *Procambarus clarkii*, Kulkarni and Fingerman (1992) and Rodríguez-Sosa et al., (1997) have measured the total content of 5-HT, as determined by HPLC, in brain and eyestalks. The range of 5-HT content found by these authors was 0.054–0.168 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet mass tissue. The values reported in the present work are higher than those reported by Kulkarni and Fingerman (1992) and Rodríguez-Sosa et al., (1997), but similar to those reported by others (Elofsson et al., 1982). Interestingly, the 5-HT concentrations expressed per wet mass tissue were always higher in the youngest animals, and 5-HT may have an additional role as a differentiation regulator at this age (Goldberg and Kater, 1989). In Crustacea in particular, the 5-HT-containing dorsal giant neurons (DGNs) play an important role in the development of brain structures (Benton et al., 1997). We show that the 5-HT content has a distinct rhythm at this age.

In eyestalks from animals maintained under LD conditions, the fluctuations in 5-HT showed a bimodal pattern at all three stages studied. During development, the highest level of 5-HT was observed during the dark period, but in the adult, the highest level occurred during the light period, as has been reported elsewhere for LL conditions (Kulkarni and Fingerman, 1992). The rhythmic changes in 5-HT concentration in the brains of PO2 and adult animals maintained under a LD cycle are similar to those reported for the brain and suprachiasmatic nucleus (SCN) of nocturnal rats (Campagnan and Inouye, 1994), with the highest levels measured during the light period and the nadir occurring during

the dark period. Interestingly, under constant light conditions, PO2 animals showed a unimodal circadian pattern in both structures studied, and this changed to a bimodal pattern in the juvenile and adult stage. Cosinor analysis revealed that, in the PO2 animals, the most significant rhythm (in the brain) had a period of 24 h ($P<0.025$). The 24 h rhythm diminishes in significance in the juvenile and adult animals, as rhythms with a period of 9 h and 12 h emerge. These results suggest there is a progressive appearance of ultradian bouts, underlying a very damped circadian component not easily detectable by the sampling method and the statistical analysis employed. If our interpretation is correct, all the above could be the result of either the action of a circadian oscillator upon central mechanisms determining periodic pulsatility in the synthesis and storage of 5-HT and in its release and metabolism, or of periodic variations in target-organ response, i.e. brain eyestalks, as has been proposed for some neuro-endocrine rhythms in mammals (Haus et al., 1998).

The rhythmic change in 5-HT reported here is important in understanding the role of the serotonergic innervation of the cerebral ganglion (Sandeman and Sandeman, 1990; 1998), a putative locus of pacemaker oscillators in *Procambarus clarkii* (Page and Larimer, 1975; Barrera-Mera and Block, 1990) of the 5-HT cell bodies and axons in the four neuropils of the eyestalk ganglion (Elofsson, 1983; Rodríguez-Sosa et al., 1997), and of tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the retina (Escamilla-Chimal et al., 1998). Electrolytic lesions of neuropils and/or neurons in the medial protocerebrum where dorsal giant neurons project in other species (Sandeman et al.,

