00343

14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DEL SISTEMA CIRCADIANO QUE REGULA EL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL CANGREJO DE RIO *Pseudothelphusa americana.*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGIA ANIMAL

P R E S E N T A

ELISA RAMIREZ LOMELI

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

MEXICO, D. F. JULIO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

OFICIO FCIEN/PCB/0735/02

ASUNTO: Asignación de jurado

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
P R E S E N T E.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado como Director(a) de la Tesis del(a) alumno(a) **BIOL. ELISA RAMÍREZ LOMELÍ**, quién desarrolló el trabajo de Tesis titulado "CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO QUE REGULA EL RITMO DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN EL CANGREJO DE RÍO *Pseudothelfusa* americana".

Así mismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el 15 de julio del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (Biología Animal).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DR.	RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
VOCAL	DRA.	RUTH CECILIA VANEGAS PÉREZ
SECRETARIO	DR.	MANUEL MIRANDA ANAYA
SUPLENTE	DRA.	ELSA ESCAMILLA CHIMAL
SUPLENTE	DR.	BALTAZAR BARRERA MERA

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 18 de julio de 2002

COORDINADORA

DRA. TILA MARÍA PÉREZ ORTIZ

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

TMPO/ASR/mnm

DEDICATORIA

A mis padres:

Juana Lomelí Lira

Antonio Ramírez Pacheco

Por todo el apoyo y cariño incondicional que me han brindado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por haberme integrado en su equipo de trabajo, por sus valiosos consejos y amistad.

A la Dra. Marcela E. Aguilar Morales y al M. en C. José Luis Villalobos Hiriart por sus acertados comentarios en la corrección final de este trabajo.

A la comisión revisora:

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez
Dra. Elsa Escamilla Chimal
Dr. Baltasar Barrera Mera

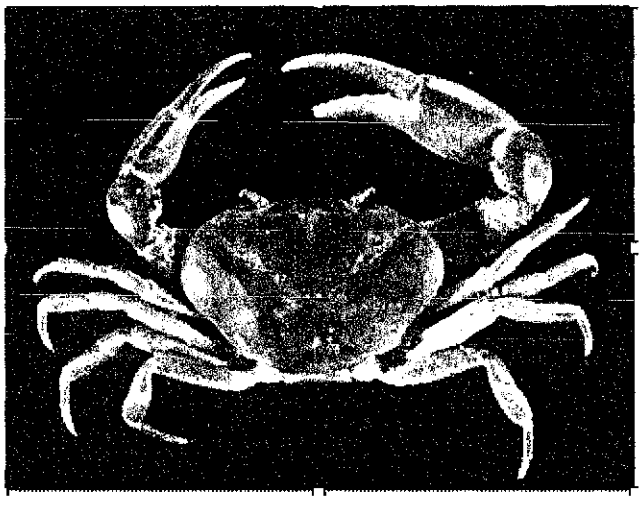
GRACIAS.

INDICE

RESUMEN 1
1. INTRODUCCIÓN 2
1.1. Antecedentes 2
1.2. Características generales de los relojes circadianos 3
1.2.1. Oscilación espontánea 3
1.2.2. Efecto de la luz constante e intensidades (Regla de Aschoff) 4
1.2.3. Sincronización 5
1.2.4. Coordinación relativa. 6
1.2.5. Enmascaramiento 6
1.2.6. Post-efectos 7
1.2.7. Compensación de la temperatura 7
1.2.8. Múltiples osciladores 7
1.3. Ritmos en crustáceos 9
1.4. Biología de la especie (*Pseudothelphusa americana*) 13
1.5. Regulación neuroendócrina del pedúnculo ocular sobre los ritmos circadianos en crustáceos 15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 19
3. HIPÓTESIS 20
4. OBJETIVOS 20
5. MATERIAL Y MÉTODO 21
5.1. Obtención y mantenimiento de animales 21
5.2. Registro de la actividad locomotora 21
5.3. Ablación peduncular 22
5.4. Histología 22
5.5. Análisis de datos 22
5.6. Diseño experimental 24
5.6.1. Grupos de referencia 24
Fotoperiodo completo: OO - LO - OO 24
Fotoperiodo esqueleto: OO – FE – OO 25
Oscuridad constante: OO 25
Luz constante: LO - LL 25

5.6.2. Grupos experimentales 25
Ablación peduncular 25
Ablación de retina 26
6. RESULTADOS 27
6.1. Animales intactos 27
Ritmos de actividad locomotora en oscuridad constante (OO) 27
Ritmos de actividad locomotora a fotoperiodos completos LO (12:12) 29
Ritmos de actividad locomotora a fotoperiodos esqueletos FE (2:10; 2:10) .31
Ritmos de actividad locomotora a luz constante (LL) 33
6.2. Efecto de la ablación peduncular 35
Ritmo de actividad locomotora de animales PO-x en OO 35
Ritmos de actividad locomotora de animales PO-x en ciclos LO 37
6.3. Efecto de la ablación de retina 39
Ritmos de actividad locomotora en OO 39
Ritmos de actividad locomotora en LO en animales Ret-x 41
Ritmos de actividad locomotora en FE 43
6.4. Histología 45
6.5. Variación del periodo del ritmo de actividad locomotora ente los distintos grupos de animales: efecto de las lesiones 46
7. DISCUSIÓN 49
7.1. Animales intactos 49
Oscuridad constante 49
Ciclos de luz-oscuridad 50
Fotoperiodo esqueleto 51
Luz-constante 51
7.2. Animales con ablación peduncular 52
Oscuridad constante 52
Ciclos de luz-oscuridad 53
7.3. Animales con ablación de retina 54
Oscuridad constante 54
Ciclos de luz-oscuridad 54
Fotoperiodos esqueleto 54
7.4. Post – efectos 54

7.5. ¿Bimodal circadiano o circamareal?.....56
8. CONCLUSIONES.....57
9. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....58
10. LITERATURA CITADA.....59



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es el estudio del ritmo de actividad locomotora del crustáceo de agua dulce *Pseudothelphusa americana* de animales intactos (grupo de referencia) en condiciones de obscuridad constante (OO); luz-oscuridad 12:12 (LO); fotoperiodo esqueleto 2:10,2:10 (FE) y luz constante (LL). Así como de aquellos que de manera experimental se les practicó ablación peduncular (PO-x), y de retina (Ret-x) de ambos ojos. El nivel de la lesión en retina fue evaluada mediante cortes histológicos.

La actividad locomotora se obtuvo mediante sensores infrarrojos ajustados a acuarios de vidrio, donde la interrupción de un sensor fue considerado como un evento de actividad. La información fue colectada y almacenada en una PC para su posterior análisis en forma de actogramas, periodogramas y curvas promedio.

Los resultados obtenidos muestran que en el grupo de referencia se observó un ritmo bimodal con un τ circadiano promedio de 23.77 ± 0.75 h. En LO el 74% de los casos sincronizó (23.92 ± 0.11 h). El grupo sometido a FE tuvo una baja capacidad de sincronización (64%), con un τ promedio largo (28.49 ± 0.36 h). En general los animales intactos colocados en LL presentaron un ritmo principalmente unimodal con un τ promedio de 25.48 ± 0.71 h.

En los organismos PO-x; se observó en OO una arritmia inmediata después de la lesión quienes después de 3 semanas presentaron un τ promedio de 25.53 ± 0.75 h. Solo el 19% de los organismos con esta lesión lograron sincronizarse (τ = 23.70 ± 0.42 h), sugiriendo la existencia de fotorreceptores extrarretinianos.

En los organismos Ret-x se encontró en la mayoría una arritmia en la actividad en OO, después de la lesión mientras que uno mostró un ritmo unimodal. Solo un 58% de los animales con esta lesión no lograron sincronizar a ciclos LO (τ = 25.06 ± 0.86 h) y se presentaron fenómenos como coordinación relativa. Un 62% de los organismos Ret-x no sincronizaron a FE (τ =29.03 ± 0.27).

Los datos obtenidos de τ y α/ρ fueron comparados entre grupos mediante las pruebas estadísticas: *t-student* y ANOVA. Se determinaron diferencias significativas entre el τ de PO-x y Ret-x y grupos de referencia en OO y post-efectos.

Se discute la relación de la retina y los pedúnculos oculares como estructuras que median el acoplamiento de osciladores circadianos responsables del ritmo de actividad locomotora *posiblemente ubicados en el ganglio cerebroide, y se determinó que el ritmo de actividad* locomotora en esta especie es circadiano y no circamareal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El ambiente físico en el que se desarrolla la vida está caracterizado por periodicidades que derivan del movimiento de la tierra y de la luna con relación al sol. Desde sus orígenes, los seres vivos han sido expuestos a ciclos diarios y anuales tanto de luz como de temperatura. Los ciclos mareales retaron a la vida tan pronto como la orilla de los mares fue invadida; en la tierra, la humedad y otros ciclos diarios se añadieron a los ya impuestos. Estas periodicidades se convirtieron en retos que la selección natural ha hecho frente; de tal forma, los ciclos externos de luz y temperatura deben haber impuesto una periodicidad puramente exógena en los procesos vitales de los primeros organismos. Los sistemas metabólicos al estar repletos de asas de retroalimentación negativa, se ajustaron a un ciclo externo que pudo entrar en el asa dando origen al "reloj biológico" (Pittendrigh, 1981a).

El "reloj biológico" o sistema temporal circadiano es un sistema fisiológico responsable de medir el tiempo y sincronizar el curso de los procesos internos de los organismos con los eventos diarios en su ambiente. El término circadiano (del latin *circa* = cerca; y *diano* = día) se ha utilizado para describir los ciclos endógenos de aproximadamente 24 horas generados por los organismos (Moore-Ede, *et al*; 1982).

Sin embargo, también existen otra clase de ritmos biológicos cuyos periodos pueden fluctuar desde menos de un segundo hasta más de un año (por ejemplo: la respiración, el latido del corazón, el ciclo estral o la hibernación). Estos ritmos son denominados de acuerdo a su frecuencia basándose en los ritmos circadianos; ultradianos son aquellos con periodo menores de 20 horas, e infradianos cuyo periodo supera las 30 horas. Estos programas temporales se basan en osciladores biológicos; cuyo periodo es una aproximación del ciclo ambiental ("circa-") con el que está relacionado (Pittendrigh, 1981a).

Como se mencionó anteriormente, la principal función del reloj biológico es emparejar su ciclo con los ciclos ambientales cuya frecuencia es parecida. A cualquier señal ambiental capaz de colocar en fase un ritmo (sincronizar) se le conoce con el

nombre de "Zeitgeber" (del vocablo aleman "dador de tiempo") o sincronizador (Aschoff, 1960), como será llamado de aquí en adelante.

Los factores físicos externos más importantes sincronizadores del reloj biológico son la luz y la temperatura. Esto se hace evidente cuando a un organismo que presenta un ritmo circadiano bajo condiciones ambientales constantes, se le expone a un régimen de luz-oscuridad cíclico de 24 horas (LO 12:12) o a un termoperiodo cíclico, el individuo responderá manifestando un ajuste al ciclo impuesto. Sin embargo, también existen otras señales de tiempo importantes en vertebrados e invertebrados capaces de sincronizar el "reloj biológico" circadiano, entre las que se encuentran presión ambiental, sonidos, señales sociales y disponibilidad de alimento entre otras (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.2. Características generales de los relojes circadianos

1.2.1. Oscilación espontánea

Un aspecto fundamental para considerar a los ritmos circadianos como tales, es el hecho de que en condiciones típicas de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persiste. Su fecuencia presenta una ligera pero significativa variación en el periodo que la caracteriza, (en este caso, los ritmos tienen un periodo que fluctuan alrededor de 24 horas); fenómeno al que se le denomina oscilación espontánea o libre curso (Aguilar-Robledo, 1993). El periodo en oscilación espontánea es la única evidencia convincente de una periodicidad endógena (Aschoff, 1960). Una propiedad de los ritmos biológicos es que su periodo es el resultado de bases genéticas (Dunlap, 1999), lo que sugiere que los ritmos circadianos son manejados por relojes autónomos dentro del organismo y no son producto de estímulos ambientales (Moore-Ede, *et al*; 1982).

Se sabe también que el periodo del ritmo en oscilación espontánea (τ), varía entre las especies, los individuos y su estado fisiológico; sin embargo en la mayoría de los casos, el periodo en oscilación espontánea es solo una aproximación de los ciclos ambientales relevantes. Existen ciertas generalizaciones de que en especies diurnas τ es mayor de 24 horas y menor de 24 en especies nocturnas cuando el ritmo se observa en condiciones constantes de oscuridad (Aschoff, 1960).

Es importante agregar que la oscilación espontánea de un ritmo también depende en cierto grado de las condiciones constantes en las que se haya colocado el organismo;

por ejemplo: luz constante (Aschoff, 1981), ya que los organismos son sistemas abiertos correlacionados con el ambiente, y su comportamiento y funciones metabólicas siempre serán el resultado de una coacción con el medio (Aschoff, 1960).

1.2.2. Efecto de la luz constante e intensidades (Regla de Aschoff)

En un ambiente constante es la intensidad de luz a la cual el organismo es expuesto un determinante de la longitud de un periodo en oscilación espontánea de un reloj circadiano (Moore-Ede, *et al*; 1982). Se ha visto que en algunos organismos (generalmente los que son diurnos), la longitud del periodo decrece con intensidades altas de luz constante mientras que en otros (generalmente los nocturnos), el periodo se alarga y que a altas intensidades de luz constante la expresión rítmica generalmente se inhibe (Palmer, 1976).

Todo lo anterior se refleja en las reglas circadianas de Aschoff propuestas por él mismo en 1960, las cuales sugieren una relación entre los hábitos nocturnos o diurnos de los animales y la longitud de sus periodos (τ). La primera regla menciona que los animales diurnos exhiben un acortamiento en su periodo en luz continua más que en oscuridad constante, mientras que en los animales nocturnos ocurre lo contrario. La segunda regla apunta que el periodo se acorta con incremento en la intensidad de la luz en animales diurnos, pero es directamente proporcional a la intensidad en animales nocturnos. La tercera regla señala que la proporción actividad/descanso (α/ρ) aumenta con el incremento en la intensidad de la luz en animales diurnos, pero disminuye en los nocturnos.

También la exposición de organismos de diversas especies a luz continua brillante resulta en una desorganización progresiva de la ritmicidad, lo que puede conducir a patrones arrítmicos de conducta o bien a la descomposición de la ritmicidad circádica en elementos ultradianos. Estos efectos se han interpretado como el desacoplamiento entre múltiples osciladores (Aguilar-Robledo, 1993).

Es necesario aclarar que la luz no juega un papel similar con los ritmos mareales, mensuales y anuales, ya que por ejemplo la sincronización de los ritmos mareales es principalmente resultado de ciclos de temperatura, presión y acción mecánica de la turbulencia producida por mareas (Palmer, 1976).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.3. Sincronización

A pesar de su naturaleza endógena, la ritmicidad biológica no manifiesta su oscilación espontánea en condiciones naturales. Esto se observa en tal forma que el periodo de la ritmicidad biológica es igual al de los ciclos ambientales. La condición en la cual el periodo endógeno y la fase del oscilador se ajustan al periodo y fase del estímulo del ciclo externo es conocida como sincronización. Su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico. De acuerdo con Pittendrig (1981a), la sincronización provee a los relojes biológicos un mecanismo por el cual son capaces de reconocer la hora local, propiedad que les provee de una relevancia adaptativa; la cordinación con el medio externo le permite al individuo prepararse anticipadamente a cambios en el ambiente.

Así, un oscilador (o) con un periodo en oscilación espontánea (τ) puede acoplarse y ser sincronizado por otro (z), con un periodo diferente pero similar (T). En la sincronización, el estado estable del periodo de (o) es cambiado de τ a τ^* el cual será igual a T; así cuando el periodo de oscilación espontanea (τ) de osciladores circadianos está muy cerca de 24 horas, se pueden sincronizar a uno o más sincronizadores con un periodo (T) dictado por la señal ambiental (Pittendrigh, 1981a).

Existen dos teorías que explican cómo puede llevarse a cabo la sincronización: una de ellas propone una influencia contínua o sincronización paramétrica, y otra una influencia momentánea por pulsos breves a la que se le denomina sincronización discreta o no paramétrica (Pittendrigh, 1981b).

En la sincronización paramétrica se propone que el estímulo ambiental afecta de manera contínua la velocidad angular del oscilador; generando aceleraciones o desaceleraciones de su velocidad angular para ajustarlo continuamente. En contraste, la sincronización no paramétrica sólo afecta la fase del oscilador en las transiciones del inicio y fin del estímulo. Cuando un fotoperiodo completo de sincronización se sustituye por dos pulsos discretos de luz presentados en las fases de transición de iluminación (es decir las del encendido y apagado de las luces), se denomina fotoperiodo esqueleto (FE) (Aguilar-Robledo; 1993).

El fotoperiodo esqueleto puede sincronizar a los organismos a ciclos de luz de unas cuantas horas o de minutos. Además, algunos autores como Pittendrigh (1981b) creen que el fotoperiodo completo es la suma de dos efectos discretos asociados con su principio y fin.

Cuando un ritmo está sincronizado a una señal ambiental, mantiene una diferencia constante (Ψ) a un punto de referencia del sincronizador (o fase) que pueden ser las luces de encendido y apagado (Aschoff, 1960).

La sincronización y el tiempo necesario para que esta se realice, depende tanto de la fuerza de la señal como de la sensibilidad del organismo a dicha señal. Las oscilaciones pueden ser sincronizadas a periodos cíclicos que se desvían de su periodo "natural" pero dentro de ciertos límites. Estas frecuencias límites es lo que se denomina "rango de sincronización". Fuera del rango de sincronización, un ritmo circadiano oscila espontáneamente con un periodo cercano al que presenta en condiciones constantes, sin embargo su frecuencia es modulada por la señal sincronizadora débil a través del cual cruza, un fenómeno llamado "coordinación relativa" (Aschoff, 1981).

