



00346
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DEL FOTORRECEPTOR CAUDAL DEL
ACOCIL COMO UN POSIBLE MARCAPASO CIRCADIANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A :
JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. LUISA FANJUL PEÑA

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OCTUBRE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi mamá Carmen Sagredo de Prieto
Su cariño y apoyo siempre han estado conmigo
Su ejemplo siempre me ha inspirado

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

Para poder realizar el trabajo experimental de esta tesis, recibí consejos y ayuda de varias personas y quiero agradecer a Luis Medrano por su asesoría en los primeros programas de análisis que hicimos. Al Dr. Raúl Aguilar y los cronócuates en el IFC por las facilidades prestadas en las capturas y análisis digitales, también al inicio de los experimentos. Al Dr. Hugo Aréchiga y al Dr. Víctor Anaya por las facilidades prestadas para aprender a usar los electrodos de succión.

Esta tesis es el resultado de varios de trabajo en el Laboratorio de Neurofisiología Comparada de Invertebrados, en la Facultad de Ciencias de la UNAM. Muchos han sido mis compañeros y amigos y todos me han apoyado, brindado sugerencias y acompañado en este proceso. A todos ellos mi agradecimiento. En particular quiero señalar que la amistad de Caro, Oscar, Sonia, Manolo y bueno, también de Aquiles, hicieron del lab un lugar para trabajar y vivir, siempre lleno de buen humor. Gracias Amigos míos!

Agradecerle a Elsita no es cosa fácil porque su constante presencia, ejemplo y valor para seguir adelante, son una inspiración. Después de tantos años de su amistad, sólo puedo decirle, que siempre contará con la mía, con mi apoyo y mi cariño.

Mi familia, mis hermanas, cuñados y sobrinos; y claro a la familia Sagredo! Quiero dejar patente que les agradezco en el alma su cariño, que me ha acompañado hasta aquí.

A los queridos amigos de Bidon: Jenaro, Jesús, Manolo, Lore y las niñas, Quique, Sabine y los niños, David y Rocío. También a Armando y a Paty! A mis compañeras y amigas, las niñas: Linda, Aileen, Rosita, Cynthia, Normita. A mi compadre Fer. A todos ustedes, Gracias mil!!

Sin duda los comentarios y sugerencias del sínodo enriquecieron esta tesis, pero a todos ellos gracias, sobre todo, por su amistad: Dr. Chema, Dra. Lety, Dr. Raúl, Dra. Carolina, Dra. Marcia. Sin duda son un gran ejemplo para mí.

Quiero agradecer de manera muy especial a la persona que me ha dirigido y muchas veces empujado hasta aquí. Gracias Maestra! Gracias por enseñarme la Fisiología Animal, la Cronobiología y simplemente a hacer ciencia y a contagiar a mis alumnos de su alegría, placer y entusiasmo por la Biología y el quehacer científico. Pero sobre todo, ¡Por su amistad!

Desde hace 8 años mi vida cobró sentido gracias a mi esposa Mary. Sin ella y su amor, esta tesis no hubiera sido. Gracias ternurita, a ti también dedico este trabajo con todo mi amor.

Esta tesis estuvo parcialmente apoyada por PAPIIT IN-212901.

"In the darkness there is no sin
Light only brings the fear.
Nothing to corrupt the eyes
There is no vision here
At first you may find it strange
But do not go away, the darkness
Holds the power that you won't
find in the day."
The Damned, 1980.

"Expose yourself to your deepest fear,
after that fear has no power,
and the fear of freedom shrinks and vanishes.
You are free."
Jim Morrison (mrf-2002-1)

INDICE

RESUMEN	-1-
INTRODUCCION	-2-
ANTECEDENTES	-4-
Generalidades de los ritmos circadianos	-4-
Marcapasos circadianos	-7-
El acocil. un modelo para el estudio del sistema nervioso	-14-
Primeros reportes de la actividad de los fotorreceptores caudales	-22-
Caracterización de la actividad eléctrica de los fotorreceptores caudales	-23-
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	-30-
MATERIALES Y MÉTODOS	-31-
Animales	-31-
Procedimientos quirúrgicos	-31-
Procedimientos experimentales	-32-
Etapa I: Registro con electrodos de platino	-32-
Etapa II: Registro con electrodos de succión	-34-
Etapa III: Refinamiento de las técnicas para incubación	-35-
Etapa IV: Registro con electrodos de acero y tungsteno	-36-
Análisis de datos	-37-
RESULTADOS	-38-
Etapa I	-38-
Etapas II y III	-44-
Etapa IV y análisis general con Cosinor	-46-
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	-53-
Actividad eléctrica del sexto ganglio, registrada con diferentes técnicas	-53-
Método de perfusión, uso de amortiguadores y control de temperatura sobre la sobre vida de la preparación	-56-
Cambios temporales en la actividad espontánea y la provocada por la luz	-58-
Relación de los FRCs con el sistema circadiano del acocil	-61-
REFERENCIAS	-63-

RESUMEN

Los acociles de la especie *Procambarus clarkii* presentan diversos ritmos circadianos. Los osciladores que constituyen el marcapaso circadiano se encuentran en el ganglio cerebroide y tallo ocular del animal. Sin embargo, los fotorreceptores caudales (FRCs) situados en el sexto ganglio abdominal se han relacionado con las funciones de sincronización del reloj, aunque los datos experimentales no son concluyentes. Los objetivos de esta tesis fueron 1) desarrollar una metodología para registrar la actividad eléctrica del sexto ganglio abdominal in vitro, en condiciones constantes de oscuridad y temperatura; 2) analizar los cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción tanto espontáneos como producidos por un estímulo luminoso de 15 s. Se utilizó el análisis de Cosinor, con el fin de estimar: 1) si existe una oscilación a lo largo del día y 2) su periodo y fase. El sistema de perfusión y control de temperatura in vitro, permitió registrar por más de 24 h la actividad eléctrica del sexto ganglio en oscuridad constante. Se encontró que tanto la actividad espontánea como la provocada por la luz, se manifestaban cíclicamente con periodos significativos y menores a 24h. Estas oscilaciones corresponden a un ritmo endógeno en la frecuencia de descarga del fotorreceptor. Los hallazgos de la tesis apuntan a que los fotorreceptores caudales pueden ser osciladores del sistema circadiano del acocil.

INTRODUCCION

El estudio de la conducta animal ha tenido como consecuencia la observación y el análisis de numerosos fenómenos fisiológicos, los que se han tratado de explicar desde muy diferentes puntos de vista. El acercarse objetivamente a este problema, requiere de una metodología estricta y métodos cuantitativos y cualitativos confiables. Pero quizá lo más importante sea una visión amplia del problema fundamentada en sólidos conocimientos biológicos que permitan elegir tanto el problema como el modelo animal que se estudiará. Al estudiar respuesta de los acociles a la luz, la cual es aparentemente simple, Welsh y Prosser marcaron un hito en el estudio de la fisiología de la conducta (Wilkens, 1988). Estos autores describieron y analizaron la respuesta eléctrica que se producía en la cadena ganglionar (específicamente en el 6° ganglio abdominal) al estimularla con luz blanca y sobre todo al correlacionar estos estímulos con la conducta fototáctica negativa del animal.

No fue hasta 1950 que distintos investigadores comenzaron a estudiar a profundidad las neuronas responsables de la actividad eléctrica como respuesta a la luz. Su posición clave en el sistema nervioso debido a la función dual de neuronas sensoriales e interneuronas que releven información desde el telson hacia los ganglios torácicos y los primeros ganglios abdominales, se comprendió más tarde (Wilkens, 1988). Esta doble función propició la intensificación de su estudio mediante metodologías experimentales dirigidas a entender sus

propiedades y su papel en la regulación conductual

Muchas funciones y conductas de los animales incluidos los crustáceos, ocurren rítmicamente y se controlan en forma endógena. Algunas preguntas que se pueden hacer en relación con la cronometría de diferentes funciones son ¿A qué hora ocurre?, ¿Cuál es su relación o inserción en el programa temporal del animal?, ¿Depende de la hora del día la forma o intensidad con que ocurre?

Con el fin de responder estas preguntas, se han estudiado los ritmos biológicos del acocil. Para ello, se desarrollaron experimentos para localizar tanto el o los marcapasos responsables del reloj circadiano, como los elementos que constituían las vías de entrada y salida del sistema. En particular, los trabajos de Page y Larimer (1972) y los de Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1987), en los que se estudió la participación del sexto ganglio abdominal en la ritmicidad circadiana de este animal, arrojaron resultados contradictorios que obscurecen la comprensión de los procesos de sincronización del reloj circadiano.

Tomando como referencia el trabajo de estos grupos de investigación, pero tratando de resolver el problema desde otra faceta que ayude a aclarar el problema, en esta tesis se realizaron para medir la actividad eléctrica espontánea y provocada por la luz, en los fotorreceptores caudales (FRCs) del 6° ganglio abdominal del acocil a lo largo del día, con el fin de establecer si existe o no una actividad rítmica circadiana.

Si la actividad eléctrica espontánea y provocada por la luz del órgano aislado, se mantiene en aislamiento y presenta una variación circadiana a lo largo

de varios días, se puede proponer que el órgano, o en este caso los fotorreceptores caudales (FRCs) se comportan como osciladores que forman parte del sistema temporal del animal.

Como se describe en esta tesis, aún quedan varios puntos por aclarar. Las preguntas anteriores, no han quedado del todo contestadas y sin embargo, los avances que aquí se exponen apuntan hacia la posibilidad de que los FRCs, formen un elemento oscilador más del sistema multioscilario temporal del acocil

ANTECEDENTES

Generalidades de los ritmos circadianos

A lo largo de la evolución, los diferentes organismos han estado sujetos a cambios periódicos debidos a los movimientos de rotación y traslación de la Tierra. Esos procesos rítmicos se repiten con gran precisión y constancia produciendo cambios en la duración e intensidad de la luz a lo largo del día (que se acompañan de cambios de alta y baja temperatura) y a lo largo de las estaciones. Esto ha ocurrido por millones de años en la tierra y durante la evolución biológica los organismos han sido capaces de generar un programa temporal endógeno que les permitió adaptarse al mantener la sincronía con tales procesos cíclicos. Prácticamente todos los seres vivos en el planeta poseen ritmos biológicos, cambios cíclicos en su conducta, fisiología, procesos bioquímicos, etc. que se repiten con una periodicidad dada. Los ritmos endógenos de un organismo que están asociados a alguno de los cambios cíclicos

de varios días, se puede proponer que el órgano, o en este caso los fotorreceptores caudales (FRCs) se comportan como osciladores que forman parte del sistema temporal del animal.

Como se describe en esta tesis, aún quedan varios puntos por aclarar. Las preguntas anteriores, no han quedado del todo contestadas y sin embargo, los avances que aquí se exponen apuntan hacia la posibilidad de que los FRCs, formen un elemento oscilador más del sistema multioscilario temporal del acocil

ANTECEDENTES

Generalidades de los ritmos circadianos

A lo largo de la evolución, los diferentes organismos han estado sujetos a cambios periódicos debidos a los movimientos de rotación y traslación de la Tierra. Esos procesos rítmicos se repiten con gran precisión y constancia produciendo cambios en la duración e intensidad de la luz a lo largo del día (que se acompañan de cambios de alta y baja temperatura) y a lo largo de las estaciones. Esto ha ocurrido por millones de años en la tierra y durante la evolución biológica los organismos han sido capaces de generar un programa temporal endógeno que les permitió adaptarse al mantener la sincronía con tales procesos cíclicos. Prácticamente todos los seres vivos en el planeta poseen ritmos biológicos, cambios cíclicos en su conducta, fisiología, procesos bioquímicos, etc. que se repiten con una periodicidad dada. Los ritmos endógenos de un organismo que están asociados a alguno de los cambios cíclicos

ambientales debidos a cambios geofísicos se denominan circarritmos. Se han descrito cuatro de ellos. Los ritmos circadianos, con un periodo cercano a las 24 horas, los ritmos circamareales (periodo cercano a 12.5 h), los circalunares (periodo cercano a 28 días) y los circanuales (periodo cercano a 365 días)

Este trabajo se concentra en los ritmos circadianos. Estos ritmos presentan las siguientes características: Son endógenos y persisten en condiciones constantes de luz y temperatura, son susceptibles de sincronizarse a los cambios cíclicos externos. En ciertas condiciones de luz o temperatura pueden alterarse a aún desaparecer y compensan los cambios de temperatura. Desde los organismos unicelulares como el dinoflagelado *Gonyaulax* hasta los vertebrados, los mecanismos fisiológicos del reloj circadiano comparten estas características.

En los últimos años, el estudio de la fisiología del sistema circadiano, se ha centrado en la búsqueda de las estructuras anatómicas circunscritas que podían ser esenciales para el funcionamiento del reloj, y en el estudio de los mecanismos mediante de los cuales el reloj mide el tiempo, sincronizándose con los cambios temporales externos para organizar un programa temporal. Para comprender la función de sincronización al tiempo local, es necesario el estudiar las estructuras receptoras que envían la información temporal externa al sistema marcapaso, así como las vías de acceso al mismo y procesos mediante los cuales el marcapaso se sincroniza. Por último, las bases moleculares del reloj son también el objeto de estudio de la fisiología de los ritmos circadianos (Pittendrigh, 1981). En la última década los avances en este ámbito, en particular en dos modelos animales, la

mosca y el ratón, han sido espectaculares, lo que ha permitido conocer el funcionamiento genético del reloj (Young, 2002, Ralph y Vitaterna, 2002).

