



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Respuesta de los fotorreceptores retinulares del ojo del acocil *Procambarus clarkii* a la luz de diferente intensidad medida en cuatro fases del ciclo circadiano

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Biología

Presenta:

Diana Patricia Cabello Torres

Dirigido por:

Dra. Beatriz Fuentes Pardo,

Co- Director:

Dr. Fausto Arellano Carvajal

SINODALES

Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Presidente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carvajal
Secretario

Firma

Dra. Carolina Barriga Montoya
Vocal

Firma

Post. a Dra. Mónica Andrea López Hidalgo
Suplente

Firma

Dra. Guadalupe Malda Barrera
Directora de la Lic. en Biología

Firma



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo de 2011
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología

Respuesta de los fotorreceptores retinulares del ojo del acocil *Procambarus clarkii* a la luz de diferente intensidad medida en cuatro fases del ciclo circadiano

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Biología

Presenta:

Diana Patricia Cabello Torres

Dirigido por:

Dra. Beatriz Fuentes Pardo,

Co- Director:

Dr. Fausto Arellano Carvajal

SINODALES

Dra. Beatriz Fuentes Pardo
Presidente

Firma

Dr. Fausto Arellano Carvajal
Secretario

Firma

Dra. Carolina Barriga Montoya
Vocal

Firma

Post. a Dra. Mónica Andrea López Hidalgo
Suplente

Firma

Dra. Guadalupe Malda Barrera
Directora de la Lic. en Biología

Firma



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo de 2011
México

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue establecer la influencia que ejerce el cambio en la intensidad de la luz sobre la amplitud y duración del potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en cuatro momentos en que puede dividirse el ciclo circadiano. En esta tesis se estudió la adaptación a la luz de los fotorreceptores visuales de este acocil como función de la hora del día. Para ello se definió la sensibilidad de los fotorreceptores a la luz como el recíproco del número de fotones incidentes necesarios para producir una respuesta estándar y se evaluó la capacidad de respuesta midiendo dos parámetros extraídos de una ecuación del tipo $A(1 - e^{-t/\tau})$ a la cual pudo ajustarse su cinética. Se evaluó la capacidad de adaptación de la amplitud y duración del potencial de receptor tomando en cuenta la velocidad que le tomó alcanzar un valor estable y el valor estable que alcanzó. La hipótesis fue que la capacidad de adaptación y la sensibilidad de los fotorreceptores del ojo del acocil *P. clarkii* varía a lo largo del ciclo de 24 horas. Los cambios en la respuesta a la luz de los fotorreceptores visuales a lo largo del ciclo de 24 horas se deben exclusivamente a modificaciones en la excitabilidad de la célula fotorreceptora. La dependencia circadiana en la sensibilidad podemos atribuírsela a cambios en la conductancia de algún ión, dada la evidencia reciente sobre la dependencia circadiana en la conductancia iónica. La información generada en este trabajo permite mejorar el entendimiento sobre la organización circadiana del ritmo de sensibilidad a la luz del acocil, demostrando que el estado funcional del fotorreceptor retinular es función del ciclo circadiano.

Palabras clave: ciclo circadiano, potencial de receptor, *Procambarus clarkii*, fotorreceptores retinulares, sensibilidad, adaptación.

SUMMARY

The purpose of this study was to establish the influence of the change intensity of light on the amplitude and duration of receptor potential from reticular cells of crayfish *Procambarus clarkii* in four stages in which circadian cycle can be divided. We studied the light adaptation of visual photoreceptors of the crayfish as a function of time of day. Sensitivity of photoreceptors to light is defined as the reciprocal of the number of incident photons needed to produce a standard response and responsiveness evaluated by measuring two parameters extracted from an equation of type $A(1 - e^{-t/\tau})$, which can be well adjusted to its kinetics. We evaluated the adaptability of the amplitude and duration of receptor potential taking into account the speed it took to reach a stable value and stable value reached. The hypothesis was that the adaptability and sensitivity of the photoreceptors of the eye of crayfish *P. clarkii* varies throughout the cycle of 24 hours. Changes in response to light of visual photoreceptors along the 24-hour cycle are due solely to changes in the excitability of the photoreceptor cell. Circadian dependence in sensitivity can be attributed to changes in the conductance of an ion, given the recent evidence on circadian dependence on ionic conductance. The information generated in this work improves the understanding of circadian organization of the rhythm of light sensitivity of the crayfish, showing that the functional state of reticular photoreceptor is a function of the circadian cycle.

Keywords: circadian cycle, potential recipient, *Procambarus clarkii*, reticular photoreceptors, sensitivity, adaptation.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas por las que fue posible realizar esta tesis, en particular deseo agradecer a la Doctora Carolina Barriga Montoya por las extensas y atinadas correcciones, al Doctor Fausto Arellano Carvajal y Dra. Mónica López Hidalgo por las correcciones y aportaciones hechas a esta tesis. A mi familia y amigos familiares que fueron testigos de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	ii
Summary	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Lista de abreviaturas	xi
Introducción	1
Planteamiento del problema	2
i. Objetivo	2
ii. Hipótesis	2
1. Antecedentes	3
1.1. Los ritmos circadianos	3
1.2. La maquinaria circadiana en el acocil	6
1.3. Organización funcional del ojo compuesto del acocil	7
1.3.1. Sistema conductor	8
1.3.2. Sistema regulador	9
1.3.3. Sistema transductor	10
1.4. Ritmicidad circadiana en la retina del acocil: El ritmo de amplitud del electrorretinograma	13
1.5. Sensibilidad a la luz de los fotorreceptores retinulares y adaptación de la membrana	14
1.6. El potencial de receptor	14
1.6.1. Iones implicados en el Potencial de receptor	15
2. Materiales y métodos	16
2.1. Aprobación por el comité de ética	16
2.2. Material biológico	16
2.3. Soluciones	17
2.4. Registro eléctrico	17

2.5. El efecto del cambio en la intensidad de luz en el potencial de receptor	18
2.6. Análisis de datos	18
3. Resultados	22
3.1. El efecto de los cambios en la intensidad de luz en el potencial de receptor	22
3.1.1. Cambios en la duración del potencial de receptor	23
3.1.2. Cambios en la duración del potencial de receptor	24
3.2. Caracterización de la cinética de las respuestas en la amplitud y duración del PR como función del tiempo ante cambios en la intensidad del estímulo luminoso	26
3.2.1. Sensibilidad del fotorreceptor a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso	26
3.2.2. Adaptación del fotorreceptor a un estímulo luminoso de baja intensidad	27
3.2.3. Amplificación de la respuesta del fotorreceptor durante la fase de adaptación	29
3.2.4. Sensibilidad del fotorreceptor a un incremento en la intensidad del estímulo luminoso	30
4. Discusión	33
4.1. Respuesta eléctrica de los fotorreceptores retinulares durante el ciclo circadiano	33
4.2. Influencia del cambio de intensidad luminosa en el potencial de receptor	34
4.2.1. Sensibilidad del fotorreceptor	34
4.2.2. Capacidad de adaptación del fotorreceptor	35
4.3. Comentarios finales y perspectiva	37
5. Bibliografía	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Curva de respuesta de fase del ritmo del ERG debido a un estímulo luminoso del acocil <i>Procambarus bouvieri</i>	5
2.	Esquema de la estructura del ojo compuesto del acocil.	9
3.	Estructura tridimensional de la rodopsina y cambio conformacional del retinaldehído	11
4.	Electrorretinograma (ERG) del acocil <i>Procambarus clarkii</i> y Ritmo de la amplitud del ERG (derecha)	13
5.	Potencial de receptor de una célula retinular del acocil <i>Procambarus clarkii</i> ante un estímulo luminoso de 2700 lux y 10 μ s de duración.	19
6.	Curso temporal típico de las características (amplitud o duración) del PR cuando se cambia la intensidad del estímulo luminoso.	20
7.	Potencial de receptor de la célula retinular del acocil <i>Procambarus clarkii</i> ante estímulos luminosos de diferente intensidad en cuatro momentos del ciclo circadiano	22
8.	Efecto de los cambios en la intensidad luminosa en la amplitud del potencial de receptor como función del tiempo	24
9.	Efecto de los cambios en la intensidad luminosa en la duración del PR como función del tiempo	25
10.	Sensibilidad de la célula retinular de acocil <i>P. clarkii</i> a una disminución en la intensidad del estímulo	26
11.	Efectividad en la adaptación de la amplitud y la duración del potencial de receptor ante un estímulo de baja intensidad como función del tiempo circadiano	29
12.	Amplificación de la respuesta a lo largo del régimen con baja intensidad luminosa a lo largo del ciclo circadiano	30
13.	Sensibilidad de la célula retinular de acocil a lo largo del ciclo circadiano durante el primer estímulo luminoso de intensidad alta	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Sensibilidad (porcentaje de disminución) del valor de la respuesta del fotorreceptor retinular del acocil <i>Procambarus clarkii</i> a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso	27
2	Cinética de la curva de adaptación del fotorreceptor al estímulo de baja intensidad como función del tiempo circadiano	28

LISTA DE ABREVIATURAS

En orden de aparición

Abreviatura	Significado
PR	Potencial de Receptor
ERG	Electrorretinograma
HDP	Hormona Dispersora del Pigmento
PIP ₂	Difosfato fosfatidil inositol 4-5
IP ₃	1,4,5-Trifosfato
GMP _c	Guanocil monofosfato cíclico
DAG	Diacilglicerol
TRP	Receptor de potencial transitorio (transient receptor potential)
TRPL	Similar al receptor potencial transitorio (transient receptor potential like)
LO	Luz-Oscuridad
TC	Tiempo circadiano
VH	Solución van Harrevelt
PMR	Potencial de membrana en reposo
CC	Ciclo circadiano
ANOVA 1-vía	Análisis de varianza de 1 vía

INTRODUCCIÓN

A los fenómenos biológicos que se repiten a intervalos regulares se les llama ritmos biológicos. En la naturaleza se pueden encontrar ritmos cuyos periodos son del orden de milisegundos, como por ejemplo: la frecuencia delta de la actividad electroencefalográfica de los humanos, hasta los que son del orden de centenas de año como la floración del bambú *Phyllostachys bambusoides*, (Janzen, 1973). Dentro de todo el conjunto de fenómenos periódicos, destacan los que tienen un periodo cercano a un día, llamados circadianos. Es importante mencionar que éstos dependen de la presencia de un reloj biológico. En particular en el acocil, que es el modelo biológico que se utilizó en este trabajo.

En el acocil, está documentada una gran variedad de respuestas fisiológicas que varían con la hora del día. De este animal se ha estudiado el ritmo de actividad motora, el ritmo circadiano de la secreción de hormonas, y en particular el ritmo circadiano de la respuesta a la luz en la retina (Aréchiga y Rodríguez Sosa, 2002; Fuentes-Pardo y Hernández Falcón, 1993).

En esta tesis se estudia la respuesta de los fotorreceptores del ojo del acocil así como la capacidad de adaptación de la membrana fotorreceptora a la luz al variar la intensidad de la estimulación en el contexto de los ritmos circadianos.

En el capítulo I de Antecedentes se revisa la literatura correspondiente a los ritmos circadianos, la organización estructural del ojo compuesto del acocil, el ritmo del electrorretinograma y el potencial de receptor.

En el capítulo II, Materiales y Métodos, se describe la técnica empleada para medir la respuesta eléctrica a la luz de los fotorreceptores visuales del acocil y el método para medir el efecto del cambio en la intensidad de luz. También se especifica el análisis que se realizó con los datos experimentales obtenidos.

En el capítulo III, Resultados, se muestra el efecto del cambio en la intensidad de la luz en la respuesta eléctrica de los fotorreceptores retinulares durante el ciclo circadiano junto con los experimentos de control correspondientes,

En el capítulo IV, Discusión, se contrastan los resultados obtenidos a la luz de lo que se sabe al respecto de este tema, y se muestra la perspectiva que se tiene sobre este campo de estudio.

En el capítulo V, Bibliografía, se enlista la literatura citada a lo largo de los capítulos restantes.