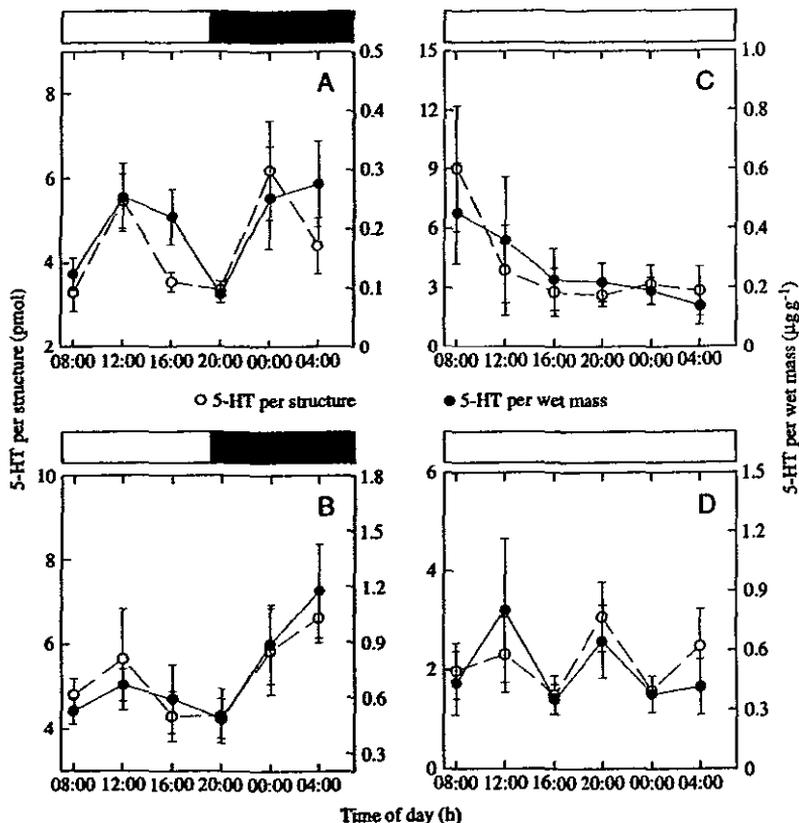


Fig. 3. Chronograms showing rhythmic changes of 5-hydroxytryptamine (5-HT) content in juvenile crayfish. Values are means \pm s.e.m. ($N=6-7$ structures). (A,C) The 5-HT content in the eyestalks. (B,D) The changes in 5-HT content in the brain. Note that under a 12h:12h light:dark photoperiod (A,B), both structures show a bimodal rhythm peaking at the same time of day. Under continuous light (C,D) the characteristics of both rhythms change. See text for further information.

1995a,b) caused changes in the circadian rhythm of activity in juvenile *Procambarus clarkii* (for a review, see Fanjul-Moles, 1999).

In vertebrates, there is a good correlation between the activity-rest cycle and the circadian variation of 5-HT (for a review, see Redfern, 1996). The results of the current study seem to confirm this correlation for Crustacea. The development and characteristics of the 5-HT rhythm shown in the present work and the motor activity rhythm of crayfish described previously (Fanjul-Moles et al., 1996, 1998; Miranda-Anaya and Fanjul-Moles, 1997) are similar. PO2, juvenile and adult stages show a unimodal activity rhythm that runs free and synchronizes to light with endogenous and exogenous peaks, which depends on the development of the eye (Fanjul-Moles et al., 1998). The endogenous peak in the activity rhythm could be related to the endogenous 5-HT peak that appears early in development. It is possible to speculate that this circadian 5-HT peak could reflect changes in the activity of serotonergic neurons in brain that are related to the pattern of crayfish behavior. The release of 5-HT in response to electrical stimulation (Rodríguez-Sosa et al., 1997), together with changes in the electrical activity of the serotonergic neurons, have been reported in different species

of crayfish (Sandeman and Sandeman, 1994; Sandeman et al., 1995a).

The temporal development of the electroretinogram rhythm seems to be related to the bimodal and trimodal increases of 5-HT found in both brain and eyestalks. The neuroendocrine mechanisms underlying the circadian rhythm in electroretinogram amplitude in adult crayfish are complex (for a review, see Aréchiga et al., 1993). The circadian secretion of different neurohormones may affect the sensitivity of the eye. Some of these endocrine rhythms have their zenith during the night, others during the day, but both types of rhythm can be modulated by 5-HT. The relationship between 5-HT, light and some of these hormones has been documented (Kulkarni and Fingerman, 1992). It has been proposed that the late maturation of the electroretinogram rhythm depends on the maturation of the X organ-sinus gland axis, which contains neurons from the brain (Fanjul-Moles et al., 1987; Fuentes-Pardo et al., 1992). Another hormone that could be related to this rhythm is melatonin. Recently, circadian rhythms of melatonin and serotonin-*N*-acetyltransferase have been reported in adult crayfish eyestalks of *Procambarus clarkii* (Agapito et al., 1995). The synthesis of melatonin from 5-HT has not been explored in crayfish. However, ontogenetic studies on the