1.2.4. Coordinación relativa.

Para que un sincronizador sea efectivo debe enviar una señal lo suficientemente fuerte para que produzca sincronización, lo que también implica que el organismo debe ser lo suficientemente sensible a ese estímulo (Aschoff, 1960); pero se ha visto que en algunos casos el ciclo ambiental no es lo suficientemente fuerte para sincronizar un ritmo, sin embargo puede ejercer alguna fase de control; así dos osciladores interactuaran con cierta relación de fase si estos están débilmente acoplados, llegando a presentarse el fenómeno de "coordinación relativa". También es necesario mencionar que se ha considerado la sincronización de un sistema circadiano en términos de su marcapaso; esto es, que el oscilador primario es el que responde directamente a señales externas y su relación de fase con el mundo exterior es el principal determinante de la fase del resto del sistema que conduce (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.2.5. Enmascaramiento

Se puede dar el caso también que ciertas condiciones experimentales, o señales ambientales pueden llegar a obscurecer el mecanismo real del sincronizador actuando

sobre los sistemas efectores del ritmo manifiesto sin llegar a afectar el reloj circadiano. A este fenómeno se le conoce como enmascaramiento, lo cual no es más que una sincronización aparente, ya que cuando la señal ambiental es eliminada, el ritmo adapta su oscilación espontánea desde la fase determinada por el reloj circadiano, y no por la del ciclo ambiental (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.2.6. Post-efectos

Algunas veces, los eventos que imponen un periodo en el reloj circadiano pueden alterar las propiedades del reloj, lo cual es útil en la sincronización, sin embargo cuando se coloca a un organismo en condiciones constantes, sus ritmos en oscilación espontánea pueden ser influenciados por las condiciones a las cuales el animal fue previamente sujeto. Este fenómeno fue descubierto en 1960 por Pittendrigh y le denominó "post efecto" (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.2.7. Compensación de la temperatura

Se ha propuesto que el reloj que conduce a los ritmos circadianos es un tipo de oscilador bioquímico (Palmer, 1976) sin embargo; la mayoría de los procesos bioquímicos doblan o triplican su velocidad cada vez que se aumenta 10°C en temperatura (esto es Q_{10}=2-3). Si el reloj circadiano dependiera de un proceso metabólico tan simple como este, el organismo mediría el tiempo incorrectamente cuando la temperatura ambiental sufriera un cambio dentro de los intervalos de tolerancia del organismo. A pesar de esto, en la mayoría de especies la velocidad del periodo de los ritmos circadianos antes y después de un incremento de 10°C está en el intervalo de 0.85 a 1.3 ($Q10 \approx 1$), como resultado de una compensación a la temperatura. Este fenómeno permite que la medición del tiempo por los organismos pueda realizarse con precisión en ciclos sucesivos sin importar los cambios térmicos ambientales. Es necesario apuntar que el mecanismo mediante el cual se compensa la temperatura es poco comprendido (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.2.8. Múltiples osciladores

Muchos de los procesos fisiológicos en organismos unicelulares son rítmicos, lo que demuestra que este nivel de organización es suficiente para la expresión de comportamiento rítmico; además estos organismos exhiben simultáneamente distintos

ritmos, lo que conduce a pensar que si es solamente un reloj el que conduce todos los ritmos o si cada ritmo tiene su propio reloj; condición que también se da en los organismos multicelulares (Palmer, 1976; Dunlap, 1999).

Así, aunque a veces el sistema circadiano se comporta como un oscilador, frecuentemente consiste de osciladores múltiples que son acoplados uno con otro con fuerza variable, que difieren en su poder para producir oscilaciones autosostenidas, y que pueden ser organizados en un orden jerárquico. De aquí la existencia de "osciladores maestros" (o marcapasos) que controlan el sistema multioscilador por acoplamiento mutuo por sincronización de señales ambientales (Aschoff, 1981).

Una de las primeras indicaciones de osciladores múltiples fue la "separación" (del vocablo inglés "splitting") de los patrones de actividad en uno o más compontentes en algunos organismos observados por Pittendrigh en 1960, en donde cada uno de los componentes osciló libremente con un periodo diferente. Esta separación en los componentes de los patrones de actividad ha sido observado especialmente cuando hay un cambio en la intensidad en la iluminación contínua (Pittendrigh, 1981b).

Hasta el momento hay tres tipos de evidencia que pueden confirmar la teoría de la existencia de más de un oscilador en un individuo. Primero, el sistema circadiano consta de dos o más osciladores, cada uno capaz de generar ritmo circadiano autosostenido. Segundo, estos osciladores potencialmente independientes están sincronizados entre si estando o no el organismo en un ambiente periódico. Los osciladores deben estar acoplados internamente por mecanismos lo suficientemente fuertes para mantener la sincronía. Tercero, cada oscilador está normalmente sincronizado a ciertos ciclos ambientales específicos, así que debe haber transductores que conviertan la señal ambiental a señales biológicas que puedan sincronizar cada oscilador (Moore-Ede, *et al*; 1982).

Pittendrigh y Daan (1976) mostraron un ejemplo de lo anterior, ya que notaron que algunos organismos colocados en ciclos de luz-oscuridad a veces exhiben dos picos de actividad, uno al encendido de las luces (denominado M - mañana) y otra al apagado (denominado T - tarde). Estos componentes pueden ser separados bajo condiciones constantes. Se ha propuesto que el marcapasos circadiano está compuesto de dos osciladores (M y T) los cuales responden diferente a cambios en la intensidad de la luz.

Además se sugiere que el comportamiento de separación de componentes puede estar presente en diferentes especies (Moore-Ede, *et al*; 1982 y Pittendrigh, 1981b).

También se debe señalar que para algunos autores como Pittendrigh y Aschoff, el reloj biológico se refiere a estructuras orgánicas que funcionarían como marcapasos capaces de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos, mientras que para otros como Halberg y Reinberg, las propiedades que definen al reloj biológico son el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos (Miranda-Anaya, 1994).

En términos generales, el concepto de reloj biológico engloba dos tipos de diferentes osciladores, aquellos identificables como entidades físicas discretas y diferenciables del resto del organismo, y aquellos que emergen como una propiedad resultante de la interacción de elementos interconectados en asas de retroalimentación negativa. La interacción de ambos sistemas oscilatorios resulta en la adaptación de los organismos a las presiones ambientales cíclicas en su nicho temporal.

1.3. Ritmos en crustáceos

La importancia de la estructura rítmica del tiempo en organismos desde unicelulares hasta los multicelulares, ha sido demostrada repetidamente a todos los niveles de organización funcional como una adaptación a los parámetros cíclicos del ambiente. Los ritmos biológicos se componen por lo tanto de un marcapasos endógeno fisiológico, el cual genera la frecuencia básica, acoplada con el ciclo ambiental el cual ajusta la fase del reloj interno al tiempo local. A pesar de la importancia de la medición del tiempo en animales, aún no se conocen totalmente sus mecanismos y su significado ecológico en crustáceos.

Los crustáceos son uno de los grupos más grandes sobre la tierra en número de especies e individuos, así como uno de los más diversos en comportamiento, muy bien adaptados a sus diferentes hábitats y altamente especializados, que van desde aguas tropicales hasta árticas, océanos, estuarios, agua dulce o hábitats terrestres.

Hasta el momento la información de los relojes biológicos en crustáceos es limitada debido a varios factores como la pequeña talla de algunos, hábitats relativamente inaccesibles, y la complejidad extrema del ciclo ambiental, lo que resulta en salidas

biológicas ruidosas, y la fragilidad de muchos crustáceos bajo condiciones de laboratorio durante largo tiempo. Sin embargo, existen algunas revisiones que incluyen ciertos aspectos de la ritmicidad en crustáceos, en donde se ha confirmado la tesis de que los marcapasos biológicos operan funciones rítmicas en estos organismos.

En crustáceos ha sido difícil identificar directamente un reloj aislado (*in vitro*) sin embargo estos han sido estudiados a través de medios indirectos, usando salidas rítmicas para estudiar las propiedades del reloj. Las funciones más estudiadas en cuanto a relojes biológicos en crustáceos son: de comportamiento (reproducción), sensibilidad visual, y actividad locomotora.

DeCoursey (1983), menciona que los ritmos mejor estudiados en crustáceos son los reproductivos, y para decápodos son los de actividad locomotora. Entre los crustáceos de agua dulce están principalmente los de acociles (Page y Larimer, 1972; Miranda-Anaya, 1994; Fanjul-Moles, *et al*, 1996; Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fanjul-Moles, 1998).

Brown (1983), hace una recopilación en cuanto a ritmos en crustáceos, mencionando que uno de los primeros ritmos estudiados fue el cambio de color (tanto con fotoperiodo completo como en condiciones constantes) del integumento de organismos como acociles y cangrejos del género *Uca*, haciendo énfasis en la desaparición de este ritmo por la eliminación de los pedúnculos oculares, determinado a estos por lo tanto como centros rítmicos que llevan a cabo esta función por medio de la liberación de hormonas.

Otro de los ritmos estudiados en crustáceos de agua dulce es el de la migración de pigmentos retinales en cangrejos, en donde se observó que el pigmento retinal se expande durante el día y se contrae durante la noche. Se ha propuesto también que un mecanismo hormonal regula los pigmentos retinales ya que no se ha demostrado la existencia de fibras de nervios eferentes hacia ellos (Brown, 1983; Aréchiga, *et al;* 1992).

Entre otros ritmos investigados se encuentran las tasas metabólicas de algunos cangrejos, como es la aceleración del corazón en fase nocturna, cambio del pH de músculos e hígado, consumo de O_2, etcétera, postulándose con estos estudios la existencia de un ritmo general en el metabolismo y reforzando la hipótesis de la existencia de ciclos diarios, lunares y mensuales en la tasa metabólica, algunos de origen exógeno que constituyen el sistema marcapasos para las ritmicidades endógenas persistentes (Brown, 1983).

Así poco a poco, el foco de atención para los estudios sobre el control del ritmo en crustáceos decápodos se fue centrando en el sistema neuroendócrino del pedúnculo ocular ya que muchos autores han registrado la desaparición del ritmo de actividad locomotora después de la ablación del pedúnculo óptico. Bliss en 1962 detectó que en un cangrejo del género *Gecarcinus sp* después de la ablación peduncular; el ritmo persistió, pero con un cambio dramático en el periodo, lo que ha sugerido que la perdida de ritmicidad reportada puede ser aparente, a menos que se utilicen los métodos adecuados para detectar posibles cambios en la frecuencia. Naylor y Williams (1968) mencionan que en experimentos que involucran eliminación de los pedúnculos se debe distinguir entre los efectos post-quirúrgicos y los efectos sobre un posible mecanismo de control rítmico o mediador y que además el decremento en el nivel de actividad en decápodos sin pedúnculos puede también relacionarse a diferencias en el lapso del tiempo entre la ablación y el registro de actividad.

Naylor y Williams (1968) también menciona que algunos reportes pueden llegar a ser contradictorios, ya que mientras algunos autores mencionan un incremento en la actividad (*e.g.* Género *Cambarus*), otros reportan el cese de esta (*Potamobius*, *Trichodactylus*, *Uca* y *Carcinus*) causada por la ablación de pedúnculos.

Muchos otros autores sugieren que un reloj biológico controla el ritmo de actividad locomotora en cangrejos del Género *Gecarcinus*, sin embargo se tienen dos teorías: que una vez removido el pedúnculo otro centro rítmico asume el control o bien que existen varios relojes biológicos que no residen dentro de los pedúnculos. Aunque la generalidad, en lo que todos los autores están de acuerdo, es que se presenta una pérdida de ritmicidad después de la ablación de pedúnculos (para *Cambarus*, *Uca* y *Trichodactylus*). Lo anterior sugiere que el mecanismo hormonal del pedúnculo es al menos un mediador, si no un reloj autónomo involucrado en el control de la actividad locomotora rítmica. Los experimentos de ablación de pedúnculos a cangrejos del Género *Gecarcinus* llevados a cabo por Bliss y reportados por Naylor y Williams (1968), no solamente afectaron el ritmo locomotor, si no que también precipitaron la muda, ya que el sistema neuroendócrino que la inhibe está presente en pedúnculos.

Page y Larimer en 1972 observaron que el acocil *Procambarus clarkii* en un ciclo de luz (LO 12:12) exhibe un ritmo de actividad locomotor bimodal, con una actividad máxima en el pico de "encendido de luces", mientras que el otro pico denominado de

"apagado" ocurre poco después del apagado de las luces. Así también observaron que al colocar a los organismos en oscuridad constante, estos animales mantienen una oscilación unimodal del ritmo circadiano, que involucra actividad en el pico de "apagado de luces" lo que implica un mecanismo endógeno ("reloj biológico").

Los mismos autores, al eliminar, las omatidias de ambos ojos, o de la sección bilateral de los lóbulos ópticos entre la lámina ganglionaris y la médula externa, observaron la supresión del pico de "encendido de luces" pero no afectó la sincronización de la respuesta de "apagado de luces", lo que implica que no se requiere para la sincronización del ritmo circadiano, así mismo, determinaron que la ablación del ganglio caudal y la retina no eliminan la sincronización, por lo que propusieron que el acocil tiene fotorreceptores extraretinianos los cuales proveen suficientes vías de sincronización para las señales ambientales.

Un número de observaciones indirectas sugieren que los elementos hormonales localizados en el pedúnculo están involucrados en el ritmo locomotor, más específicamente en el complejo glándula sinusal – órgano-x (Page y Larimer, 1972).

Aréchiga *et al* en 1992 hace énfasis que en crustáceos decápodos se han localizado por medio de ablaciones dos órganos principales generadores de tiempo circadíano: pedúnculo óptico y ganglio supraesofágico. La ablación del pedúnculo óptico suprime los ritmos circadianos de locomoción además de otras funciones, ya que estas están influenciadas por las hormonas que libera el pedúnculo, y particularmente la glándula sinusal – órgano-x, el cual sintetiza, almacena y libera hormonas. Sin embargo, este autor subraya que no se ha podido establecer exactamente el papel del pedúnculo óptico como marcapasos a pesar de la presencia de ritmo endógeno en aislamiento. Por otra parte cada pedúnculo óptico está conectado al ganglio supraesofágico, vía tractos cerebrales derecho e izquierdo, por lo que se cree que este ganglio funciona como integrador del ritmo circadiano.

La luz es el principal agente sincronizador de la locomoción; en donde las motoneuronas involucradas en el movimiento están bajo la influencia modulatoria de agentes neurohumorales que realzan o suprimen su actividad, particularmente de la hormona neurodepresora producida principalmente por el pedúnculo óptico (Aréchiga, *et. al.*, 1992).

Se han hecho también algunas investigaciones a cerca del mecanismo de los ritmos circadianos durante la ontogenia mediante el estudio de diferentes estadíos de desarrollo del acocil *Procambarus clarkii*, observando los cambios en los principales componentes del sistema circadiano (marcapasos, vías para el ritmo manifiesto y elementos que participan en la sincronización); estos estudios revelaron actividad rítmica en el acocil, los cuales demostraron la presencia de un marcapasos funcional capaz de sincronizar a la luz desde la eclosión; evidenciando que la fuerza de acoplamiento entre el ritmo y la señal ambiental incrementa con la edad (Fanjul-Moles, *et al,* 1996; Fanjul, 1998).

En experimentos que involucraron ablación de retina se observó que las respuestas circadianas tanto a luz blanca como a la monocromática en acociles jóvenes son mediadas por fotorreceptores extrarretinianos (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997).

1.4. Biología de la especie (*Pseudothelphusa americana*)

Los crustáceos son artrópodos de respiración branquial. El carácter fundamental de los Crustáceos es que tienen el tegumento muy consistente, el cual en ciertas especies, adquiere una dureza muy acentuada, porque la cubierta de quitina está incrustada de sales calcáreas y forma una verdadera costra, a lo que deben el nombre. Su cabeza está formada por cinco somitas: anténulas (o primeras antenas), antenal (o segundas antenas), mandibular maxílulas (o primeras maxilas) y maxilar (o segundas maxilas). (Rioja *et al,* 1975).

El Orden Decápoda agrupa a crustáceos como camarones, langostas y cangrejos, en los cuales el caparazón cubre a las regiones cefálica y torácica, formando el cefalotórax el cual se extiende lateralmente para formar las cámaras branquiales.

Los decápodos son predominantemente marinos (89%), pero han invadido ambientes dulceacuícolas (10%) y terrestres (1%) por medio de diversas adaptaciones. Los adultos en su mayoría son organismos bentónicos que viven sobre el sustrato, protegidos por rocas o vegetación, formando la epifauna, pero también pueden vivir enterrados en el sedimento (infauna), dentro de otros organismos como comensales (*e.g.* esponjas, ostiones) o perforar hoyos en sustratos duros como coral (criptofauna). Otra porción significativa de los decápodos se pueden clasificar como formas pelágicas y en algunos casos como batipelágicas. Desde luego, la gran mayoría de las fases larvarias no son bentónicas, desplazándose activamente por la columna de agua.

El orden Decápoda se divide en dos subórdenes: Dendrobranchiata y Pleocyemata; en este último se encuentran los camarones, langostas, acociles y cangrejos anomuros y verdaderos. Los cangrejos braquiuros (o cangrejos verdaderos), tienen el primer par de pereiópodos quelado y más desarrollado que los restantes, el abdomen es reducido, simétrico y totalmente flexionado sobre la superficie ventral de tórax (Álvarez *et. al.*, 1996).

Los cangrejos braquiuros de agua dulce del continente americano pertenecen a dos familias: Pseudothelphusidae y Trichodactylidae. Las dos familias son distinguibles por la forma del caparazón; en los pseudotelfúsidos es más ancho que largo con dientes anterolaterales muy reducidos o ausentes, mientras que el de los tricodactílidos es de redondeado a hexagonal con espinas anterolaterales bien formadas (Álvarez y Villalobos, 1997).

Los cangrejos de agua dulce son comunes a lo largo de su área de distribución y representan un componente importante en los ecosistemas dulceacuícolas, por que son procesadores eficientes de materia orgánica, depredadores de pequeños invertebrados y peces; son a su vez, alimento de una gran variedad de vertebrados y huéspedes intermediarios de parásitos del hombre. No obstante, solo existen unos cuantos estudios de su ecología. En contraste, se ha publicado una vasta literatura acerca de su taxonomía, (e.g. Rodríguez y Smalley, 1969 y Álvarez y Villalobos, 1996) biogeografía y filogenia (Álvarez *et al*, 1996; Álvarez y Villalobos, 1997).

Los cangrejos de la familia Pseudothelphusidae se distribuyen en el continente americano siguiendo un patrón estrictamente neotropical. La distribución de la familia comprende desde el norte del estado de Sonora, continuándose hacia el sur por la vertiente del Pacifico hasta el eje neovolcánico, a partir del cual alcanza la costa del Golfo de México. El resto de la porción sur central de México está ocupada por estos organismos, con excepción de la Península de Yucatán. Estos cangrejos se distribuyen en Centroamérica y el norte de Sudamérica desde las Guayanas hasta Perú, incluyendo una vasta porción de la cuenca del Amazonas (Álvarez y Villalobos, 1997).