Como se señaló anteriormente, desde el punto de vista adaptativo, los ritmos circadianos proveen a los organismos de un sistema que controla el programa temporal innato que asegura conductas y respuestas que van acordes a los cambios cíclicos del día. Incluso, el programa puede colocar al organismo en una situación metabólica más conveniente anticipándose a situaciones oportunas (disponibilidad de alimento) o evitando aquellas que pongan en peligro su vida (mayor presencia de depredadores) (Pittendrigh, 1980)

Los relojes circadianos tienen una estructura básica que se puede resumir así. Un sistema receptor que le proporciona al marcapaso la información externa necesaria para sincronizarse al tiempo local (lo pone "a tiempo"); el "marcapaso" que mide el tiempo y que es el componente principal, y el sistema efector a través del cual el marcapaso impone el orden temporal al organismo entero. Estos tres componentes varían de una especie a otra en cuanto a su localización, estructura, e incluso maquinaria molecular, pero comparten las propiedades que se citaron arriba

Los sistemas de recepción que proporcionan información temporal externa se denominan fotorreceptores circadianos. Estos pueden ser receptores visuales o no, de hecho la mayoría de las veces no se encuentran en la retina, y proveen al reloj de la información temporal externa. En los artrópodos, por ejemplo, se han propuesto como fotorreceptores circadianos a los ojos mediales, ventrales y

laterales de *Limulus* (Horne y Renninger, 1988), así como en el telson (Hanna, et al., 1988) En los acociles, tanto los ojos como el ganglio cerebroide poseen funciones de fotorreceptor circadiano (Page y Larimer, 1972 y 1975a y b; Larimer y Smith 1980). Como se explicará más adelante, el sexto ganglio abdominal del acocil ha sido explorado como una posible vía de entrada del sistema circadiano (Page y Larimer, 1972; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987, Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987, Bernal-Moreno et al , 1996, Fanjul-Moles, 1998)

La presencia de ritmos circadianos en organismos unicelulares como *Gonyaulax*, muestra que para la generación de los mismos sólo se necesita la maquinaria celular. Sin embargo, los organismos multicelulares requieren de la interacción de diversos grupos neuronales en el sistema nervioso para dar origen a los ritmos del individuo (Turek y Takahashi, 2001)

Diversos modelos animales han sido usados para estudiarlos componentes del reloj y han servido para descubrir las funciones de los marcapasos circadianos. A continuación se hace una descripción de estudios sobre estas estructuras, que son de relevancia, dado el tema de esta tesis

Marcapasos circadianos

Los ritmos biológicos como fenómenos periódicos han sido estudiados sistemáticamente en el siglo XX. Tanto Pittendrigh como Aschoff en 1960 señalaron las características de los ritmos circadianos a la luz de los experimentos que se habían realizado hasta ese momento. Ellos evaluaron

características tales como el periodo en condiciones constantes de luz u oscuridad (periodo en oscilación libre), la compensación de temperatura, los procesos de sincronización y los post-efectos de los regimenes luz oscuridad así como las condiciones que podían alterar o incluso abolir un ritmo (Aschoff, 1981, Pittendrigh, 1981) Estas características definen al sistema circadiano que mide el tiempo y forman parte del reloj circadiano.

Los sistemas circadianos son sistemas biológicos endógenos capaces de medir el tiempo en dos sentidos, como menciona Pittendrigh (1981) 1) Miden los lapsos de tiempo, es decir son capaces de establecer relaciones de fase estables entre las distintas variables oscilatorias que controlan y 2) miden el tiempo externo, lo que significa que pueden sincronizar los ritmos a la hora local en la que se encuentra el organismo. Las implicaciones fisiológicas, adaptativas y ecológicas que esto conlleva son inmensas al contemplarlas desde el punto de vista de un organismo que está sometido a cambios periódicos predecibles provocados por la noche y el día en un planeta que revoluciona sobre si mismo cada 24 horas

Un sistema que mide el tiempo, requiere de ciertas características, entre ellas la posibilidad de generar una oscilación que mantenga su fase y cuya amplitud no disminuya al paso de los días. Esto se manifiesta en los seres vivos como funciones y conductas cíclicas. De hecho, la demostración *sine qua non* de un ritmo consiste en medir las oscilaciones de una variable en condiciones constantes de luz, temperatura y otras variables ambientales cíclicas. Por ende,

en un organismo multicelular, debe ser posible aislar *in vitro* el órgano o tejido donde se presupone reside el marcapaso circadiano y registrar en él variaciones cíclicas sin amortiguación a lo largo de los días, e g. al aislar los ojos y cerebro de *Aplysia* (Jacklet, 1969a y b). Esta técnica junto con las de lesión y trasplante se han considerado como los diseños experimentales clásicos para probar la hipótesis de que un órgano o tejido es o no un marcapaso circadiano.

Un ejemplo de este tipo de experimentos fue publicado por Zimmerman y Menaker en 1979. Estos autores demostraron que la pinealectomía abolía los ritmos circadianos de actividad (percheo) de los gorriones comunes. Sin embargo, cuando la glándula pineal de otro animal era implantada en la cámara anterior del ojo del animal pinealectomizado, la ritmicidad se recobraba, incluso era posible que la glándula pineal trasplantada impusiera la fase del animal donador sobre el receptor. Posteriormente, Takahashi, Hamm y Menaker (1980), demostraron que la glándula pineal de pollos *in vitro* mantenía un ritmo circadiano estable de secreción de melatonina. Este hallazgo confirmó las evidencias anteriores de que la glándula pineal de estas aves constituye el marcapaso circadiano del animal.

El sistema circadiano compensa la temperatura y es susceptible de ser sincronizado. Por ello, un tejido u órgano en el que se cree reside un marcapaso circadiano, debe poder ser sincronizado o su periodo de oscilación debe poder compensar cambios en la temperatura (Aschoff, 1981). Este tipo de demostraciones experimentales requieren de varios días de oscilación previa estable antes de introducir las variaciones necesarias en el fotoperiodo o en la

temperatura. Deben también durar lo suficiente para poder medir el efecto en el periodo

Los datos experimentales de un sinnúmero de investigadores indican la existencia de tejidos y órganos -en organismos complejos- o de sistemas bioquímicos -en organismos unicelulares- que oscilan y responden a las características mencionadas antes (para una revisión consultar: Johnson y Kondo, 2001, Page, 2001 y Underwood, 2001). Además son capaces de imponer su fase a otros sistemas que requieren estar en fase y sincronizarse con los cambios periódicos del medio. Tales osciladores se les llama marcapasos circadianos.

Vale la pena decir aquí que esos osciladores no producen ritmos con periodos iguales a 24 horas sino que oscilan con periodos diferentes, pero cercanos a esa cifra, de ahí el nombre de circadianos (circa= cerca, diem, día) (Halberg, 1959) Pittendrigh (1981) señala que esa diferencia tiene un valor adaptativo importante ya que al medir la diferencia entre su propia oscilación y las señales externas que lo sincronizan (principalmente la longitud del día o el tiempo entre transiciones luz-oscuridad, oscuridad-luz) le permiten tanto la sincronización diaria como la predicción de los cambios estacionales

La búsqueda de el sustrato anatómico y funcional de los marcapasos circadianos ha sido y sigue siendo una tarea fundamental en el estudio de los ritmos circadianos. El aprender dónde están y cómo funcionan nos proporcionará el entendimiento de cómo miden el tiempo los organismos, clave de su adaptación

al medio ambiente periódicamente cambiante

Sin embargo, al marcapaso no basta localizarlo físicamente, se necesita entender su función y composición, es decir si son uno o varios los osciladores que lo componen y como se relacionan entre si para ejecutar la función cronométrica y de regulación circadiana. Por lo anterior otra tarea fundamental es la de desentrañar los mecanismos a través de los cuales el oscilador controla las funciones rítmicas el organismo

En los animales, la centralización de las funciones reguladoras en sistemas nerviosos complejos, trae consigo también la centralización de los marcapasos circadianos, pero queda abierta la pregunta de si se trata de un sólo cúmulo de neuronas o de la interacción entre varios núcleos lo que origina la señal central periódica.

Se ha demostrado que varios órganos o tejidos pueden mantener una oscilación circadiana como tal, cuando se les aísla del organismo y de las claves temporales externas. Esto ha sido demostrado para diversos metazoarios como las cucarachas en las cuales se ha demostrado que al menos existe un par de marcapasos distribuidos bilateralmente en los lóbulos ópticos (Page et al , 1977, Page, 1981).

Otro ejemplo es el de los gasterópodos marinos de los géneros *Bulla* y *Aplysia*. En estos organismos se han localizado células nerviosas asociadas a los ojos capaces de mantener un ritmo circadiano estable en condiciones de aislamiento del organismo y de claves temporales externas. Jacklet fue el primero

en describir el ritmo circadiano de potenciales de acción compuestos (CAPs) en *Aplysia* (Jacklet, 1969a y 1969b) Posteriormente se demostró que grupos de células (las células basales de la retina) localizadas en ambos ojos funcionan como osciladores, están acopiados mutuamente e imponen su fase sobre el resto del organismo, es decir, constituyen el marcapaso circadiano (Block, et al., 1996)

Posteriormente otros investigadores han ahondado en los mecanismos del reloj que subyacen a ese ritmo. Sin entrar en una descripción detallada, el ritmo de potenciales de acción compuestos es producido por las células basales en ambos ojos, de hecho se requiere de cierta comunicación entre ambos para producir un ritmo sincronizado entre los dos ojos y se sabe que los CAPs son producidos por cambios ritmicos en la permeabilidad de la membrana de las células basales de la retina (Block et al., 1996; Whitmore y Block, 1996)

La presencia de varios grupos neuronales capaces de funcionar como marcapaso también se ha sugerido como un modelo viable para el acocil (Larimer y Smith, 1980) Estos autores demostraron que las lesiones quirúrgicas o químicas en un tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii*, producían la desaparición del ritmo circadiano del electroretinograma (ERG), mientras que el ojo intacto mantenía su ritmo. Esto pone de manifiesto la existencia del marcapaso en el ganglio cerebroide y la necesidad de una vía patente de comunicación entre éste y el tallo ocular para que el ojo manifieste su ritmo de sensibilidad

Sin embargo, los trabajos de Sánchez y Fuentes-Pardo (1977) y de

Aréchiga y Rodríguez-Sosa (1998) confirmaron que los tallos oculares *in vitro* podían mantener el ritmo en la amplitud del ERG durante algunos días. Otra prueba a favor de la existencia de varios osciladores la constituyen los experimentos en los que es posible generar un desfaseamiento de los ritmos del electroretinograma al dividir quirúrgicamente al ganglio cerebroide siguiendo su línea media (Page y Larimer 1975b, Barrera-Mera, 1978). Basándose en estos experimentos y en los propios, Larimer y Smith (1980) propusieron que tanto en los ojos como en ganglio cerebroide residen osciladores que se mantienen acoplados entre sí y controlan las funciones rítmicas del animal tales como la sensibilidad visual medida a través del electroretinograma y la actividad locomotora.

Como se describirá más adelante, el acocil es un crustáceo en el que ha sido posible detectar varias oscilaciones circadianas controladas por el sistema nervioso central. Con los datos aportados por trabajos como los descritos anteriormente, es posible que estos organismos posean un sistema marcapaso central formado por varios osciladores,

La relativa simplicidad del sistema nervioso de los acociles, los trabajos enfocados a la identificación de neuronas, y el conocimiento que se tiene de sus ritmos circadianos, localización de marcapasos y sus funciones rítmicas, hacen de este animal un buen modelo en el cual investigar la organización del sistema circadiano. Además, la importancia comercial de algunas especies de acocil, su papel en las cadenas tróficas en los ambientes dulceacuícolas, y las aplicaciones

en estudios ecotoxicológicos que los estudios sobre la fisiología del sistema circadiano (y de sus otros ritmos biológicos) tengan más valor. *Procambarus clarkii* es una especie que ecológicamente puede causar estragos a otras especies de acociles y en diversos niveles de los ecosistemas de agua dulce, posee una capacidad adaptativa sorprendente fundamentada en múltiples mecanismos fisiológicos de aclimatación y adaptación. Posiblemente parte de estas ventajas adaptativas están en su sistema de temporal, por lo que el entenderlo puede llevar a comprender mejor el papel de estos animales dentro de su contexto ecológico y evolutivo.

El acocil: un modelo para el estudio del sistema nervioso

Los acociles son los crustáceos decápodos más abundantes en los ecosistemas de agua dulce templados. Se reconocen más de 400 especies diferentes pero sólo unas cuantas son utilizadas en esfuerzos comerciales de producción acuícola. Varias especies del género *Astacus* y *Pacifastacus* en Europa y la especie *Procambarus clarkii* en Estados Unidos, son las preferidas para ser cultivadas de manera intensiva para el consumo, y por mucho, *P. clarkii* es la especie que más se produce en el mundo. El interés por estos organismos llevó a su estudio desde el siglo XVIII, pero quizá el trabajo de Huxley (1974) publicado a finales del siglo pasado y reeditado en 1974, sea el que consiguió una descripción más detallada de los géneros de acociles de Europa así como de las especies americanas y australianas más importantes. Sus magníficas

ilustraciones son aún hoy en día la guía preferida para muchos que buscan estudiar estos organismos (Holdich, 2002)

Quizá haya sido el interés comercial el que llevó a preocuparse por conocer más sobre la biología y particularmente sobre la fisiología de los acociles. La facilidad de su obtención en el campo y de su cultivo en el laboratorio, facilitó el uso de estos animales para estudios científicos. Por tratarse de un invertebrado, del cual se tenía una buena cantidad de información sobre su historia natural (ver Huxley, 1974), conductas, hábitos reproductivos, y su fisiología (ver Parker, 1897) hicieron del acocil un animal muy útil para estudios científicos, no sólo aquellos dirigidos a incrementar su producción, sino también como un organismo muy interesante, de características adaptativas y con estrategias fisiológicas que ameritaban un enfoque dirigido.

Morfológicamente el sistema nervioso central (SNC) de los crustáceos decápodos ofrece ciertas ventajas. Su anatomía macroscópica revela un cordón nervioso que corre ventralmente y está recubierto por una fina capa de tejido conectivo llamada vaina. Está formado por ganglios pareados unidos transversalmente por comisuras y longitudinalmente por conectivos. El más rostral es el ganglio cerebroide que en realidad se constituye por tres grupos de ganglios fusionados que reciben el nombre de protocerebro, deutocerebro y tritocerebro, siendo este último el más caudal. El ganglio cerebroide se une al ganglio subesofágico a través de un par de conectivos que rodean el esófago. Por debajo de éste se encuentran 5 ganglios torácicos seguidos de otros 6 ganglios

abdominales. De cada ganglio parten nervios con fibras sensoriales y motoras que van a constituir el sistema nervioso periférico propiamente (para una revisión ver Vogt, 2002) (Fig 1)

Tratándose de un organismo con un sistema nervioso mucho menos complejo que el de un mamífero, el acocil atrajo la atención de muchos investigadores, quizá uno de los más destacados haya sido Welsh, que al estudiar la fisiología del sistema nervioso del acocil transformó lo que simplemente sería una colección más de datos en una serie de nuevos conceptos y puntos de vista novedosos para el entendimiento de la fisiología nerviosa

Una característica típica del acocil es que es una especie de hábitos nocturnos que evita la luz en el día y presenta un claro reflejo fototáctico negativo. El trabajo de Welsh de 1934 sobre la participación del sexto ganglio abdominal en la regulación de esta conducta permitió contar con un modelo ideal para analizar la participación directa de elementos identificados en el sistema nervioso sobre la regulación de una conducta específica. En una época donde aún predominaban las ideas conductistas, el tratar de entender, aunque fuera en un organismo invertebrado, cómo "funciona" y se regula una conducta, analizando sus componentes en el sistema nervioso, marcó un punto de partida de gran valor para el desarrollo posterior de las neurociencias.