Planteamiento del problema

i) Objetivo

El propósito principal de este trabajo es establecer la influencia que ejerce el cambio en la intensidad de la luz sobre la amplitud y duración del potencial de receptor de las células retinulares del acocil a lo largo del ciclo circadiano, dado los papeles determinantes que esta energía y estructuras desempeñan en la actividad circadiana de respuesta a la luz. Es por ello que se pretende:

Detectar la influencia que tiene el cambio de intensidad luminosa en las características del potencial de receptor de los fotorreceptores del ojo del acocil *Procambarus clarkii* durante cuatro momentos del ciclo circadiano.

ii) Hipótesis

La sensibilidad y la adaptación de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* varía durante el ciclo de 24 horas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Los ritmos circadianos

Un ritmo está definido como un cambio que se repite de manera periódica. Se cree que la mayoría de los organismos muestran esta ritmicidad en sus funciones para ajustarse al tiempo local. La transición crepuscular suele ser el principal dador de tiempo (Foster y Hankins, 2007). El programa temporal que adquirieron los organismos es lo bastante sofisticado como para permitirles la habilidad de anticiparse al ciclo luz-oscuridad aun en la ausencia de las señales luminosas. A este tipo de ritmos se les conoce como ritmos circadianos.

Entre todas las señales externas que se conocen, la luz es, con mucho, la señal sincronizadora más potente. No obstante, los ritmos circadianos pueden ser sincronizados por otras señales no fóticas como el alimento, la temperatura, la humedad, factores químicos, sociales, entre otros.

La ritmicidad se ha reconocido como un aspecto fundamental de la organización de los sistemas vivos (Aschoff, 1960) y puede que sea el fenómeno más conservado en los organismos (Koukkari y Sothorn, 2006). Un buen número de variables bioquímicas, fisiológicas y comportamentales manifiestan directa o indirectamente la existencia de un ritmo, lo que representa la posibilidad de alternar las fases o momentos de actividad máxima con las de actividad mínima, regulando así la energía usada. Los relojes biológicos proveen el horario endógeno para el desarrollo, el comportamiento, la fisiología y la bioquímica en los organismos; coordinan la ocurrencia de un evento biológico al momento en que acontece un hecho característico en el ambiente y aseguran que se acoplen de manera adecuada. La existencia de los ritmos posibilita que haya coincidencias espaciales y temporales entre los miembros de la misma especie (Fuentes Pardo y Moreno Sáenz, 1988).

Además de los ritmos circadianos, se reconocen los circamareales, circalunares y circanuales, dependiendo del periodo externo con el que estén relacionados.

En 1960 J. Aschoff, S. Pittendrigh y E. Bünning establecieron las características mínimas que debían cumplir los ritmos para poder considerarlos circadianos:

- Son endógenos. En condiciones ambientales constantes, muestran un periodo cercano pero diferente de 24 horas.
- Se comportan de acuerdo con la actualmente reconocida regla de Aschoff (1960). Cuando los organismos diurnos reciben mayor cantidad de luz, aumenta la frecuencia de su ritmo, la relación entre el tiempo de actividad y de reposo y el nivel de excitación. Bajo la misma condición, los organismos nocturnos reducen el valor de estos tres parámetros.
- Compensan los cambios de temperatura. La duración del periodo circadiano es independiente de la temperatura ambiental.
- Son innatos, están determinados genéticamente. Actualmente están bien identificados un buen número de genes directamente implicados en el funcionamiento de la maquinaria circadiana, llamados genes reloj (Sehgal y Price, 2004). La oscilación autosostenida del reloj es generada por una activación, transcripción y traducción de genes cuyos productos (protéicos) influyen su propia activación transcripcional (Yannielli y Harrington, 2004).
- Se pueden sincronizar, es decir, hay un ajuste del tiempo interno con una señal temporal externa.

Para modelar al sistema circadiano, se ha propuesto la existencia de tres componentes básicos:

1: Un sistema generador de oscilación con un periodo cercano a 24 horas. En ausencia de señales periódicas externas y con capacidad de imponer este ritmo a otras estructuras. Se usa el término marcapaso para aludir al oscilador o sistema de osciladores en el organismo que tienen la característica de generar y mantener

la oscilación aun cuando han sido extirpados del organismo. Además deben cumplir con la condición de que al ser reimplantados, la ritmicidad en todo el organismo debe restituirse en la fase del marcapaso.

2: Un sistema de sincronización por estímulos externos, compuesto por los receptores y vías sensoriales que transmiten al marcapaso circadiano la información temporal externa.

3: Un sistema efector, el marcapaso tiene la capacidad de imponer su ritmo a otras estructuras del organismo llamadas efectoras.

La capacidad que tienen los ritmos circadianos para sincronizarse es debida a cambios en la sensibilidad del marcapaso a lo largo del ciclo de 24 horas. En condiciones ambientales constantes, cuando se aplica un estímulo de duración corta, después de un tiempo transitorio se observa un cambio en la fase del ritmo, cuya magnitud y sentido dependen de la hora del día en que se evaluó. La gráfica de los adelantos y atrasos de la fase del ritmo debidos a la perturbación como función de la hora del día se conoce como la curva de respuesta de fase. En la Figura 1 se muestra la curva obtenida para la respuesta de los fotorreceptores retinulares del acocil ante estímulos luminosos (Fuentes Pardo y Ramos Carvajal, 1983).

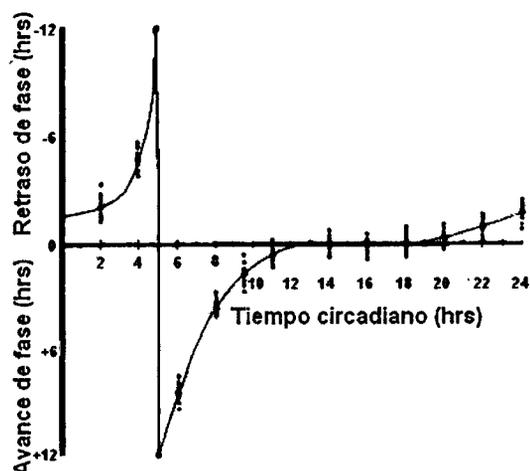


Figura 1: Curva de respuesta de fase del ritmo del ERG debido a un estímulo luminoso del acocil *Procambarus bouvieri*. Se grafica la amplitud contra la hora circadiana de estimulación. Los retrasos ocurren entre las 20 y las 5 horas tiempo circadiano (TC) y los avances entre las 5 y las 13 horas TC (Modificado de Fuentes-Pardo y Ramos-Carvajal. 1983).

En un principio se propuso que la red de sistemas periféricos oscilan debido al forzamiento de un oscilador autosostenido o marcapaso. En este caso el sistema se sincronizaría con las señales externas debido a las vías aferentes sensoriales hacia el generador central. La destrucción del marcapaso debería provocar la desaparición de los ritmos.

Sin embargo, actualmente se reconocen otros dos modelos. El primero considera una red de osciladores periféricos que tienen la capacidad de oscilar en ausencia de entradas periódicas (autosostenidos) y un oscilador central o marcapaso, que ajusta la fase de la red. La destrucción del oscilador central debería provocar la pérdida del ajuste de la fase entre diferentes osciladores periféricos. El segundo considera un sistema multioscilar no jerárquico. Las vías aferentes sensoriales sincronizan a los diferentes osciladores con las señales externas. La sincronización interna se mantiene a través de asas de retroalimentación positivas y negativas (Barriga Montoya, 2011)¹.

1.2 La maquinaria circadiana en el acocil

El acocil *Procambarus clarkii* es un crustáceo decápodo de agua dulce de la familia Cambaridae con hábitos nocturnos. Ha probado ser un excelente modelo biológico por ser capaz de sobrevivir por largo tiempo bajo condiciones no naturales necesarias en la experimentación. El control de la ritmicidad en el acocil ha sido materia de discusión desde hace varias décadas.

Como en otros sistemas biológicos, originalmente se asumió la existencia de un marcapasos central capaz de generar y mantener la señal circadiana (Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 2002).

¹ Barriga Montoya C. 2011. El efecto de la hormona dispersora del pigmento sobre el potencial de receptor de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de 24 horas. Tesis de Doctorado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 84 pp.

Para el ritmo circadiano de la sensibilidad a la luz del acocil, se han propuesto como estructuras responsables de la sincronización y la generación de las oscilaciones del ritmo de sensibilidad a la luz a los siguientes candidatos:

1. En la sincronización: Los fotorreceptores retinales y extrarretinales.
2. En la generación: Tres osciladores.
 - El ganglio supraesofágico (protocerebro en el ganglio cerebroide)
 - El sistema neurosecretor en los lóbulos ópticos (en particular el órgano X, glándula sinusal).
 - Las células retinulares

(Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1987; Aréchiga et al., 1993; Aréchiga y Rodríguez-Sosa, 1998; Fanjul-Moles y Prieto-Sagredo, 2003).

Con base en esta información, Aréchiga y Rodríguez-Sosa (2002) defendieron la idea de que el sistema circadiano podría resultar de la integración de un grupo de marcapasos independientes, pero que la extirpación de ninguno de ellos podría ser capaz de suprimir la ritmicidad junta, ya que ninguna estructura aislada ha mostrado poseer las características completas del marcapasos central circadiano en este animal.

1.3 Organización funcional del ojo compuesto del acocil

El acocil posee un ojo compuesto (Figura 2). Se trata de una estructura dividida en 2000 a 3000 unidades o facetas llamadas omatidios. Cada una de ellas es una unidad funcional (Shaw y Stowe, 1982).

El omatidio del acocil está compuesto por un cristalino, ocho células fotorreceptoras rbdoméricas y un rbdomo integrado por las extensiones o microvellosidades de las membranas de las células fotorreceptoras. En este organelo, que se especializa en absorber la luz, se encuentra la maquinaria necesaria para llevar a cabo el proceso de la fototransducción.

Como unidad funcional, el omatidio cumple tres papeles importantes: conducir la luz hasta las células retinulares fotorreceptoras, regular la intensidad de luz que debe llegar hasta los elementos fotosensibles por medio de los pigmentos accesorios y transducir la señal luminosa en señal eléctrica en el fotorreceptor.

1.3.1 Sistema conductor

La capa más externa del sistema conductor es la córnea. Es una porción transparente del cuerpo general de la cutícula que puede tener hasta 60 μm de grosor y forma el límite óptico con el medio que rodea al ojo (aire o agua). En seguida se encuentran los conos cristalinos acuosos. Estas estructuras conducen la luz permitiendo enfocarla hacia el interior en el rabadomo y colindan espacialmente con las células fotorreceptoras.

Una vez que la luz atraviesa las estructuras transparentes del omatidio (córnea y conos cristalinos), es absorbida en el rabadomo, cuyas microvellosidades se extienden desde la superficie de las células fotorreceptoras a 90° con respecto a la ruta de entrada de la luz, maximizando así la superficie absorbente.

Según la clasificación de Exner (1981), el ojo compuesto del acocil pertenece a tipo de ojos por superposición. En ellos la luz se recoge de varias facetas corneales repetidas (Shaw y Stowe, 1982), lo que le confiere una amplia apertura óptica cuando la luz es débil. Este arreglo es típico en animales activos en luz de penumbra o en oscuridad.

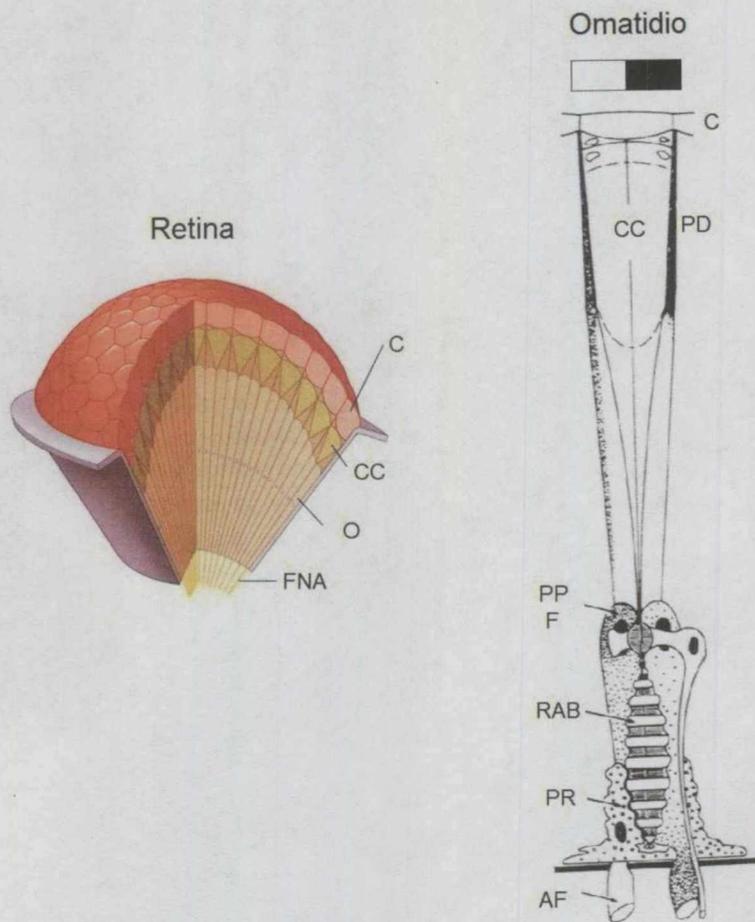


Figura 2. Esquema de la estructura del ojo compuesto del acocil. Retina y omatidio adaptado a la luz (izquierda) y a la oscuridad (derecha). C, córnea; CC, cono cristalino; O, omatidio; FNA, fibra neuronal aferente; F, célula fotorreceptora; RAB, rabdomo; AF axón de la célula fotorreceptora; PD, pigmento distal; PP, pigmento proximal; PR, pigmento reflector. (Modificado de Doyes y Schtle, 2007; Shaw y Stowe, 1982).