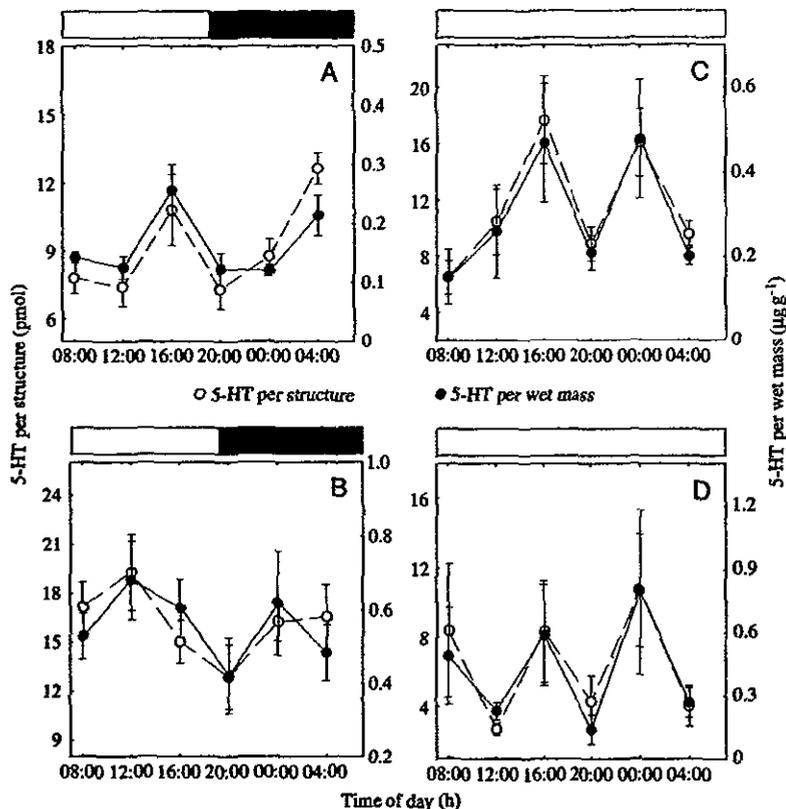


Fig. 4. Chronograms showing rhythmic changes of 5-hydroxytryptamine (5-HT) content in adult crayfish under 12h:12h light:dark cycles (A,B) and continuous light conditions (C,D). Each point in the graphs represents the mean \pm S.E.M. for 6–7 structures assayed. (A,C) The daily rhythm of 5-HT content in eyestalks. (B,D) The bimodal rhythmic pattern of 5-HT content in the brain. Note the harmonics appearing under continuous light conditions. See text for further information.

melatonin rhythm in vertebrates revealed that the first element to develop is the clock function in the suprachiasmatic nucleus, and one of the last elements to develop is the enzymatic capability of the pineal gland to convert *N*-acetyl-serotonin to melatonin (for a review, see Klein, 1993). In crayfish, the synthetic machinery for melatonin must be in the eye. The retina and X organ–sinus gland axis have been proposed as synthetic loci (Agapito et al., 1995; Balzer et al., 1997). Observations from a previous study of tryptophan hydroxylase-like immunoreactivity indicate that 5-HT synthesis must occur in the retina (Escamilla-Chimal et al., 1998); however, 5-HT neurons from the brain innervate the medulla terminalis near the X organ where pinealocyte-like cells have been reported (Elofsson and Lake, 1971). Further studies on the temporal interactions between 5-HT and different endocrine rhythms during crayfish ontogeny may help explain the late development of the electroretinogram rhythm in this animal.

Authors are greatly indebted to Cristina Pérez-Amador and Carlos Contreras for their support and technical assistance in the biochemical experiments. We also thank Ana Isabel Bieler for the photographic plates. This work is part of the doctoral

thesis of Oscar Castañón-Cervantes and was partially supported by PAEP 2316 (O.C.-C.), PAPIIT IN 209397 (M.L.F.-M.) and NSF IBN 9631565 (B.-A.B.).