La morfología externa es uniforme en todas las especies de la familia, con excepción de las formas cavernícolas que carecen de pigmentación y ojos, y presentan una elongación de los apéndices ambulatorios. La sistemática se basa en la morfología de los genitales masculinos o gonópodos, que corresponden al primer par de apéndices

abdominales o pleópodos modificados como apéndices copuladores. Basados en estas estructuras se han reconocido más de 150 especies.

Estos cangrejos (familia Pseudothelphusidae) generalmente se encuentran debajo de rocas, a las orillas de ríos y lagos debido a que tienen cierta capacidad de realizar respiración aérea; siempre y cuando exista suficiente humedad en el ambiente. Se ha descrito la presencia de una membrana epitelial en la cámara branquial a través de la cual se lleva a cabo el intercambio de gases llamada "pseudopulmón". Esta adaptación no solo al medio dulceacuícola si no también al terrestre, ha permitido a los cangrejos pseudotelfúsidos ocupar tierras húmedas a varios cientos de metros de un cuerpo de agua (Álvarez y Villalobos, 1997).

En estas especies existe desarrollo directo, es decir, no hay etapas larvarias; de los huevecillos emergen pequeños cangrejos que permanecen en el abdomen de la hembra durante algún tiempo hasta alcanzar tallas de más de 1.6 mm de ancho de caparazón. El desarrollo abreviado o directo, es una respuesta a la necesidad de reducir la dispersión y de permanecer cerca o en el lugar de origen, puesto que mientras más se alejen de éste, las posibilidades de encontrar un lugar apropiado para establecerse disminuyen y es debido al tipo de desarrollo, cuando menos parcialmente, que las áreas de distribución de cada especie pueden ser muy reducidas: una sección de un río, una porción de orilla de un lago, una cueva, una cañada, etc. Necesariamente, una dispersión reducida o ausente conduce a la diferenciación de las poblaciones y consecuentemente a la especiación. (Álvarez y Villalobos, 1997).

1.5. Regulación neuroendócrina del pedúnculo ocular sobre los ritmos circadianos en crustáceos

Hasta el momento dos órganos han sido identificados como esenciales para el mantenimiento de los ritmos circadianos en crustáceos: el pedúnculo ocular y el ganglio supraesofágico.

El pedúnculo ocular fue el primer candidato sugerido como un sitio de generación del ritmo circadiano en crustáceos. Su ablación elimina los ritmos circadianos locomotores. Una de las razones para considerar al pedúnculo ocular como el sitio del marcapasos

circadiano es que los ritmos identificados de la posición de cromatóforos, actividad metabólica y locomoción desaparecen cuando hay ablación peduncular.

Todas estas funciones son influenciadas por hormonas que se producen en el pedúnculo ocular, el cual contiene el sistema glándula sinusal - órgano-x. Así se ha reconocido la naturaleza neurohemal de la glándula sinusal en el pedúnculo del cangrejo como resultado del descrubrimiento de su conexión a un grupo de somas neurosecretoras, referidas como el órgano-x.

Las células neurosecretoras pueden ser definidas como neuronas con terminales axonales que muestran especialización y localización para liberar sustancias a la hemolinfa.

El sistema glándula sinusal de los crustáceos es uno de los principales centros de control neuroendócrino. La glándula sinusal está ubicada en la superficie del ganglio óptico en el lado dorsal o dorso-lateral, a nivel de la médula interna, pero su posición relativa al ganglio óptico puede variar de la superficie de la médula interna al comienzo del margen entre la médula interna y la médula externa y está bien expuesta a la hemolinfa.

Las hormonas peptídicas liberadas a la circulación actúan vía otras estructuras endocrinas, en órganos blanco y tejidos. Estas vías están involucradas en procesos de muda, crecimiento, maduración sexual y metabolismo. La glándula sinusal es una fuente de hormonas que media las adaptaciones de funciones metabólicas a las condiciones ambientales. Estas funciones incluyen regulación de los niveles de azúcar en la sangre, osmorregulación; adaptación a la luz y al color del ambiente (homocromia); y quizás al mantenimiento de ritmos locomotores y mareales (Cooke y Sullivan, 1982). También es plausible la hipótesis de que este mismo órgano lleve a cabo la síntesis y liberación de sustancias neurosecretoras que podrían generar la señal del tiempo para el control circadiano (Aréchiga et al, 1992).

Existe un grupo de neuronas (órgano-x) cuyas terminales axónicas forman la glándula sinusal. Los cuerpos neuronales generan y transportan neurohormonas a la glándula sinusal, en donde las hormonas son liberadas a la sangre. Se ha establecido también que todas las actividades hormonales conocidas presentes en la glándula sinusal también están presentes en el órgano-x.

De las distintas hormonas presentes en el pedúnculo ocular destacan: la hormona concentradora del pigmento rojo (ECH, RPCH) que fue la primer hormona peptídica de crustáceo en ser aislada, actúa sobre los cromatóforos concentrándolos produciendo blanquecimiento en el tegumento de decápodos; hormona de adaptación a la luz (LAH, DRPH), que actúa en la migración del pigmento proximal y distal en la retina como respuesta a la luz, esta hormona actúa en la posición de los pigmentos retinales tanto distales como proximales y en la amplitud de los electrorretinogramas. En algunas especies también tiene efectos dispersores en melanoforos, eritroforos y leucoforos. La hormona hiperglicemica (HGH) que regula el nivel de la glucosa en la sangre. La eliminación del pedúnculo resulta en un decremento de los niveles de azúcar en la sangre.

Se ha observado que la ablación del pedúnculo, tiene como consecuencia un incremento en la actividad locomotora general, la cual es arritmica. Las inyecciones de extracto crudo de pedúnculo suprimen esta actividad (aunque también se han reportado efectos opuestos), lo que sugiere que existe un factor neurodepresor (hormona neurodepresora - NDH) liberado de la glándula sinusal aislada de acocil.

En particular entre las hormonas presentes en la glándula sinusal están: la hormona inhibidora de la muda, la cual aparentemente viene del órgano-x, ya que su eliminación promueve la actividad del órgano-y, el cual acelera la muda que puede ser inducida por la eliminación de los pedúnculos oculares; y la hormona depresora del desarrollo gonadal, la cual inhibe la acción de células neurosecretoras del pedúnculo sobre las gónadas, lo que es indicado por la rápida maduración de las últimas que ocurre cuando el pedúnculo es eliminado, ya que se ha observado que las hembras juveniles sin pedúnculos desarrollan ovarios. Las hormonas que inhiben el ovario aparentemente se originan en la médula terminalis organo-x. Así también la eliminación de los pedúnculos de machos inmaduros de *Carcinus* resultan en una hipertrofia de la glándula androgénica y en un incremento en el desarrollo de los testículos (Cooke y Sullivan, 1982; Aréchiga y Huberman, 1980).

La siguiente figura muestra de forma esquemática la localización de los diferentes órganos neurohumorales del pedúnculo ocular de un decápodo braquiuro.

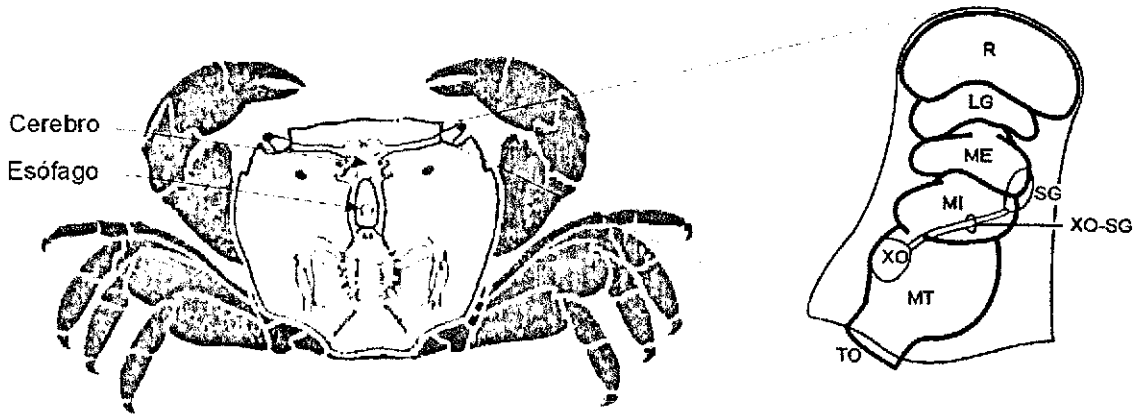


Figura 1. Pedúnculo ocular de un decápodo (Modificado de Escamilla-Chimal, 2001).
R = Retina, LG = Lámina ganglionaris; ME = Médula externa; MI = Médula interna, MT = Médula terminalis; SG = Glándula sinusal; XO-SG = Tracto órgano-x-gándula sinusal; XO = Órgano-x; TO = Tracto óptico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Muchos autores han propuesto el sistema de crustáceos como un modelo útil para examinar la fisiología de los relojes, ya que los mayores órganos postulados hasta hoy como marcapasos, receptores, sensores y transductores neurohumorales son grandes y fácilmente accesibles al interior del cerebro: los pedúnculos y los ojos. DeCoursey (1983) menciona que un grupo de investigadores (como Page y Larimer) ha señalado al ganglio supraesofágico como sitio marcapasos con foto-recepción extrarretinal para la sincronización sin embargo, otros investigadores han refutado esta idea (Fuentes-Pardo e Inclán-Rubio, 1997). Aréchiga *et al* (1992) propone (principalmente en acocil) a la glándula sinusal de los pedúnculos como el sitio oscilador primario. A lo que se ha propuesto centros osciladores múltiples circadianos en el sistema nervioso.

La actividad locomotora está claramente bajo control de un reloj en las distintas especies de crustáceos; aunque los registros son poco claros en comparación con otras especies, su actividad es exacta, no solo en frecuencia, sino en su patrón (DeCoursey, 1983).

En este estudio se considera al cangrejo de agua dulce *Pseudothelphusa americana* como un modelo de trabajo para el estudio de la participación de los pedúnculos oculares sobre el ritmo de actividad locomotora (RALM) en decápodos braquiuros, ya que esta especie presenta un ritmo de actividad más claro que otros crustáceos.

El presente trabajo por lo tanto es una nueva contribución al conocimiento de la especie *Pseudothelphusa americana*, ya que solo se ha estudiado desde el punto de vista taxonómico en descripciones de género y especie.

3. HIPÓTESIS

En estudios realizados en otros crustáceos decápodos se ha destacado la participación de estructuras del pedúnculo ocular y del ganglio supraesofágico en la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora (Page y Larimer 1972; Aréchiga *et al* 1992).

Si ambas regiones del sistema nervioso central en crustáceos están implicadas en la generación del ritmo circadiano de actividad locomotora, entonces las lesiones selectivas en pedúnculo ocular modificarán la arquitectura del ritmo y la capacidad de sincronización observada en animales intactos de la especie *Pseudothelphusa americana*.

4. OBJETIVOS

a) Describir el ritmo circadiano de actividad locomotora del cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* en oscilación espontánea obtenido en condiciones constantes de oscuridad y luz; y en fotoperiodos completo (LO 12:12) y esqueleto (FE 2:10; 2:10).

b) Describir el efecto de lesiones específicas como ablación peduncular y retinalectomía sobre la manifestación de actividad rítmica locomotora en esta especie.

c) Determinar la posible participación de estructuras contenidas en el pedúnculo ocular en la organización del sistema circadiano de la especie *Pseudothelphusa americana.*

3. HIPÓTESIS

En estudios realizados en otros crustáceos decápodos se ha destacado la participación de estructuras del pedúnculo ocular y del ganglio supraesofágico en la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora (Page y Larimer 1972; Aréchiga *et al* 1992).

Si ambas regiones del sistema nervioso central en crustáceos están implicadas en la generación del ritmo circadiano de actividad locomotora, entonces las lesiones selectivas en pedúnculo ocular modificarán la arquitectura del ritmo y la capacidad de sincronización observada en animales intactos de la especie *Pseudothelphusa americana*.

4. OBJETIVOS

a) Describir el ritmo circadiano de actividad locomotora del cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* en oscilación espontánea obtenido en condiciones constantes de oscuridad y luz; y en fotoperiodos completo (LO 12:12) y esqueleto (FE 2:10; 2:10).

b) Describir el efecto de lesiones específicas como ablación peduncular y retinalectomía sobre la manifestación de actividad rítmica locomotora en esta especie.

c) Determinar la posible participación de estructuras contenidas en el pedúnculo ocular en la organización del sistema circadiano de la especie *Pseudothelphusa americana.*

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Obtención y mantenimiento de animales

Los ejemplares fueron obtenidos del laboratorio de investigación del Dr. Baltazar Barrera M. en Mixquiahuala, Estado de Hidalgo y transportados al Laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, para ser aclimatados durante dos semanas mediante fotoperiodo natural y alimentados con carne cocida y verduras *ad libitum*. Durante la aclimatación los cangrejos fueron mantenidos en acuarios de vidrio, parcialmente llenos de agua corriente, la cual era cambiada totalmente 2 veces a la semana. El alimento fue provisto en horarios aleatorios con el fin de no generar sincronización a esta actividad. En los acuarios se usó agua corriente con cambios de la misma dos veces por semana.

5.2. Registro de la actividad locomotora

El registro de la actividad locomotora se llevó a cabo en las cámaras de ambiente controlado de la Facultad de Ciencias UNAM a una temperatura de 23 ± 2°C. En total se utilizaron 71 cangrejos adultos sin distinción de sexo, con un peso promedio de 14.52 ± 0.86 g.

Los cangrejos fueron colocados individualmente en acuarios de 30 x 10 x 11 cm equipados con fotosensores infrarrojos, conectados a un sistema de registro (PC). Los datos obtenidos, fueron acumulados en bloques (bin) de 10 minutos. Los sensores registraron el movimiento uno a la vez (Figura 2).

Un total de ocho acuarios fueron colocados cada vez en un gabinete de madera con divisiones para contener dos acuarios cada uno, acondicionados con lámparas (Phillips 150 lux) que suministraron las condiciones de luz. Los fotoperiodos (completo y esqueleto) fueron controlados mediante el uso de un interruptor programable.

El fotoperiodo completo comprendió un ciclo de luz de 12 horas seguido por uno de oscuridad con la misma duración, mientras que el fotoperiodo esqueleto se aplicó por pulsos de luz de dos horas con una separación de 10 horas uno de otro.

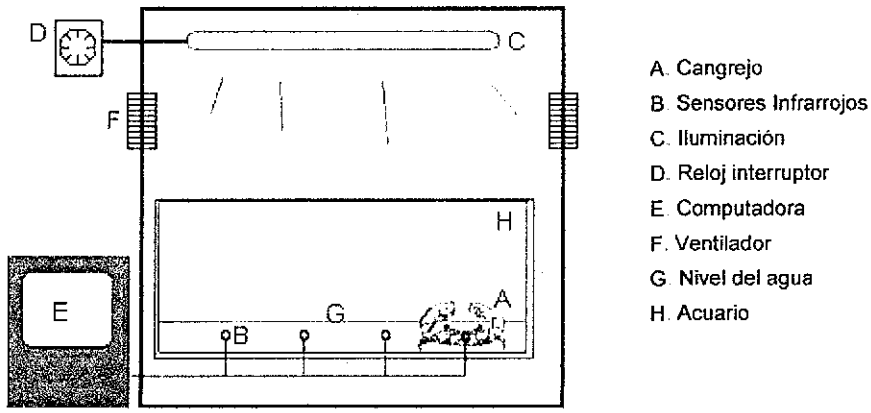


Figura 2. Dispositivo individual para el registro del RALM del cangrejo *P. americana*

5.3. Ablación peduncular

Los animales a los que se les practicó de ablación peduncular y de retina fueron anestesiados por enfriamiento, durante 15 minutos a 4°C. La ablación se llevó a cabo usando tijeras oftalmológicas. El pedúnculo fue cortado desde su base, mientras que la retina se cortó a nivel aproximado de la lámina ganglionaris (Miranda-Anaya, 1994). Para aumentar la sobrevivencia de aquellos cangrejos con ablación peduncular, se les practicó extrangulamiento del pedúnculo ocular mediante un hilo fino una semana antes de la ablación (Com. Pers. Vanegas-Pérez, 2002).

Para evitar infecciones y pérdida de hemolinfa las heridas fueron selladas con petrolato inmediatamente después del corte.

5.4. Histología

La verificación del grado de la lesión en los ejemplares con ablación de retina se llevó a cabo mediante histología de los pedúnculos experimentalmente dañados, en animales que estuvieron en registro. Los pedúnculos fueron fijados en formaldehído al 10%, deshidratados e incluidos en paraplast. Posteriormente se hicieron cortes de 6μ de espesor mediante un microtomo, los cuales fueron teñidos con azul de toluidina para posteriormente ser observados mediante un microscopio óptico (Miranda-Anaya, 1994).

5.5. Análisis de datos

Los datos obtenidos de cada registro fueron analizados mediante el uso de los programas TAU (Minimiter Co. Inc.) y Dispac (Vega, 1994), del cual se obtuvieron

actogramas de doble gráfica, y periodogramas de X^2 en intervalos de 0 a 30 horas de las distintas condiciones a que fueron sometidos los cangrejos; de igual forma se obtuvieron curvas promedio de los 5 últimos días, para cada condición con el fin de considerar el estado estable del ritmo manifiesto para cada condición. De los periodogramas obtenidos para cada registro se consideró como significativo el pico resultante que presentara valores de la varianza de cada uno de los componentes del periodo (Qp) por encima del nivel de significancia ($P<0.05$).

Del periodo resultante (± error estándar) para cada condición se graficó la curva promedio que proporciona el programa TAU, de esta, se obtuvo la fase (ϕ) del (los) picos de máxima actividad, así como la relación α/ρ; donde α representa la duración de la actividad presente sobre el nivel medio de actividad y ρ la misma debajo de dicha referencia. La Figura 3 muestra una curva de actividad representativa, en donde se observa la relación α/ρ, la fase, y la relación de fase ($+\Psi$), en donde el signo positivo indica un adelanto de la fase con respecto al encendido de las luces.