1.3.2 Sistema regulador

Los pigmentos accesorios distal y proximal regulan la cantidad de luz que debe llegar hasta el rabdomo. El pigmento distal se encuentra en las células pigmentarias distales y el proximal en las células fotorreceptoras (Figura 2). La luz es la señal que desencadena el movimiento de los pigmentos accesorios. El pigmento distal cambia de posición periódicamente a lo largo del omatidio como resultado de una respuesta hormonal (Welsh, 1930) debida a un reflejo neuroendocrino que actúa desde el principal complejo neuroendocrino formado por la glándula sinusal-órgano X, desde donde la HDP es liberada a la circulación

general, la cual juega un papel determinante en esta migración. Por otro lado, los pigmentos proximales localizados dentro de las células retinulares migran como respuesta directa a la luz (Aréchiga et al, 1974).

Existe un tercer grupo de pigmentos ubicados en la base del omatidio llamados reflectores, que no tienen movimiento y actúan como un espejo protegiendo al rabdomo contra el exceso de luz incidente (Fanjul-Moles *et al*, 1992).

Ante la presencia de luz, los pigmentos, proximales y distales se dispersan a lo largo del eje principal del omatidio, limitando la cantidad de luz que llega hasta los fotorreceptores; en oscuridad se retraen en posición polar hacia la base del omatidio, resultando en la extensión de los campos receptivos (Aréchiga, 1974). La primera configuración se conoce como estado de adaptación a la luz, y la segunda se conoce como estado de adaptación a la oscuridad (ver Figura 2).

La posición de los pigmentos accesorios muestra un ritmo circadiano y es capaz de cambiar la sensibilidad de la retina por hasta dos unidades logarítmicas (Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982).

1.3.3 Sistema transductor

La fototransducción es el proceso por el que la energía luminosa es convertida en una respuesta eléctrica por parte del fotorreceptor visual (Hardie y Raghu, 2001). La transducción se lleva a cabo a través de un proceso fotoquímico al exterior celular y un proceso metabotrópico que incluye una cascada de señalización al interior de la célula.

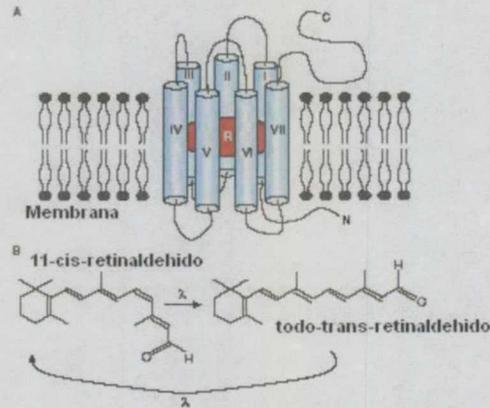


Figura 3. A. Estructura tridimensional de la rodopsina con siete dominios trans-membranales. B. Cambio conformacional del retinaldehído desde la posición *cis* a la posición *todo-trans* (Modificado de Foster y Hankins, 2007).

Los eventos fotoquímicos dependen de la existencia del fotorpigmento visual rodopsina (Figura 3a).

La rodopsina es ubicua en el mundo animal, (Greenspan, 2007) y consiste de dos componentes principales, una lipoproteína opsina y una molécula cromóforo de origen no proteico derivada del retinol (vitamina A). En el rabdómero del acocil se encuentra una alta concentración de rodopsina. Se han detectado dos tipos de cromóforos, retinal (A1) y 3-dehidroretinal (A2) (Hariyama *et al*, 1993).

Cuando una molécula de fotorpigmento visual absorbe una parte del espectro de luz visible, el estado de energía de la molécula aumenta, moviendo electrones asociados con uno o más enlaces dobles a orbitales de más energía (Randall, Burggren y French, 2001). La luz causa un cambio de conformación en la rodopsina; la absorción de la luz por el *11-cis retinal* unido a la rodopsina, hace que sea isomerizada a *todo-trans retinal* (Figura 3B) (Hargrave y McDowell, 1992, Hardie y Raghu, 2001). En este estado excitado la molécula se nombra metarodopsina. El proceso se llama blanqueo (Shaw y Stowe, 1982).

Cada pigmento visual tiene su propio espectro característico de sensibilidad a la luz (460 a 560 nm en 22 especies de Crustácea medidos por Goldsmith, 1972). Si la longitud de onda es superior a un cierto límite, no ocurre ningún

cambio en la molécula, si está por debajo de un umbral mínimo, la molécula se rompe (Ranganathan *et al*, 1991).

En los invertebrados la metarodopsina es termoestable. Inmediatamente después del blanqueo por luz, la metarodopsina puede ser directamente re-isomerizada de regreso a rodopsina por la absorción de luz de longitud de onda larga (≈ 560 nm) (Hardie y Raghu, 2001).

En los crustáceos y en particular en el acocil, la cascada de fenómenos biofísicos y bioquímicos que se desencadenan por la luz está lejos de conocerse íntegramente. Se ha identificado una rodopsina del tipo de las porfirropsinas que está acoplada a una proteína de membrana del tipo Gq (Terakita *et al*, 1998). Los eventos subsecuentes se desconocen, aunque es posible inferir lo que sucede a partir de lo que se ha descrito en otros invertebrados. Parece ser un denominador común que la luz activa la vía del segundo mensajero PIP_2 . A partir de aquí la vía de señalización depende de la especie.

En *Limulus*, por ejemplo, el IP_3 , libera calcio de almacenes intracelulares (Fein, 2003); el calcio activa la enzima guanilato ciclasa que produce GMPc; el GMPc se une a un canal permeable a sodio activado por nucleótido cíclico y esto produce una despolarización de la membrana celular. Se cree que el DAG, el otro producto de la reacción, activa otro tipo de conductancias de sodio y/o calcio que también participan en la despolarización de la membrana. En los fotorreceptores de *Drosophila*, el papel de IP_3 no parece ser relevante debido a que la mutante nula al gen del receptor a IP_3 presenta respuestas normales a la luz. Es un incremento en la concentración de DAG o en la hidrólisis de sus productos, lo que promueve la apertura de los canales catiónicos TRP y TRPL (Barriga-Montoya, 2011).

Con respecto a la repolarización de la membrana, la evidencia experimental sugiere que están implicadas corrientes de potasio sujetas a mecanismos

regulatorios (Miller y Glantz, 2000). Los resultados en *Drosophila*, *Limulus* y *Hermisenda* sugieren que la corriente de potasio disminuye cuando se incrementa el calcio intracelular (Lisman y Brown, 1972; Lisman *et al.*, 1982; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991).

1.4 Ritmicidad circadiana en la retina del acocil: El ritmo de amplitud del electroretinograma

El ERG es la diferencia de voltaje medido a través de la resistencia a la separación del líquido extracelular por un electrodo activo colocado en la retina y un electrodo de tierra colocado en cualquier otro sitio. Al ser un registro de campo, se recoge la respuesta eléctrica de la actividad sumada de varios fotorreceptores desde la superficie de la córnea de manera no invasiva. En el acocil, las únicas células a las que se les ha podido registrar actividad eléctrica en el ojo son los fotorreceptores (Naka y Kuwabara, 1959).

En el crustáceo *Procambarus clarkii* se observa que en oscuridad constante existe un ritmo (endógeno) en la amplitud del ERG (ver Figura 4). El periodo es de 22.5 horas (Fuentes-Pardo *et al.*, 1995), la amplitud es menor durante el día subjetivo (intervalo de reposo) que durante la noche subjetiva (intervalo de actividad) (Pittendrigh, 1965), como se espera en una especie de hábitos nocturnos (Fuentes-Pardo y Hernández-Falcón, 1993).

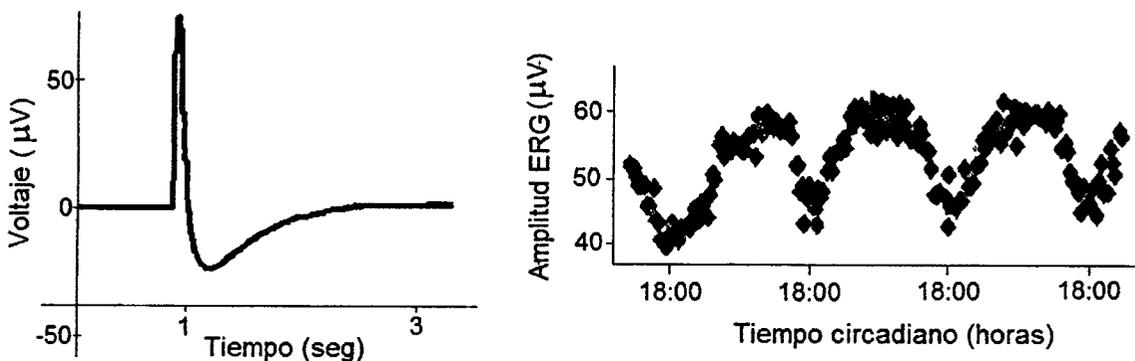


Figura 4: ERG del acocil *Procambarus clarkii* (izquierda). Ritmo de la amplitud del ERG (derecha).

Se han identificado dos componentes en la expresión de este ritmo, un ritmo de transducción de los fotorreceptores retinales y un ritmo de regulación de la entrada de luz por parte de los pigmentos accesorios (Aréchiga, 2003).

1.5 Sensibilidad a la luz de los fotorreceptores retinulares y adaptación de la membrana

La sensibilidad a la luz de los fotorreceptores retinulares está definida como el recíproco del número de fotones incidentes necesarios para producir una respuesta estándar, como por ejemplo una amplitud arbitraria del potencial de receptor (Hildebrand *et al*, 1974).

Cuando se habla de la adaptación del fotorreceptor, hay que aclarar si se trata de la “adaptación del pigmento” debido al blanqueamiento de los fotopigmentos y su regeneración en la oscuridad, o a la “adaptación de la membrana”, debida a los cambios en los gradientes iónicos, las permeabilidades, etcétera (Hildebrand *et al* 1974). En este trabajo se estudia la dependencia circadiana de la adaptación de la membrana de las células retinulares del acocil *Procambarus clarkii*.

En *Drosophila* se ha comprobado que los mecanismos de adaptación de la membrana fotorreceptora, son mediados por el ión Ca^{2+} y trabajan en una escala de tiempo de milisegundos a segundos (Ranganathan *et al*, 1991; Hardie y Raghu, 2001, Hardie, 2003.). Bajo estos límites los fotorreceptores pueden responder sobre un amplio intervalo de intensidades medioambientales.

1.6 El potencial de receptor

En los invertebrados, la respuesta eléctrica de los fotorreceptores visuales a la luz, el PR, es una despolarización graduada de la membrana fotorreceptora. La luz despolariza la membrana desde un potencial negativo a uno menos negativo (Shaw y Stowe, 1982). Esta respuesta muestra diferentes fases, una fase inicial

transitoria seguida de una fase sostenida que precede la repolarización (Hernández-Falcón *et al*, 1997) (ver Figura 5). La fase transitoria está asociada con la intensidad de la luz, y la duración de la fase sostenida con la duración del estímulo (Naka y Kuwabara, 1959).

1.6.1 Iones implicados en el potencial de receptor

La despolarización del PR de las células retinulares de los invertebrados, es conducida por un influjo de cationes (Millecchia y Mauro, 1969), probablemente calcio y sodio (Hernández-Falcón y Fuentes Pardo, 1991). La repolarización de la célula fotorreceptora es debida probablemente a la apertura de canales de potasio dependientes de voltaje (Lisman y Brown, 1972; Hernández-Falcón y Fuentes-Pardo, 1991; Miller y Glantz, 2000).