References

- Agapito, M. T., Herrero, B., Pablos, M. L., Miguel, J. L. and Recló, J. M. (1995). Circadian rhythms of melatonin and serotonin-*N*-acetyltransferase activity in *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. A* **112**, 179–185.
- Aguilar-Roblero, R., Salazar-Juárez, A., Rojas-Castañeda, J., Escobar, C. and Cintra, L. (1997). Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. *Am. J. Physiol.* **273**, R1321–R1331.
- Aréchiga, H., Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel, F. and Rodríguez-Sosa, L. (1993). The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* **10**, 1–19.
- Balzer, L., Espinola I. R. and Fuentes-Pardo, B. (1997). Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish. *Biol. Cell* **89**, 539–543.
- Barrera-Mera, B. and Block, G. D. (1990). Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* **522**, 241–245.
- Benton, J., Huber, B., Ruchhoeft, M. and Betz, B. (1997). Serotonin depletion by 5,7-dihydroxytryptamine alters

- deutocerebral development in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Neurobiol.* 33, 357-373.
- Campagnan F. R. A. and Inouye S.-C. (1994). Diurnal and circadian changes of serotonin metabolism in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and endogenous pacemaker. *Brain Res.* 123, 175-179.
- Elofsson, R. (1983). 5-HT-like immunoreactivity in the central nervous system of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Cell Tissue Res.* 232, 221-236.
- Elofsson, R. and Lake, P. S. (1971). On the cavity receptor organ (X-organ or organ of Bellonci) of *Artemia salina* (Crustacea, Amostraca). *Z. Zell. Forsch.* 121, 319-326.
- Elofsson, R., Lannsyr, L., Rosengren, L. and Hansson, C. (1982). Identification and quantitative measurements of biogenic amines and DOPA in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). *Comp. Biochem. Physiol. C* 71, 195-201.
- Engbrethson, G. A. and Battelle, B.-A. (1987). Serotonin and dopamine in the retina of a lizard. *J. Comp. Neurol.* 257, 140-147.
- Escameilla-Chimal, E. G., García-Rivera, C. C., Aguilár-Morales, M., Romero-Díaz, V. and Fanjul-Moles, M. L. (1998). The retina of crayfish *Procambarus clarkii* during development shows serotonin and tryptophan hydroxylase-like immunoreactivity daily changes. *Biol. Rhythm Res.* 29, 471-479.
- Fanjul-Moles, M. L. (1999). Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: clock pacemaker and entrainment. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* (in press).
- Fanjul-Moles, M. L., Castañón-Cervantes, O. and Prieto-Segredo, J. (1998). Effect of skeleton photoperiods upon the circadian locomotor activity rhythm during the development in crayfish *Procambarus clarkii*. *Biol. Rhythm Res.* 29, 427-441.
- Fanjul-Moles, M. L., Miranda-Anaya, M. and Prieto, J. (1996). Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Chronobiol. Int.* 13, 15-26.
- Fanjul-Moles, M. L., Moreno-Sáenz, E., Villalobos-Hiriart, M. and Fuentes-Pardo, B. (1987). ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 88, 213-219.
- Fuentes-Pardo, B., Fanjul-Moles, M. L. and Moreno-Sáenz, E. (1992). Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 102, 99-106.
- Garabatte, M. L., Martin, K. F. and Redfern, P. H. (1998). Twenty four hour variation in the function of the terminal 5-HT_{1B} autoreceptor in the rat SCN. In *Biological Clocks. Mechanisms and Applications* (ed. Y. Touitou), pp. 103-106. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Goldberg, J. L. and Kater, S. B. (1989). Expression and function of the neurotransmitter serotonin during development of the *Helisoma* nervous system. *Dev. Biol.* 131, 483-495.
- Halberg, F., Carandente, F., Cornelissen, G. and Katinas, G. S. (1977). Glossary of chronobiology. *Chronobiologia* 4, 1-189.