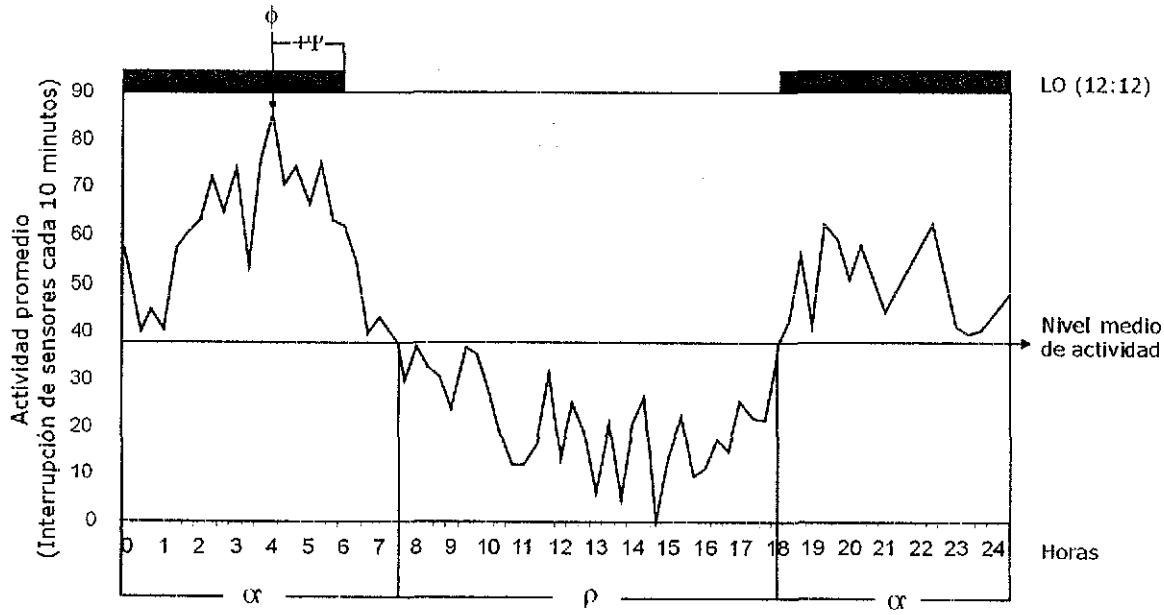


Figura 3. Curva de actividad.

Para determinar diferencias significativas entre los periodos obtenidos, post-efectos, relaciones α/ρ y número de transitorios de los grupos experimentales, se utilizaron las pruebas estadísticas: Anova, de contraste (Tukey) y *t*-student (Wayne,1995).

5.6. Diseño experimental

En el presente trabajo, cada condición a la que fueron sometidos los grupos experimentales tuvo una duración de 7 a 10 días, excepto en aquellos en donde se indica la duración precisa.

La Figura 4 muestra el método seguido para cada uno de los grupos experimentales, y las condiciones a las que fueron sometidos para obtener el registro continuo de sus movimientos.

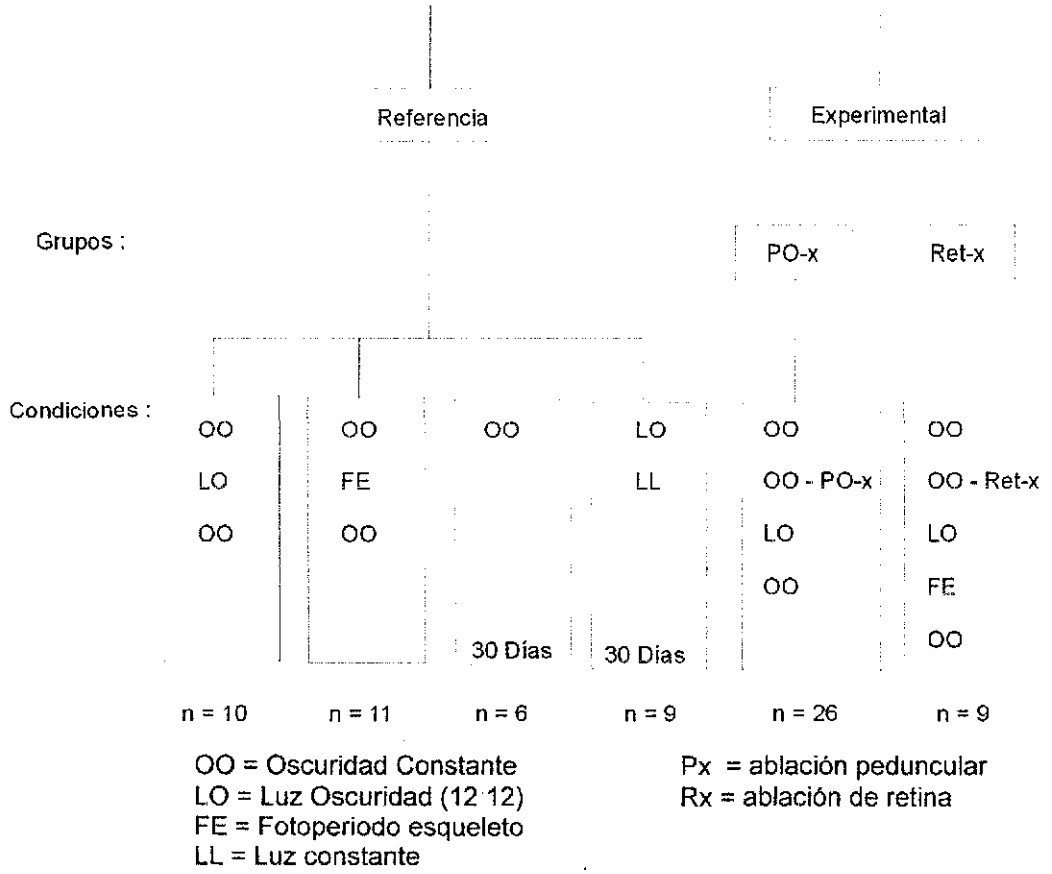


Figura 4. Diagrama de organización de los registros para los grupos control y experimental desarrollados en el presente trabajo.

5.6.1. Grupos de referencia

Fotoperiodo completo: OO - LO - OO

El presente diseño experimental se llevó a cabo con el fin de observar y analizar el ritmo de actividad locomotora en oscuridad constante (OO) así como la sincronización a fotoperiodos completos(LO 12:12; 08:20; 250 lux) en animales intactos. Se utilizaron un total de 10 cangrejos, a los que se les colocó bajo un régimen de oscuridad constante

(OO) durante al menos 10 días, después de los cuales se les aplicó un fotoperiodo de luz-oscuridad (LO), para finalmente liberarlos en OO.

Fotoperiodo esqueleto: OO – FE – OO

Para determinar la sincronización del ritmo de actividad locomotora de cangrejos intactos a un fotoperiodo esqueleto (FE), este grupo de referencia que comprendió un total de 11 cangrejos fue sometido sucesivamente a un régimen de OO, seguido de un FE (con pulsos de luz de dos horas de duración separados por 10 horas de oscuridad), para finalizar con un régimen OO.

Oscuridad constante: OO

Para observar si en animales intactos hay pérdida de ritmo de actividad después de 15 días en condiciones de oscuridad constante se colocaron 6 cangrejos en OO durante aproximadamente 30 días.

Luz constante: LO - LL

Este grupo experimental fue diseñado para conocer el efecto de la luz constante sobre el ritmo de actividad locomotora de la luz constante en esta especie. Se utilizaron un total de 9 cangrejos, que se colocaron en condiciones LO (12:12) durante 1 semana, para después someterlos a un régimen de luz constante (LL) aproximadamente durante 30 días.

5.6.2. Grupos experimentales

Ablación peduncular

Con el fin de comprobar presencia o ausencia de ritmo de actividad y su sincronización a ciclos LO y con ello determinar la posible presencia de fotorreceptores extrarretinianos en esta especie, se llevó a cabo el presente diseño experimental. Se utilizaron un total de 26 cangrejos los cuales se dispusieron en un régimen OO, después del cual se efectuó la ablación peduncular, continuando OO, al final de esta condición se continuó con LO (12:12) seguido de OO. La ablación peduncular fue hecha bajo iluminación artificial.

Ablación de retina

Para estudiar el posible papel de la retina en la expresión del ritmo de actividad locomotora con los ciclos de luz, se colocaron un total de 9 cangrejos en condiciones OO, después del cual se les cortó la retina previa anestesia con frío. Después de la lesión se continuó el registro con el régimen OO, una vez terminado se sometieron a dos fotoperiodos: el primero un fotoperiodo completo LO 12:12, seguido de un FE; para al final continuar en OO.

Se debe mencionar que la baja capacidad de sincronización presentada por *P. americana* con lesión de retina, fue un determinante para que no se llevaran a cabo experimentos de animales con ablación peduncular en ciclos de luz no-paramétrica.

Al final de los registros, se hizo la histología a los pedúnculos con lesión, como se mencionó anteriormente.

6. RESULTADOS

6.1. Animales intactos

Ritmos de actividad locomotora en oscuridad constante (OO)

El ritmo circadiano de actividad locomotora se presentó básicamente bimodal. En la figura 5 se muestran dos ejemplos típicos donde la actividad mostró un ritmo circadiano con periodo de 24 h cada uno. Debajo del periodograma correspondiente se muestra la curva promedio ajustada al periodo obtenido en el periodograma. En la figura 5a el ritmo de actividad es bimodal entre los dias 7 y 16, posteriormente la intensidad de la actividad disminuye reapareciendo con la fase esperada para el día 23. Tanto el periodograma como la curva promedio no resalta la bimodalidad del ritmo como se aprecia en la figura 5b.

En general, en esta condición (OO) la actividad locomotora fue bimodal y en algunos casos se presentaron en el mismo registro, dos o más componentes que oscilaron con periodos distintos. La figura 5b muestra que entre los días 2 y 15 un grupo de actividad mantiene un periodo de 24 h y un segundo grupo oscila con un periodo de 26 h (resaltado con líneas en el actograma). El ritmo circadiano de actividad se mantuvo durante los más de 30 días que comprendió el experimento.

El periodo promedio mostrado por este grupo (n=21), fue de 23.77 $\pm$ 0.56 horas, además mostró una relación promedio de α/ρ de 0.93 $\pm$ 0.03, lo que implica que el tiempo de actividad y descanso son cercanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

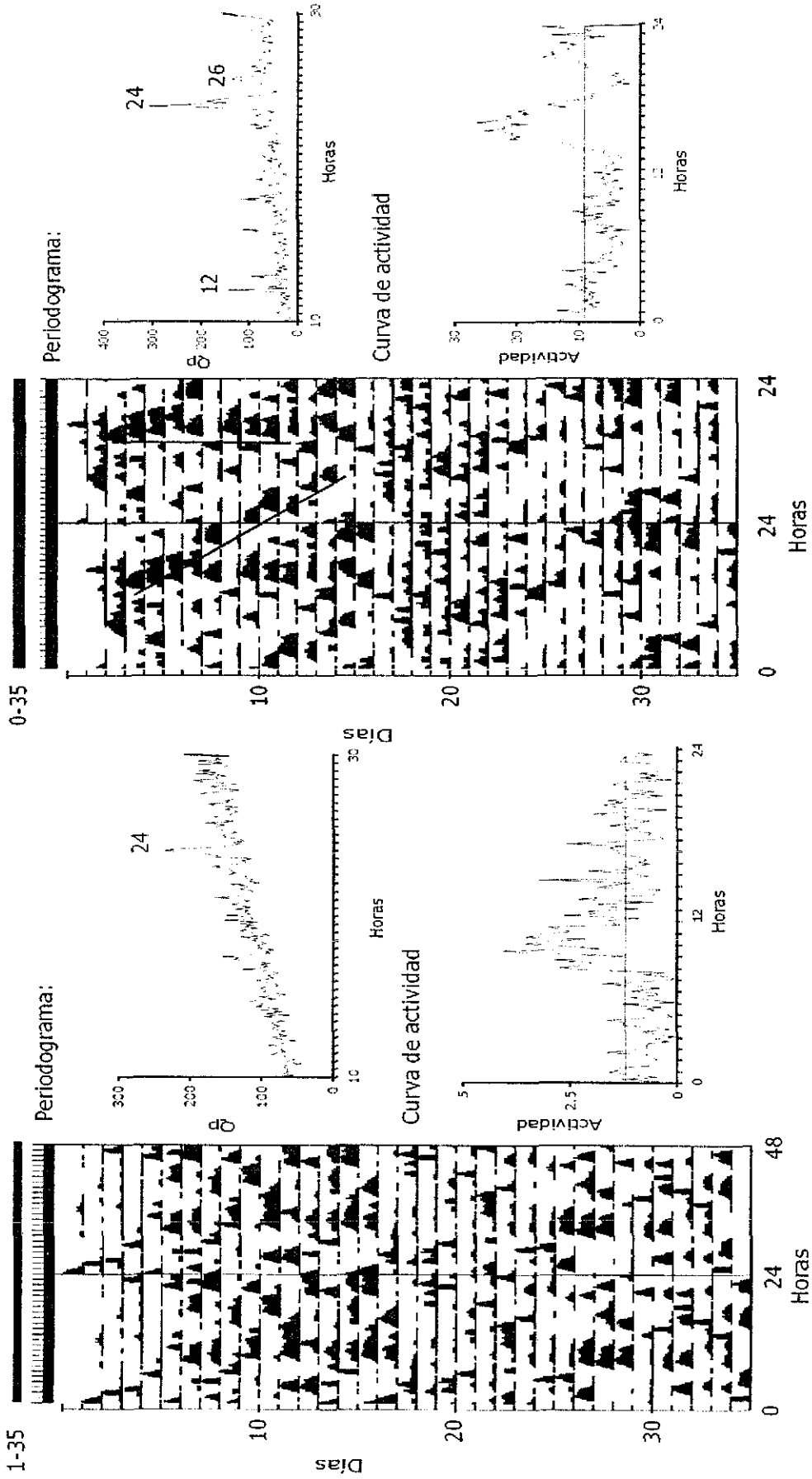


Figura 5. Ritmo de actividad locomotora en obscuridad constante.. En la figura b se muestran componentes en oscilación espontánea con distinto periodo (líneas).

Ritmos de actividad locomotora a fotoperiodos completos LO (12:12)

El ritmo de actividad locomotora mostrado por animales de este grupo fue bimodal como se observa en la Figura 6, y en algunos casos cada pico se presentó después del cambio de iluminación (Figura 6a), pero en la mayoría mostraron anticipación al cambio de iluminación (Figura 6b). En este grupo se observó una sincronización en el 74% de los casos con un τ promedio de 23.92 ± 0.11 h, mientras que el restante (26%) no logro sincronizarse, presentando un periodo largo (28.05 ± 0.15 h).

La relación de fase (Ψ) entre cada uno de los picos de actividad y el encendido y apagado de la luz fue de 7.67 ± 1.76 h y 17.0 ± 0.46 h respectivamente.

En algunos casos (n=7) se presentó un pico de actividad alrededor de media noche con una fase de 0.3 ± 0.55 h, como se observa en la Figura 6a.

El número promedio de ciclos transitorios que le tomó a este grupo para alcanzar sincronización fue de 1 a 2 ciclos. El índice α/ρ fue de 1.45 ± 0.28, lo cual determina que los periodos de actividad fueron mayores a los de reposo.

Para confirmar la sincronización a los ciclos LO, los animales fueron sometidos a OO (Figura 6a) o LL (Figura 6b), en donde en ambos se observa un claro control de fase, antes y después del cambio de condición.

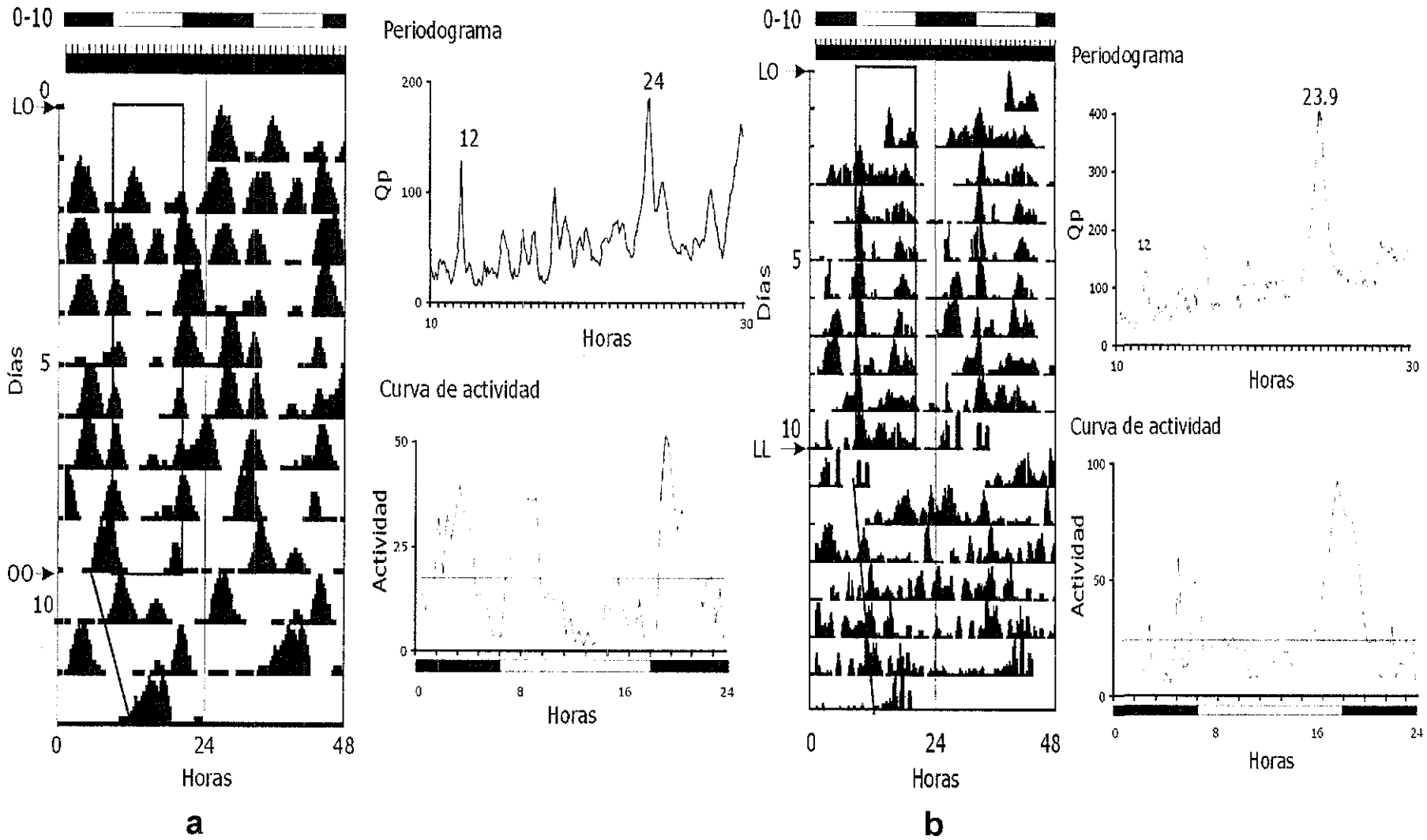


Figura 6. Respuesta bimodal del ritmo de actividad locomotora a ciclos LO (12:12), con un pico de actividad asociado al encendido de las luces. El cuadro en el actograma indica los días en que se mantuvo el fotoperiodo.