El calcio intracelular modula la duración del PR (Lisman y Brown, 1975). Una concentración alta de Ca^{2+} intracelular incrementa la duración del PR, mientras que una concentración baja, produce respuestas más duraderas. La luz induce un aumento del ión Ca^{2+} intracelular (Lisman y Brown, 1975; Bolsover, 1982). Se ha sugerido que el Ca^{2+} intracelular regula la permeabilidad del K^+ . En *Drosophila*, *Balanus* y *Hermisenda*, la conductancia del ión K^+ aumenta con el aumento intracelular de Ca^{2+} (Miller y Glantz, 2000), facilitando así la terminación de la respuesta.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aprobación por el comité de ética

Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y aprobados por la Comisión de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (26 de noviembre de 2008, proyecto IN200208).

2.2 Material biológico

Se emplearon acociles adultos de 6 a 8 cm de longitud de la especie *Procambarus clarkii* en etapa de intermuda, de sexo indistinto, originarios de los ríos San Pedro y Conchos en Ciudad Delicias, Chihuahua, México. En el laboratorio, se mantuvieron en acuarios oxigenados a 15 °C y fueron alimentados una vez por semana con alimento comercial Camaronina® (Purina AgribRANDS México).

Por lo menos un mes previo a los experimentos, los acociles se mantuvieron bajo fotoperiodos en los que se alternaban 12 horas de luz con 12 horas de oscuridad (LO 12:12). Para verificar el tiempo circadiano de la población de acociles, se registró el ritmo del ERG de una muestra aleatoria.

Definimos las 0 horas TC como el punto del ciclo en el que el nivel de actividad alcanza el 50% de su amplitud. Debido a que el acocil *Procambarus clarkii* es un animal nocturno, las 0 horas coinciden con el inicio de su noche subjetiva. Las 24 horas TC ocurren un ciclo después.

2.3 Soluciones

Se utilizó solución salina van Harreverd modificada (VH) (van Harreverd, 1936), cuya composición en mM fue de: NaCl 205; KCl 5.4; MgSO₄ 1.23, CaCl₂ 13.6; Buffer Hepes 5; y pH de 7.2 a 7.4.

2.4 Registro eléctrico

Una vez que el acocil se anestesió por baja temperatura:

1. Se extirpó el tallo ocular desde la base.
2. Se abrió una ventana de aproximadamente 3mm² sobre la capa de quitina del ojo en la córnea dorsal.
3. El tallo ocular se sumergió en una cámara de perfusión continua de 2 ml de capacidad y una tasa de flujo de 0.5 ml/seg adentro de una jaula Faraday llenada con solución salina VH modificada. A lo largo del experimento, la preparación se mantuvo en oscuridad y a 10 °C.
4. Con un micromanipulador se introdujo por la ventana hecha en la capa de quitina del ojo un microelectrodo de borosilicato. Estos fueron pulidos hasta obtener una resistencia de 15 a 20 MΩ una vez que fueron llenados con KCl 2.7M. El criterio para considerar que el microelectrodo penetró la membrana de una célula retinular fue una baja súbita en el voltaje de alrededor de -30 mV correspondiente al PMR, y la presencia de una despolarización ante un estímulo luminoso aplicado paralelamente al eje longitudinal del tallo ocular.
5. La luz de prueba provino de un fotoestimulador Grass PS33 que emitió pulsos de luz blanca de 10 μs e intensidad variable.
6. El potencial de receptor fue registrado usando un amplificador Axoclamp 2A, (Axon Instruments) en la configuración *Bridge*. La respuesta eléctrica fue visualizada en la pantalla de un osciloscopio (Tektroniks TDS 460) y digitalizadas usando la interfaz Digidata 1200 Interface (Axon Instruments) a una velocidad de 100 μs/punto.

2.5 El efecto del cambio en la intensidad de luz en el potencial de receptor

Una vez que no cambió el valor del PMR ni la forma del PR. Se registraron 30 PR provocados por la aplicación de la luz de prueba cada dos minutos.

Durante los primeros 20 minutos, la intensidad de luz con la que se estimuló el tallo ocular fue de 2700 lux (medido con un fotómetro Tektronix J16). En los siguientes 20 minutos la intensidad de los estímulos fue de 800 lux. A partir del minuto 40, para ver la posible reversibilidad del fenómeno, se aplicaron estímulos luminosos de 2700 lux.

El protocolo experimental se llevó a cabo en 4 momentos distintos del ciclo circadiano: 0, 6, 12 y 18 horas TC.

Para llevar a cabo el control del experimento se siguieron los pasos mencionados, excepto que la intensidad de los estímulos fue de 2700 lux durante todo el experimento.

2.6 Análisis de datos

De cada PR se midieron dos parámetros:

1. La amplitud fue evaluada como la diferencia de potencial entre el PMR y el máximo valor de despolarización (Figura 5); la duración evaluada como el tiempo transcurrido desde el inicio de la respuesta hasta que ésta disminuyó al 20% de su valor máximo.

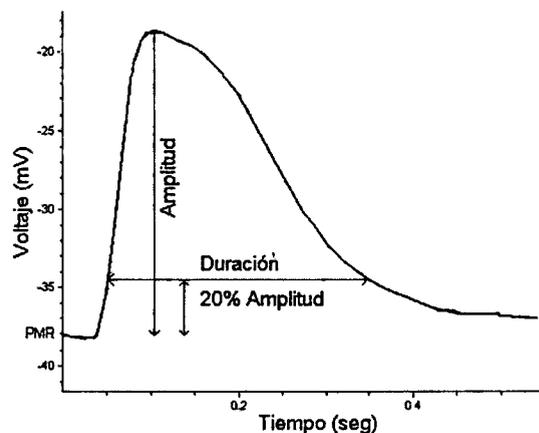


Figura 5. Potencial de receptor de una célula retinular del acocil *Procambarus clarkii* ante un estímulo luminoso de 2700 lux y 10 μ s de duración.

Para poder comparar el efecto de la intensidad de la luz en las características del PR en diferentes momentos del ciclo circadiano, los valores de amplitud y duración del PR fueron normalizados con respecto a la amplitud y duración promedio de los primeros 10 estímulos (evocados con un estímulo de 2700 lux).

Como una medida de la sensibilidad del sistema se considera el porcentaje de cambio de las características del PR cuando hay una modificación en la intensidad del estímulo.

Para cuantificar la sensibilidad se distinguieron dos casos:

1. La sensibilidad del sistema a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso (que ocurre en el minuto 22 del experimento)
2. La sensibilidad del sistema a un incremento en la intensidad del estímulo luminoso (que ocurre en el minuto 42 del experimento).

La amplificación de la respuesta durante el régimen de estímulos de baja intensidad (800 lux) se estimó restando la sensibilidad en el último estímulo con intensidad baja (minuto 40) menos la sensibilidad en el primer estímulo de baja intensidad (minuto 22).

Durante la fase en la que se aplica el estímulo de baja intensidad (800 lux) se observa una adaptación de la respuesta. Los cursos temporales de la amplitud y duración del PR mostraron una cinética. Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación $A(1 - e^{-t/\tau})$ utilizando el método de mínimos cuadrados con el programa Origin Pro 7.0 Scientific Graphic and Analysis Software. El parámetro A, correspondiente al valor de la asíntota, se consideró como una medida de la capacidad de adaptación del fotorreceptor. La constante de tiempo τ fue considerado como una medida de la velocidad de adaptación del fotorreceptor, ya que representa el tiempo en el que el valor de la respuesta alcanza el $\approx 63.2\%$ de su valor ($1/e$). Finalmente se midieron los cambios máximos en las características del PR, amplitud y duración, durante la adaptación de la respuesta. Los denominamos como amplificación o reducción de la respuesta, dependiendo el caso, durante la fase de adaptación. Para mayor claridad ver Figura 6.

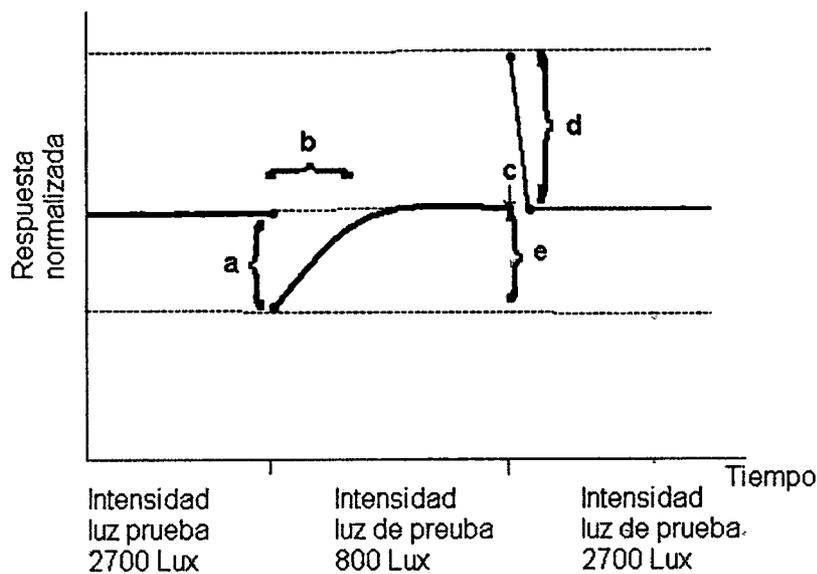


Figura 6. Curso temporal típico de las características (amplitud o duración) del PR cuando se cambia la intensidad del estímulo luminoso. Se indican los parámetros que se van a medir: a, sensibilidad del sistema a una disminución en la intensidad del estímulo; b, velocidad de adaptación del fotorreceptor; c, capacidad de adaptación del fotorreceptor; d, sensibilidad del sistema a un incremento en la intensidad del estímulo; e, amplificación de la respuesta durante la fase de adaptación.

En todos los casos los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar del número indicado de experimentos. Para probar si dos o

más poblaciones fueron significativamente diferentes se usó la prueba de ANOVA-1 vía. El nivel de significancia utilizado fue de 0.05. Debido a que las pruebas estadísticas asumen que los conjuntos de datos provienen de poblaciones que siguen una distribución normal con varianza constante, se aplicaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y la de constancia en la varianza de Levene. Todos los datos pasaron las pruebas de normalidad y de varianza constante.

Los cálculos estadísticos fueron hechos con los programas SigmaPlot 10.0 y OriginPro 7.0 Scientific Graphing and Analysis software.

3. RESULTADOS

3.1 El efecto de los cambios en la intensidad de luz en el potencial de receptor

En la Figura 7 se muestran las respuestas representativas de los fotorreceptores retinulares del acocil *Procambarus clarkii* a estímulos luminosos de diferente intensidad en cuatro momentos del ciclo circadiano (0, 6, 12, y 18 horas TC). En rojo se observa la respuesta que se obtiene durante los primeros 20 minutos del experimento (2700 lux); en negro se muestra la respuesta cuando se disminuye la intensidad del estímulo de 2700 a 800 lux (minuto 22 del experimento) y en verde cuando se incrementa la intensidad del estímulo de 800 a 2700 lux (minuto 42 del experimento). Se observa que los cambios en las características del PR debidos a los cambios en la intensidad de luz, con respecto al control, amplitud y duración, dependen de la fase del CC en la que se realizaron los experimentos.

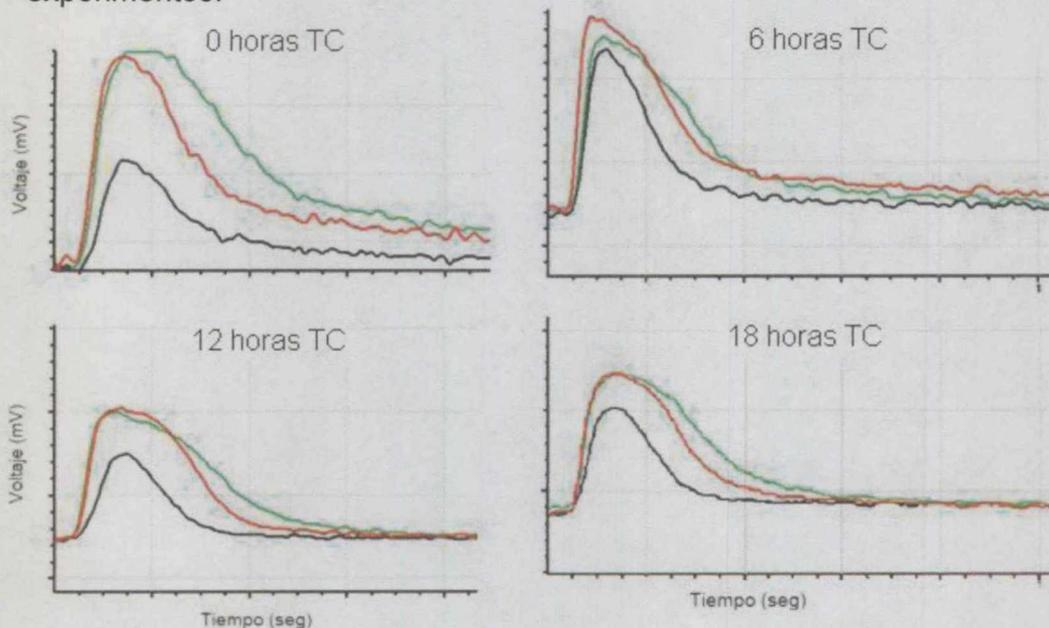


Figura 7: Potencial de receptor de la célula retinular del acocil *Procambarus clarkii* ante estímulos luminosos de diferente intensidad en cuatro momentos del ciclo circadiano. En rojo, respuesta obtenida con un estímulo de 2700 lux; en negro, respuesta obtenida cuando la intensidad del estímulo disminuye de 2700 a 800 lux y en verde cuando la intensidad del estímulo incrementa de 800 a 2700 lux.

