



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

"Cambios de fase por pulsos de luz en el ritmo
circadiano de actividad locomotora del cangrejo de
rio *Pseudothelphusa americana*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

PRESENTA

VANIA PATRICIA CARMONA ALCO CER

DIRECTOR DE TESIS

DR. MANUEL MIRANDA AN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA IT
MEZQUITE

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Vania Patricia
Carmona Alcocer
FECHA: 02/04/04
FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Cambios de fase por pulsos de luz en el ritmo circadiano de actividad locomotora del cangrejo de río Pseudothelphusa americana."

realizado por Vania Patricia Carmona Alcocer.

con número de cuenta 9854415-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Manuel Miranda Anaya .

[Signature]
[Signature]

Propietario Dr. Baltazar Barrera Mera.

Propietario Dra. Ruth Cecilia Vaneças Pérez.

[Signature]

Suplente M. en C. Enrique Moreno Saenz.

[Signature]

Suplente M. en C. Jose Ignacio Fernandez Mendez .

[Signature]

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chavez.



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

*...Dos Fechas –nacimiento y muerte-
Entre una y otra todos los días son míos...*

Pessoa

No quería tener un hogar, No quería tener el deseo de regresar a ninguna parte. Necesitaba saber que nada me esperaba en ningún lugar, de que el sitio donde se suponía que debía de estar, era justo donde estaba en ese momento...

Josef Koudelfka.

*...Los hombres encuentran por que buscan,
y así han creado el mundo pieza por pieza...
Deberías daros prisa si queréis encontrar lo que buscáis.
Pronto no habrá ya sitio, pronto todo estará completo y terminado...*

Michael Ende

Dedico este trabajo:

A mis padres por guiarme.

A la flaca por ser mi mejor amiga.

A mi medio metro de abuelita, por existir.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su amor, paciencia, sabiduría y comprensión. Gracias por respetarme, por tener confianza en las decisiones que tomo; por brindarme su mano cuando las cosas van mal.

A mi hermana por su amistad, por ser tan realista y dar siempre a las cosas su justo valor, pero sobre todo por nuestros pleitos, risas y complicidades.

Gracias abuelita por quererme tanto, por aguantarme durante todos estos años, y por siempre recibir a mis amigos con los brazos abiertos.

A mi tutor y un buen amigo Dr. Manuel Miranda Anaya, por su paciencia, sus enseñanzas, por creer en mi capacidad y ayudarme a crecer como biólogo.

A las cuatro fantásticas y mis mejores amigas, Elizabeth, Ilse, Karla y Whaleeha; contar con su amistad ha hecho que ir a la facultad valiera la pena hasta en los perores días, sin contar todas las cosas divertidas que quedan en mi corazón.

A la banda guerrera, por tanto momentos inolvidables, en especial a Ezequiel, Jorge, Otero, Aldo. Gracias por todas sus locuras.

Al Club de Verduras, Frijol, Fresa y Jitomate, me enseñaron que personas entran y salen de nuestras vidas lo importante son las que deciden quedarse.

A Harry, Arturo, Clementina, Nandadevi, Cira Pera Loca y Cesar; por su risa, sus burlas y sus oídos.

A mis amigos del Ingles Erika, Edith, por siempre escucharme y por brindarme su tiempo, en especial a Gargamel.

A mis sinodales Dr. Manuel Miranda Anaya, Dr. Baltazar Barrera Mera, Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez, M. en C. Enrique Moreno Saenz, y M. en C. Jose Ignacio Fernández Méndez por todos sus comentarios.

A mis maestros de la carrera por todas sus enseñanzas, en especial al Dr. José Luis, maestro de Física en la UAM Iztapalapa, por transmitirme la pasión con que la ciencia debe vivirse.

Gracias a el personal de las Cámaras de Ambiente Controlado y el Acuario de la facultad de ciencias, por su apoyo en la realización del los experimentos y el mantenimiento de los animales.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
• Ritmos Biológicos	4
Importancia de los Ritmos Biológicos	5
• Características de los Ritmos Circadianos	6
Libre Curso	6
Efectos de Luz Constante e Intensidades de Luz	6
Post-Efectos	7
Compensación de la Temperatura	7
• Sincronización	8
Límites de Sincronización	9
Mecanismos de Sincronización	10
• Curva de Respuesta de Fase	11
Características de la Curva de Respuesta de Fase	13
Curva de Transición de Fase	15
• Organización del Sistema Circadiano	15
Múltiples Osciladores	16
Modelo de Oscilador de Mañana y Tarde	16
• Biología de la Especie Estudiada	17
Crustáceos	17
Orden Decapoda	18
• Ritmos en Crustáceos	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23

HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
• Objetivo General	24
• Objetivos Particulares	24
MATERIAL Y MÉTODO	25
• Obtención y Mantenimiento de Animales	25
• Diseño Experimental	25
• Análisis de Datos	27
RESULTADOS	31
• Organismos en Fotoperiodos Completos	31
• Cambios de Fase	35
• Respuesta Diferencial a Pulsos de Luz	43
• Organismos en Oscuridad Constante	48
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	57
LITERATURA CITADA	58

RESUMEN

El cangrejo de río Pseudothelphusa americana presenta un ritmo circadiano de actividad locomotora bimodal, con un componente de actividad alrededor del encendido de la luz (pico de mañana) y una segundo componente de actividad que anticipa el apagado de la luz (pico de tarde). Así, bajo condiciones de luz oscuridad los organismos de esta especie presentan actividad crepuscular. En este trabajo se estudió si ambos componentes de actividad tienen cambios de fase de la misma magnitud y dirección, ante pulsos de luz aplicados en diferentes horas de tiempo circadiano. Los resultados son representados por las Curvas de Respuesta de Fase (CRF), para el pico de mañana y de tarde, las cuales son diferentes. La CRF para el pico de mañana es unimodal y la del pico de tarde es bimodal, por otra parte, los retrasos son de mayor amplitud en la CRF para el pico de tarde; es decir, en este ritmo los cambios de fase son diferentes para ambos componentes de actividad, por lo que el ritmo de actividad locomotora puede estar controlado por más de un oscilador. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que el ritmo circadiano de actividad locomotora en esta especie presenta una sensibilidad diferencial a la luz para los posibles osciladores que regulan los picos de mañana y de tarde, lo cual puede tener relevancia adaptativa, ya que permitiría a los organismos ajustarse a cambios estacionales.

INTRODUCCIÓN

• Ritmos Biológicos

Un ritmo biológico es un fenómeno biológico que se repite a intervalos regulares. Una pregunta elemental acerca de los ritmos biológicos es; si estos se originan en respuesta a fenómenos ambientales cíclicos en cuyo caso se consideran de origen exógeno; o bien, si son generados por el organismo en cuyo caso se consideran de origen endógeno (Gruart et.al, 2002), en estos casos el ambiente actúa sólo como un modulador del ritmo (Aschoff, 1960).

Los ritmos endógenos son generados por estructuras del organismo que reciben el nombre de reloj biológico, el cual es un sistema fisiológico responsable de medir el tiempo y ajustar el curso de los procesos internos de los organismos con los eventos diarios del ambiente (Moore-Ede et.al, 1982a). Para medir el tiempo es necesario hacer uso de un fenómeno recurrente a intervalos regulares, es decir, un oscilador cuyos intervalos de variación sirvan como referencia temporal (Gruart et.al, 2002).

Algunos de los parámetros que caracterizan a los ritmos biológicos son: La frecuencia, que es el número de veces que se repite un ciclo en un tiempo determinado; el periodo (t), que es el inverso de la frecuencia y representa el tiempo que tarda en completarse un ciclo; la media ó mesor es el nivel promedio del ritmo; la amplitud es la magnitud de la variación del fenómeno en estudio; y por último, la fase, que es el momento en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio (Ejemplo: el valor máximo de secreción de una hormona) (Kennedy, 1998).