Ritmos de actividad locomotora a fotoperiodos esqueletos FE (2:10; 2:10)

La Figura 7a muestra un ejemplo representativo de la mayoría de los casos (64%) de este grupo, en donde se observó una baja capacidad de sincronización a los ciclos de FE, en donde los componentes del ritmo se mantienen con periodos distintos a los de los pulsos de luz aplicados.

La Figura 7b muestra un patrón de comportamiento de la minoría de los casos (36%) que presentaron sincronización. Durante los primeros 5 días un grupo de actividad se nota prominentemente antes del pulso de luz correspondiente al atardecer; a partir del día 6 comienza a ser notable el grupo de actividad relacionado con el primer pulso de luz. Este grupo de actividad mantiene control de fase cuando el registro continua en oscuridad total a partir del día 10.

El periodo promedio de la actividad locomotora en este grupo para los organismos que sincronizaron fue de 23.83 $\pm$ 0.28 h, mientras que fue de 28.49 $\pm$ 0.36 h para los que no lo hicieron; la relación α/ρ fue de 0.93 $\pm$ 0.14. El número de ciclos transitorios para este grupo en aquellos que alcanzaron la sincronización fue de 1 $\pm$ 1.0.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

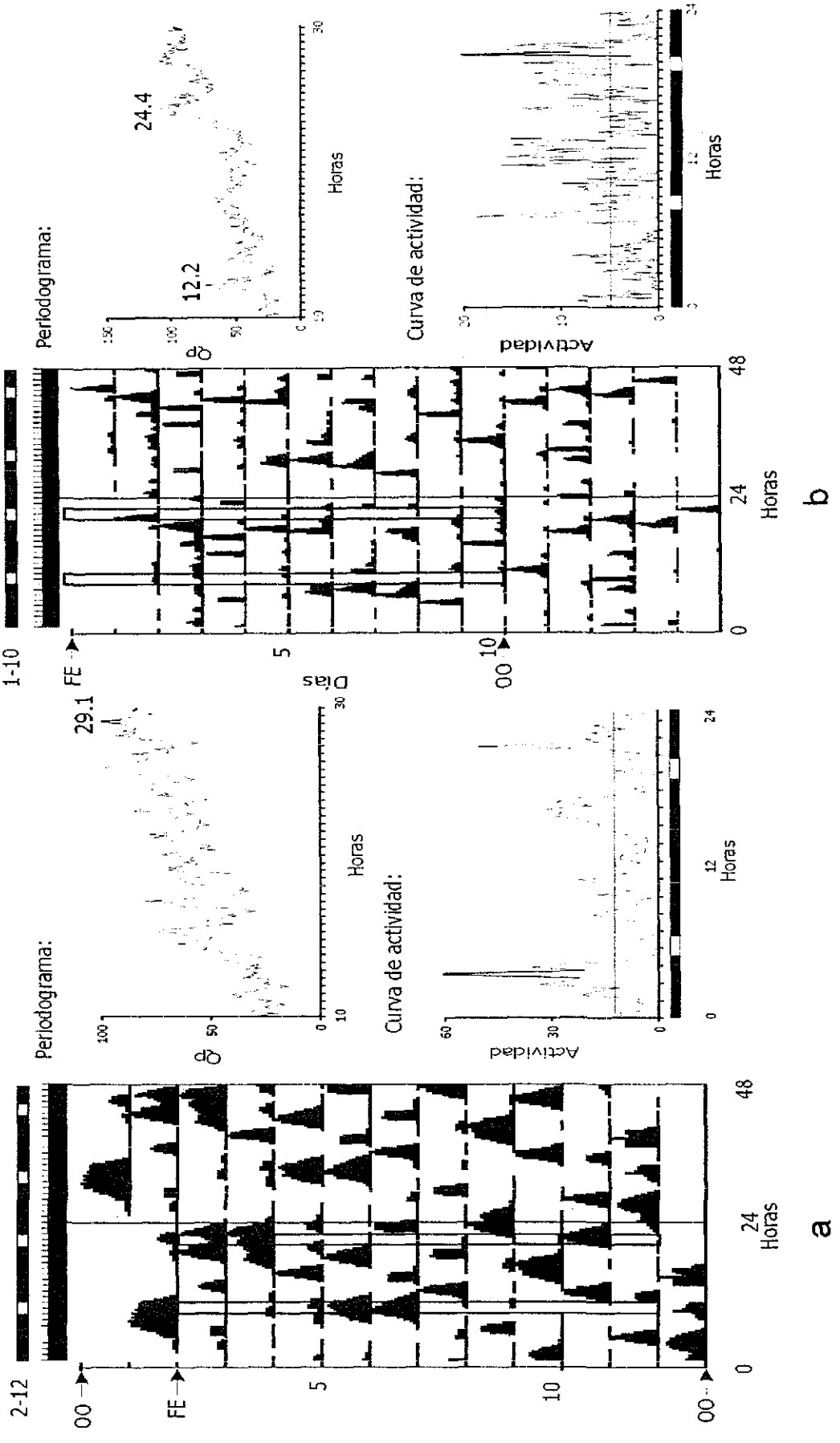


Figura 7. Respuesta de sincronización de la actividad locomotora a FE (2:10;2:10).

Ritmos de actividad locomotora a luz constante (LL)

La Figura 8a muestra que después de 10 ciclos en LO al que fue sometido este organismo, y después de presentar un ritmo bimodal, este ritmo se vuelve unimodal al entrar a un régimen LL (33% de los casos), alargando su periodo (24.6 h).

Mientras que en la figura 8b se observa que después de presentarse al comienzo del régimen LL un ritmo de actividad unimodal con periodo largo (24.9 h), se observan dos componentes en donde cada uno oscila espontáneamente con un periodo diferente, lo que se conoce como separación (o "splitting") en el 67% de los casos.

En este grupo de organismos se observó que el periodo promedio se incremento (26.13 ± 0.70 h) a comparación de los organismos en OO (23.77 ± 0.56 h).

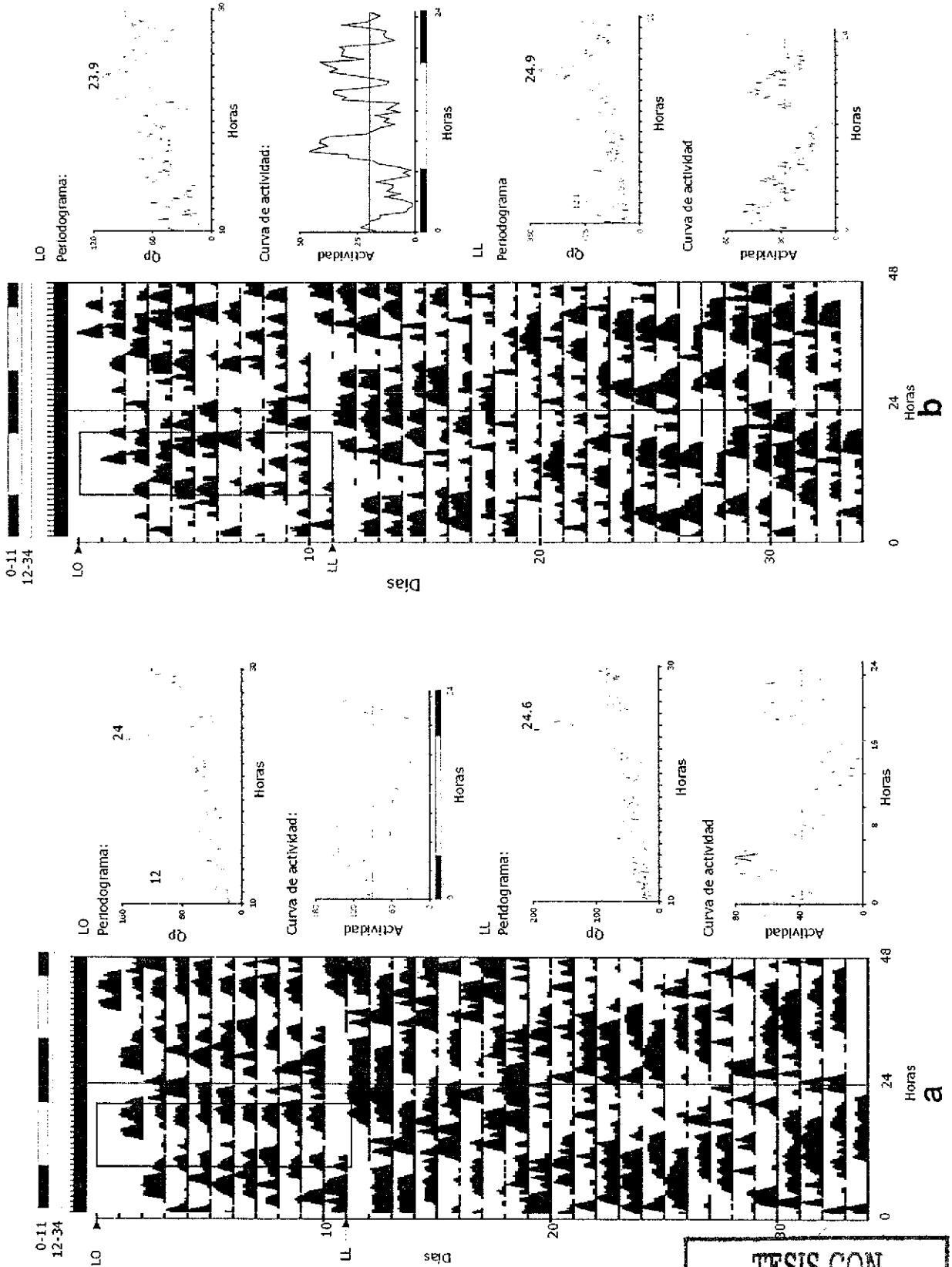


Figura 8. Respuestas a los efectos de la luz constante sobre el ritmo de actividad locomotora en *P. americana*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2. Efecto de la ablación peduncular

Ritmo de actividad locomotora de animales PO-x en OO

En la mayoría de los casos después de la ablación de los pedúnculos oculares se obtuvo actividad arrítmica en los días posteriores a la lesión; la figura 9a muestra un ejemplo en donde el ritmo en el animal intacto presenta un periodo de 22.8 h. Después de que se cortan los pedúnculos (PO-x) oculares al día 10, el ritmo pierde amplitud, pero el periodograma muestra un τ de 24.4 h.

Cuando los animales sin pedúnculo ocular se mantuvieron durante aproximadamente dos semanas antes de iniciar el registro, se observó un ritmo claro (Figura 9b), con un periodo de 26 y 29.9 h.

En general el ritmo mantuvo una fase constante y un promedio del periodo de 27.0 ± 0.75 h, encontrándose diferencias significativas con aquellos organismos intactos en OO, donde el promedio del periodo fue de 23.7 ± 0.56 h.

También se encontró que los periodos de actividad superaron a los de reposo en animales PO-x en OO, lo que se reflejó en el valor de la relación α/ρ que fue igual a 1.64 ± 0.25.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

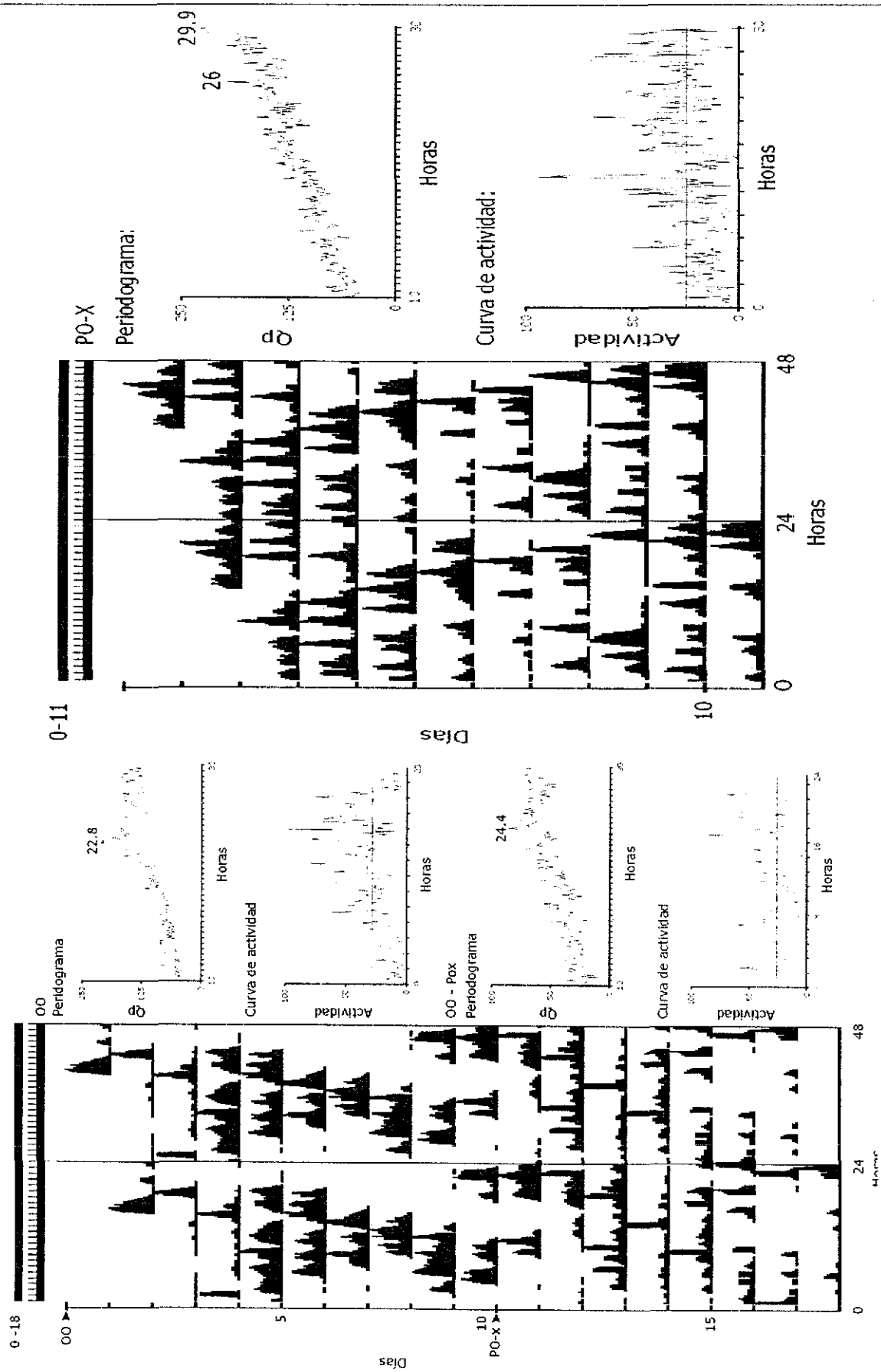


Figura 9. Ritmos de actividad locomotora en OO con ablasión peduncular.

Ritmos de actividad locomotora de animales PO-x en ciclos LO

La figura 10 muestra los dos principales patrones presentados por los organismos con ablación peduncular y sometidos a un régimen LO (n=26). En el primer caso (Figura 10a), un 81.5% de los organismos no lograron sincronizarse con el encendido y apagado de las luces; por el contrario, el ritmo se mantuvo en oscilación espontánea (τ = 26.2). Mientras que un 18.5% (Figura 10b) presentó un ritmo circadiano unimodal después de la ablación, en el cual un grupo conspicuo de actividad se adelantó a la señal de apagado de las luces, registrando una fase promedio a las 15.66 $\pm$ 2.02 hrs.

El periodo promedio para los organismos que no sincronizaron a este ciclo de luz fue de 27.41 $\pm$ 0.74 h, mientras que para los que si lograron la sincronización fue de 23.70 $\pm$ 0.42 h.

El τ promedio para este grupo fue de 26.51 $\pm$ 0.17 h, y se encontraron diferencias significativas con el grupo sin lesión. El promedio de ciclos transitorios antes de alcanzar la sincronización fue de 1 a 2 ciclos y el promedio de la relación α/ρ fue de 1.44 $\pm$ 0.28 lo que significa que en la mayoría de los casos fue mayor la actividad que el reposo.