3.1.1 Cambios en la amplitud del potencial de receptor

La población de experimentos control no tuvo diferencias significativas (ANOVA-1 vía con un nivel de significancia de 0.05) en ninguna hora TC como función del curso temporal ni como función de la hora del día (en los 60 minutos de registro con la misma intensidad de luz; ver sección 2.5). Al comparar contra la población experimental, durante los estímulos 11 al 20 (minuto 22 al 40), las diferencias fueron significativas en todas las horas evaluadas, tanto en amplitud como en la duración.

En la Figura 8 se muestra el efecto de los cambios en la intensidad del estímulo luminoso en la amplitud del PR a las 0, 6, 12 y 18 horas TC, (n=5).

En el minuto 22, momento en el que se disminuye la intensidad luminosa, la amplitud del PR es mínima. Después se observa cómo van incrementando los valores de amplitud hasta alcanzar un valor estable. Tanto el porcentaje de disminución, que se nombró sensibilidad del fotorreceptor (ver sección 2.6 y Figura 6), como la cinética correspondiente a la fase de adaptación (ver sección 2.6 y Figura 6), dependen del momento circadiano en que se realiza el experimento.

En la sección 3.2 se describirá de manera detallada la cinética de las respuestas. Se cuantificarán los parámetros que la describen y se harán explícitas las diferencias como función de la fase del ciclo circadiano.

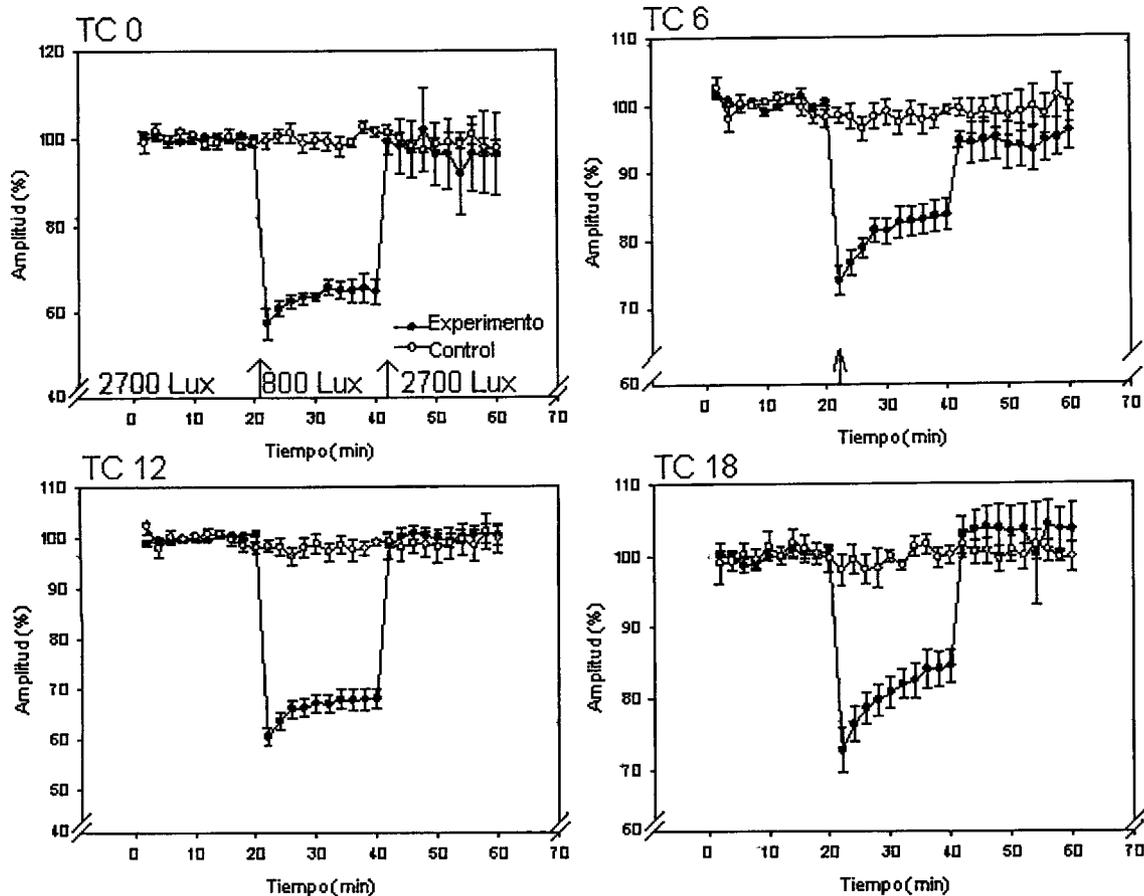


Figura 8: Efecto de los cambios en la intensidad luminosa en la amplitud del PR como función del tiempo a las 0, 6, 12 y 18 horas TC (n=5). Las flechas indican los momentos del cambio de la intensidad del estímulo luminoso. Para cada hora se muestra el registro experimental (círculos llenos) y el control (círculos vacíos).

En el minuto 42 se vuelve a cambiar la intensidad de luz (de 800 a 2700 lux). Llama la atención que a diferencia del primer cambio en la intensidad de luz, no hay un cambio gradual en la forma de la respuesta.

3.1.2 Cambios en la duración del potencial de receptor

En la figura 9 se muestra el efecto de los cambios en la intensidad del estímulo luminoso en la duración del PR a las 0, 6, 12 y 18 horas TC (n=5). En el minuto 22, cuando se disminuye la intensidad del estímulo luminoso, la duración del PR se reduce drásticamente. Después se observa que este valor se va incrementando de manera gradual. Tanto la máxima disminución (sensibilidad)

como la cinética de adaptación (ver sección 2.6 y figura 6) dependen de la fase del ciclo circadiano. En la sección 3.2 se describe de manera detallada la cinética de las respuestas como función del ciclo circadiano.

En el minuto 42, cuando se incrementa la intensidad del estímulo luminoso, la duración del PR muestra un valor por encima del 100%. Sin embargo en el minuto 44, en los experimentos realizados a las 0, 6, y 12 horas TC se observa que la duración se recupera al 100%. A las 18 horas TC, la duración del PR se mantiene por arriba del 100%. El efecto es irreversible, al menos durante el tiempo de duración del experimento.

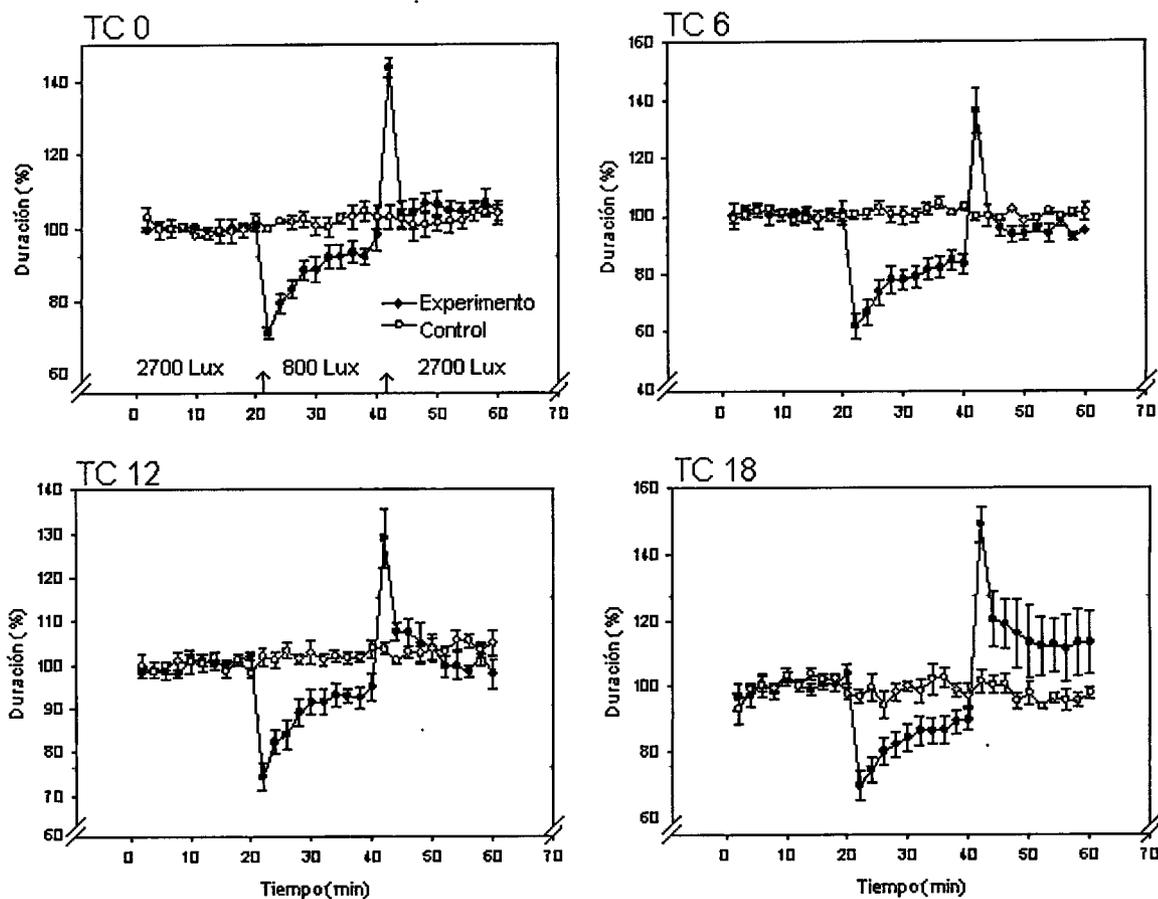


Figura 9: Efecto de los cambios en la intensidad luminosa en la duración del PR como función del tiempo a las 0, 6, 12 y 18 horas TC ($n=5$). Las flechas indican los momentos del cambio de la intensidad del estímulo luminoso. Para cada hora se muestra el registro experimental (círculos llenos) y el control (círculos vacíos).

3.2 Caracterización de la cinética de las respuestas en la amplitud y duración del PR como función del tiempo ante cambios en la intensidad del estímulo luminoso

3.2.1 Sensibilidad del fotorreceptor a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso

En la figura 10 se grafican, como función del tiempo circadiano, el porcentaje de disminución de la amplitud y la duración del PR debido a una reducción en la intensidad del estímulo luminoso, es decir, la sensibilidad del fotorreceptor a una disminución en la intensidad del estímulo.

Se puede notar que los cambios en la amplitud y la duración dependen de la hora circadiana.

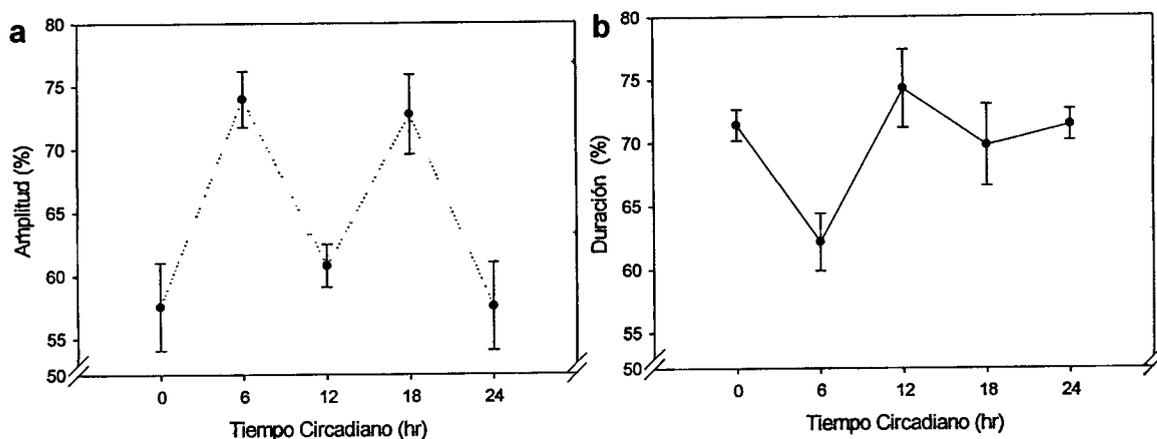


Figura 10: Sensibilidad de la célula retinular de acocil *P. clarkii* a una disminución en la intensidad del estímulo (de 2700 a 800 lux) en 4 fases del ciclo circadiano (n= 5). a) Amplitud del PR. b) Duración de PR.