- Hanz, E., Lakatos, D. J., Sackett-Lundeen, L., Dumitriu, L., Nicolae, G., Petrescu, E., Flinga, L. and Bogdan, C. (1998). Interaction of circadian, ultradian and infradian rhythms. In *Biological Clocks. Mechanisms and Applications* (ed. Y. Touitou), pp. 141-150. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Helfry, S., Sandeman, R., Beltz, B. and Sandeman, D. (1993). Comparative brain ontogeny of the crayfish and clawed lobster: implications of direct and larval development. *J. Comp. Neurol.* 335, 343-354.
- Klein, D. C. (1993). The mammalian melatonin rhythm generating system. In *Light and Biological Rhythms in Man* (ed. L. Wetterberg), pp. 55-71. Oxford, New York, Seoul, Tokyo: Pergamon Press.
- Kulkarni G. K. and Fingerman, M. (1992). Quantitative analysis by reverse phase high performance liquid chromatography of 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Biol. Bull.* 182, 341-347.
- Marsden, C. A. and Joseph, M. H. (1986). Biogenic amines. In *HPLC of Small Molecules, a Practical Approach* (ed. C. K. Lim), pp. 29-47. Oxford, Washington DC: IRL Press.
- Miranda-Anaya, M. and Fanjul-Moles, M. L. (1997). Non-parametric effects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish. *Chronobiol. Int.* 14, 25-34.
- Nelson, W., Liang-Tong, Y., Lee, J.-K. and Halberg, F. (1979). Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* 6, 305-323.
- Page, T. L. and Larimer, J. L. (1975). Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. I. The locomotor activity rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97, 59-80.
- Redfern, P. T. (1996). Biological rhythms and signal transduction. In *From the Biological Clock to Chronopharmacology* (ed. F. Blemmer), pp. 46-56. Stuttgart: Medphar Scientific Publishers.
- Reinberg, A. and Smolensky, M. H. (1983). Investigative methodology for chronobiology. In *Biological Rhythms and Medicine. Cellular, Metabolic, Physiopathologic and Pharmacologic Aspects* (ed. A. Reinberg and M. H. Smolensky), pp. 23-46. New York: Springer-Verlag.
- Rodríguez-Sosa, L., Picones, A., Calderón-Rosete, G., Islas, S. and Aréchiga, H. (1997). Localization and release of 5-hydroxytryptamine in the crayfish eyestalk. *J. Exp. Biol.* 200, 3067-3077.
- Sandeman, D. C. and Sandeman R. E. (1994). Electrical responses and synaptic connections of giant serotonin-immunoreactive neurons in crayfish olfactory and accessory lobes. *J. Comp. Neurol.* 341, 130-144.
- Sandeman, D. C. and Sandeman, R. E. (1998). Orthodromically and antidromically evoked local field potentials in the crayfish olfactory lobe. *J. Exp. Biol.* 201, 1331-1344.
- Sandeman, D. C., Beltz, B. and Sandeman, R. E. (1995a). Crayfish brain interneurons that converge with serotonin giant cells in accessory lobe glomeruli. *J. Comp. Neurol.* 352, 263-279.
- Sandeman, D. C., Sandeman, R.E. and Covet, H. G. (1990). Extraretinal photoreceptors in the brain of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Neurobiol.* 21, 619-629.
- Sandeman, D.C., Sandeman, R. E. and Ahken A. R. (1988). Atlas of serotonin-containing neurons in the optic lobes and brain of the crayfish, *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* 269, 465-478.
- Sandeman, R. and Sandeman D. C. (1990). Development and identified neural systems in the crayfish brain. In *Frontiers in Crustacean Neurobiology* (ed. K. Wiese, W. D. Krenz, J. Tautz, H. Reichert and B. Mulloney), pp. 498-508. Basel: Birkhäuser.
- Sandeman, R. E., Watson, A. D. H. and Sandeman, D. C. (1995b). Ultrastructure of the synaptic terminals of the dorsal giant serotonin-IR neuron and deutocerebral commissure interneurons in the accessory and olfactory lobes of the crayfish. *J. Comp. Neurol.* 361, 617-632.
- Sukó, T. (1953). Studies on the development of the crayfish. I. The development of secondary sex characters in appendages. *Sci. Rep. Saitama. Univ.* 1, 77-96.
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological solution for fresh water crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34, 428-432.