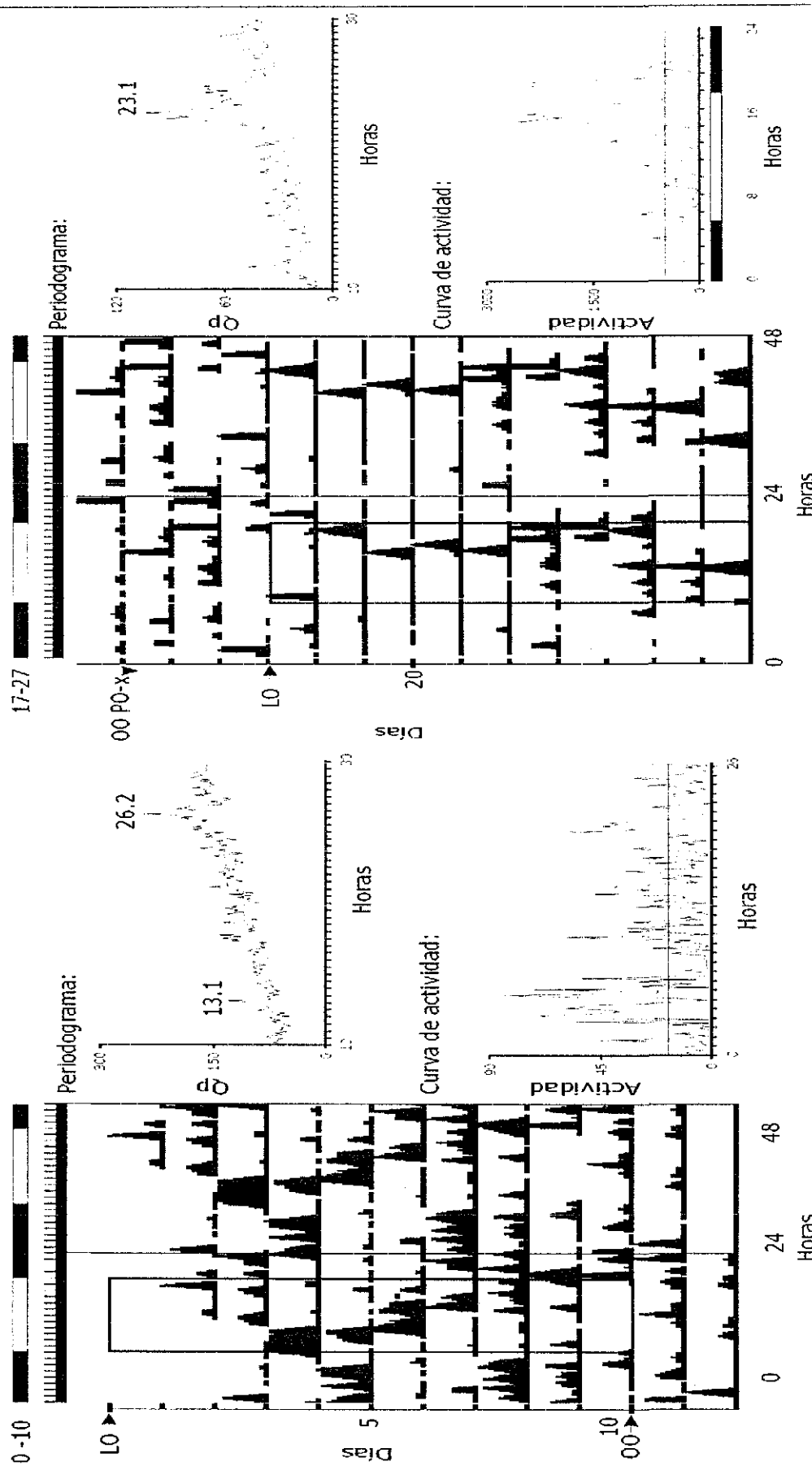


Figura 10. Ritmo de actividad locomotora en ciclos LO de animales a los que previamente se les eliminaron los pedúnculos oculares.

6.3. Efecto de la ablación de retina

Ritmos de actividad locomotora en OO

La figura 11a muestra un ejemplo del el ritmo típico bimodal presentado en OO por estos organismos (con un τ de 24 h), se transforma en unimodal después de la lesión de retina (día 10), mostrando bloques compactos de actividad con una fase bien definida, con un periodo promedio de 24.2 h.

El otro patrón de comportamiento se caracteriza por una arritmia de la actividad después de la lesión de retina en OO (Figura 11b), en donde se puede observar una baja actividad que se presenta durante el registro.

Se determinó un periodo promedio largo en los animales que mostraron ritmo significativo para este grupo, ($\tau = 26.54 \pm 0.68$ h); con una relación α/ρ de 1.30 ± 0.28.

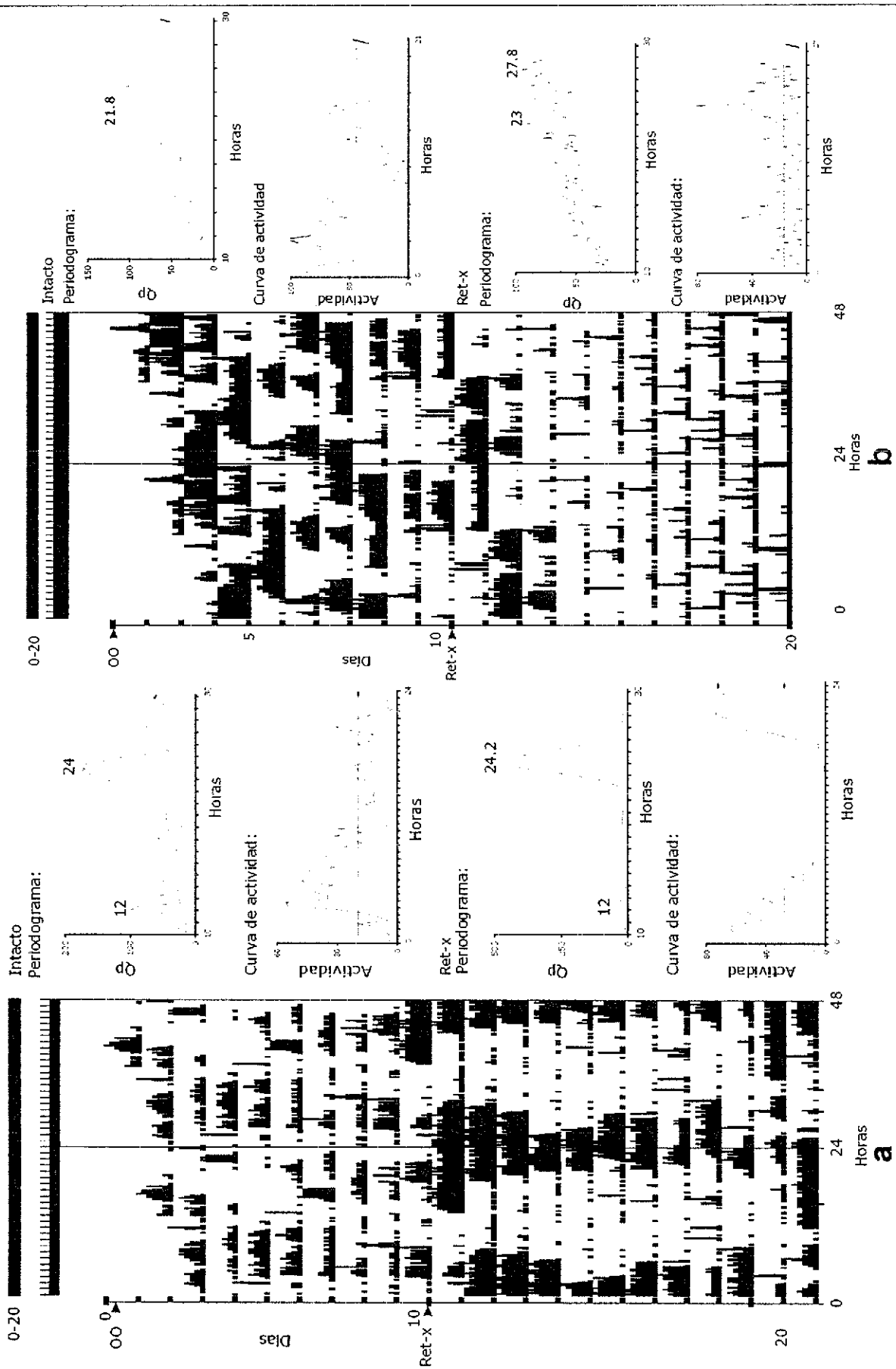


Figura 11. Ritmo de actividad locomotora en condiciones de OO antes y después de la retinalectomía (Ret-x).

Ritmos de actividad locomotora en LO en animales Ret-x

La Figura 12 presentan los dos patrones de comportamiento que también se observaron dentro de este grupo experimental.

En el primer caso (Figura 12a), después de la ablación de retina y durante la condición LO, uno de los organismos presentó coordinación relativa (τ=24.2), mostrando por lo tanto un acoplamiento débil de los bloques de actividad a la señal de luz.

En el segundo caso (Figura 12b) el efecto del régimen LO, resulta en un ritmo bimodal sincronizado (τ=24), ya que se muestra un bloque de actividad, con una fase bien definida, en donde la anticipación al encendido y apagado de la luz sugieren sincronización al fotoperiodo impuesto.

Solamente el 42% (τ promedio de 23.92 $\pm$ 0.19 h) de los organismos presentó sincronización; y requirieron de 2 a 3 ciclos transitorios para ajustar su fase con el ciclo LO; contra un 58% de los animales de este grupo que no sincronizaron (τ promedio de 25.93 $\pm$ 1.41 h)

En general el ritmo presentado por este grupo fue bimodal con un pico de actividad asociado al encendido de las luces (10.66 $\pm$ 2.02 h) y un pico de actividad a media noche (23 $\pm$ 0.57 h), y una relación α/ρ de 1.06 $\pm$ 0.08.

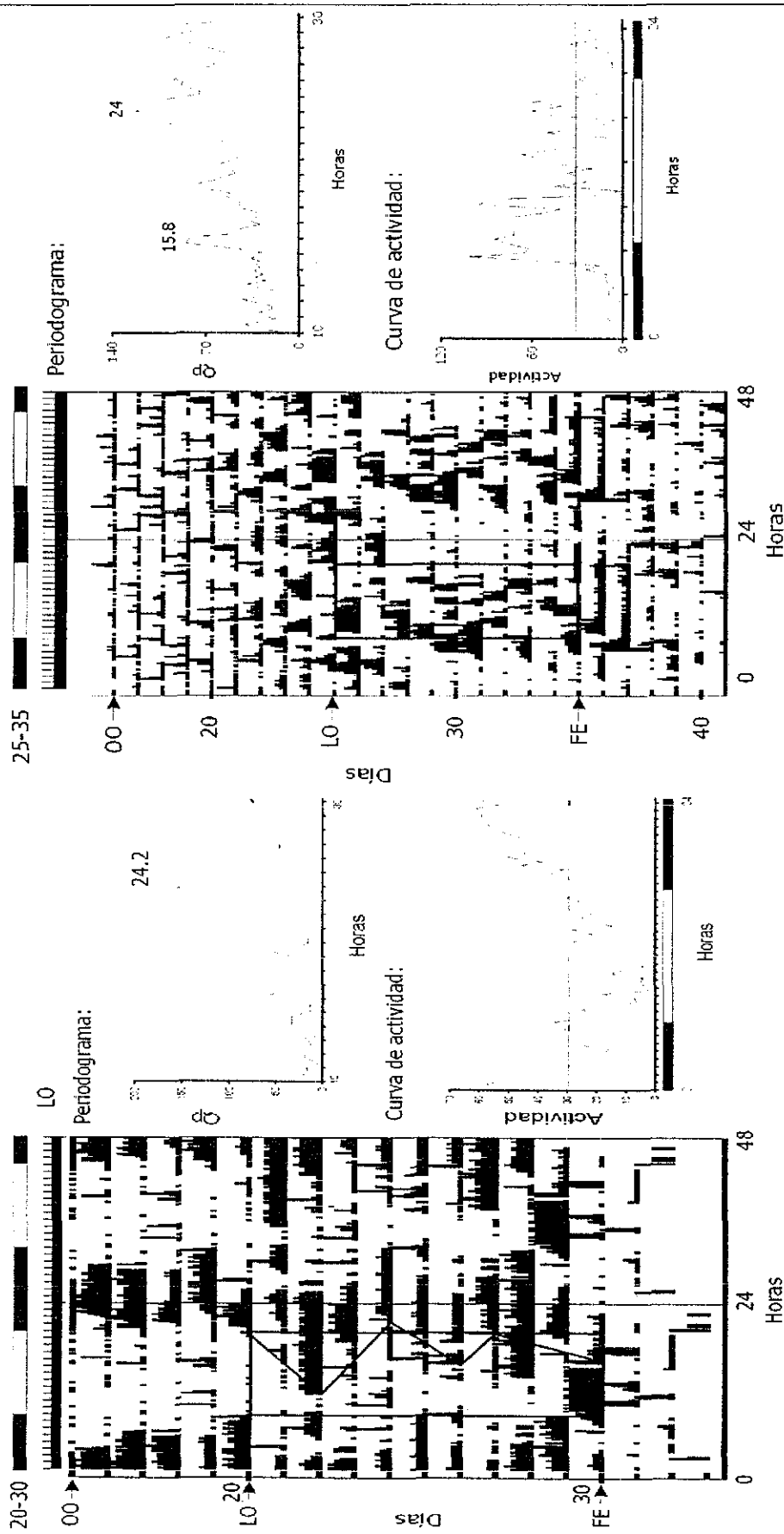


Figura 12. Efectos de LO después de la lesión Ret-x. Los periodogramas y curvas promedio corresponden solo a la condición LO.

Ritmos de actividad locomotora en FE

El grupo sometido a este régimen de iluminación, presentó una baja capacidad de sincronización, como lo muestra la Figura 13a, en donde se observan bloques de actividad que oscilan espontáneamente, con una fase definida, y con periodo corto (23.4 h).

La Figura 13b muestra uno de los casos en donde se presentó sincronización ($\tau = 24$), se puede observar en esta un pico de actividad en el pulso de atardecer, y otro durante la noche subjetiva. Se nota además un periodo de 29.6 h.

Solo algunos casos (37.5%) presentaron sincronización (periodo promedio de 23.77 ± 0.18 h) con un pulso de actividad en el encendido de las luces (9.5 ± 1.19 h) y el apagado (18.0 ± 1.0) de las mismas, tomando 1 a 2 ciclos transitorios en llegar a la fase estable. El 62.5% de los casos no sincronizaron, y presentaron un periodo promedio de 29.03 ± 0.27 h.

En general el periodo promedio para este grupo fue de 26.30 ± 1.01 h, sin presentar diferencias significativas con el grupo de referencia y una relación α/ρ de 0.93 ± 0.15; además se tuvo para este grupo un promedio total de 2.6 ciclos transitorios para llegar a la sincronización.

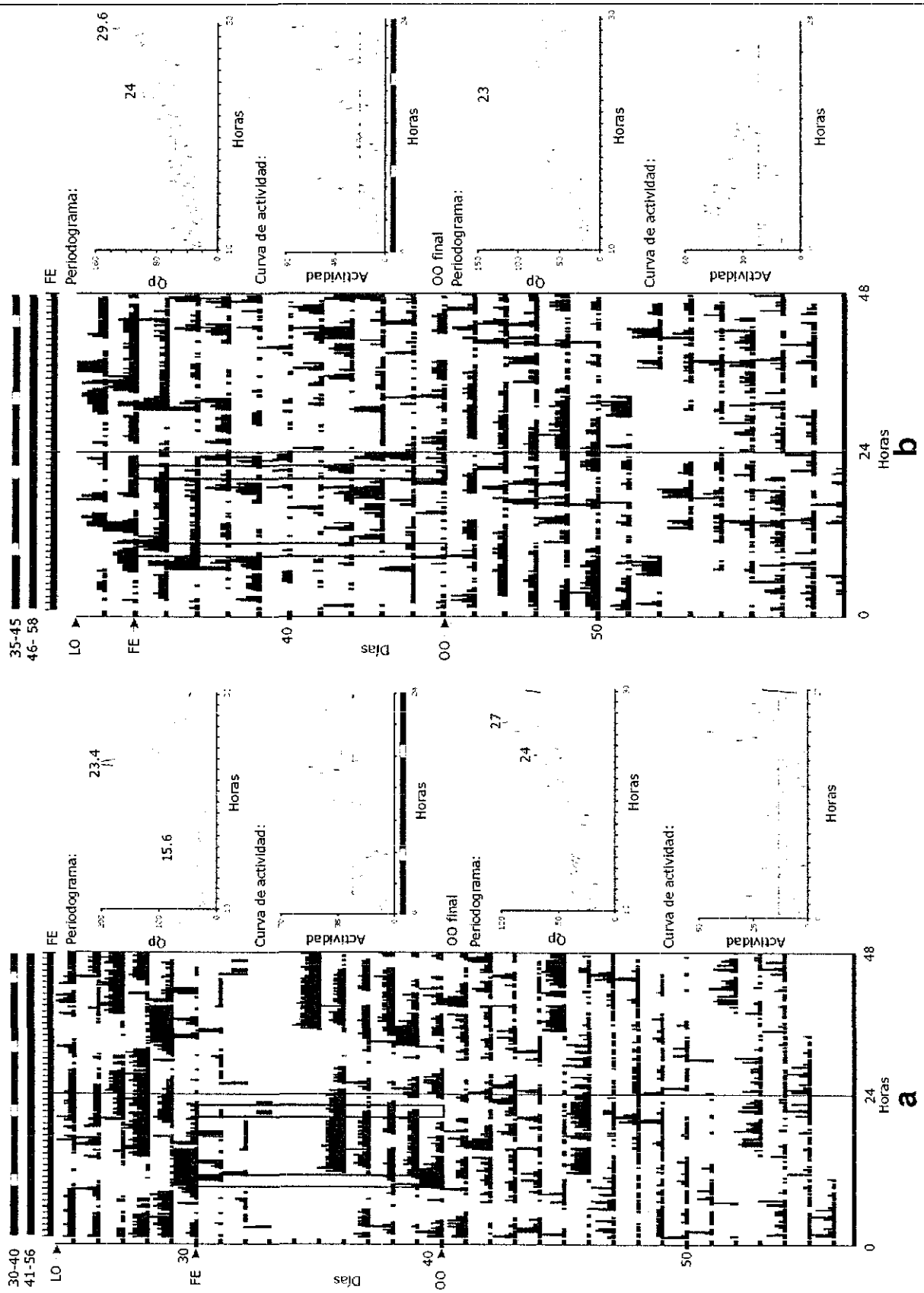
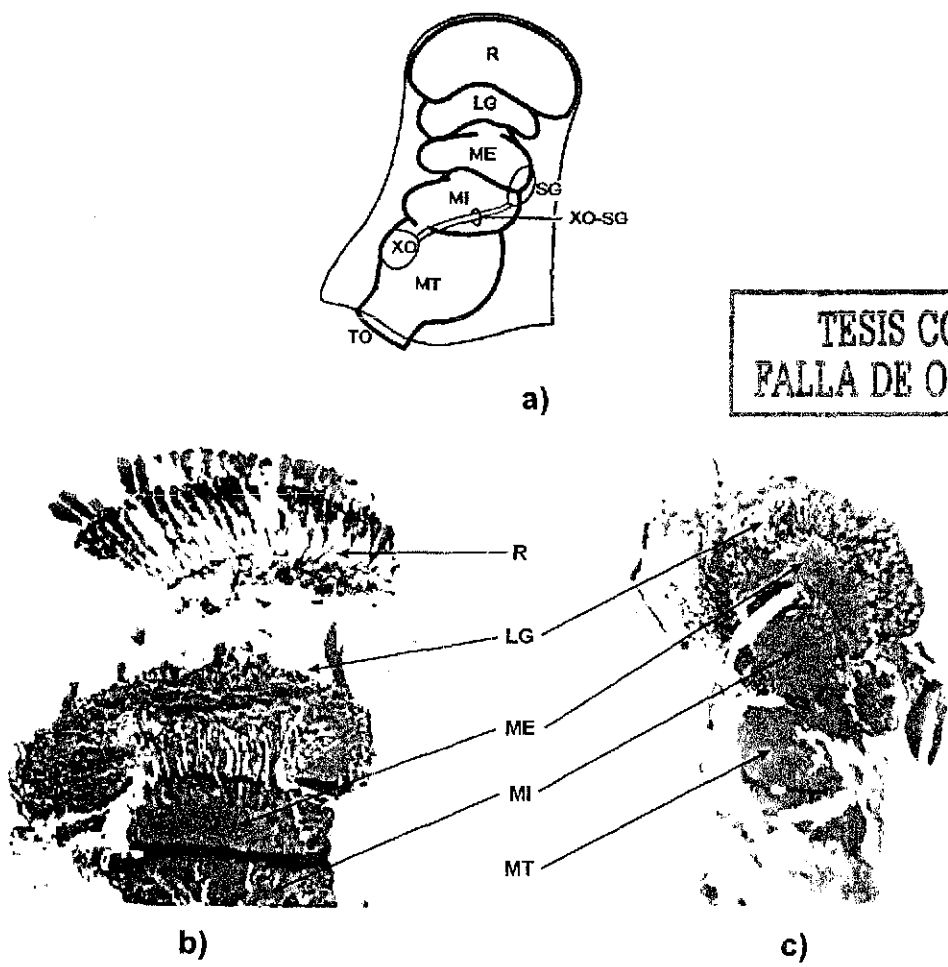


Figura 13. Efectos de FE después de la lesión Ret-x.