La curva de sensibilidad para la amplitud, como función del TC (Figura 10a), tiene un comportamiento bimodal. A las 6 y 18 horas TC la célula es más sensible. A las 0 y 12 horas TC la célula es menos sensible. Nótese que entre este par de horas circadianas (6 y 18 y 0 y 12 horas TC) hay una diferencia significativa en el valor de la amplitud (ANOVA -1 vía con nivel de significancia de 0.05).

En el primer caso, ante la reducción del estímulo luminoso, la amplitud disminuye $42.8\% \pm 1.8$, mientras que en el segundo, disminuye $26.6\% \pm 3.3$.

TC	Amplitud	Duración
0	$42.8\% \pm 1.8$	$28.6\% \pm 2.0$
6	$26.6\% \pm 3.3$	$37.8\% \pm 1.6$
12	$39.2\% \pm 3.2$	$25.7\% \pm 3.1$
18	$30.9\% \pm 3.1$	$30.2\% \pm 2.8$

Tabla 1: Sensibilidad (porcentaje de disminución) del valor de la respuesta del fotorreceptor retinular del acócil *Procambarus clarkii* a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso (de 2700 a 800 lux) en cuatro fases del ciclo circadiano (n=5).

La curva de sensibilidad para la duración, como función del TC (Figura 10b) tiene un pico a las 6 horas TC. En ese momento del ciclo circadiano, la sensibilidad es mínima pues ante una disminución en la intensidad del estímulo, el valor de la duración cambió drásticamente ($37.8\% \pm 1.6$) con respecto al resto del ciclo, a saber, a las 0, 12 y 18 horas TC, en donde la sensibilidad es máxima pues sólo se observa un cambio de 26 al 30% (ver valores en Tabla 1). Se hace notar que entre estas tres horas circadianas no hay una diferencia significativa en el valor de la duración (ANOVA 1 - vía con nivel de significancia de 0.05).

3.2.2 Adaptación del fotorreceptor a un estímulo luminoso de baja intensidad

Cuando la intensidad del estímulo luminoso se reduce de 2700 a 800 lux, la amplitud y la duración del PR disminuyen y durante los siguientes 18 minutos incrementan hasta alcanzar un valor estable (ver figuras 8 y 9).

Esta cinética pudo ajustarse a una curva de crecimiento exponencial de tipo $A(1-e^{-t/\tau})$. A corresponde a la capacidad de adaptación del sistema ante el estímulo de baja intensidad (800 lux); la constante de tiempo τ corresponde a la constante de recuperación al estímulo de baja intensidad (ver sección 2.6 y figura

6). En la Tabla 2 se muestran los valores de la capacidad de adaptación y la constante de recuperación al estímulo de baja intensidad de la amplitud y duración del PR para los diferentes momentos del ciclo circadiano en el que se realizaron los experimentos.

TC	AMPLITUD		DURACIÓN	
	Asíntota (%)	τ (min)	Asíntota (%)	τ (min)
0	67.7 \pm 3	5.3 \pm 0.4	111.7 \pm 4.4	9.6 \pm 1
6	86.5 \pm 4.7	5.4 \pm 0.4	100.4 \pm 3.3	10.4 \pm 1.4
12	70.2 \pm 4	5.0 \pm 0.1	104 \pm 2.7	7.8 \pm 0.8
18	88.1 \pm 2.4	6.0 \pm 0.3	100.5 \pm 3.4	8.6 \pm 1

Tabla 2: Cinética de la curva de adaptación del fotorreceptor al estímulo de baja intensidad como función del tiempo circadiano para la amplitud y la duración del PR (n=5). Se especifican la asíntota de la curva y la constante de tiempo de recuperación, τ .

En la figura 11 se grafican los valores de la capacidad de adaptación y la constante de recuperación del fotorreceptor al estímulo de baja intensidad (800 lux) para la amplitud y la duración del PR. Puede notarse que estos valores varían de acuerdo con la fase del CC.

La capacidad de adaptación ante un estímulo luminoso de baja intensidad de la amplitud del PR se comporta en forma bimodal, siendo significativamente mayor a las 6 y 18 horas TC que a las 0 y 12 horas TC (ANOVA-1vía; nivel de significancia 0.05). Sin embargo para la constante de recuperación τ de la amplitud no se observan diferencias significativas entre los valores encontrados en las diferentes horas circadianas (ANOVA 1-vía, nivel de significancia 0.05) (ver tabla 2 y Figura 11).

Con respecto a la duración se observa que a las 0 horas TC la capacidad de adaptación es mayor y es significativamente diferente que al resto de las horas circadianas (ANOVA-1 vía, nivel de significancia 0.05) y que, al igual que en el caso de la amplitud, no hay diferencias significativas en los valores de la constante de recuperación.

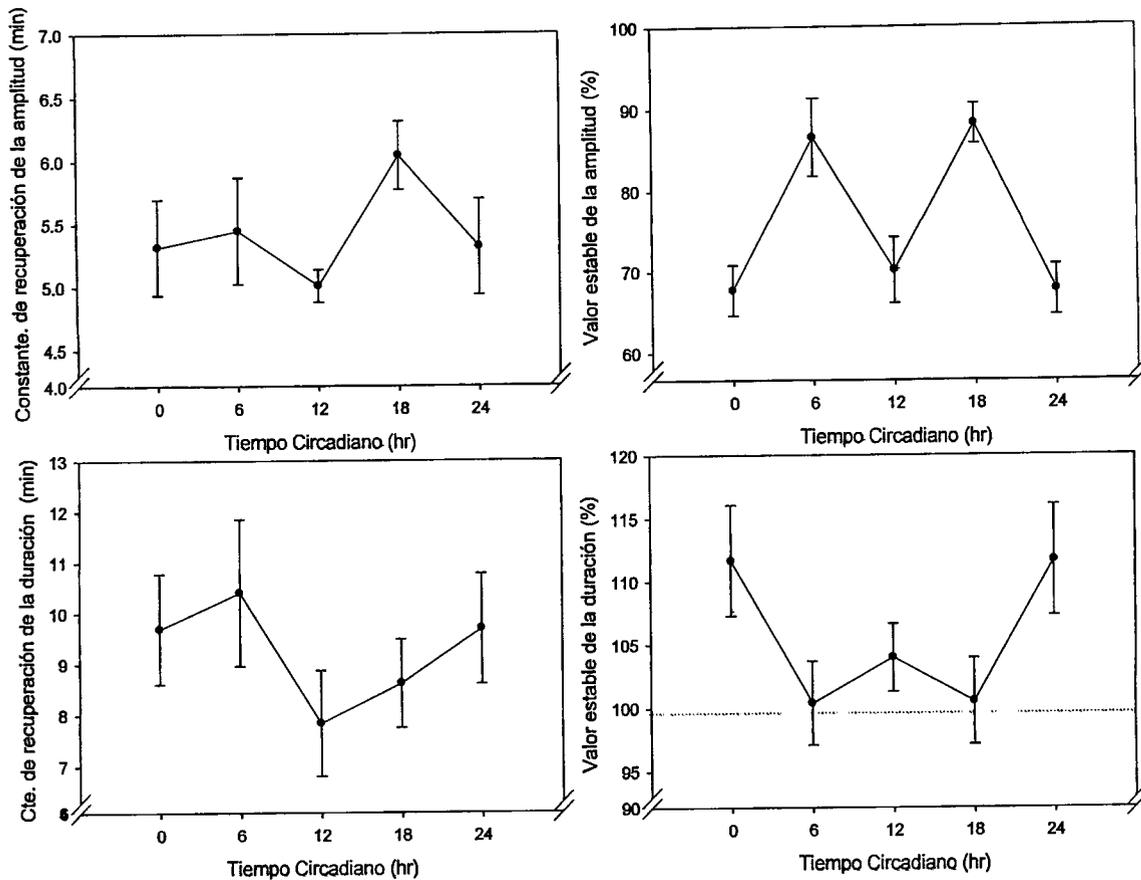


Figura 11. Efectividad en la adaptación de la amplitud y la duración del PR ante un estímulo de baja intensidad como función del tiempo circadiano. Se grafica la capacidad de adaptación (A) y la constante de recuperación τ , (n= 5).

3.2.3 Amplificación de la respuesta del fotorreceptor durante la fase de adaptación

Durante el régimen con estímulos luminosos de baja intensidad, tanto en la amplitud como en la duración, la respuesta del PR se amplifica progresivamente. La diferencia de amplificación (ver sección 2.6 y figura 6) no varía significativamente como función de la hora del día. No obstante el grado de

amplificación de la respuesta en la amplitud es significativamente diferente (ANOVA -1 vía con nivel de significancia de 0.05) con respecto al grado de amplificación de la duración (Figura 12).

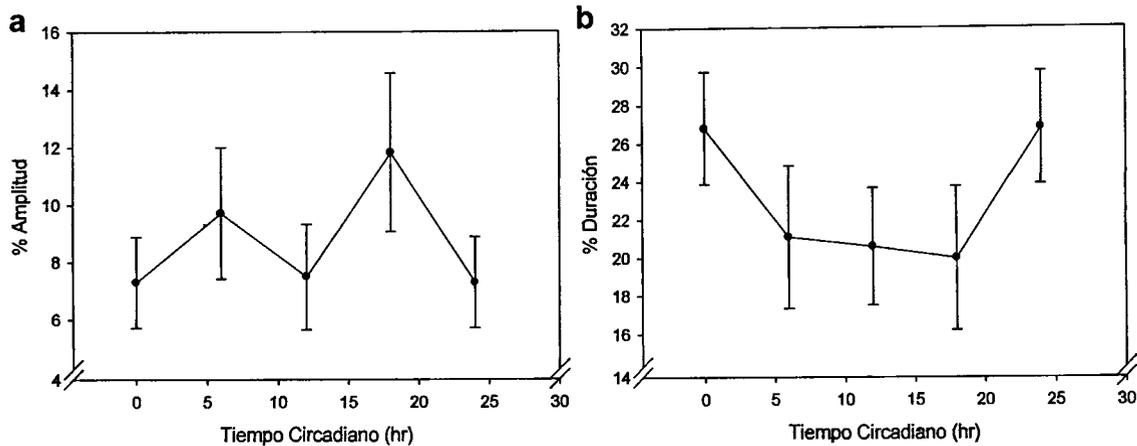


Figura 12. Amplificación de la respuesta a lo largo del régimen con baja intensidad luminosa a lo largo del ciclo circadiano en las características evaluadas del potencial de receptor a) Amplitud b) Duración

3.2.4 Sensibilidad del fotorreceptor a un incremento en la intensidad del estímulo luminoso

Con el fin de ver la posible recuperación de la respuesta del PR, a partir del minuto 42 y hasta el término del experimento se aplicó nuevamente el estímulo luminoso de intensidad alta (2700 lux), (de mínimo a máximo; ver sección 2.3 de materiales y métodos y figuras 8 y 9).

En la figura 13a se grafica el curso de tiempo de la amplitud inicial del PR del fotorreceptor del ojo del acocil al volver a aplicar la intensidad inicial, medida con respecto al 100% de la respuesta. La sensibilidad (porcentaje de cambio) de la célula retinular ante el primer estímulo con intensidad luminosa alta (minuto 42), cambia como función del ciclo circadiano.

La sensibilidad de la célula fotorreceptora es significativamente diferente en la hora 6 TC ($94.6\% \pm 2.7$) con respecto del valor control que retorna a un valor cercano pero inferior al 100%. Para esta hora y considerando el intervalo de

tiempo evaluado, la influencia que tiene el regresar al estímulo de intensidad alta sobre la amplitud del PR es irreversible.