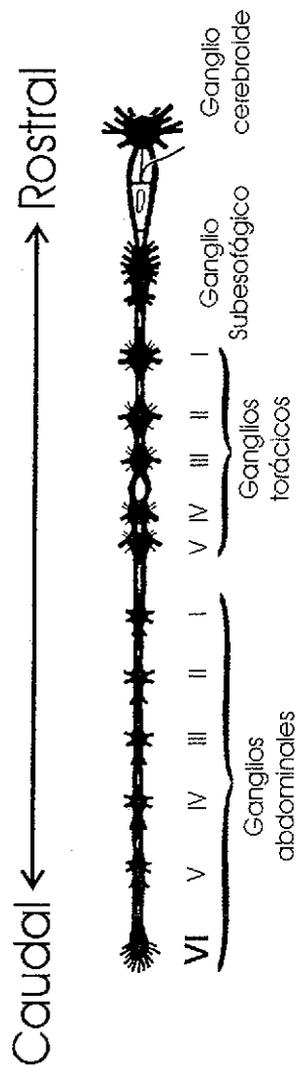


Figura 1. Plan general del sistema nervioso central de los decápodos. El sexto ganglio abdominal es el más caudal. Los nervios periféricos no se observan.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los trabajos de Prosser (1934a y 1934b) que acompañaron al de Welsh en la misma publicación van en el mismo tenor y son un claro esfuerzo por comprender la función nerviosa que subyace al reflejo fototáctico negativo. Quizá el hallazgo más importante en estos trabajos, fue que el reflejo era regulado por alguna o algunas estructuras contenidas en el sexto ganglio abdominal del acocil. Aún más, Prosser describió la actividad eléctrica espontánea de la cadena ganglionar y encontró que al recibir un estímulo luminoso, el sexto ganglio respondía con un incremento en su frecuencia de disparo. Este hallazgo fue aún más relevante porque hasta ese momento no se conocía ningún fotorreceptor no retiniano en estos animales. Las características de esa respuesta fueron descritas por Prosser y posteriormente investigadas por otros autores como Kennedy y Hermann entre otros (ver más adelante)

Por primera vez, se logró encontrar la participación directa de una estructura nerviosa en el control de una conducta, el que los fotorreceptores extrarretinianos estuvieran localizados en una pequeña región del sistema nervioso central del acocil, facilitó mucho su estudio. El análisis de las características de estos fotorreceptores -tanto su morfología como sus propiedades eléctricas- marcaron otro importante avance para la neurofisiología

Para poder comprender mejor cómo es que una conducta es regulada por el SNC, se hace necesario localizar sus componentes nerviosos desde los sensoriales hasta los efectores. Para ello es vital poder localizar plenamente cada una de las neuronas involucradas en esos circuitos. De nuevo el estudio del SNC

del acocil permitió importantes avances al respecto. Con técnicas experimentales depuradas Kennedy (1963) y Hermann y Olsen (1968) lograron identificar dos pequeñas zonas que al ser estimuladas con luz respondían tal como se había descrito para la estimulación completa del sexto ganglio. Al disectar cuidadosamente los conectivos de la cadena ganglionar, se logró registrar la actividad de dos axones, uno en cada conectivo que propagaban ortodrómicamente la respuesta a la luz. Con este tipo de preparaciones se inició el estudio de neuronas localizadas responsables de una conducta. Con el desarrollo de las técnicas de marcaje con amarillo de Proción (Stretton y Kravitz, 1968) la identificación fue completa. Solo dos neuronas, una en cada hemiganglio, que proyectaban sus axones rostralmente, eran las responsables de la respuesta a la luz en el sexto ganglio.

Con relación al estudio de los ritmos circadianos, los acociles también han tenido un papel importante, en buena parte por las razones descritas anteriormente. El avance en el conocimiento que se tenía de la fisiología del SNC del acocil a finales de los años 60, así como el propio desarrollo conceptual de los ritmos biológicos, hicieron que el acocil fuera sujeto a diversos estudios sobre sus variaciones periódicas conductuales y fisiológicas. Además de las observaciones sobre sus hábitos nocturnos, existían reportes de las variaciones diarias en, por ejemplo, los movimientos de los cromatóforos tegumentarios de los cangrejos del género *Uca* que llevó a indagar sobre la naturaleza humoral de su regulación (Brown et al., 1953). Y se tenía una clara idea de los movimientos diarios de los

pigmentos accesorios en los ojos de los acociles (Fingerman y Lowe, 1957) Los niveles hormonales variaban a lo largo del día, la conducta también, y muy posiblemente muchas otras cosas.

Fue necesario buscar oscilaciones en el sistema nervioso y de ahí se desprendieron trabajos encaminados a describir, y posteriormente a explicar la organización circadiana del acocil. Claramente un organismo como éste con el conocimiento que se tenía de su SNC, y su biología en general era un candidato ideal para convertirse en un modelo de estudio de ritmos biológicos. Además, los primeros hallazgos de cambios en la sensibilidad visual y en la actividad locomotora, impulsaron a buscar el origen de las variaciones diarias, a buscar el marcapaso circadiano del acocil (Page y Larimer, 1972, Page y Larimer 1975 a y 1975b, Aréchiga et al , 1993)

Como se mencionó anteriormente, hay diversas pruebas experimentales de que el sistema circadiano del acocil no posee un sólo oscilador circadiano, se trata de un sistema multioscilar que se mantiene en sincronía. Por un lado están los experimentos en los que se divide quirúrgicamente el cerebro (Page y Larimer, 1975b; Barrera-Mera, 1978, Barrera-Mera y Block, 1990). En ellos se ha demostrado que cada hemiganglio es capaz de controlar el ritmo del electroretinograma ipsilateralmente. Por otro lado están los experimentos de Sánchez y Fuentes-Pardo (1977) y de Aréchiga y Rodríguez- Sosa que apoyan la existencia de osciladores en la retina. Estos hallazgos junto con los que demuestran que el tallo ocular (en particular el órgano X) es capaz de seguir

produciendo hormonas rítmicamente (Aréchiga y Mena, 1975) aún sin la regulación del ganglio cerebroide (Barrera-Mera, 1976); dan por resultado por lo menos 3 pares de osciladores en el sistema nervioso del acocil que están involucrados en la ritmicidad circadiana.

Los experimentos de lesión del tallo ocular de Larimer y Smith (1980) demostraron que era necesaria la participación hormonal, además de la neural para mantener sincronizados ambos ojos. También se requiere la participación hormonal para el proceso de sincronización por luz cuando el estímulo se hace directamente al ojo (Page y Larimer, 1976, Barrera-Mera, 1978, Larimer y Smith, 1980). Aunque ésta es también posible a través de la iluminación directa al cerebro en animales con los ojos pintados de negro o ciegos (Page y Larimer, 1976).

La organización del sistema circadiano del acocil también ha sido estudiada a lo largo de la ontogenia (para una revisión ver Fanjul-Moles, 1998). A partir del estudio del ritmo de amplitud del ERG y del de actividad locomotora, se distinguió un patrón de maduración del sistema circadiano que puede estar relacionado con la maduración de diferentes estructuras neurales. Ambos ritmos presentan oscilaciones ultradianas en los primeros estadios de desarrollo, pero el ritmo del ERG tarda más en manifestar un período circadiano nocturno.

Aunque de manera somera, la descripción anterior nos muestra que, por un lado se ha avanzado en discernir los elementos del sistema circadiano y entender su ontogenia y sus relaciones, pero por otro lado hay estructuras que merecen un

estudio más acucioso para resolver las dudas que aún nos presentan

Primeros reportes de la actividad de los fotorreceptores caudales

C. Ladd Prosser tuvo la oportunidad de realizar una estancia postdoctoral con Hallowell Davis en la Escuela de Medicina de Harvard (Prosser 1986). Fue en esta época que logró registrar la actividad eléctrica extracelular rítmica, de la cadena ganglionar ventral del acocil aislada (Prosser 1934a). Ese mismo año descubrió que el sexto ganglio abdominal respondía a la estimulación por luz (Prosser 1934b). Su estancia en Harvard fue de lo más estimulante, como él mismo relata y le permitió compartir con J. H. Welsh el interés por la fisiología de la conducta: el aumento de la actividad locomotora del acocil al ser estimulado con luz. Un acocil en plena luz iniciará un patrón locomotor que lo aleje de ella y lo lleve hacia la sombra, es decir, presenta un reflejo fototáctico negativo. El trabajo que desarrollaron se presentó como dos artículos adyacentes en el *Journal for Cell and Comparative Physiology*. Prosser describió una serie de experimentos en los que se medían los cambios en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PAs) registrados en la cadena ganglionar del acocil al estimular el sexto ganglio abdominal. Welsh por su parte, escribió sobre los experimentos realizados en animales intactos y ciegos a los que se les sometía a estimulación con luz pero se les permitía tener un área de sombra para esconderse. La conclusión de ambos investigadores apuntaba hacia la participación del sexto ganglio en la modulación de una conducta específica, la

fototaxis negativa, y la respuesta fisiológica que mediaba esto eran los cambios en la frecuencia de disparo de los PAs. Visto en retrospectiva, los experimentos de estos autores fueron fundamentales para el entendimiento de la fisiología de la conducta al ser los primeros en señalar la relación conducta vs procesos fisiológicos en el sistema nervioso

Caracterización de la actividad eléctrica de los fotorreceptores caudales

A pesar del impacto que tuvieron los trabajos de Prosser (1934a y 1934b) entre los conductistas y los fisiólogos que estudiaban la conducta, la caracterización de la respuesta del sexto ganglio a la luz no fue desarrollada hasta 1958, cuando Donald Kennedy publicó un trabajo en el que prácticamente redescubrió la actividad del sexto ganglio aislado y analizó la respuesta sensorial del órgano ante intensidades logarítmicas de luz y otras propiedades como la capacidad de suma (Kennedy, 1958a) Además realizó una comparación funcional con el ojo de *Limulus*. Al mantener la cadena aislada por varias horas en solución de Van Harreveld fría, Kennedy logró disminuir la actividad espontánea al grado de poder registrar solamente los potenciales extracelulares provocados por la luz Así, demostró que la actividad del sexto ganglio a la luz se incrementaba con el logaritmo de la intensidad de luz, mientras que la latencia se comportaba de manera inversa Por otra parte reportó que se requería de por lo menos un estímulo de 1.5 s de duración para provocar el incremento de la frecuencia de disparo a intensidades bajas, mientras que bastaba un estímulo de 0.1 s a

intensidades 10 veces mayores

Sin embargo, el origen de tal respuesta no pudo ser aclarado en ese momento. Siguiendo técnicas quirúrgicas y electrofisiológicas clásicas, Kennedy pudo aislar axones de la cadena ganglionar ventral del acocíl *in situ* en animales anestesiados con frío. Para mantener las estructuras aisladas, además de utilizar soluciones salinas como el Van Harreveld frío, se le agregó el uso de soluciones despolarizantes de potasio que permitían disminuir la actividad aferente presente en la cadena ganglionar no aislada. Gracias a estas técnicas, Kennedy en 1963 pudo presentar el análisis de los experimentos realizados para evaluar tanto la actividad sináptica (para evaluar el patrón de aferencias periféricas), como la extensión a la que era posible registrar la respuesta en la cadena ganglionar, estableciendo el primer relevo sináptico, así como la actividad espontánea de la o las neuronas involucradas en la respuesta a la luz. Cabe aclarar que este trabajo es uno de los más representativos en el análisis de neuronas identificadas, ya que demostró sin lugar a dudas, que el aumento en la frecuencia de disparo que Prosser había descrito en 1934 y que él estaba registrando desde la década de los 50's, se originaba en un par de neuronas que emitían sus axones desde el sexto ganglio, a lo largo de la cadena ventral del acocíl. Cada axón corría en un conectivo y él detectó la presencia de la respuesta al menos hasta el conectivo que se encuentra entre el 2º y el 3er ganglio abdominal.

Para Kennedy en ese momento quedó claro que se trataban de neuronas que funcionaban como fotorreceptores primarios a partir de los siguientes

criterios: a) El aumento en intensidad de iluminación produce una respuesta graduada, b) existe el reajuste de la actividad sensorial rítmica por medio de pulsos antidrómicos interpolados. Aquí vale la pena detenerse a explicar que Kennedy había demostrado que el potencial de membrana de estas células era inestable y por lo tanto era capaz de generar potenciales de acción espontáneamente, es decir, se comportaba como un marcapaso (Kennedy, 1963).

También demostró que los fotorreceptores caudales (FRCs) reciben información sináptica excitatoria de las raíces terminales del sexto ganglio que llevan información aferente desde las estructuras sensoriales del telson. Esta actividad se caracterizó como potenciales postsinápticos excitatorios. Además existe información inhibitoria aferente que también puede modular la actividad espontánea y la provocada por la luz (Kennedy, 1963).

En 1962, Bruno y Kennedy reportaron la sensibilidad espectral de las neuronas fotorreceptoras del sexto ganglio. Al comparar dicha curva con la sensibilidad espectral del ojo, encontraron que el pico máximo de sensibilidad se encuentra desplazado hacia la derecha, alrededor de los 500 nm, más cercano a la banda correspondiente al azul. Sin embargo, los autores aún especulaban sobre la naturaleza adaptativa de estos fotorreceptores "primitivos" ya que tenían un umbral más bajo que el de los fotorreceptores oculares. Estaba claro que se trataba de neuronas muy diferentes a las descritas hasta entonces, ya que además de funcionar como interneuronas que relevaban la información proveniente de las sensilas del telson, poseían actividad fotorreceptora

Esta dualidad de funciones, quizá fue lo que llamó tanto la atención y llevó a continuar los trabajos para identificarlas morfológicamente y describir con detalle sus funciones. Hermann y Stark (1963a) desarrollaron experimentos fisiológicos en los que demostraron que la respuesta a la luz en *Orconectes* se propaga a través de las fibras B de la cadena ganglionar y por lo tanto no podían estar asociadas a las estructuras que Hama (1961) había descrito como "lamelares" y a las que asociaba con el fotorreceptor caudal, el cual posee como se dijo antes, un bajo umbral. Los hallazgos morfológicos de Hama no fueron confirmados por Hermann y Stark (1963a) quienes mencionan que a la fecha de la publicación, no se habían encontrado a pesar de los esfuerzos.