La periodicidad de los ritmos puede fluctuar de menos de un segundo hasta más de un año. Así, los ritmos biológicos se clasifican en: ultradianos, aquellos con periodo menor a 20 horas (Ejemplo: respiración y latido del corazón); circadianos (del latín *circa* = cerca; *diano* = día) los cuales tienen periodicidad cercana a un día y persisten en condiciones constantes con un periodo que va de 20 a 30 horas; por último, los ritmos infradianos son los que presentan un periodo que supera las 30 horas (Ejemplo: ciclo estral e hibernación) (Gruart et.al, 2002).

Importancia de los Ritmos Biológicos

El ambiente físico en el que se desarrolla la vida se caracteriza por periodicidades que derivan del movimiento de la tierra y la luna con relación al sol; desde sus orígenes los organismos han sido expuestos a estos ciclos ambientales (Ramírez-Lomelí, 2002). Así, en un principio los seres vivos se sometían al orden temporal impuesto por el ambiente y conforme estos evolucionaron, dicho orden fue asimilado dando origen a una organización temporal interna (Aguilar-Roblero, 1993).

El tiempo biológico es una adaptación de los organismos a su entorno cíclico, lo que les permite coordinar sus funciones orgánicas en el devenir temporal. La importancia adaptativa de los ritmos, es que los organismos se anticipan y preparan a los cambios cíclicos en el ambiente, por lo que inician procesos fisiológicos en una fase apropiada del día. En algunos organismos el reloj biológico actúa como un temporizador, lo que es de particular relevancia para compensar el cambio en el compás del sol a lo largo del día, durante la migración. Además, permite a los organismos medir la longitud del día y de la noche, ayudando a la regulación adecuada de fenómenos estacionales (Johnson et.al, 2003a). Por último los ritmos biológicos que tienen expresión conductual, pueden determinar que de la misma manera que existe un nicho espacial para cada especie, exista también un nicho temporal al cual la especie se encuentra adaptada (Gruart et.al, 2002).

• Características de los Ritmos Circadianos

El estudio de los ritmos biológicos es importante porque exhiben algunas de las características de los relojes biológicos (Bruce, 1960); dentro de los ritmos biológicos los más estudiados son los circadianos, cuyas características son descritas a continuación.

Libre Curso

Un aspecto fundamental para considerar un ritmo como circadiano, es que bajo condiciones de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persista con una frecuencia que presenta una ligera pero significativa variación en el periodo que la caracteriza, fenómeno al que se denomina oscilación espontánea o libre curso (Aguilar-Roblero, 1993). El periodo en libre curso " τ " es una aproximación a los ciclos ambientales relevantes, y su variación indica que el ritmo observado surge independientemente de estímulos externos (Moore-Ede et.al, 1982a), es decir, los ritmos observados son determinados por el código genético y cada especie presenta un periodo característico (Liu et.al, 1999).

Efectos de Luz Constante e Intensidades de Luz

Bajo condiciones de luz constante (LL) los animales diurnos acortan el periodo del ritmo (" τ "), mientras que los nocturnos lo alargan. Por otra parte, en LL, " τ " depende de las condiciones de iluminación, encontrando que " τ " se acorta con un incremento en la intensidad de la luz en organismos diurnos y se alarga en nocturnos; por último, la proporción de actividad/reposo (α/ρ) aumenta con la intensidad de la luz para animales diurnos y disminuye en el caso de organismos nocturnos, lo que se conoce como la regla de Aschoff (1960).

Post-Efectos

Cuando los ritmos son ajustados (sincronizados) a ciclos de luz-oscuridad u otros factores ambientales, las características del ritmo subsiguiente en libre curso "t" están influenciadas por los ciclos previos de sincronización. Los post-efectos demuestran que los factores ambientales periódicos pueden modular la velocidad angular del reloj circadiano por varios ciclos, lo cual tiene relevancia adaptativa ya que facilita la sincronización (ajuste del periodo endógeno igualando el periodo del ciclo ambiental). Algunos factores que causan post-efectos son las horas de luz y el periodo del ciclo ambiental (Pittendrigh y Daan, 1976a). Se ha observado que los pulsos de luz que ocasionan que la fase ocurra después de lo esperado (retraso de fase) están asociados con un incremento en el periodo, mientras que los pulsos de luz que generan que la fase ocurra antes de lo previsto (avance de fase) conllevan un acortamiento en el periodo. Una forma de controlar los post-efectos es colocar a los organismos en las mismas condiciones antes de cada experimento (Moore-Ede et.al, 1982a).

Compensación de la Temperatura

Una de las características fundamentales de los relojes biológicos es su capacidad de corregir el efecto que cambios en la temperatura del ambiente pudieran tener sobre el periodo en libre curso "t" (Gruart et.al, 2002). Así, la mayoría de las especies conservan la velocidad angular del oscilador (reloj biológico) antes y después de un incremento de temperatura de 10° C ($Q_{10} \approx 1$), debido a una compensación de la temperatura (Moore-Ede et.al, 1982a). Esta capacidad permite que la medición del tiempo por los organismos pueda realizarse con precisión en ciclos sucesivos sin importar los cambios térmicos en el ambiente (Aguilar-Roblero, 1993). Demostrar la existencia de una función biológica que presente la misma cinética a diferentes temperaturas es un problema que implica la existencia de una enzima con una actividad similar en un amplio rango de temperaturas, ó bien, un conjunto de enzimas con acción a diferentes temperaturas, las cuales deben estar delicadamente ajustadas entre sí; esta última hipótesis es la más aceptada en la actualidad (Gruart et.al, 2002).

• Sincronización

Los factores ambientales capaces de ajustar a los ritmos biológicos son denominados "zeitgebers" del alemán "dador de tiempo" (Daan y Aschoff, 2001). Un zeitgeber tiene varios efectos sobre el ritmo; primero ajusta el periodo del ritmo (" t ") con el periodo del ambiente (T); segundo, mantiene en fase a individuos de la misma especie; por último, ajusta los diferentes relojes circadianos de un organismo (Aschoff, 1960). En la naturaleza existen diversas señales ambientales que pueden funcionar como zeitgebers, por ejemplo: los ciclos de luz, temperatura, disponibilidad de alimento, ruido, señales sociales, ciclos mareales, ciclos lunares etc; sin embargo, el ciclo de luz-oscuridad, es uno de los zeitgebers más importantes para los ritmos circadianos, ya que provee la señal de tiempo más precisa en la mayoría de los ambientes.

La sincronización puede definirse como el proceso en el que un oscilador (o), con un periodo (" t ") en oscilación espontánea puede acoplarse y ser ajustado por otro oscilador (z), denominado zeitgeber, el cual tiene un periodo similar (T). En un estado estable de sincronización el periodo del oscilador cambia de " t " a t^* , donde t^* es igual a T. En otras palabras, la sincronización es el ajuste de " t " del sistema circadiano igualando el periodo T del zeitgeber, e implica el ajuste de fase y frecuencia del ritmo en oscilación espontánea al ciclo de rotación de la tierra (Daan y Aschoff, 2001). Sin la sincronización el individuo no podría ajustar sus funciones a los cambios que ocurren en el ambiente. Este hecho le confiere una relevancia adaptativa a los ritmos biológicos; ya que maximiza la supervivencia del individuo, en un mundo donde la comida disponible y la actividad de depredación son también cíclicas.

Para que un ritmo se sincronice con el zeitgeber, en cada ciclo debe haber un cambio de fase (desfasamiento a lo largo del eje del tiempo) en el reloj biológico, para que se corrija la diferencia entre el periodo de la señal (T) y el del reloj (" t ") (Moore-Ede et.al, 1982a).

Así, el zeitgeber ejerce un control sobre la fase del ritmo endógeno, por lo que bajo fotoperiodos completos, la sincronización lleva consigo el establecimiento de una relación de fase fija entre el ritmo y el zeitgeber (Bruce, 1960). La diferencia de fase del ritmo respecto al zeitgeber es conocida como el ángulo de fase (Aschoff, 1960), y puede representarse en unidades de tiempo ($t/24$) ó en grados de un círculo ($t/360^\circ$) (Gruart et.al, 2002). Para obtener el ángulo de fase se selecciona una fase arbitraria " ϕ " para el ritmo y otra " Φ " para el zeitgeber, y se determina como: $\psi = \Phi - \phi$ (Daan y Aschoff, 2001).