Durante las horas 0, 12 y 18 TC (minuto 42), la sensibilidad recupera la amplitud original. En la hora 6 TC (ver Figura 8 y 13) la sensibilidad en la amplitud se recupera por debajo del valor de control ($94\% \pm 0.78$). Es notable que al retornar a la intensidad inicial el sistema sufre una dinámica claramente diferente de lo que ocurrió ante el estímulo luminoso de baja intensidad. La amplitud se recupera de forma inmediata (regresa a su valor control).

La duración, por su parte (Figura 13b), en todas las horas evaluadas sufre un rebote súbito con respecto al valor control durante el minuto 42 cuando se incrementa la intensidad del estímulo, y a continuación, regresa del mismo modo súbito, al valor de control (ver Figura 9). El valor inicial de la duración varía como función del CC. Hubo diferencias significativas (ANOVA -1 vía con nivel de significancia de 0.05) en la hora 12 TC ($129\% \pm 6.7$) con respecto al valor de la duración de las horas 0 TC ($143.6\% \pm 2.7$) y 18 TC ($149\% \pm 5.3$).

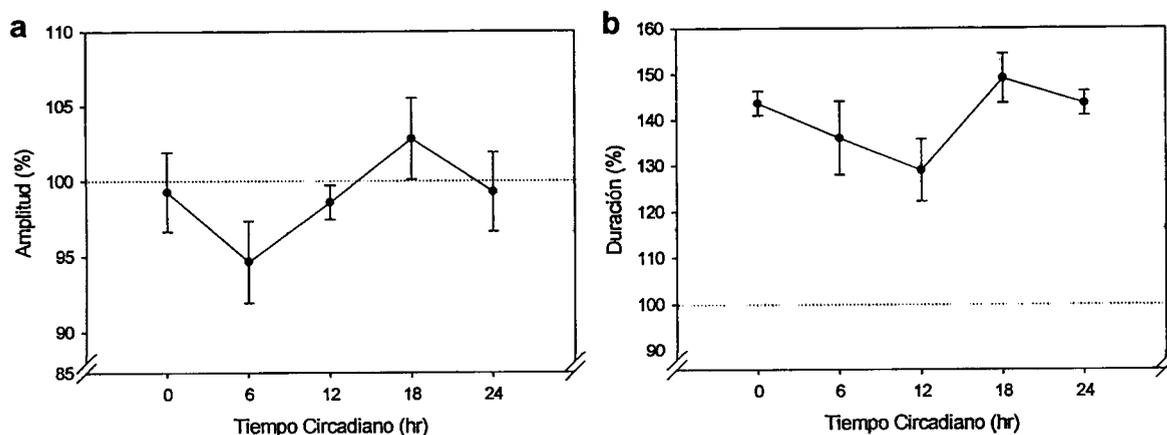


Figura 13. Sensibilidad de la célula retinular de acocil a lo largo del CC durante el primer estímulo luminoso de intensidad alta (2700 lux) después de aplicar 10 estímulos con baja intensidad luminosa (datos normalizados), ($n=5$). La línea punteada indica el valor de referencia, a) Amplitud del PR, b) Duración del PR; nótese la magnitud de los valores por arriba del 100%.

Se hace notar que en los estímulos 22 al 30 (minuto 44 a 60, ver figura 9) la respuesta del PR regresa de forma inmediata al valor de control (excepto en la HC

18), razón por la cual no fue posible ajustar a la curva exponencial. La dinámica de la respuesta del PR es discontinua para la escala de tiempo del experimento.

En la HC 18 la duración del PR retorna a un valor superior al control ($114 \% \pm 3.1$) durante los siguientes estímulos (minuto 44 al 60, ver Figura 9). En esta hora, la influencia que tiene el estímulo luminoso de intensidad alta sobre la duración del PR es irreversible en el intervalo de tiempo evaluado.

4. DISCUSIÓN

4.1 Respuesta eléctrica de los fotorreceptores retinulares durante el ciclo circadiano

En este trabajo observamos que la sensibilidad a la luz y la adaptación de los fotorreceptores retinulares del acocil *P. clarkii* son función del tiempo circadiano. Suponemos que estas diferencias se deben a cambios a nivel de la membrana, como podrían ser modificaciones en los gradientes iónicos, las permeabilidades, etcétera (Hildebrand *et al* 1974).

Los cambios en las características de la respuesta eléctrica de los fotorreceptores retinulares del acocil no se deben a la influencia de los pigmentos accesorios dado que en el tallo ocular aislado no se observa el movimiento de éstos (Sánchez y Fuentes-Pardo, 1977; Rodríguez-Sosa y Aréchiga, 1982). También se descarta la influencia debida al blanqueamiento del fotopigmento pues el número de fotones enviados blanquea menos del 0.1% del fotopigmento (Stieve *et al.*, 1973). Por lo tanto, se puede afirmar que los cambios en la respuesta de los fotorreceptores visuales se deben exclusivamente a modificaciones en la excitabilidad de la célula fotorreceptora y que los cambios a lo largo del CC se deben a cambios circadianos en la excitabilidad de la célula fotorreceptora. Al respecto se ha demostrado que hay cambios circadianos en la cinética, la conductancia y la permeabilidad iónica que subyace a la respuesta eléctrica a la luz (Barriga-Montoya *et al.*, 2010). Esto no descarta que uno de los productos implicados en la fototransducción sea el que controle la sensibilidad y la adaptación de la célula fotorreceptora y que la variación en su concentración sea lo que le confiera al sistema su dependencia circadiana.

4.2 Influencia del cambio de intensidad luminosa en el potencial de receptor

Los resultados muestran que la amplitud y la duración del PR no guardan una relación directa (ver figuras 8 y 9), más bien parecen ser procesos modulados de manera independiente. La forma en que varía la sensibilidad a lo largo del CC ante la disminución de la intensidad del estímulo luminoso es equivalente para la amplitud y la duración, en los dos casos ocurre de manera gradual, es hasta que aumenta la intensidad del estímulo luminoso que se observa cómo la amplitud del PR regresa inmediatamente a su valor de referencia mientras que en la duración se observa un rebote súbito de la respuesta que regresa de forma inmediata al valor de referencia. Se sabe que la amplitud del PR guarda una relación directa con la intensidad del estímulo (ver figura 8) (Naka y Kuwabara, 1959). Los mecanismos que modulan la duración del PR en cambio están lejos de ser entendidos en su totalidad.

4.2.1 Sensibilidad del fotorreceptor

Los resultados muestran que la sensibilidad de la célula fotorreceptora es función del tiempo circadiano tanto para la amplitud como para la duración. La sensibilidad del sistema a una disminución en la intensidad del estímulo luminoso en la amplitud mostró ser mayor a las 6 y 18 horas TC comparada con las 0 y 12 horas TC. La máxima sensibilidad ocurre en los puntos críticos del ritmo del ERG (máxima y mínima amplitud) y la mínima sensibilidad sucede en los momentos en que se obtiene una amplitud media en el ritmo del ERG. La sensibilidad en la duración también varía con el CC siendo mínima en la hora 6 TC (ver Figura 10).

En cuanto a la sensibilidad al aumento en la intensidad del estímulo luminoso, se observó que varía también con respecto al CC. En los valores de la amplitud se recupera inmediatamente al valor de referencia excepto en la hora 6 TC momento en que es menos sensible, en contraste con lo que ocurre a esta misma hora al disminuir la intensidad luminosa. En el resto de las horas evaluadas

el efecto es reversible, es notable cómo el sistema regresa de forma inmediata al valor de referencia. La dependencia circadiana en la sensibilidad podríamos atribuírsela a cambios en la conductancia de algún ión, dada la evidencia reciente sobre la dependencia circadiana en la conductancia iónica.

La sensibilidad en los valores de duración, muestran también una dependencia circadiana. Particularmente en este momento (al regresar a 2700 lux, minuto 42) en todas las fases del CC ocurre una sobre-recuperación momentánea de la respuesta muy por arriba del valor de referencia, que a la fecha está pobremente entendida, y estos valores también son dependientes de la fase del CC, siendo más sensible en la hora 18 TC con respecto a la hora 6 TC, que corresponde a los puntos críticos del ERG.

4.2.2 Capacidad de adaptación del fotorreceptor

Cuando se evalúa la capacidad de adaptación de la membrana A, midiendo la amplitud del PR se observa una dependencia circadiana (figura 11). Además se observa una correspondencia con la variación circadiana de la sensibilidad ante la disminución del estímulo luminoso (Figuras 10a y 11): una mayor sensibilidad se corresponde con una mayor capacidad de adaptación (6 y 18 horas TC) y una menor sensibilidad con una menor capacidad de adaptación (0 y 12 horas TC).

Para la duración también se observa una correspondencia entre los valores de sensibilidad inicial y la capacidad de adaptación en las horas 0 y 6 TC; aunque esto no ocurrió en las horas 12 y 18 TC, sin embargo es notable cómo la capacidad de adaptación a lo largo del CC no es constante y alcanza valores iguales o mayores al 100%, no obstante la reducción de la intensidad del estímulo (ver figura 11).

Llama la atención que durante la serie de estímulos con baja intensidad luminosa (800 lux), la constante de recuperación τ y la capacidad de adaptación A

en el caso de la amplitud y la duración, no mantienen una relación directa (ver figuras 11), es decir, una mayor velocidad de recuperación no corresponde con una mayor capacidad de adaptación, lo cual denota que la cinética que subyace a la adaptación de la membrana a la luz es realmente compleja.

Al regresar a la serie de estímulos luminosos de intensidad alta, la velocidad de adaptación es lo suficientemente rápida como para ajustarse a un decaimiento exponencial y ocurre de forma discontinua para la escala de tiempo evaluada. Los valores estables a los que regresa corresponden con los valores de referencia, es decir el efecto es reversible, excepto en la hora 6 TC para la amplitud, cuya respuesta se recupera por debajo del valor de referencia (100%) y la hora 18 TC para la duración, cuya respuesta se recupera por arriba del valor de referencia; para este par de horas, el efecto de regresar al estímulo luminoso de intensidad alta es irreversible al tiempo del experimento (ver figuras 8 y 9) y corresponde con los momentos críticos del ERG (máxima y mínima amplitud).

Al igual que en el caso de la sensibilidad a la luz de la célula fotorreceptora los mecanismos que modulan la adaptación para la amplitud y la duración del PR son independientes (Figura 11). Cuando la intensidad del estímulo luminoso se reduce, la velocidad de adaptación de la amplitud es más rápida que la de duración (ver Tabla 2) en todas las horas circadianas, pero como esta última alcanza un valor estable más alto tiene una mayor capacidad de adaptación en todas las horas circadianas.

En cuanto a la amplificación de la respuesta (Figura 12) Hardie y Raghu (2001) propusieron que puede atribuirse a uno o más procesos a nivel bioquímico, involucrando cambios a nivel de segundos mensajeros, dado que por ejemplo, en *Drosophila* los canales TRP son muy permeables al Ca^{2+} , y el influjo de iones Ca^{2+} a través de canales TRP intervienen en la amplificación, la rapidez de la terminación de la respuesta y la adaptación a la luz, a través de múltiples vías de retroalimentación (Hardie y Minke, 1995). La cinética de la sensibilidad cuando se disminuye la intensidad luminosa describe un cambio en la amplificación de la

respuesta, lo que significa que la célula cambia cuantitativamente la forma en la que codifica la intensidad del estímulo.

Cuando la intensidad del estímulo luminoso se reduce, aunque la amplificación no muestra diferencias significativas a lo largo del CC, no crece equivalentemente en las dos características del PR evaluadas, para la amplitud se amplifica en el orden del 6 al 12 % de la respuesta inicial, y del 18 al 30 % en el caso de la duración.

También llama la atención que el sistema no responde del mismo modo cuando el estímulo va de mayor a menor intensidad que cuando va de menor a mayor intensidad luminosa (ver Figuras 8 y 9), lo cual prueba que la sensibilidad a la luz, además de depender de la hora circadiana, depende de la "historia" de estimulación. Suponemos que esta diferencia puede deberse a la dirección de movimiento de los flujos iónicos implicados en la adaptación de la membrana a la luz. Los datos experimentales sugieren que hay una relación directa entre la intensidad del estímulo luminoso y la concentración de calcio intracelular (Brown y Blinks, 1974). Al reducir la intensidad luminosa también debería disminuir la concentración de calcio intracelular, para lo cual debe usarse algún tipo de transporte activo (en contra del gradiente de concentración); al aumentar la intensidad luminosa debería aumentar la concentración de calcio intracelular lo cual podría ocurrir por la liberación de este ión de los almacenes intracelulares o por la apertura de canales de calcio. En cualquier caso los mecanismos son mucho más rápidos que cuando está implicado algún tipo de transporte activo, lo cual coincide con el tiempo necesario para que la célula alcance un estado estable: cuando hay un cambio de mayor a menor intensidad se requiere de más tiempo que cuando el cambio es de menor a mayor intensidad.