Sin embargo Kennedy y Preston (1960) ya habían logrado identificar dos axones, uno en cada conectivo, que eran los únicos en los que se podía registrar actividad eléctrica a la luz (de ahí que se propusieran dos neuronas una en cada hemiganglio. Antes, Preston y Kennedy (1960) habían reportado los mecanismos de integración sináptica en el 6º ganglio. Posteriormente Hermann y Stark (1963b) reportaron el análisis de la respuesta de estas neuronas a cambios sigmoidales de intensidad de luz. Este análisis permite obtener las funciones de transferencia que tratan de definir las entradas y salidas del receptor.

No fue sino hasta 1972 que Wilkens y Larimer pudieron describir la morfología de las neuronas que se identificaron como los fotorreceptores caudales del acocil y su actividad sináptica, habían transcurrido 38 años desde los trabajos de Prosser y Welsh. Gracias a la técnica de marcaje intracelular

(Stretton y Kravitz, 1968), Wilkens y Larimer pudieron inyectar el colorante a través de los axones del fotorreceptor, el cual identificaban por su respuesta a la luz. De esa manera lograron fotografiar por primera vez a las neuronas del sexto ganglio que aumentaban su frecuencia de disparo al ser estimuladas fóticamente. Como se había predicho por los experimentos electrofisiológicos, se trataba de una neurona en cada hemiganglio, la cual poseía un árbol dendrítico bastante ramificado y que se extendía contralateralmente. Mediante una guía de luz de cuarzo de apenas 4 mm de diámetro en la punta, con la que al estimular un ganglio (mapeando las zonas sensibles a la luz) conseguían registrar la respuesta en el axón contralateral, estos autores lograron identificar que la respuesta a la luz se originaba en dichos árboles dendríticos.

Todos estos trabajos para identificar y describir la función de neuronas relacionadas con una conducta fueron la antesala de los trabajos posteriores encaminados a entender como se controla el reflejo fototáctico negativo en los acociles que Wilkens revisó ampliamente en 1988. Sin embargo los fotorreceptores caudales también atrajeron el interés de los cronobiólogos, quienes estaban interesados en saber si estas neuronas podían estar involucradas en el sistema circadiano del acocil.

Los fotorreceptores caudales y los ritmos circadianos

Los estudios de Kennedy sobre los FRCs (1958a) o sobre otras interneuronas de la cadena ganglionar del acocil (1971) -bien ya fuera para

explicar la acción directa de ciertas neuronas o circuitos neuronales pequeños sobre una conducta específica, o para "aislar" e identificar neuronas-constituyeron un avance para la neurofisiología, en una época en la que tener acceso a sistemas nerviosos complejos con miles de neuronas, resultaba difícil

Por otro lado, las investigaciones encaminadas a entender los procesos rítmicos de los invertebrados y en particular de los crustáceos, fueron desarrollados con el objetivo de describir y analizar su posible origen endógeno. Algunos de estos trabajos ofrecieron las descripciones de ritmos como el de amplitud del ERG (Aréchiga y Wiersma, 1969, Aréchiga et al., 1973) y el de actividad locomotora (Page y Larimer, 1975a). Con el interés de entender mejor los procesos circadianos subyacentes a estos ritmos, en particular el de actividad locomotora, es que Page y Larimer (1972 y 1976) buscaron las vías de sincronización y la participación de los fotorreceptores caudales y visuales en tales procesos. Basados en los trabajos de Chapple (1960) y los de Wilkens y Larimer (1972, 1976) que ya habían encontrado y marcado a los FRCs, realizaron experimentos de ablación del sexto ganglio o de cortes en los conectivos entre el 5º y el 6º ganglios, a la vez que registraban la actividad locomotora en regímenes luz-oscuridad (LO) 12:12. Ninguno de sus experimentos logró demostrar que los FRCs tuvieran alguna relación en los procesos de sincronización del pico endógeno de actividad locomotora. Sin embargo encontraron que tampoco los ojos eran necesarios para la sincronización y más aún que aparentemente un fotorreceptor cerebral no visual era el responsable.

No hubo más intentos por relacionar los FRCs con el sistema circadiano del acocil hasta los trabajos de Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1987) y de Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo (1987). En ellos se estudió el efecto de la estimulación ventral del acocil pero ahora sobre el ritmo del ERG, hallándose una clara influencia de la estimulación luminosa vía el fotorreceptor caudal, sobre la amplitud del ERG que dependía de la hora del día en que se estimulara, aunque en este trabajo los autores sólo exploraron dos horas del día

En el modelo de los elementos funcionales del sistema circadiano del acocil, Larimer y Smith (1980) excluyen la participación de los FRCs, sobre la base de que hasta ese momento no existían pruebas de su participación. Recientemente, Aréchiga y Rodríguez-Sosa (1997) los incluyen en un modelo más actual como elementos aferentes de la información sensorial que modula los patrones de actividad locomotora. Sin embargo aún no queda claro si el papel de los FRCs en el sistema circadiano es de un fotorreceptor circadiano o si participan como un oscilador que, acoplado a los demás que se han descrito, regulan la cronostasia del acocil.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: Los fotorreceptores caudales del sexto ganglio abdominal del acocil presentan una actividad rítmica circadiana que se pone de manifiesto al registrar su actividad eléctrica espontánea y provocada por la luz, en condiciones *in vitro*

Objetivos:

1. Desarrollar la metodología para aislar y mantener *in vitro* la cadena ventral abdominal del acocil.
2. Registrar en esas condiciones, la actividad eléctrica extracelular, espontánea y provocada por la luz, del sexto ganglio abdominal de acociles *Procambarus clarkii* adultos en intermuda.
3. Con el objeto de determinar las características circadianas de la actividad eléctrica extracelular, espontánea y provocada por la luz, del sexto ganglio abdominal *in vitro*, se cuantificará la fase y periodo de la posible oscilación, en condiciones constantes de luz y temperatura

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se usaron acociles *P. clarkii* adultos en etapa de intermuda, sin distinción de sexo. Los animales fueron colectados en el campo y colocados en condiciones de aclimatación en acuarios aereados, con fotoperiodo luz-oscuridad (LO) 12:12, por lo menos dos semanas antes del experimento; la luz se proporcionó con lámparas fluorescentes y el encendido de la luz era a las 7:00 h. Se les alimentó con verduras y pescado 3 veces por semana.

Procedimientos quirúrgicos

La disección de la cadena ganglionar siempre se realizó con luz ambiental. Los animales eran colocados en frío por 20 a 30 minutos hasta alcanzar el nivel de anestesia profunda. Se sacrificaban por decapitación y se aislaba la región del abdomen con un corte por arriba del primer segmento abdominal. Se exponía la cadena ganglionar por medio de dos cortes paralelos en la cutícula del abdomen y que corrían a lo largo del eje sagital de la estructura. La cadena era disecada con varillas de vidrio y colocada en una caja petri con solución salina para acociles (Van Harreveld, 1936) fría (15° C) y posteriormente se colocaba en la cámara de registro la cual contaba con un sistema de control de temperatura y que permitía mantener la preparación a $19 \pm 1.0^{\circ} \text{C}$.

Procedimientos experimentales

Etapa I: Registro con electrodos de platino

En ésta etapa se utilizaron 30 animales. Todos los registros se iniciaron a la misma hora. La cadena ganglionar de cada animal se colocó en la cámara de registro y se bañó con solución Van Harreveld hasta cubrir la cadena por completo. El registro eléctrico se logró colocando la cadena a la altura del conectivo entre el quinto y sexto ganglios, sobre un gancho de alambre de platino (3mm diámetro) que servía como electrodo vivo mientras que un electrodo de plata (Ag-AgCl) se colocaba en el baño y servía como electrodo indiferente. El electrodo se conectaba a una sonda de alta impedancia (Grass, mod. HIP5GA) y la señal era llevada a un amplificador AC (Grass, mod 7P511, Polígrafo mod 79). La actividad eléctrica multiunitaria así registrada se pasaba a un osciloscopio de memoria (Narco Biosystems, mod. NarcoTrace) donde se fotografiaba, al mismo tiempo la señal se grababa en cinta de audio convencional.

La preparación se dejaba estabilizar y adaptar a la oscuridad durante 30 a 60 minutos. Después de este tiempo y cada tres horas, se registraba un minuto la actividad espontánea y después registraba la actividad provocada por un pulso de luz de 15 s de duración, que se aplicaba con una lámpara Olympus (mod TL2). El control de encendido y apagado de la luz, así como del encendido y apagado de la grabadora se controlaban con un dispositivo electrónico (desarrollado por el Ing. David Elías, CINVESTAV). El registro se mantenía por 45 segundos más

después del apagado de la luz para un total de dos minutos de registro. A pesar de que no se calibró la intensidad de estimulación en esta primera etapa, todos los experimentos se realizaron con la máxima intensidad de la lámpara, la cual se situaba a 10 cm de altura sobre la preparación.

Los primeros registros se fotografiaban y la frecuencia de potenciales de acción multiunitarios se estimaba por conteo sobre las fotos de cada situación (antes y durante el pulso de luz), para después tabular y graficar la frecuencia en Hz vs la hora de registro.

Cuando fue posible grabar la señal en casete, la información se capturaba a través de una tarjeta analógico-digital y una computadora PC. Este equipo y el programa de análisis fueron proporcionado por el Dr. Raúl Aguilar. El programa permitía calcular la frecuencia instantánea de los potenciales de acción extracelulares y tabular los datos para después obtener la frecuencia promedio durante la fase de oscuridad y la frecuencia al pico en la fase de estimulación por luz para cada segmento de dos minutos capturado. Los datos se tabulaban después como frecuencia (Hz) vs hora externa.

Para analizar la organización temporal de los datos, se utilizó un programa que permitía calcular el periodograma de Enright (1965). El programa fue diseñado y escrito en nuestro laboratorio.

Etapa II. Registro con electrodos de succión

Con el fin de mejorar tanto las condiciones de registro como las de incubación para lograr mejores tiempos de viabilidad de la preparación, se desarrollaron varias acciones. Se construyó una cámara de control de temperatura que permitía mantener la variación de esta variable en un rango menor (19 ± 0.5 °C). Esto se logró con un baño circulante de temperatura controlada (Cole Parmer mod PolyStat 01268-14) que permitía mantener la preparación en el intervalo de temperatura señalado. También se calibró la intensidad del estímulo luminoso para poder aplicar estímulos de 1, 10, 380 y 2000 lx a través de una fuente de luz incandescente acoplada a una fibra óptica. También se construyó un circuito con una fotocelda que permitía censar el momento de la aplicación del estímulo de luz. La señal de voltaje de este circuito podía ser registrada simultáneamente con el registro de actividad eléctrica de la preparación. En cuanto al registro, se requirió modificar la disección como se detalla a continuación: El conectivo entre el 5° y 6° ganglios se cortaba lo más proximal posible al quinto ganglio, se retiraba la vaina que cubre al tejido nervioso por medio de varillas de vidrio finamente estiradas y después se dividía cada uno de los dos conectivos en varios haces o filetes de axones (aprox. 4 por conectivo). Posteriormente, y con el uso de una micropipeta de succión conectada con un sujetador con un alambre de Ag-AgCl, se succionaba un haz con el fin de buscar aquel que contuviera uno de los axones proveniente de una de las dos células fotorreceptores del sexto ganglio. La señal era llevada por medio de una sonda

de alta impedancia a un amplificador AC Grass (mod. 7P511, polígrafo mod 79 o mod. P511). La señal era monitorizada en un osciloscopio de memoria (Hameg HM 2053) y un monitor de Audio (Nafri).

Una vez que se tenía un haz dentro de la micropipeta se escuchaba y observaba la actividad eléctrica. Si los potenciales eran consistentes en aumentar su frecuencia de disparo ante un estímulo luminoso, la preparación se dejaba estabilizar de 30 a 60 min en oscuridad antes de iniciar los registros a lo largo del día o para construir una curva de Frecuencia vs log intensidad de luz. Estas curvas se hicieron siempre a la misma hora (13:00) y consistían en estimular a la preparación con intensidades de 1, 10, 380 y 1000 lx.

Una modificación más en todo el sistema de registro fue el de la grabación de la señal en formato de video, por medio de un registrador digital (Instrutech mod VR10) y una video grabadora Sharp (mod VC-A206). Además el sistema tenía una tarjeta analógico digital que permitía capturar cualquier segmento grabado previamente para posteriormente analizarlo con el programa Pclamp (ver 5.0).

Etapas III: Refinamiento de las técnicas para incubación

Se utilizaron soluciones Van Harreveld modificadas a las que se les añadió un amortiguador diferente al bicarbonato. Se probaron tres tipos de ellos, el de fosfatos, el Tris y el Hepes. Además se incluyó glucosa en el medio como fuente de energía para el tejido. La Tabla I resume las diferentes modalidades del Van

Harreveld que se probaron.

Tabla I Soluciones Van Harreveld modificadas

Reactivo	VH normal*	Fosfatos	Trizma	HEPES + Glucosa	HEPES
NaCl	205.3	195.8	153	170.42	201.4
KCl	5.37	5.37	5.37	5.37	5.37
CaCl ₂	13.55	13.55	13.55	13.55	13.55
MgCl ₂	2.61	2.61	2.61	2.61	2.61
NaHCO ₃	2.38	--	--	--	--
NaH ₂ PO ₄	--	2	--	--	--
Na ₂ HPO ₄	--	8	--	--	--
Trizma		--	10	--	--
Hepes	--	--	--	10	10
Glucosa	--	10	10	10	--

* Todos los valores en mM, pH en todas 7.35-7.45

Con el fin de mantener el aporte de solución fresca se montó un sistema de perfusión y vaciado del Van Harreveld, que permitía tener un flujo continuo de solución a la preparación

Etapa IV: Registro con electrodos de acero y tungsteno

En esta etapa, se usaron electrodos de acero (fabricación nacional) o tungsteno (A-M Systems, Inc.) para registrar la actividad eléctrica del sexto ganglio. La

cadena ganglionar abdominal completa se colocaba en una caja petri con fondo de Sylgard 181 (Dow Corning) que estaba dividida en dos partes por medio de un vidrio delgado y angosto que tenía un espacio de 5 mm que comunicaba ambos compartimentos. El sexto ganglio se colocaba en un compartimento y la cadena se dejaba cruzar el espacio abierto del vidrio, perpendicularmente al eje del mismo. La región de la cadena que quedaba justo en la apertura se cubría con vaselina y hasta formar un sello entre ambos compartimentos. Después, con ayuda del electrodo de acero o de tungsteno (aprox. 2 M Ω de resistencia) se empalaba el conectivo entre el quinto y sexto ganglio, que había quedado en el compartimento del lado del sexto ganglio, lo más cercano posible a éste. El electrodo indiferente se colocaba en el otro compartimento y ambos se llenaban de solución Van Harrevelde modificada con Hepes y glucosa. La actividad eléctrica se registraba con el equipo descrito en la Etapa II.