Limites de Sincronización

Los ritmos circadianos pueden ser sincronizados a ciclos con periodicidad cercana a la propia, pero sólo dentro de ciertos límites (Bruce, 1960). Fuera de los límites de sincronización el ritmo presenta libre curso (Kennedy, 1998). Existe la generalización de que entre más complejo es el organismo más difícil es sincronizar el ritmo a periodos lejanos de 24 horas, así los insectos presentan un límite de sincronización mas amplio que los vertebrados (Gruart et.al, 2002). Por otra parte, en algunas ocasiones el zeitgeber no es capaz de sincronizar el ritmo, sin embargo, puede ejercer un efecto modulador sobre su periodo y este fenómeno es conocido como coordinación relativa (Kennedy, 1998). En la coordinación relativa, las frecuencias de dos osciladores T (del zeitgeber) y " t " (del ritmo), están débilmente acopladas interactuando con cierta relación de fase. Esta interacción puede acelerar al oscilador del ritmo en una relación de fase y desacelerarlo en otra.

Existen condiciones experimentales o ambientales que pueden oscurecer los mecanismos reales de sincronización, actuando sobre los sistemas efectores del ritmo manifiesto, sin llegar a afectar al reloj circadiano (Moore-Ede et.al, 1982a). En otras palabras, el estímulo ambiental puede no afectar el periodo y la fase del oscilador biológico y este fenómeno es conocido como enmascaramiento (Aguilar-Roblero, 1993).

Una forma de conocer si el ritmo se sincroniza con un zeitgeber, es quitar el zeitgeber y observar el ritmo en libre curso; si hay sincronización, la fase en la que empieza la oscilación espontánea puede ser determinada por la fase previa en la cual estaba sincronizado, pero si la fase se determina por la predicción de la oscilación espontánea previa a la sincronización, estamos ante un caso de enmascaramiento (Kennedy, 1998). Otra forma de demostrar la sincronización es someter al organismo a ciclos ambientales con diferentes periodos, si en la sincronización se establecen ángulos de fase diferentes y específicos para cada valor de T de los ciclos ambientales, ésta será una excelente demostración de que el ritmo está sincronizado, pero si el ángulo de fase es igual en diferentes periodos para el zeitgeber, entonces el ritmo observado está enmascarando al oscilador endógeno (Johnson et.al, 2003b).

Mecanismos de Sincronización

Los mecanismos por los cuales un zeitgeber puede sincronizar a un ritmo son de dos tipos: paramétricos y no paramétricos.

El modelo de sincronización paramétrica se basa en la observación de que el periodo "t", depende de la intensidad de la luz, por lo que, el zeitgeber ejerce un efecto proporcional sobre el ritmo (Aschoff, 1960). Así, el zeitgeber genera aceleraciones del oscilador biológico en el día y desaceleraciones en la noche, para ajustarlo continuamente. En este caso, los cambios graduales en el ambiente son los responsables de la sincronización.

En la sincronización no paramétrica se propone que son los efectos ambientales transitorios, semejantes al amanecer y anochecer, son los responsables de la sincronización (Johnson et.al, 2003b). En este caso el zeitgeber ejerce un efecto diferencial sobre el ritmo, de tal manera que la velocidad de los osciladores varía a lo largo del periodo, lo que significa, que hay fracciones del periodo donde el sistema corre lento y otras fracciones donde corre más rápido (Aschoff, 1960).

En este modelo, breves periodos de exposición a la luz causan avances y retrasos en el reloj circadiano, dependiendo de la parte del ciclo en la cual cae la luz. Así, los avances y retrasos de fase son suficientes para provocar un cambio de fase en el oscilador circadiano y con ello sincronizar el ritmo.

El modelo de sincronización no paramétrica es útil para entender como se da el ajuste a los ciclos ambientales en muchos animales que viven en la oscuridad de sus cuevas y se exponen únicamente a breves periodos del ciclo diario de luz. Esta breve exposición ocurre al amanecer y al anochecer. La idea de que dos pulsos de luz son suficientes para sincronizar el ritmo de actividad circadiana es corroborada al realizar experimentos con fotoperiodos esqueleto, los cuales consisten en dos pulsos de luz dentro de un lapso de 24 horas, simulando el amanecer y el anochecer (Pittendrigh y Daan, 1976b).

• **Curva de Respuesta de Fase**

Los elementos esenciales para entender el modelo de sincronización no paramétrico son el periodo en libre curso y la Curva de Respuesta de Fase (CRF) (Pittendrigh y Daan, 1976a), que es la forma gráfica de indicar la magnitud y la dirección de un cambio de fase inducido por un estímulo, en función de la hora circadiana en la cual es aplicado el mismo. La construcción de la CRF se basa en dos aspectos: el primero, que los pulsos de luz causan cambios de fase en el sistema oscilante y, como segundo aspecto el efecto que un pulso de luz tiene sobre un organismo depende de la sensibilidad diferencial durante el ciclo ante el mismo estímulo (Kennedy, 1998). Los estímulos más utilizados incluyen: pulsos de luz, temperatura y químicos (Johnson, 1992).

Las Curva de Respuesta de Fase (CRF) para pulsos de luz y temperatura han sido las más utilizadas, ya que ayudan a entender como se sincronizan los relojes circadianos a los ciclos diarios de luz y temperatura. La CRF a pulsos de luz es una herramienta que permite predecir como se da el ajuste de los ritmos endógenos a los ciclos ambientales, por ejemplo: al aplicar un pulso de luz por ciclo, el modelo propone que el reloj es sincronizado cuando el pulso de luz cae en una fase específica de la CRF, en la cual el cambio de fase iguala la diferencia entre el periodo en libre curso y el ciclo del zeitgeber (Johnson et.al, 2003a).

Existen diferentes métodos propuestos por Aschoff (1965) para obtener una CRF. La estrategia mas utilizada consiste en colocar a los organismos en oscuridad constante, y después de varios días, dar un pulso de luz en una fase predeterminada del ciclo en libre curso, posteriormente se deja correr el ciclo en oscuridad constante por varios días más con el fin de determinar el cambio de fase, su desventaja es que la determinación de la fase no es fiable cuando se trata de ritmos oscurecidos por ruido o irregulares. Una técnica alternativa consiste en colocar al organismo en un ciclo luz-oscuridad en condiciones constantes con el fin de sincronizar y establecer relaciones de fase, una vez sincronizado, el ritmo pasa a oscuridad constante por varios días, dando un pulso de luz durante el primer día en oscuridad constante. La ventaja de este método es que los organismos presentan una fase fija en el ciclo previo al pulso de luz por lo que la determinación de cambio de fase es más fácil. Además, este es quizá el mejor método para conocer el comportamiento de sincronización, ya que la CRF obtenida es una aproximación a como ocurre la sincronización en condiciones naturales (Johnson, 1992).

Al aplicar un estímulo, la nueva fase se observa después de un número de ciclos transitorios (ciclos en los cuales ocurre el ajuste del periodo a una fase estable). Sin embargo, se puede medir el cambio de fase en el primer día después de la aplicación del pulso, ya que hay ocasiones en las que, la fase es poco estable y es difícil medir después de varios ciclos (Moore-Ede et.al, 1982a).

Los cambios de fase que puede presentar un ritmo son: retrasos, cuando una fase determinada ocurre después de lo esperado, o avances cuando el marcador de fase ocurre antes de lo previsto (Daan y Pittendrigh, 1976). Para considerar un cambio de fase como tal es necesario que el cambio se mantenga en forma estable, lo cual sólo ocurre cuando el reloj subyacente al ritmo ajusta su hora (Gruart et.al, 2002). La magnitud en los cambios de fase depende de la intensidad y duración del estímulo, así como de la plasticidad de "t" (Johnson, 1992).