6.4. Histología

La Figura 14a muestra de forma esquemática la disposición de las diferentes estructuras que conforman un pedúnculo ocular sin lesión. Un corte de pedúnculo intacto puede ser observado en la figura 14b, distinguiéndose: retina, lámina ganglionaris, médula externa y médula interna. El espacio que se presenta entre retina y lámina ganglionaris es un artefacto del corte.

En la figura 14c se muestra un pedúnculo ocular al que se eliminó completamente la retina. Estos ejemplares fueron utilizados en el protocolo de lesión de retina (Ret-x). Se observa la lámina ganglionaris, medula externa, médula interna y médula terminalis.

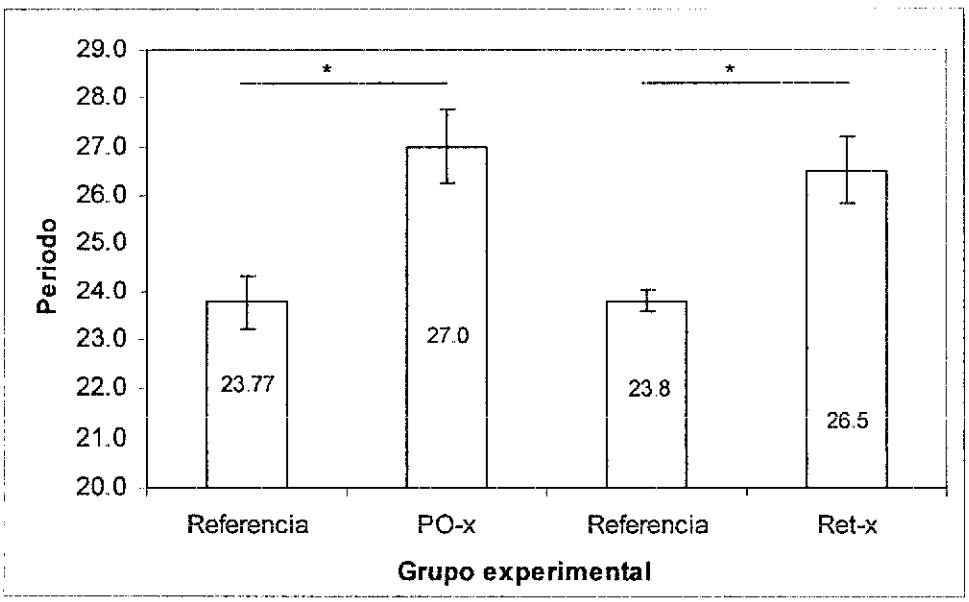


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 14. a) Esquema de un crustaceo decápodo (acocil) (Tomado de Escamilla-Chimal, 2001)
b) Corte histológico de pedúnculo ocular de *P. americana* sin lesión; c) con ablación de retina.
R = Retina; LG = Lámina ganglionaris; ME = Médula externa; MI = Médula interna;
MT = Médula terminalis; SG = Glándula sinusal, XO-SG = Tracto organo-X-gándula sinusal;
XO = Órgano-X; TO = Tracto óptico

6.5. Variación del periodo del ritmo de actividad locomotora ente los distintos grupos de animales: efecto de las lesiones

En la figura15 se presenta el promedio del periodo (± error estándar) para la condición OO inicial contra el mismo post lesión de los grupos experimentales (PO-x y Ret-x). Mediante una prueba de *t* entre grupo de referencia y los lesionados, se observaron diferencias significativas entre los datos de referencia y después de las lesiones ($p<0.05$, *t*-student). Se observa también que existió un aumento en el periodo en ambas lesiones.



(*) = diferencias significativas entre los grupos.

Figura 15. Valores promedios de periodo en OO inicial de los grupos experimentales, y comparación estadística entre estos y los de referncia por medio de pruebas de *t*.

La figura 16 muestra el porcentaje de sincronización y de no sincronización a ciclos LO de cada grupo experimental. Se observa que el porcentaje de sincronización disminuye con respecto al nivel de ablación. Un 74% del grupo de referencia (intacto) presentó sincronización (τ promedio de 23.92 ± 0.11 h), la cual disminuyó a un 42% en el grupo con retinalectomía. El grupo experimental con ablación peduncular presentó un gran porcentaje (81.5%) de ejemplares que no sincronizaron.

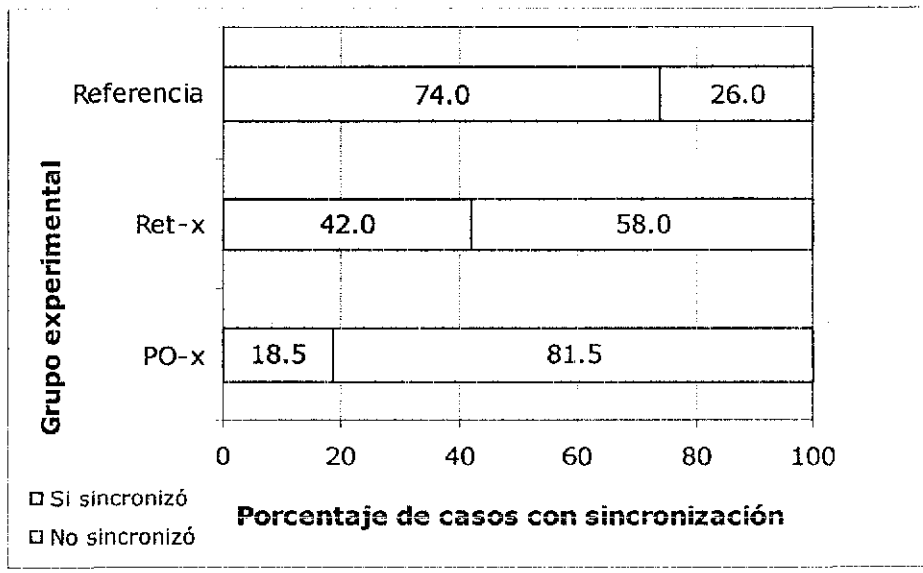


Figura 16 Porcentaje de casos en que el ritmo circadiano de los organsmos correspondientes a cada grupo experimental sincronizó al fotoperiodo completo.

La tabla 1 presenta una comparación de los periodos observados en condiciones OO iniciales y finales entre los distintos grupos de trabajo. Se aprecia la presencia de post- efectos, es decir un cambio significativo en el promedio del periodo probablemente debido a la influencia de la luz a la cual se sometió cada grupo.

Condición	OO inicial	OO final
Referencia		
LO	25.2 ± 0.65	27.4 ± 0.89*
FE	25.3 ± 0.60	26.0 ± 0.55*

Nota: (*) = diferencias significativas.

Tabla 1. Análisis del periodo del ritmo en OO: post-efectos

La tabla 2 presenta la relación α/ρ, es decir la proporción que hay entre el tiempo de actividad y descanso en un ciclo completo. Mediante pruebas de *t* solamente se determinaron diferencias significativas entre OO inicial y final en el grupo experimental *PO-x*. *Los valores obtenidos muestran un decremento en la intensidad de la actividad en* los ejemplares lesionados.

Condición	OO inicial	OO final
Referencia		
LO	0.93 ± 0.33	0.94 ± 0.05
FE	0.96 ± 0.05	0.90 ± 0.08
PO-x	1.64 ± 0.25	0.95 ± 0.17*
Ret-x	1.30 ± 0.28	0.94 ± 0.09

Nota: (*) = diferencias significativas.

Tabla 2. Relación α/ρ.

7. DISCUSIÓN

7.1. Animales intactos

Oscuridad constante

Los cangrejos de la especie *Pseudothelphusa americana* mostraron un ritmo circadiano de actividad locomotora bimodal en condiciones constantes de oscuridad (OO), cuyo periodo circadiano promedio fue de 23.77 ± 0.56 h. Aunque se ha considerado que los crustáceos de agua dulce exhiben ritmos circadianos agudos con un rango intraespecífico en OO de 23.3 a 23.6 h (DeCoursey, 1983), es necesario hacer notar que estas diferencias pueden ser consecuencia de la diversidad de peso y la edad (no conocida) de los animales usados (Aschoff, 1981; Miranda-Anaya, 1994).

Existen solamente algunos reportes para crustáceos de agua dulce en esta condición, entre los que se encuentran el ritmo de actividad locomotora en acociles (*Procambarus clarkii*) con periodos que ocilaron entre los 23.3-23.6 h (Page y Larimer, 1972), el cual a diferencia de *P. americana,* se muestra unimodal en OO. La actividad locomotora en *P. americana* presentó algunos componentes que oscilaron espontáneamente con periodos distintos, también observados en *Uca subcylindrica* (Thurman y Broghammer; 2001). El ritmo de actividad locomotora en OO se mantuvo durante más de 30 días de registro, lo que es importante, si se observan que los datos provistos por algunos autores para acocil *P. clarkii*, en donde la desaparición del ritmo se da después de aproximadamente 10 días (Page y Larimer, 1972) y para el cangrejo *Uca subcylindrica* que no sobrepasan los 19 días debido a la alta mortandad de los organismos en laboratorio (Palmer, 2000).

La forma de manifestar la actividad locomotora en crustáceos parece ser variable según el ambiente previo a su registro. Se ha reportado que al colocar individuos de *U. subcylindrica* en OO después de un tratamiento LO no se observó ritmo de actividad locomotora robusto y en cambio si se observó un ritmo débil en algunos animales el cual se perdió después de 19 días; sin embargo encontraron que al colocar estos cangrejos en OO directamente (después del ciclo LO natural, como en el presente trabajo) se detectó un ritmo circadiano en el 95% de los casos. La falta de ritmo encontrado en OO después del ciclo artificial de LO ha sido interpretada como interrupción del acoplamiento entre

osciladores endógenos y el sistema ambulatorio por los ciclos artificiales de luz o por inhibición del oscilador responsable para el ritmo en OO (Thurman y Broghammer, 2001). Para *P. americana* se observó que un 83% de los casos mostraron ritmo robusto en OO, por lo que esta especie es un buen modelo para el estudio del ritmo de actividad locomotora en crustáceos decápodos.

En cuanto a la relación α/ρ promedio, Aréchiga *et al* (1992) menciona que para el acocil *P clarkii* en OO es de 1.21, es decir la proporción de la actividad contra el descanso en un ciclo fue mayor que lo encontrado para *P. americana* (α/ρ=0.93 ± 0.33); sin embargo no hay evidencias de que estas diferencias sean estadísticamente significativas.

Ciclos de luz-oscuridad

El ritmo de actividad locomotora en este grupo fue bimodal, con inicio de actividad en anticipación al cambio de iluminación, y en algunos (71%) con actividad nocturna. Durante esta condición sincronizaron el 74%, con un τ = 23.92 ± 0.11 h.

El ritmo locomotor del acocil (*P. clarkii*), al someterse a condiciones de laboratorio bajo un fotoperiodo (LO 12:12), desplegó dos picos característicos, donde el primer pico de actividad sincronizó con el encendido de las luces (exógeno) y el segundo ocurrió después del apagado de las mismas (Page y Larimer, 1972). En el caso de *P. americana*, la actividad bimodal se presentó cuando los animales se liberaron nuevamente en OO, por lo tanto no son considerados como componentes exógenos producidos por el encendido y apagado de la luz, indicando que esta especie de cangrejo es crepuscular. Lo anterior hace suponer que cada grupo de actividad pudiera semejarse a lo observado por Pittendrigh (1981a) en su modelo propuesto de los dos osciladores M (mañana) y T (tarde).

El comportamiento de *P. americana* en LO se semejó a lo encontrado para la especie *U. subcylindrica* el cual presenta un ritmo bimodal con un pico de actividad en el encendido y un segundo pico que anticipo el apagado. Aunque estas especies tienen hábitats distintos, ninguna de las dos muestra ritmos circamareales o circalunares (con periodos de 12.4 y 24.8 h respectivamente), a pesar de que *U. subcylindrica* es un género que ha evolucionado de especies intermareales para ocupar ambientes terrestres (orillas de ríos y lagunas hipersalinas). Además, las oscilaciones se sincronizaron en las dos

especies a fotoperiodo, lo que descarta la posibilidad de que estos ritmos sean circamareales o circalunares (Thurman y Broghammer; 2001). Estos autores, mencionan que los ritmos circadianos en *U. subcylindrica* son una adaptación al hábitat terrestre, proponiendo que la presión ambiental dicta la naturaleza del sistema cronofisiológico en una especie en particular; y apoyándose en que los ritmos circadianos son prominentes en especies terrestres y de agua dulce (Aréchiga, *et al*; 1992)

En cuanto a los organismos que no mostraron sincronización a LO (26%) esto pudo deberse a que desde el inicio del registro (OO inicial) no mostraron picos o bandas de actividad definidos, y sí algunos componentes que oscilaron espontáneamente con un periodo largo. Así, esta condición fue conservada durante el registro de los animales en LO y en OO final.

Fotoperiodo esqueleto

Algunos autores (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997) muestran que el acocil juvenil *P. clarkii* es capaz de sincronizar a pulsos de luz (monocromática); en general en este trabajo se observó una baja capacidad de sincronización (64%) a ciclos FE por parte de *P. americana* que en algunos organismos podría ser debido a que la intensidad de luz provista por las lámparas no es la suficiente para tomar el control de la fase del ritmo de actividad locomotora de los animales. Hasta el momento no se conoce si en su hábitat natural, al vivir bajo rocas (Álvarez y Villalobos, 1997) reciban con suficiente intensidad la luz durante todo el día, lo que de alguna manera podría interferir en la capacidad de respuesta a pulsos de luz (FE) y sugiere que la sincronización se lleve a cabo de forma afín a los mecanismos paramétricos en lugar de los no paramétricos.

Luz-constante

En general los individuos colocados en LL mostraron un periodo largo comparado al presentado en OO, lo cual concuerda con lo descrito por algunos autores para diferentes especies (Aschoff, 1981), que mencionan que un efecto de la iluminación continua causa un cambio en el periodo, y que generalmente en especies diurnas este se acorta y se alarga en especies nocturnas, con respecto a su periodo en OO, como lo presentado en este trabajo (Figura 8).

La relación α/ρ para este grupo fue de 1.52 ± 0.20, en comparación a lo mostrado en OO (0.93 ± 0.33) lo que indica que el tiempo de actividad fue mucho mayor al tiempo de descanso en cada ciclo, lo cual no está de acuerdo con una de las reglas de Aschoff que menciona que esta relación debería disminuir en animales nocturnos.

Estos animales mostraron ritmo durante los más de 30 días en LL. Esto es importante, ya que anteriormente no habían sido reportados experimentos de esta duración en otras especies de crustáceos de agua dulce. Para *P. clarkii*, se tienen reportes que el ritmo locomotor es muy lábil y desaparece en menos de dos semanas en LL (Aréchiga *et al*, 1992). Aunque se ha mencionado que a altas intensidades de luz continua pueden causar un detenimiento total del reloj biológico (Pittendrigh, 1981a).

La separación ("splitting") de componentes observada en el 67% de los casos en el presente trabajo sugiere que el sistema circadiano de *P. americana* consiste de osciladores múltiples que son acoplados uno con otro con fuerza variable. Esto se apoya en las observaciones hechas de ritmos de diversos organismos (musarañas y hamsters) colocados en LL, en donde la banda de actividad circadiana única (unimodal) se "separa" en dos componentes que persisten con frecuencias diferentes hasta que alcanzan una antifase de 180° una de otra. Esta separación de componentes y su reacoplamiento uno con otro (0 - 180°) hace suponer que están claramente guiados por osciladores separados. (Pittendrigh, 1981b). Lo anterior indica que el efecto de la luz constante en crustáceos puede ser a nivel del acoplamiento de los osciladores, lo cual hace suponer que en *P. americana* el ritmo de actividad locomotora es consecuencia del acoplamiento de distintos osciladores.

7.2. Animales con ablación peduncular

Oscuridad constante

En la mayoría de los casos la ablación peduncular generó arritmia. Algunos autores mencionan que la pérdida del ritmo por cirugía; se debe a que se destruye el marcapasos o las vías de acceso al sistema (Pittendrigh, 1981b). En algunos animales la arritmia observada es el resultado del trauma quirúrgico, más que la eliminación del marcapasos responsable de la generación del ritmo de actividad. Sin embargo, se presenta un cambio dramático en el periodo (Naylor y Williams, 1968). Las observaciones hechas en el

presente trabajo indican lo mismo en *P. americana*, ya que cuando los animales sin pedúnculo ocular se mantuvieron en recuperación aproximadamente dos semanas antes de iniciar el registro, se observó un claro ritmo circadiano (Figura 9). En animales PO-x, se observó un aumento en la actividad (de $\alpha/\rho = 0.93 \pm 0.03$ a 1.64 ± 0.25) como en lo reportado para *Cambarus sp.* y *Procambarus sp.* donde los animales que habían sufrido ablación y habían tenido tiempo para recuperarse de la operación mostraron alta actividad continua, sugiriendo que los pedúnculos son una fuente de inhibición rítmica de la locomoción y que una ritmicidad normal es alterada o perdida por ablación peduncular, lo cual sugiere que el mecanismo hormonal del pedúnculo es al menos un mediador si no un reloj autónomo, involucrado de alguna forma no conocida en el control de actividad locomotora rítmica (Naylor y Williams, 1968, Aréchiga *et al*, 1992).