Análisis de datos.

Además de los primeros análisis con los programas para hacer el periodograma de Enright, los datos promedio de la frecuencia espontánea y la provocada por la luz se sometieron al análisis de Cosinor con el programa Dispac, desarrollado en el Laboratorio del Dr. Raúl Aguilar (IFC, UNAM).

RESULTADOS

Etapa I

De los 30 animales que se registraron en esta etapa, sólo 8 registros cumplieron cerca de 24 horas de incubación o un poco más y pudieron ser grabados y analizados con el sistema de captura de señales descrito en Materiales y Método.

Los registros con electrodos de platino permitían registrar señales multiunitarias como las que se observan en la figura 2. Las fotografías de esta figura fueron tomadas a la pantalla del osciloscopio de memoria. En el trazo superior se observa la actividad espontánea y en el trazo inferior la actividad provocada por la luz.

El panel A muestra una foto tomada a las 1200 h mientras que en B la foto se tomó a las 0000 h. A pesar de ser una técnica en la que se registraba la actividad de varias neuronas, el incremento en la frecuencia de disparo al aplicar la luz es claro, así como las diferencias en la actividad eléctrica a las dos horas aquí mostradas.

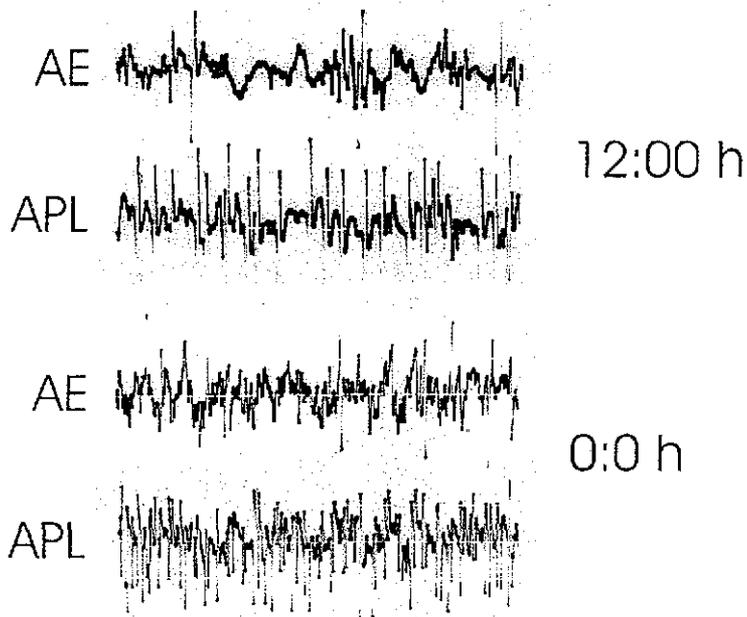


Figura 2. Registro multiunitario de la actividad eléctrica espontánea y provocada por luz en el 6° ganglio abdominal del acocil, a dos horas del día. AE: Actividad espontánea; APL: Actividad provocada por la luz.

En la figura 3A, se observa la gráfica de frecuencia (Hz) vs tiempo externo de la actividad espontánea del registro que tuvo mayor duración (por arriba de las 48 h). En el panel B de la misma figura se gráfica la actividad provocada por la luz. A pesar del decremento en la amplitud de las respuestas y que probablemente se deba al deterioro de la preparación, es posible discernir un pico de actividad en las noches subjetivas de la preparación. Es interesante también que estos picos parecen estar en fase.

En la figura 4 se observan los cambios en la actividad espontánea y provocada por la luz a lo largo de 27 horas. Cada punto representa el promedio de la frecuencia de potenciales de acción obtenida ($n=8$ por punto). En la gráfica se puede observar que existe un pico en la noche subjetiva, en el disparo de PAs en ambas condiciones. La menor actividad fue registrada en el periodo correspondiente al día subjetivo, siendo aún menor hacia el final del experimento.

Al aplicar el periodograma de Chi cuadrada a los datos de ambas condiciones, se revela un pico de periodo significativo mayor a 24 h (Figs. 5A y B)

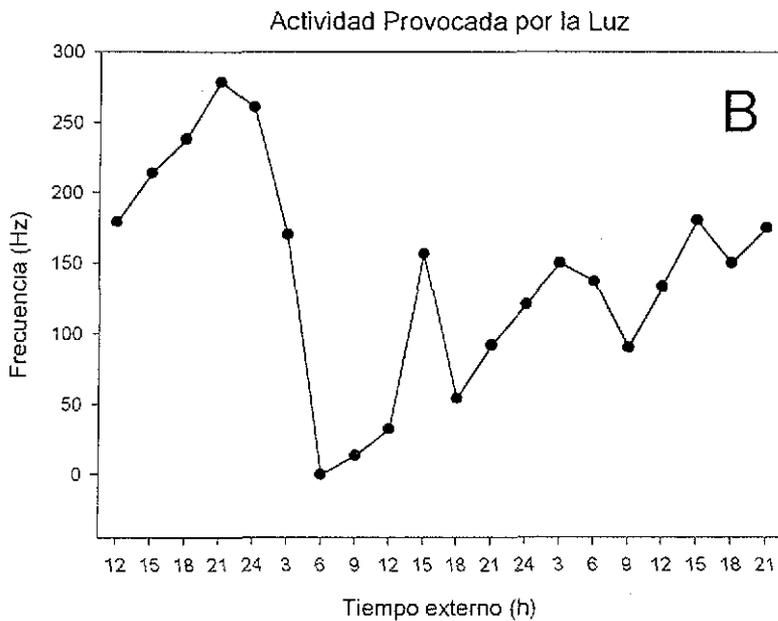
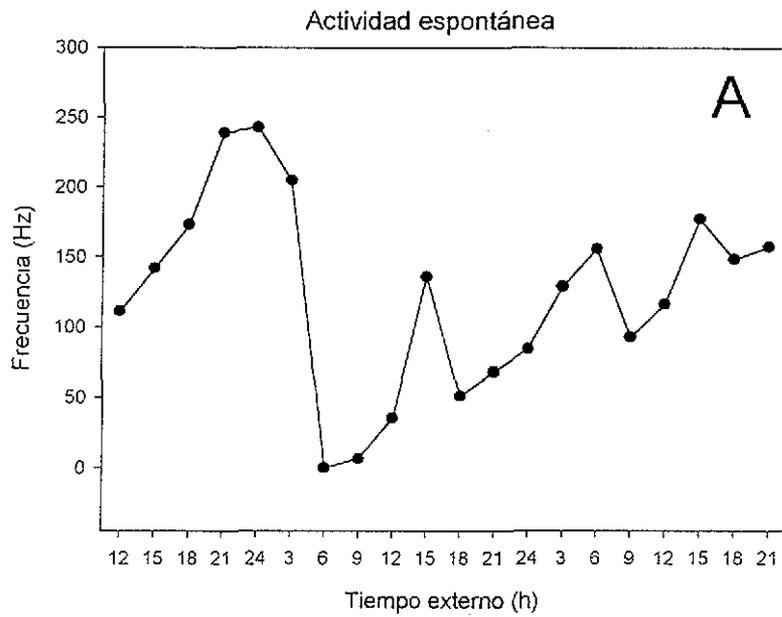


Fig 3. Gráfica de la frecuencia de disparo espontánea (A) y provocada por la luz (B), a lo largo de un poco más de 48 h.

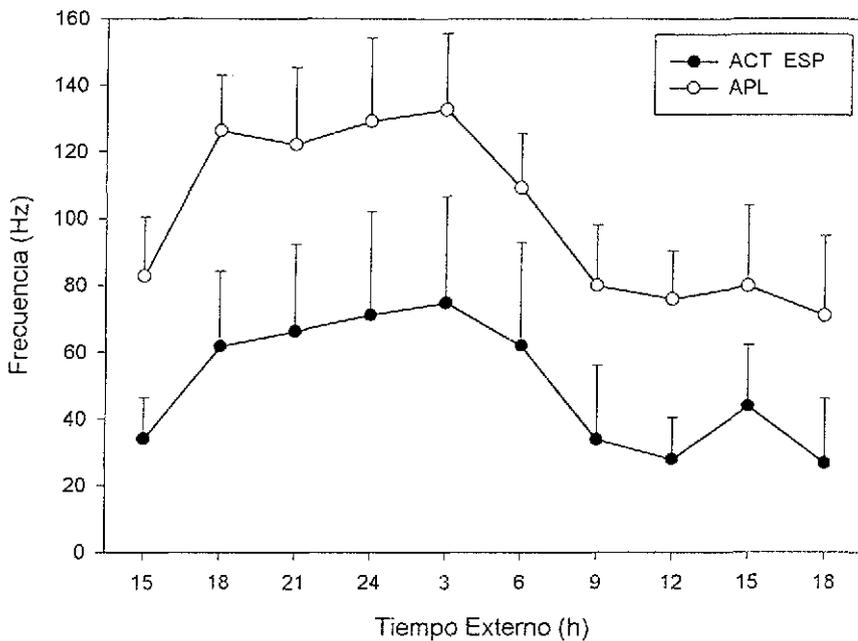


Figura 4. Cronograma de la actividad eléctrica espontánea (Act. Esp) y la provocada por la luz (APL), registradas con electrodos de platino. Cada punto corresponde al promedio de 8 ciclos \pm desv. est..

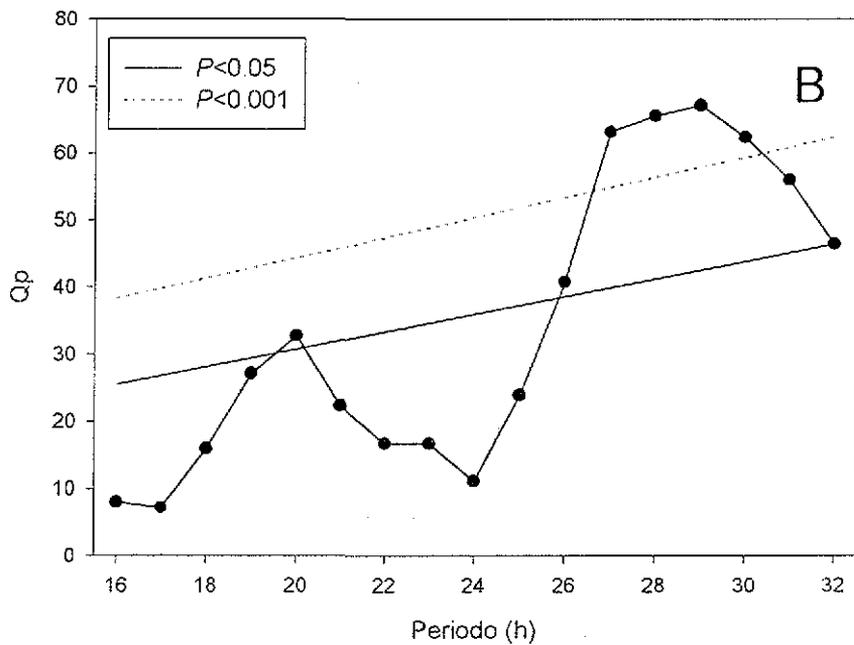
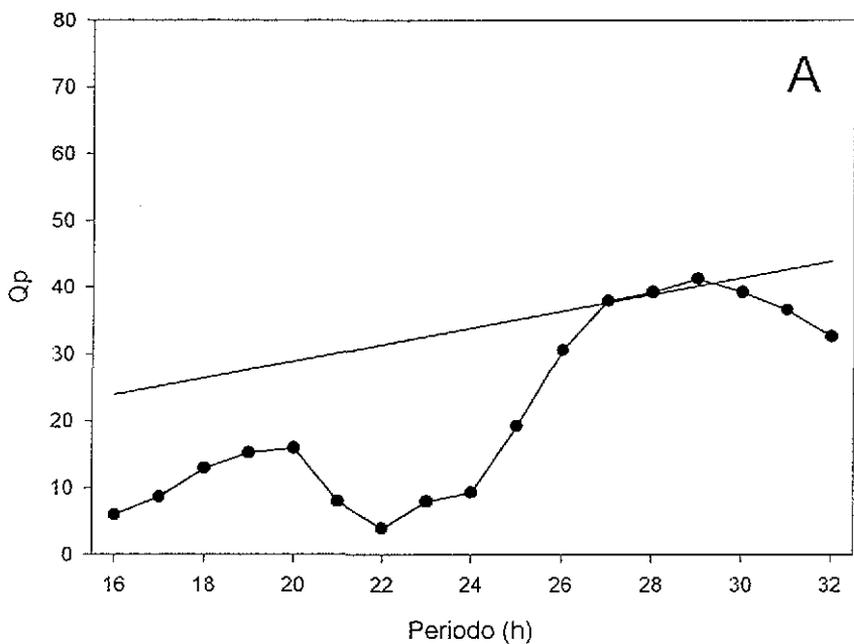


Fig 5 Periodograma X^2 de los datos de la Fig. 4
 A: AE; B: APL.

Etapas II y III

El registro con electrodos de succión permitió registrar con mejor relación señal ruido, la actividad eléctrica de los FRCs, lo que ayudó a caracterizar el tipo de potenciales que se encontraban y facilitó su análisis en el programa Pclamp.

En la figura 6A y B se observa el registro con la técnica de electrodos de succión antes y durante la aplicación de un pulso de luz en la misma preparación. En ocasiones esta técnica permitió rehacer registros unitarios de los FRCs pero comúnmente se registraban potenciales pareados o hasta un máximo de 4 unidades diferentes. Con ayuda de la rutina Pstat del programa Pclamp era posible discernir entre ellos y hacer el análisis de frecuencia instantánea. En el panel 6C se observa una curva de frecuencia vs log intensidad de luz. La curva es semejante a la encontrada por otros autores (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997) en preparaciones equivalentes. Gracias a estas curvas se decidió estimular siempre con una intensidad de 100 lx lo que permitía tanto poner en evidencia la respuesta a la luz como evitar el deterioro rápido del fotorpigmento en la preparación crónica.

Los potenciales que respondían a la luz se caracterizaron por su tamaño y duración así como por su forma de disparo. Se trataba de potenciales bifásicos con un componente positivo inicial más grande en amplitud que el negativo que les seguía. La amplitud total era de alrededor de 900 μ V y 3 ms de duración. Se encontraban disparando rítmicamente y en ocasiones se observaban en pares.