Características de la Curva de Respuesta de Fases

En animales diurnos y nocturnos los pulsos de luz presentados en el día subjetivo (fase donde teóricamente debe haber luz) producen cambios de fase pequeños y los pulsos de luz presentados en la noche subjetiva (fase donde teóricamente debe haber oscuridad) producen cambios de fase más grandes (Daan y Aschoff, 2001). Los retrasos de fase ocurren tarde en el día subjetivo y temprano en la noche subjetiva, por su parte, los avances de fase ocurren tarde en la noche subjetiva y temprano en el día subjetivo, por último, gran parte del día subjetivo se caracteriza por una insensibilidad al estímulo (zona muerta) (Daan y Pittendrigh, 1976).

En todas las especies estudiadas hasta el momento se ha confirmado que las características de la Curva de Respuesta de Fase (CRF) son similares, esta preservación a lo largo de la filogenia sugiere que el origen de los osciladores circadianos fue un evento temprano en la evolución, y que estos sistemas circadianos se han mantenido a pesar de la diversificación en otros fenómenos elementales (Aguilar-Roblero, 1993). A pesar de que la forma de la CRF es parecida en las especies, existen diferencias en la amplitud de los avances y retrasos; algunas de las características que tienen influencia sobre la forma de la CRF son la intensidad del estímulo, las condiciones anteriores de iluminación, etc. (Johnson, 1999).

En ocasiones la Curva de Respuesta de Fase no es simétrica (alguna de las zonas, de avances o de retrasos, predominan). En un estado de sincronización estable no se requiere que las zonas de avance y retraso sean iguales, más aún, una asimetría en las curvas puede permitir una sincronización estable; por lo que estas CRF son interesantes desde la perspectiva ecológica (Johnson, 1992).

Daan y Pittendrigh (1976) cuantificaron las diferencias entre CRF en términos de la diferencia del área bajo la curva (A-D) en la zona de retrasos (D) y la zona de avances(A). La importancia de conocer la relación entre zonas de avance y retraso radica en que una combinación de valores de τ y CRF asimétricas ocasiona una sincronización estable del reloj circadiano a varios fotoperiodos, lo cual permite a los organismos mantener una relación de fase alrededor del año. Por ejemplo; un organismo con $\tau < 24$ hrs, en combinación con una CRF con una zona predominante de retrasos, permite que el tiempo circadiano¹ 12 (TC 12) del reloj coincida con el anochecer, lo cual permite ajustarse a fotoperiodos largos, esta estrategia es probablemente utilizada por animales nocturnos los cuales necesitan empezar su actividad al anochecer. Por otra parte animales con $\tau > 24$ hrs y zonas predominantes de avances en la CRF, permiten que el TC 0 coincida con el amanecer, estrategia utilizada por organismos diurnos que tienen el inicio de actividad al amanecer.

Así el anochecer es más importante para organismos nocturnos y el amanecer para organismos diurnos (Johnson, 1999). El hecho de que el amanecer y anochecer del ciclo subjetivo sean los momentos más sensibles, es el resultado de un control endógeno de la fluctuación en el acoplamiento a la señal de luz con base en un sistema oscilante (Bruce, 1960).

¹ Tiempo circadiano.- Es el periodo de un ciclo ajustado a 24 horas, donde una hora de tiempo circadiano es igual a $t/24$.

Curva de Transición de Fases

La Curva de Transición de Fase (CTF) se obtiene al graficar la nueva fase (ϕ_n) después del pulso de luz, en función de la fase anterior (ϕ) a la que se dió el pulso; la nueva fase es dada por ($\phi_n = \phi - \Delta\phi$), donde, $\Delta\phi$, es el cambio de fase (Daan y Aschoff, 2001). Con la Curva de Transición de Fase se puede clasificar a sujetos de distintas especies en dos grupos, aquellos en los que la curva presenta una pendiente cercana a 0 (curva tipo 0) y los que su pendiente es cercana a 1 (curva tipo 1) (Aguilar-Roblero, 1993). Cuando se relaciona la CTF con la Curva de Respuesta de Fase se observa que animales con curva tipo 0 presentan cambios de fase grandes (hasta 12 hrs.), y los organismos con curva tipo 1 presentan cambios de fase pequeños (menores a 8 hrs.). Por otra parte en organismos con curva tipo 1 hay una transición continua entre los retrasos y avances, mientras que en los organismos que presentan curva tipo 0 se observa un punto de inflexión, en el cual es difícil determinar la dirección del cambio de fase (Johnson, 1992).

• Organización del Sistema Circadiano

Existen diversos modelos que explican la organización del sistema circadiano: Puede tratarse de un oscilador maestro (marcapasos) que conduce elementos pasivos, que son tejidos o subsistemas fisiológicos capaces de presentar un ritmo autosostenido y pueden ser considerados como tejidos blanco del sistema circadiano, los cuales controlan la expresión del ritmo. También puede ser un marcapasos que actúa sobre osciladores secundarios (osciladores autosostenidos que sincronizan por mediadores) imponiéndoles fase y frecuencia. Por último, puede tratarse de 2 o más osciladores (marcapasos), los cuales se sincronizan con diversas señales ambientales y la sincronización interna depende del acoplamiento entre los osciladores (Moore-Ede et.al, 1982b).

Múltiples Osciladores

Cuando hay dos o más osciladores cada uno es capaz de generar un ritmo circadiano autosostenido (Bruce, 1960). Existe evidencia experimental de que el sistema circadiano se organiza alrededor de múltiples osciladores. El fenómeno de partición de actividad ("splitting") es una evidencia de un sistema circadiano multioscilar, este fenómeno se presenta en diversas especies bajo condiciones de luz constante, donde se observa una separación del ritmo de actividad en dos componentes, los cuales tienen periodos diferentes. Cuando ambos componentes se hayan en una relación de antifase 180° pueden estabilizarse y correr paralelamente por varios días y después empezar a oscilar de manera separada nuevamente (Pittendrigh y Daan, 1976c). Por otra parte diversas especies de organismos expuestos a luz continua brillante, presentan una desorganización progresiva de la ritmicidad, lo que puede conducir a patrones arrítmicos de conducta o bien a la descomposición de la ritmicidad circadiana en elementos ultradianos. Estos efectos se han interpretado como el desacoplamiento entre múltiples osciladores (Aguilar-Roblero, 1993).

Modelo de Oscilador de Mañana y Tarde

Pittendrigh y Daan (1976c) propusieron un modelo de organización circadiana en roedores, basados en la observación del fenómeno de repartición "splitting", que asume la existencia de dos osciladores M (mañana) y T (tarde). Así, el "splitting" se presenta cuando el patrón de interacción entre los osciladores M y T falla; entonces, M y T se desacoplan y oscilan con periodos diferentes hasta que el oscilador T vuelve a ejercer una influencia sobre el oscilador M, cambiando su periodo. Las cuatro suposiciones en las que se basa el modelo son: los periodos tienen una dependencia diferencial a la intensidad de luz; cuando están acoplados, el periodo expresado para ambos es diferente al propio; la influencia de un componente sobre el otro depende de la diferencia del ángulo de fase (ψ_{TM}), y por último, la relación de fase entre los dos osciladores puede variar.

Muchos animales presentan una actividad crepuscular con una compresión y descompresión de α (etapa de actividad) con los cambios estacionales; el modelo de dos osciladores M (mañana) y T (tarde) nos permite explicar el ajuste a las demandas ecológicas de cambios en el fotoperiodo, a través de las distintas relaciones de fase (ψ_{TM}) que pueden existir entre estos osciladores, ya que ambos responden diferencialmente al encendido y apagado de las luces.

En este modelo, la Curva de Respuesta de Fase (CRF) genera un cambio neto del sistema acoplado de osciladores, el cual depende de la respuesta de cada oscilador al pulso de luz y de la interacción mutua entre los osciladores, así, la CRF para el oscilador T es diferente a la CRF para el oscilador M. Cuando los organismos son expuestos a ciclos luz oscuridad 12:12 el estado estable en sincronización depende de la interacción de los avances y retrasos de T y M. (Pittendrigh y Daan, 1976c).