En el presente trabajo se observa que el reloj biológico que controla el ritmo de actividad locomotora en *P. americana* no está situado en los pedúnculos.

En cuanto a los organismos que mostraron ritmo circadiano en OO post lesión, este fue generalmente unimodal, con un $\tau = 27.0 \pm 0.75$ lo que contrasta con el τ de intactos (23.77 ± 0.56 h).

Este ritmo circadiano en OO final, presentó un promedio de actividad bajo que se reflejó en un α/ρ de 0.95 ± 0.17. Sin embargo esto no concuerda con algunos reportes de la literatura (Aréchiga, 1996) en donde se menciona que los pedúnculos oculares pueden participar como inhibidores de la actividad.

Ciclos de luz-oscuridad

Aunque la mayoría de los organismos no logró sincronizarse con el apagado y el encendido de las luces, solo un 18.5% de los animales de este grupo sincronizó a LO. Esto sugiere que existen fotorreceptores extrarretinianos. En otros crustáceos decápodos existe un par de neuronas fotorreceptoras en el sexto ganglio abdominal (Prosser, 1934), así como otros fotorreceptores extrarretinianos en ganglio supraesofágico en el crustáceo *Cherax destructor* (Sandeman *et al*, 1990). Debido a que un número importante (81.5%) animales con ablación peduncular no lograron sincronizar a LO; se puede interpretar que los pedúnculos oculares contienen a los principales fotorreceptores del sistema circadiano que integrará la señal (Figura 10), muy posiblemente la retina misma.

7.3. Animales con ablación de retina

Oscuridad constante

El patrón general de comportamiento para este grupo fue arritmia, la cual una vez más pudo estar determinada por el tiempo de recuperación de los individuos a la cirugía (Thurman y Broghammer, 2001). Sin embargo el comportamiento unimodal mostrado después de la lesión en algunos animales (Figura 11a) podría implicar que la retina es necesaria para mantener una relación de fase de 180° entre dos osciladores propuestos.

Ciclos de luz-oscuridad

Más de la mitad de los animales en esta condición (58%) no logró sincronizarse al fotoperiodo, sin embargo se observó que algunos casos mostraron coordinación relativa (Figura 12a), indicando que la retina es necesaria para una sincronización completa en los mecanismos de sincronización paramétrica, lo cual es consistente con las observaciones hechas en animales con ablación de pedúnculo ocular en LO.

La baja capacidad de sincronización presentada por *P. americana* con lesión de retina, fue un determinante para que no se llevaran a cabo experimentos de animales con ablación peduncular en ciclos de luz no-paramétrica (FE).

Fotoperiodos esqueleto

En *P. americana* se observó que los organismos con lesión (Ret-x) presentaron una baja capacidad de sincronización esto en contraste con lo observado en otras especies como *P. clarkii*, donde el 100% de acociles sin retina y lámina ganglionaris, mostraron sincronización a ciclos FE de luz roja y azul (Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997). Este mecanismo de sincronización puede presentarse extrarretinalmente, debido a los organismos que sincronizaron; es probable que la retina sea necesaria para la respuesta locomotora en esta especie durante la sincronización paramétrica.

7.4. Post – efectos

Las comparaciones estadísticas del valor del periodo (Tabla 1) en OO de los animales de referencia y experimentales anteriores a la sincronización, con los calculados

en la condición OO después de los regímenes de luz aplicados revelaron cambios en el periodo, también conocidos como post-efectos (Pitendrigh, 1981a).

En todos los casos este cambio se manifestó como un aumento en el valor del periodo, haciéndose evidente que el periodo en la oscilación espontánea es influenciado por el periodo impuesto del agente sincronizador (luz) por muchos ciclos subsecuentes (Moore-Ede, *et al;* 1982).

Los post efectos pueden explicarse como un efecto de los pulsos de luz que colocan en fase el reloj, adelantando o atrasando el ciclo, ya que durante la síncronizaciòn, la regulación del periodo es producto del control de fase del sistema circadiano por la luz. También (desde 1960) se ha determinado que los periodos en oscilación espontánea de los relojes circadianos en condiciones ambientales constantes son histórico-dependientes. Así, la sincronizaciòn por ciclos de luz puede generar cambios a largo plazo en el periodo de los ritmos expresados después de que se eliminan los ciclos de luz. Estos cambios a largo plazo en el periodo (o post-efectos) desaparecen lentamente y en algunos casos se requiere másde 100 ciclos para regresar al estado estable endógeno (Pittendrigh y Daan, 1976).

Algunos modelos para explicar los post-efectos de sincronización derivan de la hipótesis de que el efecto de la señal sincronizadora causa un cambio en la relación de fase de los osciladores débilmente acoplados que son diferencialmente sensibles a la luz. Al entrar en condiciones constantes, el regreso a la relación de fase constante del estado estable y consecuentemente al periodo del estado estable, puede requerir muchos ciclos si el acoplamiento entre los osciladores es débil. Así, la regulación del periodo marcapasos, durante la sincronización y post-efectos, es dependiente de la habilidad de la luz para colocar en fase los osciladores que componen en su totalidad el sistema circadiano (Page, 2002).

El porcentaje de organismos que no sincronizaron y la presencia de post-efectos puede deberse a que las condiciones experimentales inducen a un acoplamiento de osciladores diferentes al que sucede de manera natural por ausencia de otras señales de tiempo y por las características (intensidad, calidad espectral, duración) del ciclo LO.

El cambio en el periodo en los organismos con lesión puede ser influido por el desbalance neuroendócrino que sufrieron los animales, ya que existen reportes (Naylor y

Williams, 1968) que apuntan que después de una cirugía se presenta un cambio en el periodo. Una sugerencia es que las hormonas liberadas por estructuras del pedúnculo tienen acción sobre la velocidad angular del marcapasos.

7.5. ¿Bimodal circadiano o circamareal?

En el presente trabajo, se asume que el reloj que conduce el ritmo de actividad locomotora del crustáceo de agua dulce *P. americana* es de tipo circadiano, debido a que no se presentaron indicaciones de ritmos circamareales (con un periodo de 12.8 h) o circalunares (24.8 h) en los ritmos de actividad locomotora, y por que éstos no pueden ser sincronizados por fotoperiodos como lo hacen los ritmos circadianos (Thurman y Brohghammer, 2001; Palmer, 2000). Estos autores mencionan que este comportamiento puede deberse a que dicha especie ha sufrido un aislamiento genético grande debido a que su reproducción y desarrollo son locales (por su distribución restringida a orillas de ríos y lagunas hipersalinas), y que estas presiones ambientales han dictado la naturaleza de su sistema cronofisiológico. Lo que puede estar ocurriendo en *P. americana* que presenta también una distribución restringida, pues solo se le encuentra agrupada en parches de cuerpos de agua dulce sin ninguna influencia de ciclos mareales.

Así también se propone que el reloj que conduce el ritmo de actividad locomotora en esta especie está organizado por múltiples osciladores acoplados a diferentes fases uno con otro, ya que como se ha visto para otras especies (Palmer, 2000) al someterse a los organismos a condiciones de laboratorio o diferentes regímenes de luz inusuales (*e.g.* LL), el acoplamiento se rompe, permitiendo que las dos piezas corran a su propia velocidad, fenómeno conocido como separación o "splitting" (Pittendrigh, 1981b).

El principal oscilador circadiano en esta especie parece estar ubicado fuera de los pedúnculos oculares. La mayoría de los organismos a los que se les eliminaron estas estructuras mostraron ritmo en OO y algunos sincronizaron en LO. Si hubieran osciladores en el pedúnculo ocular implicados en la regulación de la actividad locomotora al eliminarlos, otros osciladores posiblemente localizados en el ganglio cerebroide tomarían el control del ritmo como han sugerido otros investigadores (Naylor y Williams, 1968).

8. CONCLUSIONES

1) El crustáceo decápodo *P. americana* presenta un robusto ritmo circadiano de actividad locomotora por primera vez registrado en este estudio.

2) El ritmo circadiano de actividad locomotora para esta especie en condiciones constantes (OO) es básicamente bimodal con un periodo promedio de 23.77 ± 0.56 horas.

3) Se propone que el reloj que conduce el ritmo de actividad locomotora en esta especie está organizado por múltiples osciladores acoplados con diferentes fases entre ellos.

4) La arritmia observada en PO-x se presentó como resultado del trauma quirúrgico, más que una disrupción de algún componente utilizado en la generación del ritmo lo cual sugiere que el mecanismo hormonal del pedúnculo es al menos un mediador involucrado de alguna forma en el control de actividad locomotora.

5) El marcapasos que controla el ritmo de actividad locomotora no está situado en los pedúnculos oculares.

6) La retina parece ser necesaria para mantener una relación de fase de 180° entre dos osciladores propuestos; así como para una sincronización completa en los mecanismos de sincronización paramétrica.

7) Existen fotorreceptores circadianos extrarretinianos que median la sincronización en los animales sin retina o pedúnculo ocular.

9. GLOSARIO DE TÉRMINOS

Amplitud	Diferencia entre el máximo (o mínimo) y el valor medio en una oscilación cosenoidal.
Cambio de fase	Desfasamiento único de una oscilación a lo largo del eje de tiempo, puede ocurrir instantáneamente o después de algunos ciclos transitorios
Control de fase	Control del periodo y de la relación de fase de un ritmo por un Zeitgeber.
Coordinación relativa	Modulación en el periodo de un ritmo el cual resulta cuando el organismo es expuesto a un ciclo Zeitgeber muy débil para sincronizar el ritmo.
Curva de respuesta de fase	Forma gráfica que indica la cantidad y la dirección de un cambio de fase inducido por un estimulo, la cual depende de la fase a la cual el estimulo es aplicado.
Desincronización	Pérdida de sincronización entre dos o más ritmos así que muestran periodos independientes.
Fase	Estado instantáneo de una oscilación dentro de un periodo.
Fotoperiodo	Duración del ciclo LO.
Frecuencia	Recíproco de un periodo
Infradiano	Ritmo biológico con un periodo más largo que los ritmos circadianos.
Marcapasos	Entidad funcional capaz de auto-sostener oscilaciones las cuales sincronizan con otros ritmos.
Oscilación espontánea	Estado de un ritmo circadiano en condiciones constantes, esto es, en ausencia de agentes sincronizadores (zeitgebers).
Oscilación secundaria	Oscilación dentro de un organismo capaz de generar oscilaciones pero la cual generalmente tiene menos estabilidad y persistencia más que un marcapasos, no está sincronizado directamente por un Zeitgeber, y puede no ser necesariamente otro oscilador.
Periodo	Intervalo de tiempo entre las recurrencias de una fase definida del ritmo.
Post-efectos	Transitorios de largo plazo, a veces duran por 100 días o más, antes de que un ritmo se libere en condiciones constantes puede adoptar su periodo de oscilación espontánea.
Ritmos circadianos	Clase de ritmos que son capaces de oscilar espontáneamente en condiciones constantes con un periodo aproximado al del ciclo ambiental al cual normalmente se sincronizan llamados Zeitgeber.
Sincronización	Sincronización de un ritmo auto-sostenido por una fuerza de oscilación (Zeitgeber). Durante la sincronización las frecuencias de dos oscilaciones son las mismas o múltiplos integrales de cada uno (ver; sincronización por frecuencia de multiplicación)
Fotoperiodo esqueleto	Cuando un fotoperiodo completo de sincronización se sustituye por 2 pulsos discretos de luz presentados en la fase de transición de iluminación (encendido y apagado de luces).
Ultradianos	Ritmos biológicos con un periodo más corto que los ritmos circadianos.
Ciclos transitorios	Ciclos en los cuales ocurre el periodo de ajuste a una fase estable
Zeitgeber	Oscilación forzada ambiental el cual sincroniza un ritmo biológico auto-sostenido.

Moore-Ede, *et al*, 1982.

10. LITERATURA CITADA

Aguilar-Robledo R. 1993. **Teorías básicas de los ritmos biológicos**. Psiquis. 2(6):121-132.

Álvarez F. J. L. Villalobos y E. Lira. 1996. **Decapoda**. En: J. Llorente, A. N. García Aldrete y E. González. eds. Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México. Hacia una síntesis de su conocimiento. Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. pp 103-129.

Álvarez F. y J. L. Villalobos. 1996. **Especie nueva de cangrejo de agua dulce del género Pseudothelphusa (Brachyura: Pseudothelphusidae) de Guerrero, México**. Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Zoología. 67(2):297-302.

Álvarez F. y J. L. Villalobos. 1997. **Pseudothelphusidae y Trichodactylidae (cangrejos).** En: González S.E., R.Dirso y R.C.Voght. eds. Historia natural de los Tuxtlas. Instituto de Biología UNAM–CONABIO. México. pp. 415 – 418.

Aréchiga H. 1996. **Neuronal mechanisms of biological rhythms**. En: Time, internal clocks and movements. M. A. Pastor and J. Artieda (eds). Elsevier Science B.V . USA. pp. 15-34.

Aréchiga H. and A. Huberman. 1980. **Hormonal control of circadian rhythmicity in crustaceans**. En: Aréchiga H, C. Valverde. eds. Frontiers in Hormone. Research. Krager, 6:16-34.

Aréchiga H.; F. Fernández-Quiróz.; F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa. 1992. **The circadian system of crustaceans.** Cronobiology International. 9(6):1-16.

Aschoff J. 1960. **Exogenous and endogenous components in circadian rhythms**. Colds Sping Harbor Symposia on Quantitative Biology. 25:11-28.

Aschoff, J. 1981. **Freeruning and entrained circadian rhythms.** En: Jürgen Aschoff. ed. Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. New York, Plenum Press. 6(4): 81-96.

Brown A.F. 1983. **Physiological rhythms.** En: Waterman T.H. ed. The physiology of crustaces, sense organs, integration, and behavior. E. U. Academic Press. 7(11):401-455.

Cooke M. I. and R. E. Sullivan. 1982. **The biology of crustacea.** En: Bliss E.D., L.H. Atwood y C.D. Sandeman ed. Neurobiology: structure and function. The biology of crustacea. E.U. Academic Press. 3:210 - 277.

DeCoursey J.P. 1983. **Biological timing.** En: Bliss E.D., F.J. Vernberg y B.W. Vernberg ed. Behavior and ecology. The biology of crustacea. E.U. Academic Press. 7:210 - 277.

Dunlap C.J. 1999. **Molecular bases for circadian clocks**. Cell. 96: 271-290.

Escamilla-Chimal E. 2001. **Cambios cíclicos en serotonina y CHH en el tallo ocular del acocil *Procambarus clarkii* en diferentes estados del desarrollo.** Tesis de Doctrorado. Biología Facultad de Ciencias. UNAM. p 8.

Fanjul-Moles M.L. 1998. **Ontogenetic study of a circadian rhythm in crayfish: clock pacemarker and entrainment**. Comparative Biochemical and Physiology. 5:153-160.

Fanjul-Moles M.L.; M. Miranda-Anaya y J. Prieto. 1996. **Circadian locomotor activity rhytm during ontogeny in crayfish *Procambarus clarkii*.** Chronobiology International. 13(1),15-26.

Fuentes-Pardo B. y V. Inclán-Rubio. 1987. **Caudal photoreceptors synchronize the circadian rhythms.** Comparative Biochemical. (86):3-523-527

Miranda-Anaya M. 1994. **Estudio ontogénico de la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotora en el acocil *Procambarus clarkii*.** Tesis de Maestría. Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. 64 p.

Miranda-Anaya y Fanjul-Moles. 1997. **Nonparametric efects of monochromatic light on the activity rhythm of juvenile crayfish**. Chronobiology International. 14(1):25-34.

Moore-Ede C. M., M. F. Sulzman y C. A. Charles. 1982 . **A physiological system measuring time**. En: The clocks that time Us. Physiology of the circadian timing sistem. Harvard University press. pp 1-29.

Naylor E. y G. B. Williams. 1968. **Efectos de la eliminación del pedúnculo ocular en la actividad locomotora en *Carcinus***. (U.K.) Journal of Experimental Biology 49:107-116 .

Page L.T. 2002. **A Novel mechanism for the control of circadian clock period by light.** Sage Publications. Journal of Biological Rhythms. 15(2): 55-162.

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

Palmer D.J. (1976). **Introduction to biological rhythms**. Academic press, New York. 375 pp.

Palmer D.J. (2000). **The clocks controlling the tide-associated rhythms of intertidal animals.** Ed. John Willey y Sons. E.U. BioEssays. 22:32-27

Pittendrigh C.S. and S. Daan. 1976. **A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency**. Jornal of Comparative Physiology 106:223-252.

Pittendrigh S.C. 1981a. **Circadian sistems: Entrainment.** Cap. 7. En: Jürgen Aschoff ed. Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. New York, Plenum Press. 4:95-123.

Pittendrigh S.C. 1981b **Circadian systems: general perspective.** Cap. 5. En: Jürgen Aschoff ed.. Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. New York, Plenum Press. 4:55-77.

Prosser, C.L. 1934. **Action potentials in the nervous sistem of the crayfish.** II. Responses to illumination of the eye and caudal ganglion. J. Cell. and Comparative Physiology. 4:363-377.

Rioja E.L., O.M. Ruiz y R.I. Larios 1975. **Tratado elemental de zoología**. Ed. Eclalsa. México. pp 292-315.

Rodriguez, G. y A. E. Smalley 1969. **Los cangrejos de agua dulce de México de la familia Pseudothelphusidae (Crustacea, Brachyura)**. Serie Ciencias del Mar y Limnología. 40(1):96-112.

Sandeman, D.C; R.E. Sandeman y H.G. de Covet. 1990. **Extrarretinal photoreceptors in the brain of crayfish (*Cherax destructor*)**. Jurnal of Neurobiology. 21(4):619-629.

Thurman C.L. y A.M. Broghammer. 2001. **Locomotor activity of the fiddler crab, *Uca subcylindrica* (Stimpson), under artificial illumination**. Biological Rhythm Research. 32(1):85-99.

Vega G.A. 1994. **Diseño e implantación de un sistema de análisis de señales en cronobiología**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ingeniería. UNAM.

Wayne W. 1995. **Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud**. México. Uteha. 878 p.