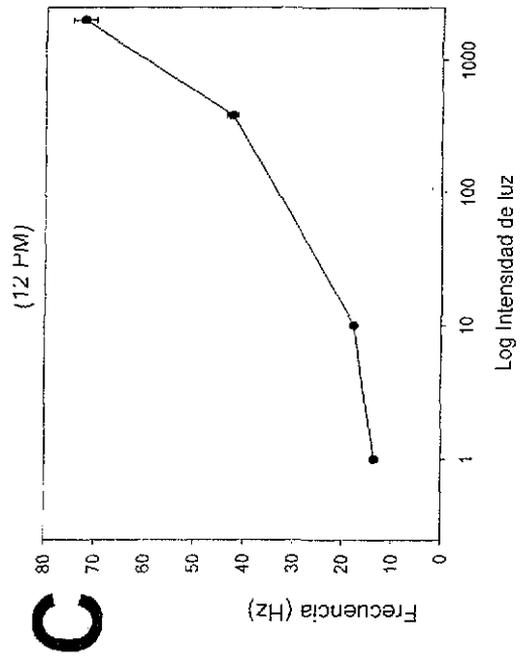
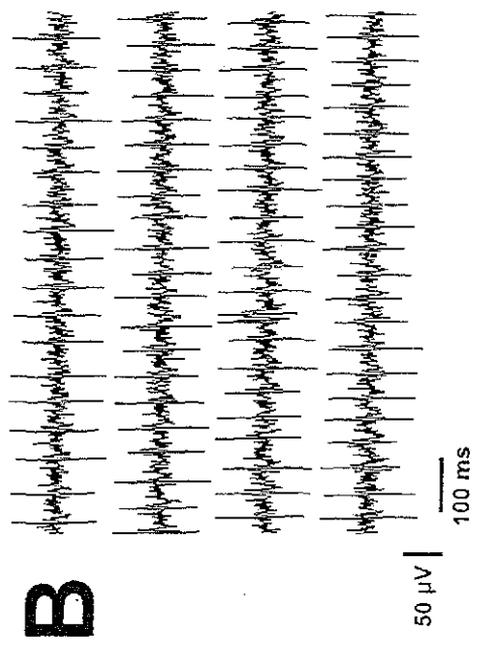
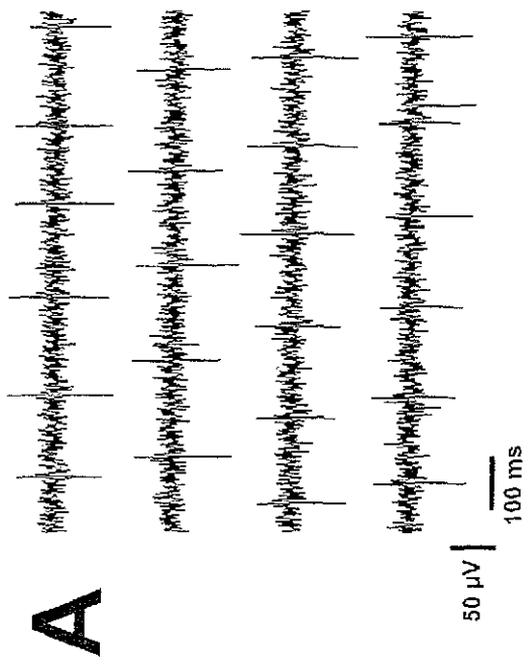


Figura 6. Registros con electrodos de succión.
 A, Actividad espontánea. B, Actividad provocada por la luz (380 ix). C, Curva de frecuencia de disparo vs log intensidad de luz.

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

Esta forma de disparo de los FRCs ya ha sido descrita con anterioridad (Kennedy, 1963). Al aplicar la luz (100lx), y después de un lapso de menos de 500 ms de latencia se observaba el típico incremento fásico en la frecuencia de disparo seguido de una disminución en la frecuencia (respuesta tónica) que se mantenía durante todo el tiempo del estímulo. Cuando éste terminaba se registraba una posdescarga que tardaba hasta 4 minutos en regresar a la frecuencia basal. Este comportamiento es el típico que se ha descrito como la respuesta a la luz de los FRCs (Kennedy, 1958a).

En cuanto a los diferentes tipos de soluciones amortiguadoras que se probaron, la que mejor permitió mantener el pH de la solución fue la que contenía Hepes, sin embargo, a pesar de los esfuerzos por prolongar la viabilidad de la preparación, no fue posible lograr preparaciones crónicas usando los electrodos de succión como método de registro.

Etapa IV y análisis general con Cosinor.

Con el fin de disminuir el manejo traumático a la preparación causado por la disección y la separación de los haces de axones en haces más delgados para poder introducirlos en la micropipeta de succión, se decidió regresar a la preparación con la cadena ganglionar completa, pero aislando el sexto ganglio del resto de la cadena por un puente de vaselina como se explicó en Materiales y Métodos. De esta forma se podía registrar con un electrodo metálico fuera de acero o de tungsteno, obteniéndose registros con tan buena relación señal-ruido

como con los electrodos de succión. La impedancia de los electrodos (de hasta 2 M Ω) permitió incluso hacer algunos registros unitarios o registros en los que sólo se registraban potenciales pareados de los FRCs. Este método de registro junto con las otras mejoras del sistema de estimulación y perfusión de solución dieron como resultado el registro repetible de la actividad de los FRCs en preparaciones crónicas que duraron hasta 27 horas.

La figura 7 se muestra la gráfica de la frecuencia vs tiempo externo de un registro típico que duró 24 horas. Se observa que la actividad provocada por la luz tiene un pico hacia las 22 h en la noche subjetiva de la preparación.

La figura 8 muestra el tipo de registros que se lograban con los electrodos de tungsteno (corresponde al registro de la figura anterior). En el lado izquierdo de la figura se muestran segmentos (2 s/condición) del registro correspondiente a las 0800 h antes (oscuridad) y durante la estimulación con un pulso de luz de 100 lx. En el lado derecho están los segmentos capturados a las 2000 h. Se puede observar la diferencia en la frecuencia de disparo (mayor en la noche) en las dos condiciones.

La figura 9 representa las gráficas de frecuencia instantánea en los 15 segundos previos y 10 segundos durante el pulso de luz también a las 0800 y a las 2000 h. Los datos así obtenidos se promediaban (por condición y por hora de registro) para hacer gráficas como la de la figura 7.

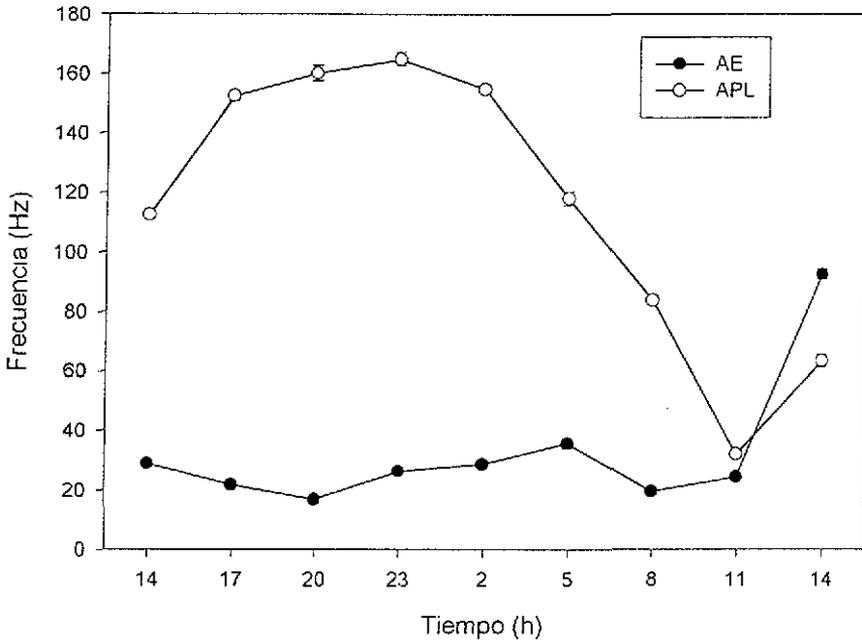
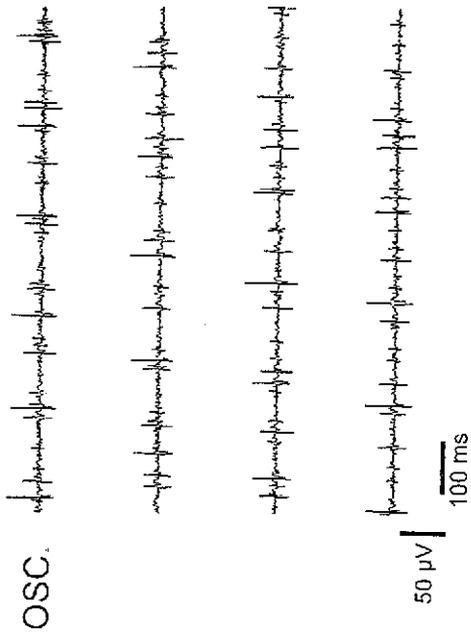


Figura 7. Cronograma de un registro con electrodos de tungsteno
 AE: Actividad espontánea; APL: Actividad provocada por la luz (100 lx)

8:00



23:00

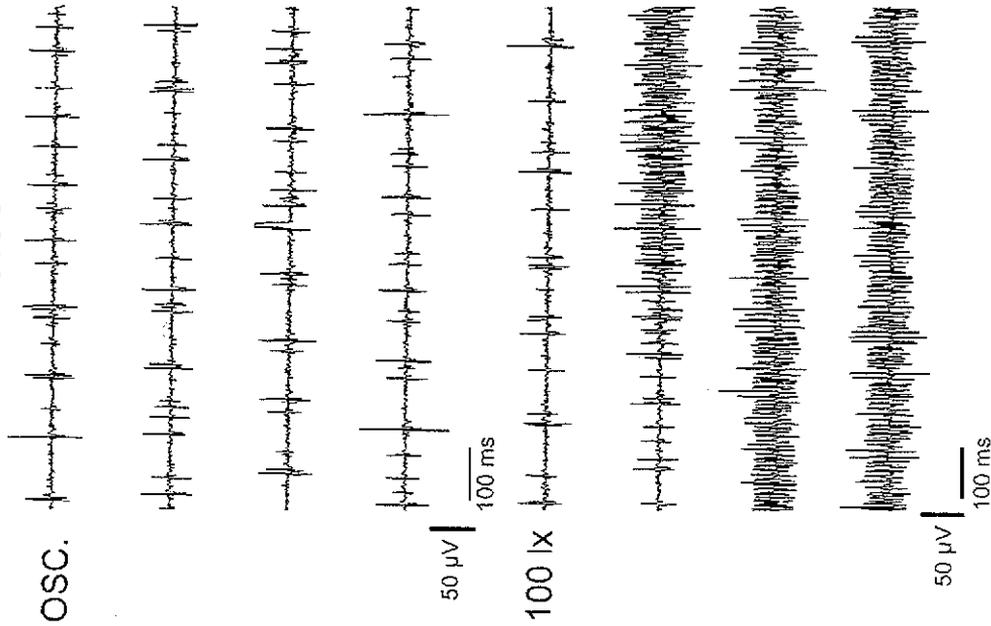
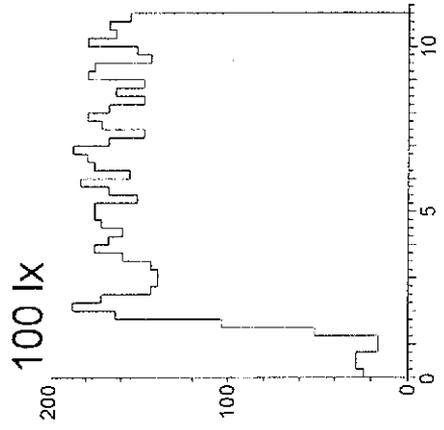
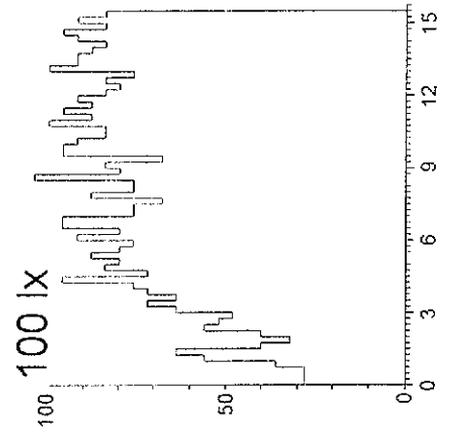
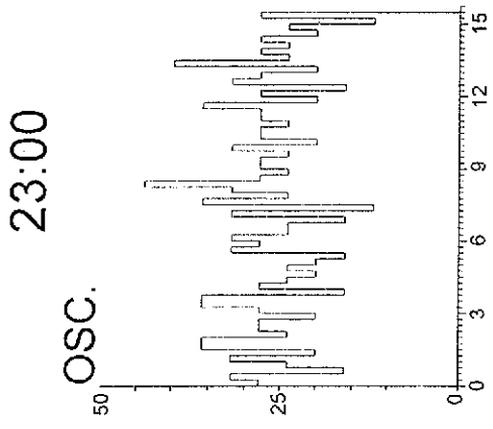
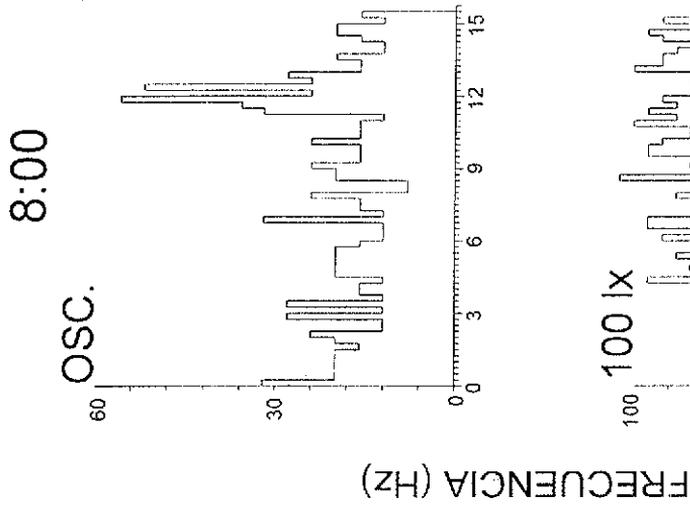


Figura 8. Muestra la actividad espontánea (osc.) y provocada por la luz (100 IX) durante 5 s de registro a dos horas diferentes usando electrodos de tungsteno. Panel derecho: A las 0800. Panel izquierdo: A las 2300. La duración de cada línea es de 1 s.