• **Biología de la Especie Estudiada**

Crustáceos

Son artrópodos, en su mayoría marinos; su característica fundamental es que tienen el tegumento muy consistente, debido a que la cubierta de quitina está incrustada de sales calcáreas y forma una verdadera costra, a lo que deben su nombre. Su anatomía externa se caracteriza por que su cabeza es de forma uniforme y esta formada por cinco pares de apéndices: anténulas (o primeras antenas), antenas (o segundas antenas), las mandíbulas que aparecen cubriendo la boca, son cortas y gruesas con superficies trituradoras y morderoras, detrás de las mandíbulas aparecen dos pares de apéndices alimentarios accesorios: maxilulas (o primeras maxilas), y el maxilar (o segundas maxilas). Los apéndices ambulatorios están típicamente divididos en dos ramas (Ruppert y Barnes, 1996).

Los crustáceos son uno de los grupos más grandes sobre la tierra en número de especies e individuos, así como de los más diversos en comportamiento, muy bien adaptados a sus diferentes hábitats y altamente especializados (DeCoursey, 1983).

Orden Decapoda

Dentro de la Clase Malacostraca encontramos el orden Decapoda el cual se distingue porque en los individuos de este orden los tres primeros pares de apéndices torácicos se han transformado en maxilípedos (apéndices modificados al servicio de la alimentación), los cinco pares restantes son patas, y de ellos viene el nombre. Su cuerpo está aplanado dorso-ventralmente, el caparazón cubre las regiones cefálica y torácica, formando el cefalotórax el cual se extiende lateralmente para formar las cámaras branquiales, además el primer par de patas está transformado en quelípedos (apéndices para la defensa o alimentación). Los decápodos son predominantemente marinos (89%), pero han invadido ambientes dulceacuícolas (10%) y terrestres (1%). Para México se han descrito 133 especies dulceacuícolas; los adultos en su mayoría son organismos bentónicos que viven sobre el sustrato, protegidos por rocas y vegetación.

El orden Decapoda se divide en dos subórdenes: Dendrobranchiata y Pleocyemata; en este último se encuentran los camarones estenopóideos, langostas, acociles y cangrejos anomuros y verdaderos. En el suborden Pleocyemata, las branquias son tricobranquias (series filamentosas sin subdivisiones) o filobranquias (branquias con ramas aplanadas o laminares en dos series). Los miembros del infraorden Brachyura o cangrejos verdaderos son los decápodos con mayor éxito adaptativo. El abdomen está muy reducido y encaja justo debajo del cefalotórax; tienen el primer par de pleópodos (apéndice abdominal) quelados y más desarrollados que los restantes (Álvarez et.al, 1996).

Los braquiuros de agua dulce del continente americano pertenecen a dos familias: Pseudothelphusidae y Trichodactylidae. Las dos familias se distinguen por la forma del caparazón; en los pseudotelfúsidos es más ancho que largo con dientes antero laterales muy reducidos o ausentes, mientras que en los trichodactilidos el caparazón es redondeado o hexagonal con espinas antero laterales bien formadas. (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 de Sonora, continuando hacia el sur por la vertiente del Pacífico hasta el eje neovolcánico, a partir del cual alcanzan 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 et.al, 1996).

La familia Pseudothelphusidae generalmente se encuentra debajo de rocas, en las orillas de los ríos y lagos debido a que tienen la capacidad de realizar respiración aérea, siempre y cuando exista suficiente humedad en el ambiente. Se ha descrito la presencia de una membrana epitelial a través de la cual se lleva a cabo el intercambio de gases llamada "pseudopulmon". Esta adaptación no sólo al medio dulceacuático si no también al terrestre, ha permitido a estos cangrejos ocupar tierras húmedas a cientos de metros de un cuerpo de agua. En estas especies existe un 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 1.6mm de ancho de caparazón. El desarrollo directo, es una respuesta a la necesidad de reducir la dispersión y 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 (Álvarez y Villalobos, 1997).

Los cangrejos de agua dulce son un importante componente del ecosistema ya que son procesadores eficientes de materia orgánica, depredadores de pequeños invertebrados y peces; a su vez, son alimento de una gran variedad de vertebrados y hospederos intermediarios de parásitos del hombre. No obstante, sólo existen unos cuantos estudios de su ecología, en contraste se ha publicado una vasta literatura acerca de su taxonomía, biogeografía y filogenia (Álvarez y Villalobos, 1997).

• Ritmos en Crustáceos

La importancia de una estructura temporal rítmica en organismos, desde unicelulares hasta los multicelulares, ha sido demostrada repetidamente como una adaptación a los parámetros cíclicos del ambiente. 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.

Dentro de los invertebrados los crustáceos son un de los grupos mas estudiados, a pesar de esto, la información de los relojes biológicos en este grupo es limitada debido a factores como; una talla pequeña, hábitats relativamente inaccesibles y la complejidad del ciclo ambiental en los que se desarrollan, lo que resulta en ritmos biológicos poco claros, y la fragilidad de muchos crustáceos bajo condiciones de laboratorio. 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 (DeCoursey, 1983).

En crustáceos ha sido difícil identificar directamente un reloj aislado (*in vitro*) sin embargo, se han realizado estudios a través de métodos indirectos, utilizando las salidas rítmicas del sistema para estudiar las propiedades del reloj. Entre los ciclos biológicos estudiados destacan: movimientos de pigmentos en los ojos, actividad locomotora, migración vertical y movimientos horizontales. En cuanto a ritmos reproductivos sobresalen cortejo, ovoposición, eclosión, y metamorfosis (DeCoursey, 1983). Entre otros ritmos investigados están los de respuestas fisiológicas como: las tasas metabólicas de algunos cangrejos; de aceleración del corazón en fase nocturna, del cambio del pH en músculos e hígado, de consumo de O₂, etc., postulándose con estos estudios la existencia de un ritmo general en el metabolismo (Brown, 1983).

Para decápodos en particular, los ritmos más estudiados son los de actividad locomotora (DeCoursey, 1983). Entre los principales estudios de ritmicidad de la actividad locomotora en decapodos de agua dulce, destacan los de acociles (Fanjul-Moles, 1998; Fanjul-Moles et.al, 1998; Miranda-Anaya y Fanjul-Moles, 1997; Fuentes-Pardo et.al, 1996; Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994); así, como estudios recientes en el cangrejo de río Pseudothelphusa americana (Miranda-Anaya et.al, 2003a; 2003b)

Diversos estudios apuntan a que el sistema circadiano en crustáceos es multioscilar (Page, 2001; Arechiga et.al, 1993). Se ha identificado que elementos diversos cumplen como relojes biológicos. Los mayores sistemas postulados como osciladores en crustáceos son: el pedúnculo ocular, y el protocerebro en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1975; Fanjul-Moles, 1998; Fuentes-Pardo et.al, 1996).

Existe evidencia indirecta de que el sistema circadiano se organiza alrededor de múltiples osciladores como es el fenómeno de partición "splitting" observado en roedores (Pittendrigh y Daan, 1976c) y que también se ha observado en Pseudothelphusa americana (Miranda-Anaya et.al, 2003b). Por otra parte, bajo condiciones de oscuridad constante algunas especies crepusculares presentan picos de actividad que oscilan con diferentes periodos, como Uca subcylindrica (Thurman y Broghammer, 2001), y Pseudothelphusa americana (Miranda-Anaya et.al, 2003a).

Otra evidencia indirecta es la variación en la relación de fase entre osciladores, como en Uca subcylindrica (Thurman, 1998) donde la relación de fase establecida bajo fotoperiodo natural depende de la época del año (longitud del día), o el caso de Pseudothelphusa americana, donde en ángulo de fase es diferente para los picos de mañana y tarde, dependiendo de las horas de luz (Miranda-Anaya et.al, 2003b).