4.3 Comentarios finales y perspectiva

La información generada en este trabajo permite mejorar el entendimiento sobre la organización circadiana del ritmo de sensibilidad a la luz del acocil. Demuestra que el estado funcional del fotorreceptor retinular es función del ciclo circadiano. En cuanto a los mecanismos que subyacen al fenómeno en cuestión, desafortunadamente no podemos afirmar nada, sólo podemos hacer suposiciones. Al respecto queda mucho trabajo experimental y teórico por hacer.

Por ejemplo se requiere hacer un estudio más detallado de la biofísica de la membrana para explorar qué canales se abren, cómo logran cambiar en el tiempo y qué requerimientos tiene el circuito de osciladores (Nitabach, 2005). Falta también caracterizar el efecto de varias hormonas y neurotransmisores y determinar cuál es la influencia en los ritmos circadianos; en particular para el acocil, falta entender y describir la mayor parte de la cascada de señalización al interior celular.

Dentro del sistema circadiano de sensibilidad a la luz del acocil, podría ser que la célula fotorreceptora esté funcionando como un oscilador secundario (ver sección 1.1). Si así fuera, entonces modularía la información que se transmite hacia el marcapaso. Este esquema es el que ha propuesto Zivkovic (2005): los sistemas sensoriales cambian su estado funcional con la hora del día y entonces tienen la capacidad de enviar hacia el marcapaso la información del ambiente "modulada". Sin embargo los resultados no permiten descartar la posibilidad de que los fotorreceptores sean solamente efectores del marcapaso.

5. Bibliografía

- ARÉCHIGA, H., B. FUENTES-PARDO Y B. BARRERA-MERA. 1974. Influence of retinal shielding pigments on light sensitivity in the crayfish. *Acta physiol. latinoam*, 24: 601 - 611.
- ARÉCHIGA, H., F. FERNÁNDEZ-QUIRÓZ., F. FERNÁNDEZ-DE-MIGUEL, Y L. RODRÍGUEZ-SOSA. 1993. The Circadian System of Crustaceans. *Chronobiol. int.* 10 (1): 1 -19.
- ARÉCHIGA H. y L. RODRÍGUEZ-SOSA. 1998. Circadian clock function in isolated eyestalk tissue of crayfish. *Proc. R. Soc. Lond.* 265: 1819 - 1823.
- ARÉCHIGA H. y L. RODRÍGUEZ-SOSA. 2002. Distributed Circadian Rhythmicity in the Crustacean Nervous System, *En: The Crustacean Nervous System* Konrad Wise (Editor) Springer-Verlag Germany, 113 -122.
- ARÉCHIGA, H. Y L. RODRÍGUEZ-SOSA. 2002. Distributed Circadian Rhythmicity Pp. 113-122. *En: K. Wise (ed.). The Crustacean Nervous System.* Springer-Verlag, Alemania.
- ARÉCHIGA, H. 2003. Sustrato neural de los ritmos biológicos, en Neurociencia. J. V. Sánchez-Andrés (eds.) en *Rev Neurol.* 36 (1): 49 - 60.
- ASCHOFF J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- BARRIGA-MONTOYA C., GÓMEZ-LAGUNAS F y B. FUENTES-PARDO. 2010. Effect of pigment dispersing hormone on the electrical activity of crayfish visual photoreceptors during the 24-h cycle. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 157: 338 - 45.
- BOLSOVER, S. R. y J. E. BROWN.1982. Light adaptation of invertebrate photoreceptors: influence of intracellular pH buffering capacity. *J. Physiol.* 330: 297 – 305.
- BROWN J. E. y J. R. Blinks.1974. Changes in intracellular free calcium concentration during illumination of invertebrate photoreceptors. Detection with aequorin. *J. Gen. Physiol*, 64:643-65.
- EXNER, S. 1981. Die Physiologie der facettierten Augen von Krebsen und Isekten. Deuticke, Vienna
- SHAW, S. R. Y S. STOWE. 1982. Photoreception. *En: The Biology of Crustacea*, Vol. 3, Academic Press Inc. Atwood H. L y D. C Sandeman (Eds), New York, 291 - 367.
- FANJUL-MOLES, M. L., M. MIRANDA-ANAYA Y B. FUENTES-PARDO.1992. Effect of monochromatic light upon the ERG circadian Rhythm during ontogeny in crayfish (*Procambarus clarkii*). *Comp. Biochem Physiol.* 102 a (1) 99 – 106.
- FANJUL-MOLES, M. L. Y J. PRIETO-SAGREDO. 2003. The Circadian System of Crayfish: A Developmental Approach. *Microsc. res. techniq.* 60: 291-301.
- FEIN, A. 2003. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release is necessary for generating the entire light response of *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol*, 121: 441 - 9.
- FOSTER, R. G. Y M. W. HANKINS 2007. Circadian Vision. *Current Biology* 17 (17): 746 - 751.
- Fuentes-Pardo, B. y J. Ramos-Carvajal. 1983. The phase response curve of electroretinographic circadian rhythm of crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 74 A: 711 - 714.
- FUENTES-PARDO, B. y V. INCLÁN RUBIO. 1987. Caudal photoreceptors synchronise the circadian rhythms in crayfish. I. Synchronization of ERG and locomotor circadian rhythms. *Comp. Biochem Physiol* 86 A: 523 - 527
- FUENTES-PARDO, B. Y E. MORENO SAENZ. 1988. Los Relojes Biológicos. Pp 203 – 234. *En: Julio Muñóz Martínez (ed.). Teorías y hechos sobre la vida.* Consejo nacional de fomento educativo, México D.F.
- FUENTES-PARDO, B. Y J. HERNÁNDEZ-FALCÓN. 1993. Neurobiology of the circadian clock of crayfish. *Trends in comparat. biochem. Physiol.* 1: 635 – 673.

- FUENTES-PARDO, B., M. LARA-APARICIO Y S. LÓPEZ DE MEDRANO. 1995. Perturbation of a circadian rhythm by single and periodic signals and its mathematical simulation. *B. math. biol.* 57(2): 175 - 185.
- GOLDSMITH, T. H. 1972. The natural history of invertebrate visual pigments. In: *Handbook of Sensory Physiology*. H. J. A. Dartnall (Ed.), Vol. 7. 685 - 719. Springer - Verlag, Berlin y New York. En Shaw y Stowe
- GREENSPAN R. J. 2006. An Introduction to Nervous Systems, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 23 - 38.
- HARDIE, R. C. y B. MINKE. 1995. Phosphoinositide-mediated phototransduction in *Drosophila* photoreceptors: the role of Ca^{2+} and *trp*. *Cell Calcium* 18, 256–274-
- HARDIE, R. C. Y P. RAGHU. 2001. Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413: 186 - 193.
- HARDIE, R. C. 2003. Phototransduction: Shedding Light on Translocation. *Current Biology* 13: 775 - 777.
- HARGRAVE, P. A. Y J. H. MCDOWELL. 1992: Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB* 6: 2323 – 2331.
- HARIYAMA, T., V.B. MEYER-ROCHOW, T. KAWAUCHI, Y. TAKAKU Y Y. TSUKAHARA. 2001. Diurnal changes in reticular cell sensitivities and receptive fields (two-dimensional angular sensitivity functions) in the apposition eyes of *Ligia exotica* (Crustacea, Isopoda). *J. exp. biol.* 204: 239 - 248.
- HERNÁNDEZ-FALCÓN, J. Y B. FUENTES-PARDO. 1991. Crayfish reticular cells: influence of extracellular Sodium and Calcium upon receptor potential. *Comp. Biochem Physiol.* 100A(4): 823 – 832.
- HERNÁNDEZ-FALCÓN, J. O. SCHNEIDER-EHRENBERG, DE LA O-MARTÍNEZ, V. CAMPOS-LOZADA Y B. FUENTES-PARDO. 1997. Steroids Modulate the Excitability of Crayfish (*Procambarus digueti*) Photoreceptors: Long-and Short-Term Actions. *Gen. comp. endocr.* 105: 255 – 269.
- HILDEBRAND, E., H STIEVE, G. HANOWSKI y H. GAUBE. 1974. Membrane adaptation in crustacean Photoreceptors as revealed by a flash Sequence Technique. *Vision Res.* 14: 1399 – 1407.
- JANZEN D.H. 1976. Why bamboos wait so long to flower. *Annu Rev Ecol Syst* 7: 347–391.
- KOUKKARI, W. Y SOTHERN R. 2006. *Introducing Biological Rhythms*. Springer Verlag, Minnesota 602p.
- LISMAN, J. E. y J. E. BROWN. 1972. The effects of intracellular iontophoretic injection of calcium and sodium ions on the light response of *Limulus* ventral photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 59:701-19.
- LISMAN J. E., BROWN J. E. 1975. Effects of intracellular injection of calcium buffers on light adaptation in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. gen. physiol.* 66: 489 - 506.
- LISMAN J.E., FAIN G. L., O'DAY P.M. (1982). Voltage-dependent conductances in *Limulus* ventral photoreceptors. *J. gen. Physiol.* 79:187-209.
- MILLECCHIA R. y A. MAURO. 1969. The ventral photoreceptor cells of *Limulus*. II: The basic response. *J. gen. Physiol.* 54: 310 - 330.
- MILLER, C. S. Y R. M. GLANTZ. 2000. Visual adaptation modulates a potassium conductance in reticular cells of the crayfish. *Visual Neurosci.* 17: 353 - 68.
- NAKA, K. Y M. KUWABARA. 1959. The components from the compound eye of the crayfish. *J. Exp. Biol.*, 36: 51-61.
- NITABACH M. N., J. BLAU, T. C. HOLMES Y J. BLAU J. 2005. Membranes, ions and clocks: testing de Njus-Sulzman-Hastings model of the circadian oscillator. *Methods in enzymology*, 393:682-92.
- PITTENDRIGH C. S. 1965. On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. *En: Circadian clocks*, pp 277-97. North Holland, Amsterdam.

- RANDALL, D., W. BURGGREN, K. FRENCH. 2001⁵. Communication Along and between neurons. *Animal Physiology (Eckert)*, W. H. Freeman and company, New York, 215 - 276.
- RANGANATHAN, R., W. A. HARRIS Y CH. S. ZUKER. 1991. The molecular genetics of invertebrate phototransduction, *TINS* 14 (11): 486 - 493.
- RODRÍGUEZ-SOSA L. y H. ARÉCHIGA. 1982. Range of Modulation of Light Sensitivity by accessory pigments in the crayfish compound eye, *Vision Res.* 22: 1515 - 1524.
- SÁNCHEZ, J. A. Y B. FUENTES-PARDO. 1977. Circadian rhythm in the amplitude of the electroretinogram in the isolated eyestalk of the crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A: 601 - 605.
- SHAW, S. R. Y S. STOWE. 1982. Photoreception. *En: The Biology of Crustacea*, Vol. 3, Academic Press Inc. Atwood H. L y D. C Sandeman (Eds), New York, 291 - 367.
- STIEVE .H.. H. GAUBE , E. HILDEBRAND y P. THOMSEN . 1973. Long-term adaptation by different monochromatic light in the photoreceptors of three crustacean species. *Vision Res.* 13: 1403-1414.
- TERAKITA, A., H. TAKAHAMA, T. HARIYAMA, T. SUZUKI y Y. TSUKAHARA. 1998. Light-regulated localization of the beta-subunit of Gq-type G-protein in the crayfish photoreceptors. *J. Comp. Physiol A* 183: 411 - 417.
- VAN HARREVELD A. 1936. A physiological solution for freshwater crustacea. *Proc soc exper biol med*, 34:428-32.
- WELSH, J. H. 1941. The sinus gland 24hours cycle of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool.* 86: 35 - 49. *En* FANJUL-MOLES, M. L. Y J. PRIETO-SAGREDO. 2003. The Circadian System of Crayfish: A Developmental Approach. *Microsc. res. techniq.* 60: 291-301.
- YANNIELLI P y M. E. HARRINGTON. 2004. Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through nonphotic pathways. *Prog Neurobiol* 74: 59 - 76.
- ZIVKOVIC, B. 2005. ClockTutorial #5: Circadian Organization, *A Blog Around The Clock*, http://blog.coturnix.org/2009/07/06/clocktutorial_5_circadian_orga_3/ Accessed on June 23rd, 2011.