Tiempo (s)

Figura 9 Análisis de Frecuencia vs tiempo a dos horas del día tanto para la actividad espontánea (osc.) Como para la actividad provocada por la luz.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Posteriormente, y dado que los registros se iniciaban a la misma hora se realizó una gráfica con las frecuencias promedio de los 4 registros completos que se consiguieron usando esta técnica. En la figura 10 se muestra esta gráfica para la condición de oscuridad (actividad espontánea y la condición de estimulación (actividad provocada por la luz) Ambas condiciones muestran un incremento en la frecuencia de disparo de PAs en la noche subjetiva de la preparación, y un segundo pico en el día subjetivo de menor amplitud que el primero. Es importante destacar que el patrón temporal es muy parecido al de los registros con electrodos de platino (fig 4)

El análisis con Cosinor que se le aplicó a los todos los datos promediados reveló que tanto la actividad espontanea (AE) como la provocada por la luz (APL) presentan periodos circadianos. AE: $t=24.4$, porcentaje de ritmicidad = 82.4, acrofase= 20.24, mesor= 45.5 Hz, amplitud= 17.76 Hz; APL: $t=24.2$, porcentaje de ritmicidad = 92.2, acrofase= 20.35, mesor=105.9 Hz, amplitud= 31.7 Hz. La amplitud de ambos ritmos es significativa: AE: $F=56.7$, APL: $F= 136.0$, $P<0.05$

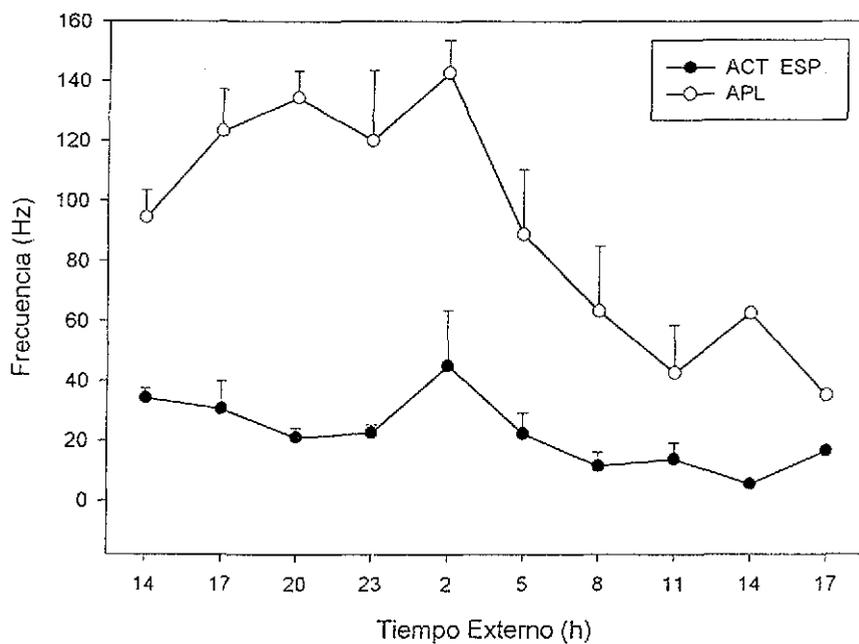


Figura 10 Cronograma del promedio de la actividad eléctrica espontánea (AE) y la provocada por la luz (APL), registradas con electrodos de tungsteno. Cada punto corresponde al promedio de 4 ciclos \pm desv. est.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actividad eléctrica del sexto ganglio, registrada con diferentes técnicas

Desde las primeras observaciones de Prosser (1934a y 1934b) se observó que la cadena ganglionar del acocil poseía una actividad espontánea intrínseca que se podía detectar como actividad multiunitaria con electrodos extracelulares. El descubrimiento de Prosser, un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción, la respuesta eléctrica a la luz, fue un hallazgo que marcó el inicio de un largo recorrido hacia el reconocimiento de unidades neurales específicas involucradas en una conducta, en este caso el reflejo fototáctico negativo. Al mismo tiempo provocó la necesidad de entender el papel de las neuronas involucradas en la modulación de esa conducta.

Los esfuerzos de Kennedy y Hermann -entre otros- los llevaron a describir con detalle las propiedades de estos potenciales y a tratar de discernir su origen (Kennedy, 1958a, 1958b y 1963; Hermann y Olsen, 1968; Hermann, 1972). Usando técnicas quirúrgicas llevadas a cabo cuidadosamente y procedimientos de registro más elaborados, estos autores lograron diseccionar la respuesta a la luz en la cadena ganglionar y delimitar su origen en el sexto ganglio y más precisamente en dos neuronas situadas bilateralmente - una en cada hemiganglio.

La actividad espontánea registrada con los electrodos de platino, utilizados en este trabajo, tiene gran similitud a la registrada en aquellos primeros registros,

ya que siendo un sistema de baja impedancia, permite captar gran cantidad de unidades, sin embargo la respuesta a la luz sigue siendo muy clara a pesar de encontrarse sobreimpuesta a la actividad de fondo. Aún con esta baja definición fue posible distinguir a ojo los potenciales provenientes de los FRCs y con la ayuda de los sistemas de captura, hacer una medición objetiva y precisa de la frecuencia de potenciales de acción existentes en el registro. Vale mencionar que la amplitud de los potenciales registrados estaba en el rango reportado (de entre 50-100 μV). La actividad provocada por la luz manifestó el mismo patrón general descrito por Prosser (1934), Kennedy (1963) y Hermann y Olsen (1968). La frecuencia se incrementa súbitamente después de una latencia que depende de la intensidad de la luz para disminuir ligeramente y mantenerse en una meseta hasta que el estímulo termina, manteniendo una posdescarga que tarda varios minutos en regresar a los valores basales. Típicamente, para un estímulo de 100 lx la respuesta se incrementa hasta alrededor de 50 Hz y tarda de dos a tres minutos en regresar a la basal. También con los electrodos de platino se consiguió observar este comportamiento, por lo que se puede afirmar que esta técnica aunque simple y gruesa en su resolución permite evidenciar los aspectos básicos que se plantearon como objetivo inicial de este trabajo.

Sin embargo en la búsqueda de mejor resolución y "aislamiento" de la respuesta fue necesario recurrir a los electrodos de succión y procedimientos quirúrgicos que ya habían probado su efectividad. Sin llegar a las proezas técnicas de Hermann (1972) quién podía diseccionar el conectivo entre el quinto y

sexto ganglio hasta dejar unos cuantos axones para registrarlos en un gancho de acero, los haces o filetes conseguidos al quitar la vaina de los conectivos y separar los axones con una varilla de vidrio, permitían muy bien diseccionar el axón de los FRCs (uno en cada conectivo, si se tiene suficiente habilidad) y registrar la respuesta del sexto ganglio con electrodos de succión en los que se introduce uno por uno los haces o filetes conseguidos y lograr registros como los que se observan en la figura 6A y B con una excelente relación señal-ruido. Registros que además facilitaron la discriminación digital de los potenciales con el programa Pclamp. Los registros así obtenidos son de mayor amplitud y se puede discernir el patrón rítmico de la actividad espontánea en adaptación a la oscuridad, así como todos los componentes de la respuesta a la luz. Quedó establecido que esta técnica era apropiada para el registro de la actividad de los FRCs. Como se verá más adelante, algunas complicaciones en este tipo de registros llevaron a tomar la decisión de no continuar usando los electrodos de succión.

Para lograr aislar la respuesta de los FRCs registrada extracelularmente en los conectivos entre el sexto y el quinto ganglios, sin someter a la preparación a una cirugía traumática, en este estudio se pensó en usar electrodos metálicos (acero o tungsteno) que tuvieran una mayor impedancia que los de platino y que colocándolos cerca de la zona central de cada conectivo -por dónde corren los axones de los FRCs (Wiersma y Hughes, 1961), fuera posible tener buenos registros. Las figuras 7 y 8 son ejemplos de que el uso de estos electrodos es una alternativa viable para registrar los potenciales de los FRCs con un mínimo de

trauma al tejido. De nuevo, todas las características de los potenciales pueden observarse en los registros con estos electrodos. La relación señal ruido es buena y es posible obtener registros en los que los potenciales provenientes de los FRCs sean los de mayor tamaño para que se facilite su discriminación digital.

En resumen, el uso de las tres técnicas de registro permite observar la actividad espontánea y la provocada por la luz en los FRCs, pero los registros con electrodos de succión y los de tungsteno dan mejor definición de las unidades, sin embargo, los de succión pueden provocar cierto trauma al tejido que para los fines de este trabajo se consideró como una desventaja mayor quedando los de acero y tungsteno de alta impedancia como la mejor opción.

Método de perfusión, uso de amortiguadores y control de temperatura sobre la sobre vida de la preparación

Para aumentar la sobrevida de la preparación, no sólo fue necesaria la selección adecuada de un método de registro. Desde 1936, Van Harrevelid demostró que una preparación de sistema nervioso de acocil podía mantenerse más de 8 h si la solución salina con la que se bañaba contenía el doble de NaCl que una solución Ringer normal (hay que recordar que la solución diseñada por Ringer lleva 6 g de esa sal), pero si se incluía CaCl_2 , la sobrevida llegaba a ser de 24 h, lo que definió al calcio como el segundo ión más importante para la solución salina de crustáceos dulceacuícolas. Los resultados que se muestran en las figuras 3 y 7 no son más que una confirmación de este hallazgo ya que en efecto

se logró registrar la actividad de los FRCs por más de 24 h y en una ocasión casi hasta 48 h aunque hay que aclarar que esta sobrevida no es consistente y fue necesario realizar muchos registros para conseguir un tamaño de muestra aceptable. Sin embargo dado que el objetivo del trabajo estaba enfocado a registrar durante más de 24 h, se decidió buscar modificaciones de la solución Van Harreveld que permitieran eso. Claramente un primer factor que se altera después de 24 h es el pH por lo que se decidió intentar amortiguar la solución de diferentes maneras. El HEPES destacó como el amortiguador que mejores resultados dio para conseguir ese objetivo. Además, un sistema abierto de perfusión logra abatir los pequeños cambios de pH que puedan alterar la preparación manteniendo un flujo constante de solución amortiguada

Bajar la temperatura a 19 °C y mantenerla constante también favoreció la sobrevida de la preparación y de hecho los experimentos realizados en la última etapa, en la que se incluían estas mejoras y la técnica de registro con electrodos de metal de alta impedancia, ofrecieron resultados consistentes, por lo que fue más fácil conseguir un tamaño de muestra y una mayor reproducibilidad de los resultados (Fig 8).

Desgraciadamente, no se han alcanzado mayores tiempos de sobrevida lo que limita, en parte, la interpretación de los resultados de las figuras 4 y 10. Es claro que se requieren mayores mejoras

Cuando la preparación deja de responder queda una interrogante: no responde porque metabólicamente es incapaz (¿las células murieron?) O bien, el

fotopigmento se acabó. Está claro que se requieren otros métodos para indagar sobre la viabilidad metabólica de la preparación, pero una forma de solucionar la segunda pregunta es usar intensidades de luz bajas, lo suficientemente altas para encontrar una respuesta pero que no agoten rápidamente el pigmento. Esta estrategia se siguió después de estudiar la curva de frecuencia vs log de la intensidad de luz encontrándose gran similitud con las curvas reportadas por otros autores (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997) y se decidió usar 100 lx ya que era una intensidad baja que permitía distinguir bien la respuesta a la luz, y no muy alta como para permitir la degradación rápida del pigmento.

Por otro lado, la incorporación de glucosa al medio no parece haber sido crucial, pero no es posible aclarar este hecho a la luz de nuestros resultados por lo que es honesto proponer más experimentos enfocados a probar esa hipótesis.

El uso de antibióticos puede ser parte de la solución a este problema, sobre todo si es posible conseguir que la preparación dure más de 24 h.

Cambios temporales en la actividad espontánea y la provocada por la luz

Diversas observaciones de la conducta de los crustáceos hicieron suponer la presencia de sistemas temporales en ellos. Desde las observaciones empíricas de la presencia periódica de crustáceos en las zonas intermareales (Huxley, 1974) hasta las observaciones sistemáticas de los diferentes ritmos que se han descrito en ellos (ver revisiones de De Coursey, 1983, Aréchiga et al., 1993, Fanjul-Moles,

1998) permiten afirmar que estos animales poseen un complejo sistema de medición de tiempo. La gran diversidad de especies y por tanto de mecanismos fisiológicos que son responsables de los ritmos biológicos, hace necesaria la búsqueda de patrones generales que permitan elucidar las complejidades de estos sistemas

Ya lo ha señalado Pittendrigh (1960) al resaltar la importancia de entender la organización funcional de los sistemas circadianos como elemento base para lograr ese objetivo. Conocer los elementos que componen el sistema circadiano del acocil es una forma de abordar ese problema

A partir de los hallazgos de los ritmos en los acociles y en particular del ritmo de actividad locomotora, Page y Larimer (1972 y 1976) trataron de probar el papel del fotorreceptor caudal en la génesis o sincronización de ese ritmo. Sus hallazgos descartaron la función de esta estructura como responsable de la sincronización del pico endógeno del ritmo. Sin embargo, los resultados de los experimentos de Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio (1987) y de Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo (1987), indican una influencia de los FRCs sobre el ritmo de amplitud del ERG del acocil *Procambarus clarkii*. El efecto de desfaseamiento del ritmo, según los autores, depende de la hora de estimulación del sexto ganglio. Más recientemente, Bernal-Moreno et al. (1996) también aportan pruebas, aunque parciales, sobre la participación de esta estructura como un fotorreceptor circadiano

La mejor manera de demostrar si los FRCs poseen una oscilación

intrínseca en su función espontánea o sensorial es la de registrarlos aisladamente, de ahí la necesidad de contar con una preparación duradera en la que se puedan evaluar tales funciones

Tanto los resultados con los electrodos de acero como los obtenidos con los de tungsteno parecen indicar que ambos tipos de funciones -la espontánea y la provocada por la luz- tienen una variación con un periodo mayor a 24 h como se observa en las figuras 4 y 10. El pico de actividad se encuentra en la noche subjetiva de la preparación hacia las 2300 h con un descenso en el día subjetivo (hacia las 1000 h).

No es posible, sin embargo, desechar la posibilidad de que el descenso que se observa en la parte final de las gráficas señaladas se deba a un deterioro de la preparación, pero ya que los registros se iniciaron en el día sí es posible ver un incremento sustancial en la frecuencia de potenciales de acción de ambas actividades que contiene una variación de periodo amplio, lo que sugiere un cambio endógeno que probablemente esté regulado por un oscilador circadiano. La naturaleza rítmica de la actividad espontánea que sitúa a los FRCs como células marcapasos también incita a pensar en que estas células puedan tener un sistema que oscile con mayor periodo.