Por último, se considera que, cuando el ritmo es conducido por dos osciladores, la Curva de Respuesta de Fase (CRF) para el oscilador de mañana (M) es diferente a la CRF para el oscilador de tarde (T) debido a que ambos osciladores presentan una dependencia diferencial a la luz (Pittendrigh y Daan, 1976c); sin embargo, en invertebrados hay muy pocos estudios en los que se analiza, si los componentes del ritmo de actividad locomotora muestran una respuesta diferencial a la luz (Alpatov et.al, 1999)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La importancia de la sincronización radica en que permite al organismo ajustar sus funciones a los cambios periódicos que ocurren en el ambiente. La Curva de Respuesta de Fase (CRF) es una herramienta que permite conocer la sensibilidad del marcapasos circadiano a diferentes estímulos; además, ayuda a entender los mecanismos por los cuales el ritmo se ajusta a las señales ambientales periódicas (Johnson, 1992). A pesar de su importancia, existen pocos estudios de CRF para actividad locomotora en crustáceos decápodos de agua dulce (Viccon-Pale y Fuentes-Pardo, 1994), como ya se menciona antes, esto puede deberse a que los crustáceos suelen presentar ritmos ruidosos, y a que muchos crustáceos en condiciones de laboratorio resultan ser muy frágiles (DeCoursey, 1983).

El cangrejo de río Pseudothelphusa americana es una especie crepuscular, que en condiciones de laboratorio presenta un ritmo circadiano bimodal donde los picos de actividad se encuentran relacionados con el encendido y el apagado de las luces (Ramírez-Lomelí, 2002). En esta especie, los componentes de actividad persisten bajo condiciones de oscuridad constante, y llegan a presentar diferentes períodos en libre curso (Miranda-Anaya, et.al, 2003a). Por otra parte, en condiciones de luz constante, el ritmo puede presentar el fenómeno de partición de actividad ("splitting") o fusión de los componentes de actividad. Además, se sabe que bajo fotoperiodos cortos y largos los picos de actividad presentan una relación de fase diferente con respecto al zeitgeber (Miranda-Anaya et.al, 2003b), lo que sugiere una regulación estacional de la estructura del ritmo.

Debido a lo anterior, se puede suponer que la actividad locomotora en esta especie puede estar conducida por un sistema multioscilar, semejante al modelo de dos osciladores M (mañana) y T (Tarde) propuesto por Pittendrigh y Daan (1976c) para roedores, en los cuales cada oscilador presentan una sensibilidad diferencial a la luz.

HIPOTESIS

Si el ritmo de actividad locomotora en el cangrejo de río Pseudothelphusa americana es regulado por osciladores distintos para el pico de actividad de mañana y tarde (M y T respectivamente), y estos osciladores presentan diferente sensibilidad a la luz; entonces, los cambios de fase, en respuesta a pulsos de luz, serán diferentes para ambos componentes del ritmo circadiano de esta especie.

OBJETIVOS

- **Objetivo General:**

Describir el efecto de la aplicación experimental de pulsos de luz sobre la fase de los picos de mañana (M) y de tarde (T), del ritmo circadiano de actividad locomotora en el cangrejo de río Pseudothelphusa americana.

- **Objetivos Particulares:**

1. Construir la Curva de Respuesta de Fase a pulsos de luz aplicados para el ritmo circadiano de actividad locomotora en Pseudothelphusa americana.
2. Determinar si existe una sensibilidad diferencial a la luz, entre los picos de mañana y tarde en el ritmo de actividad locomotora de esta especie.
3. Reconocer las horas circadianas de mayor y menor sensibilidad a los pulsos de luz, del ritmo circadiano de actividad locomotora de Pseudothelphusa americana.
4. Analizar los resultados obtenidos mediante la Curva de Transición de Fase correspondiente al pico de mañana y tarde.

MATERIAL Y METODO

• Obtención y Mantenimiento de Animales

Los ejemplares fueron obtenidos del laboratorio de investigación del Dr. Baltazar Barrera Mera; los cuales fueron colectados en Mixquiahuala, Hidalgo; y transportados al acuario de la Facultad de Ciencias en la UNAM, para ser aclimatados durante dos semanas a un fotoperiodo natural luz-oscuridad (12:12) y alimentados con carne cocida y verduras *ad libitum*. Durante el proceso de aclimatación los cangrejos fueron mantenidos en un acuario de vidrio 60x30x45cm, con agua de la llave, la cual era tratada por un filtro bacteriológico y cambiada parcialmente (80%) una vez a la semana.

• Diseño Experimental

El registro de actividad locomotora se llevó a cabo en las cámaras de ambiente controlado de la Facultad de Ciencias, UNAM; a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$. En total se utilizaron 48 cangrejos adultos, sin distinción de sexo. Durante el registro de actividad los organismos fueron colocados en acuarios individuales de 30x10x11cm, con agua de la llave, la cual era cambiada totalmente 3 veces por semana; el alimento fue provisto 3 veces a la semana en horarios aleatorios con el fin de no generar sincronización por esta actividad.

Un total de cuatro acuarios fueron colocados en un gabinete de madera con divisiones para contener un acuario cada uno; los gabinetes estaban acondicionados con lámparas (Phillips 150 lux), las cuales suministraron las condiciones luz por interruptores programables.

Los acuarios estaban equipados con fotosensores infrarrojos (NAFRI) que registraban el movimiento cada vez que el haz de luz era interrumpido; esta información se mandaba a una computadora que capturaba los datos (Fig.1). Los datos obtenidos fueron acumulados y guardados en bloques de 10 minutos a lo largo del periodo experimental, para su análisis posterior.

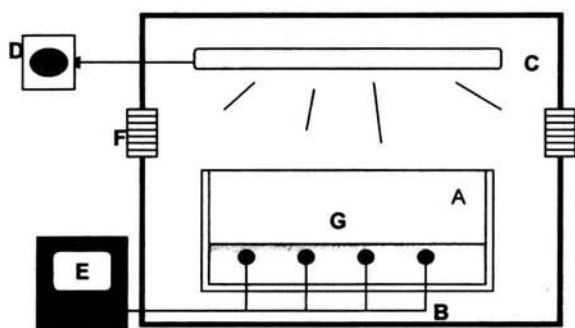


Figura 1. Dispositivo individual para el registro de actividad locomotora (RALM) A.- Acuario, B.- Sensores Infrarrojos, C.- Iluminación, D.- Reloj, E.- Computadora, F.-Ventilador, G.- Nivel de Agua.

Para construir la curva de respuesta de fase (CRF) en este experimento se utilizó la estrategia 2, propuesta por Aschoff (1965). Se colocó a los organismos bajo un fotoperiodo completo luz-oscuridad (12:12) durante 5 días o más con el fin de lograr la sincronización del ritmo y establecer relaciones de fase fijas, con lo cual se facilita la determinación de los picos de actividad de mañana y tarde.

Posterior a la sincronización se colocó a los organismos en condiciones de oscuridad constante (OO) y a distintas horas del primer día en esta condición (OO) se aplicó un pulso de luz de 2hrs (150 lux) en una hora determinada del ciclo. Los pulsos de luz se dieron en 12 puntos de tiempo circadiano (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23) cubriendo así el día y la noche subjetiva, para cada punto de tiempo circadiano se ocuparon de 3-4 organismos.

En este caso el tiempo circadiano en el que se aplica el pulso de luz, es una proyección de la hora en luz-oscuridad debido a que el ritmo se encontraba previamente sincronizado a un periodo de 24 hrs, por lo que una hora de tiempo circadiano es igual a una hora sideral. En un estado de sincronización para ciclos LO 12:12, TC 0=7:00 hrs, es arbitrariamente designado como la hora de inicio de la luz, la parte del fotoperiodo en la cual hay luz es designada como el "día subjetivo" (7:00-19:00), y la parte del fotoperiodo en la cual hay oscuridad es designada "noche subjetiva" (19:00-07:00) (Pittendrigh y Daan, 1976a).

Por último, se dejó correr el ritmo en oscuridad constante por un periodo de 4-5 días para observar el cambio de fase de los componentes de actividad M y T para el ritmo de actividad locomotora en Pseudothelphusa americana.

• Análisis de Datos

Los datos obtenidos para cada registro son series de tiempo, y se analizaron con el programa Dispac (Vega, 1994) con el cual se obtuvieron actogramas de doble gráfica (Fig.2) que muestran de manera gráfica el ritmo manifestado.

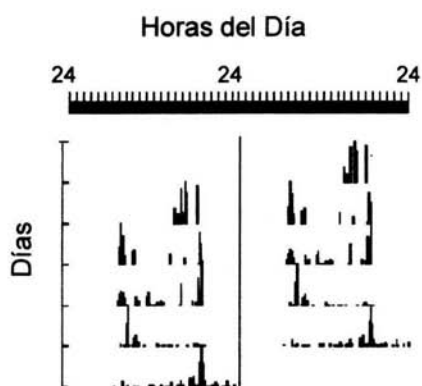


Figura 2.- Actograma de doble gráfica, el eje vertical representa los días, el horizontal las horas, y las barras negras indican la actividad locomotora. En el lado izquierdo se grafica la actividad del día anterior, lo cual nos permite observar el ritmo de una manera consecutiva.

Se obtuvieron periodogramas de X^2 (Fig.3) en intervalos de 0 a 30 horas para las condiciones de luz oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO), en ellos se muestra el periodo del ritmo; se consideró como significativo el pico resultante que presentaba valores de varianza de cada uno de los componentes del periodo (Qp) por encima del nivel del significancia ($P < 0.05$).

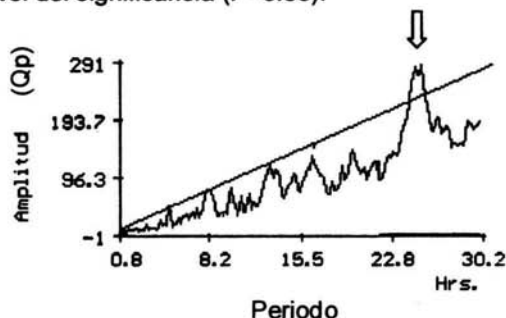


Figura. 3.- Periodograma. En el eje horizontal se grafican horas del periodo, en el vertical los componentes del periodo (Qp). La línea diagonal representa el nivel de significancia ($P < 0.05$). La flecha señala el pico que es considerado como el valor del periodo del ritmo.

Con el periodo resultante para cada condición experimental (LO y OO), se hizo una grafica de la curva promedio de actividad ajustada a su periodo y se obtuvo la fase (Φ) de máxima actividad, para los picos de mañana (M) y de tarde (T); la fase de ambos picos fue representada en horas siderales (Fig. 4).

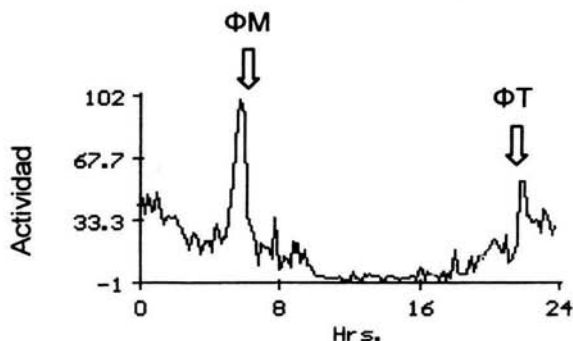


Figura. 4.- Curva de Actividad. El eje horizontal representa las horas, el vertical la actividad (eventos cada 10 min), las flechas señalan las fases de máxima actividad.

Además se obtuvo la distancia en horas entre el pico de mañana y tarde (ψ_{MT}), al restar la fase del pico de mañana (Φ_M) a la fase del pico de tarde (Φ_T); para las condiciones de luz-oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO).

$$\psi_{MT} = \Phi_T - \Phi_M.$$

Una vez obtenidas las fases de actividad para ambos componentes de actividad, en las condiciones de luz oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO), se determinó el cambio de fase para cada pico (Fig. 5), de acuerdo a lo propuesto por Aschoff (1965)

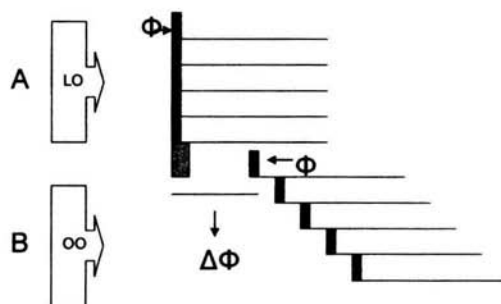


Figura 5.- Diagrama de un cambio de fase hipotético. A) ritmo está sincronizado en ciclos luz-oscuridad (12:12) y se observan las fase. B) muestra el ritmo en oscuridad constante después de recibir un pulso de luz (barra gris), y la nueva fase. El cambio de fase, es la distancia entre la fase anterior al pulso de luz y la fase después del pulso de luz ($\Delta\Phi$).

El cambio de fase para el pico de mañana ($\Delta\Phi_M$) se obtuvo restando la fase del pico mañana en oscuridad constante (Φ_{MOO}) a la fase del pico de mañana en luz oscuridad (Φ_{MLO}), lo cual es representado por la ecuación:

$$\Delta\Phi_M = \Phi_{MLO} - \Phi_{MOO}$$

Por su parte, el cambio de fase para el pico de tarde ($\Delta\Phi_T$) se obtuvo restando la fase del pico tarde en oscuridad constante (Φ_{TOO}) a la fase del pico de tarde en luz oscuridad (Φ_{TLO}), lo cual es representado por la ecuación:

$$\Delta\Phi_T = \Phi_{TLO} - \Phi_{TOO}.$$

Con los cambios de fase se construyó la Curva de Respuesta de Fase (CRF) para cada pico de actividad. La CRF se obtiene al colocar en el eje horizontal la hora en la cual se aplicó el pulso de luz, como horas de tiempo circadiano TC0 a TC 24 (TC 0 = 7:00 hrs.); y en el eje vertical la magnitud del cambio de fase obtenido para cada tiempo circadiano, los cambios de fase son presentados en horas. Los retrasos de fase son registrados como valores negativos y los avances de fase como valores positivos (Moore-Ede et.al, 1982a). Los puntos con diferencias significativas fueron obtenidos con la prueba estadística de t-student para muestras independientes (Infante-Gil y Zárate de Lara, 1984), mediante el programa "statistica" con diferencias significativas de $P < 0.05$.

Para determinar si existe una respuesta diferencial a la luz en ambos picos de actividad, se determinó el área bajo la curva (D-A), donde D es el área bajo la zona de retrasos y A, el área bajo la zona de avances. Las especies con zonas de retraso grandes presentan una diferencia positiva, lo contrario ocurre en organismos con zonas de adelanto amplias (Daan y Pittendrigh, 1976). Las áreas bajo la curva se obtuvieron por la regla trapezoidal (Haaser et.al, 1976).

Asimismo se hizo una gráfica con la diferencia entre los cambios de fase para ambos componentes; en el eje horizontal se graficó el tiempo circadiano y en el eje vertical la diferencia absoluta en horas. Con el fin de analizar la magnitud en los cambios de fase se obtuvieron las Curvas de Transición de Fase (CTF) (Daan y Aschoff, 2001) para cada pico; graficando en eje horizontal la fase anterior al pulso (Φ) y en el eje vertical la nueva fase alcanzada (Φ_n), que se define como:

$$\Phi_n = \Phi - \Delta\Phi$$

Todas las diferencias significativas se obtuvieron mediante t-student para muestras independientes y los promedios son mostrados con desviación estándar.