Es muy importante aclarar que para definir con mayor rigor la capacidad oscilatoria de los FRCs se necesitan preparaciones de mayor duración que permitan estudiar mejor tanto el posible ritmo circadiano que posean como sus características (capacidad de sincronización, compensación de temperatura, etc)

Relación de los FRCs con el sistema circadiano del acocil

Es muy claro el hecho que los FRCs modulan la actividad eléctrica aferente y que su respuesta a la luz parece ser una vía de información que a su vez modula la actividad locomotora, aspectos que han sido demostrados tanto por su actividad eléctrica ante cambios de luz (Kennedy, 1963; Hermann y Olsen 1968) como por las relaciones sinápticas que establecen sus axones en los ganglios ventrales (Kennedy, 1963, Wilkens y Larimer, 1972) así como por las observaciones conductuales (Welsh, 1934, Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997).

Es necesario saber entonces como se relaciona esta actividad rítmica de los FRCs con el sistema temporal del acocil

Ontogénicamente, los ritmos de actividad locomotora y el ritmo del electroretinograma se desarrollan de manera diferente (Fanjul-Moles et al., 1987, Fanjul-Moles et al., 1997), mientras que el ritmo de actividad locomotora se presenta tempranamente, el de amplitud del ERG lo hace más tardíamente. Pero ambos pasan de ser diurnos a nocturnos. Esto puede implicar que existan sistemas osciladores que aunque acoplados en el adulto no lo estén en los estadios juveniles. Probablemente se puede hablar de una acción diferencial en la modulación que hacen los FRCs sobre dichos sistemas lo que puede explicar el porque Page y Larimer (1972, 1976) no hallaron una clara influencia de estas células sobre el ritmo de actividad locomotora pero si modulan la actividad rítmica del ERG (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Inclán-Rubio y Fuentes-Pardo, 1987; Bernal-Moreno et al., 1996). Posiblemente se requieran experimentos del

papel del sexto ganglio a lo largo de la ontogenia

La influencia de los FRCs sobre la actividad locomotora depende de la intensidad de la luz, ya que se ha demostrado que dependiendo de la intensidad de la luz pueden modularla como un reflejo fototáctico negativo a intensidades altas o positivo a intensidades bajas (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1997). La oscilación circadiana en la respuesta a la luz de los FRCs representa una variación diaria en la información aferente que envían sobre la intensidad de la luz modula las salidas motoras en los diferentes ganglios, con lo que no sólo se consigue información de la intensidad de luz o de los cambios luz-oscuridad que proveen los fotorreceptores circadianos, sino que participaría dentro del sistema circadiano del animal como un oscilador que a su vez modula la información sensorial en relación con la hora del día, al tener una sensibilidad diferencial al estímulo luminoso que se mantiene en fase con la hora local y también con el resto del sistema circadiano del acocil en el ganglio cerebroide y los tallos oculares y que controlan el ritmo de actividad locomotora y del ERG.

REFERENCIAS

Aréchiga H., Fernández-Quiroz F., Fernández de Miguel, F. y Rodríguez-Sosa L. 1993. The circadian system of crustaceans. *Chronobiol. Int.* 10:1-19.

Aréchiga H., Fuentes-Pardo B. y Barrera-Mera B. 1973. Circadian rhythm of responsiveness in the visual system of the crayfish. En: *Neurobiology of invertebrates*. Salanki J. (ed.). Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, p. 403-426.

Aréchiga H. y Mena F. 1975. Circadian variations of hormonal content in the nervous system of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 52A:581-584.

Aréchiga H. y Rodríguez-Sosa L. 1997. Coupling of environmental and endogenous factors in the control of rhythmic behaviour in decapod crustaceans. *J. mar. Biol.* 77:17-29.

Aréchiga H. y Rodríguez-Sosa L. 1998. Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc. R. Soc. Lond.* 265:1819-1823.

Aréchiga H., Wiersma CAG. 1969. Circadian rhythm of activity in the crayfish visual units. *J. Neurobiol.* 1:71-85.

Aschoff J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. En: *Biological Clocks*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 11-28.

Aschoff J. 1981. Free running and entrained rhythms. En: *Handbook of behavioral Neurobiology*, V 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed.). Plenum Press, New York, pp. 81-93.

Barrera-Mera B. 1976. Effect of cerebroid ganglion lesions on ERG circadian rhythm of the crayfish. *Physiol. Behav.* 17:59-64.

Barrera-Mera B. 1978. Neural coupling between left and right electroretinographic circadian oscillations in the crayfish *P. bouvieri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 61A:427-432.

Barrera-Mera y Block G D. 1990. Protocerebral circadian pacemakers in crayfish: evidence for mutually coupled pacemakers. *Brain Res.* 522:241-245.

Bernal-Moreno J.A., Miranda-Anaya M. Y Fanjul-Moles M L. 1996. Phase shifting the ERG amplitude circadian rhythm of juvenile crayfish by caudal monochromatic illumination.

Block G.D, Geusz M, Khalsa S B, Michel S y Whitmore D. 1996. Circadian rhythm generation, expression and entrainment in a molluscan model system Prog brain res. 111:93-102.

Brown F A, Fingerman M, Sandeen M. And Webb H.M. 1953. Persistent diurnal and tidal rhythms of color change in the fiddler crab *Uca pugnax*. J. Exp Zool. 123, 29-60.

Bruno M S y Kennedy D. 1962 Spectral sensitivity of photoreceptor neurons in the sixth ganglion of the crayfish Comp. Biochem. Physiol 6:41-46.

Chapple W D. 1960. Light and the movement of crayfish, Masters thesis, Syracuse University

De Coursey P. 1983 Biological timing. En Biology of Crustacea V. 7: Behavior and Ecology Bliss D.E., Vernberg F J, Vernberg W B (eds.). Academic Press, New York, pp. 107-162.

Edwards D.H. 1984. Crayfish extraretinal photoreception. I: Behavioural and motoneuronal responses to abdominal illumination. J exp Biol. 109 291-306.

Enright J T. 1965 The search for rhythmicity in biological time-series J Theor Biol 8:426-468

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., Miranda-Anaya M. and Prieto-Sagredo, J.A. 1997 Circadian locomotor activity rhythm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*. Chronobiol Int. 13(1). 15-26

Fanjul-Moles M.L. Moreno-Sáenz E, Villalobos-Hiriart N Y Fuentes-Pardo-B 1987. ERG circadian rhythm in the course of ontogeny in crayfish Comp Biochem Physiol 88A:213-219

Fingerman M Y Lowe M. 1957. Twenty-four hour rhythm of distal pigment migration in the dwarf crayfish J Cell Comp. Physiol 50 371-379.

Fuentes-Pardo B e Inclán-Rubio V. 1987 Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. I: Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. Comp. Biochem. Physiol. 86A(3) 523-527

Halberg F. 1959. Physiological 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. En: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. R.B. Withrow (ed.) AAAS, Washington, pp. 803-878.

Hama K. 1961. A photoreceptor-like structure in the ventral nerve cord of the crayfish, *Cambarus virilis*. Anat. Rec. 140:329-331.

Hanna W.J.B., Horne J.A. y Renninger G.H. 1988. Circadian photoreceptor organs in *Limulus*. II. The telson. J. Comp. Physiol. 162A:133-140

Hermann H.T. 1972. Analysis of the properties of the crayfish caudal photoreceptor (PRU-photoreceptor unit). Exp. in Physiol. and Biochem. 5:155-192.

Hermann H.T. y Olsen R.E. 1968. Afferent stochastic modulation of crayfish caudal photoreceptor units. J. Gen. Physiol. 51:534-551.

Hermann H. y Stark L. 1963a. Prerequisites for a photoreceptor structure in the crayfish tail ganglion. Anat. Rec. 147:209-217

Hermann H. y Stark L. 1963b. Single Unit responses in a primitive photoreceptor organ. J. Neurophysiol. 26:215-228

Holdich D.M. 2002. Background and functional Morphology. En: Biology of Freshwater crayfish. Holdich D.M. (ed.). Blackwell Science, London, pp. 1-29

Horne J.A. y Renninger G.H. 1988. Circadian photoreceptor organs in *Limulus*. I. Ventral, median and lateral eyes. J. Comp. Physiol. 162A:127-132.

Huxley T.H. 1974. The Crayfish. The Mit Press, Cambridge, Mass. 371 pp (Edición facsimilar de la de 1880).

Inclán-Rubio V. y Fuentes-Pardo B. 1987. Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms in crayfish. II: Functional relationships between caudal and visual photoreceptors. Comp. Biochem. Physiol. 86A(3):529-536.

Jacklet J.W. 1969a. Electrophysiological organization of the eye of *Aplysia*. J. Gen. Physiol. 53:21-42.

Jacklet J.W. 1969b. Circadian rhythm of optic nerve impulses recorded in darkness from isolated eye of *Aplysia*. Science 164:562-564.

Johnson C.H. 2001. Circadian rhythms in unicellular organisms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, V12: Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.) Kluwer Academic, New York, pp. 61-77

Kennedy D. 1958a. Responses from the crayfish caudal photoreceptor. *Am. j. Ophthalmol.* 46:19-26.

Kennedy D. 1958b. Electrical activity of a "primitive" photoreceptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 74:329-336.

Kennedy D. 1963. Physiology of photoreceptor neurons in the abdominal nerve cord of the crayfish. *J. Gen. Physiol.* 46:551-572.

Kennedy D. 1971. Crayfish interneurons. *The Physiologist* 14:5-30.

Kennedy D. y Preston J.B. 1960. Activity patterns of interneurons in the caudal ganglion of the crayfish. *J. Gen. Physiol.* 43:655-670.

Larimer J.L. y Smith J.T.F. 1980. Circadian rhythm of retinal sensitivity in crayfish: Modulation by cerebral and optic ganglia. *J. Comp. Physiol.* 136:313-326.

Larimer J.L., Trevino L.T. y Ashby E.A. 1966. Comparison of spectral sensitivities of caudal photoreceptors of epigeal and cavernicolous crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 19:409-415.

Moore R.Y. y Leak R.K. 2001. Suprachiasmatic nucleus. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, V12. Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.). Kluwer Academic, New York, pp. 111-179.

Page T.L., Caldarola D.C. y Pittendrigh C.S. 1977. Mutual entrainment of bilaterally distributed circadian pacemakers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:1277-1281.

Page T.L. y Larimer J.L. 1972. Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. The role of the eyes and caudal photoreceptor. *J. comp. Physiol.* 78:107-120.

Page T.L. y Larimer J.L. 1975a. 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. 1975b. Neural control of circadian rhythmicity in the crayfish. II. The ERG amplitude rhythm. *J. Comp. Physiol.* 97:81-96.

Page T.L. y Larimer J.L. 1976. Extraretinal Photoreception in entrainment of crustacean circadian rhythms. *Photochem Photobiol.* 23:245-251.

Page T.L. 1981. Neural and endocrine control of circadian rhythmicity in invertebrates. En: *Handbook of behavioral Neurobiology*, V 4. Biological Rhythms. J. Aschoff (ed.). Plenum Press, New York, pp. 145-172.

Page T.L. Circadian system of invertebrates. 2001. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, V12: Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.). Kluwer Academic, New York, pp. 79-110

Parker G.H. 1897. The retina and the optic ganglia in decapods especially in *Astacus*. Mitt. Zool. Stn. Neapel. 12:1-73.

Pittendrigh C.L. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. En: Biological Clocks. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 159-184.

Pittendrigh C.L. 1981. General perspective. En: Handbook of behavioral Neurobiology, V.4: Biological Rhythms. J. Aschoff (ed.). Plenum Press, New York, pp. 57-80.

Preston J.B. y Kennedy D. 1960. Integrative synaptic mechanisms in the caudal ganglion of the crayfish. J. Gen. Physiol. 43:671-681

Prosser C.L. 1934a. Action Potentials in the nervous system of the crayfish. I: Spontaneous impulses. J. Cell comp. Physiol. 4:185-210.

Prosser C.L. 1934b. 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

Prosser C.L. 1986. The making of a comparative physiologist. Ann. Rev. Physiol. 48:1-6

Ralph M.R. y Vitaterna M.H. 2002. Mammalian clock genetics. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, V12: Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.). Kluwer Academic, New York, pp. 433-453.

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. 1982. Organization of the Central Nervous System. En: Biology of Crustacea, Vol. 3: Neurobiology: Structure and Function. Atwood H.L. y Sandeman D.C. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 1-61

Stretton A.D.W. y Kravitz E.A. 1968. Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. Science. 162:132-134.

Takahashi J. Hamm H. y Menaker M. 1980 Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. PNAS 77 2319-2322.

Turek F.W. y Takahashi J.S. 2001 Introduction to circadian rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, V12: Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.). Kluwer Academic, New York, pp 3-6.

Underwood H. 2001 Circadian Organization in nonmammalian Vertebrates. En: Handbook of behavioral Neurobiology, V12 Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.). Kluwer Academic, New York, pp. 111-140.

Van Harreveld A. 1936. A physiology solution for freshwater crustaceans. Proc Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 34 428-432

Vogt G. 2002 Functional anatomy. En: Biology of Freshwater crayfish. Holdich D.M. (ed.) Blackwell Science, London, pp 53-151

Welsh J. H. 1934 The caudal photoreceptor and responses of the crayfish to light. J. Cell Comp. Physiol. 4 379-388

Whitmore D., Block G.D. 1996 Cellular aspects of molluscan biochronometry. Semin Cell Dev. Biol. 7(6) 781-789.

Wiersma C.A.G. y Hughes G.M. 1961 On the functional anatomy of neuronal units in the abdominal cord of the crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard). J. comp. neurol. 116:209-228.

Wilkins L.A. 1988. The crayfish caudal photoreceptor: Advances and questions after the first half century. Comp Biochem Physiol 91C(1):61-68

Wilkins L.A. y Larimer J.L. 1972 The CNS photoreceptor of crayfish: Morphology and synaptic activity. J. Comp. Physiol. 80:389-407.

Wilkins L.A. y Larimer J.L. 1976 Photosensitivity in the sixth abdominal ganglion of decapod crustaceans: A comparative study. J. comp. Physiol. 106:69-75.

Young M.W. 2002. Circadian timekeepers in *Drosophila*. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, V12: Circadian clocks. J.S. Takahashi, F.W. Turek y R.Y. Moore (eds.) Kluwer Academic, New York, pp. 351-369.

Zimmermann N.H. y Menaker M. 1979. A pacemaker within the circadian system of the house sparrow. PNAS 76:999-1003.