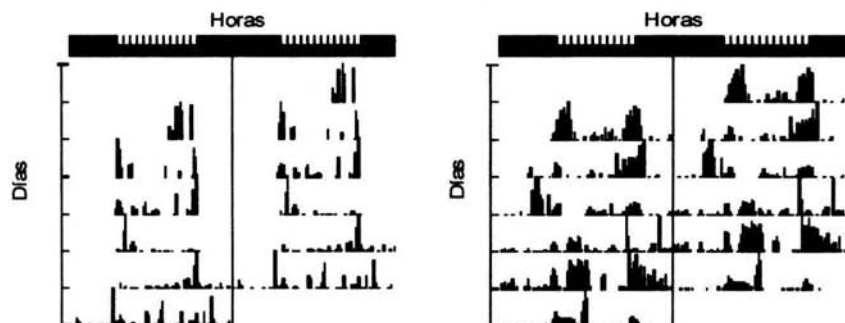
RESULTADOS

• Organismos en Fotoperiodos Completos

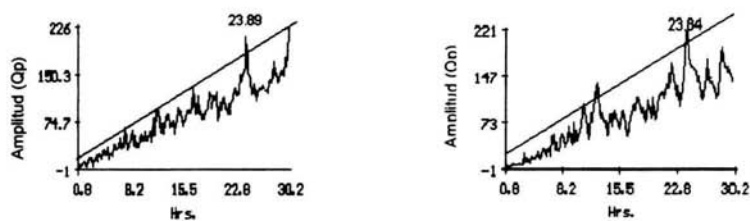
De los 48 organismos analizados en ciclos de luz-oscuridad (12:12), se observó que en el 83.33% (n = 40) el ritmo de actividad locomotora se sincronizó, con un periodo promedio de $T=23.94\pm 0.22$ hrs. (Fig. 6A y B). El 16.67% restante de los organismo no pudo ser sincronizado, por lo que no fueron considerados en el estudio. El número de ciclos transitorios para alcanzar la sincronización fue de 1 a 2.

Bajo fotoperiodos completos (LO 12:12), el ritmo de actividad locomotora es bimodal, presentando un componente de actividad alrededor del encendido de la luz (pico de mañana) $\Phi_M=7.93\pm 1.12$ hrs; y un segundo componente que anticipa el apagado de la luz (pico de tarde) $\Phi_T=18.43\pm 1.67$ hrs. (Fig. 6C). El 30% (n = 12) de los organismos presenta un tercer pico de actividad alrededor de la medianoche $\Phi=0.93\pm 2.4$ hrs. La relación de fase entre los picos de mañana y tarde es $\psi_{TM}=10.5\pm 1.59$ hrs.

A) Actogramas:



B) Periodogramas:



C) Curvas de Actividad:

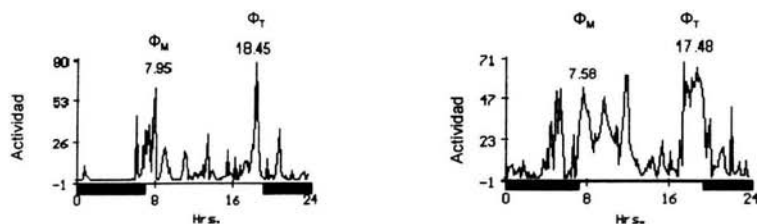


Figura 6. Ritmo de actividad locomotora en ciclos LO (12:12) para dos organismos. A) Actogramas que muestran un ritmo sincronizado, las barras oscuras indican la fase de oscuridad (19:00 a 07:00 hrs.). B) Periodogramas que denotan que el ritmo esta sincronizado. C) Curvas de actividad señalan un componente de actividad asociado al encendido de las luces y el segundo componente al apagado de la luz, la barra oscura representa la zona de oscuridad.

Los resultados obtenidos demuestran que Pseudothelphusa americana es una especie de hábitos crepusculares (actividad en el amanecer y en el ocaso). Sin embargo esta especie puede presentar mayor actividad a lo largo del día o la noche. Así, el 72.5% de los organismos presentaron mayor actividad durante el día (hábitos diurnos) y sólo el 27.5% presentó mayor actividad durante la noche (hábitos nocturnos) (Fig. 7).

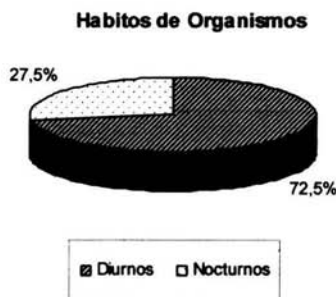
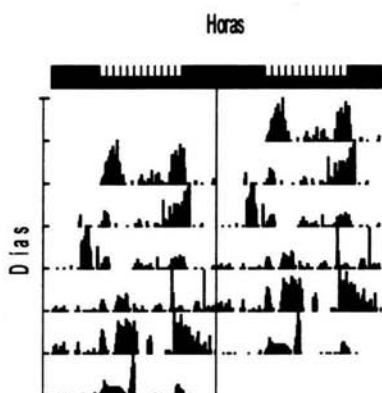


Figura 7. Porcentaje de organismos con hábitos diurnos y nocturnos de la especie Pseudothelphusa americana.

Al analizar las fases de mañana y tarde de manera separada para organismos diurnos y nocturnos, encontramos que la fase del pico de mañana no presenta diferencias significativas, en organismos diurnos $\Phi_M=8.2\pm 1.56$ hrs y nocturnos $\Phi_M=7.8\pm 0.62$ hrs; sin embargo la fase del pico de tarde presenta diferencias significativas ($p<0.05$) para organismos diurnos $\Phi_T=17.97\pm 1.4$ hrs y nocturnos $\Phi_T=19.65\pm 1.7$ hrs. (Fig.8). La distancia entre el pico de mañana y tarde (ψ_{TM}) también presenta diferencias significativas ($p<0.05$) en organismos diurnos $\psi_{TM}=10.14\pm 1.45$ hrs, y para organismos nocturnos $\psi_{TM}=11.45\pm 1.6$ hrs.

En la figura 8 se representan los actogramas para un organismo con mayor actividad durante el día (diurno) (Fig. 8A) y uno con mayor actividad durante la noche (nocturno) (Fig. 8B), los cuales están sincronizados con ciclos luz-oscuridad 12:12. En las curvas de actividad se observa que aunque el pico de mañana se presenta en una hora semejante $\Phi_M=7.58$ hrs para el diurno y $\Phi_M=7.26$ hrs para el nocturno; el pico de tarde ocurre más temprano $\Phi_T=17.48$ hrs para el organismo diurno que para el nocturno $\Phi_T=18.59$ hrs.

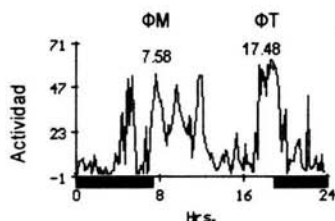
A) Organismo Diurno
Actograma.



B) Organismo Nocturno
Actograma.



Curva de Actividad.



Curva de Actividad

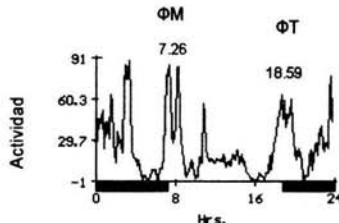


Figura 8. Muestra las diferencias en las fases de actividad para organismos diurnos (A) y nocturnos (B). Las Curvas de actividad muestran como los picos de actividad se asocian al encendido y apagado de las luces.

• Cambios de Fase

Los cambios de fase ocasionados por pulsos de luz están representados en las Curvas de Respuestas de Fase (CRF).

La CRF para el componente de actividad de mañana es unimodal (Fig.9) y presenta una zona de avances en TC 03 con un avance promedio de 2.48 ± 1.88 hrs, la zona de retrasos va de TC 21-01 con retrasos promedio de -1.65 ± 2.68 hrs; los mayores retrasos los encontramos en TC 01 con un retraso promedio de -3.42 ± 0.12 hrs. Tanto el final del día subjetivo y el inicio de la noche subjetiva (TC 05-19) se caracterizan por una baja respuesta al estímulo (zona muerta) con cambios de fase promedios de 0.58 ± 2.4 hrs.

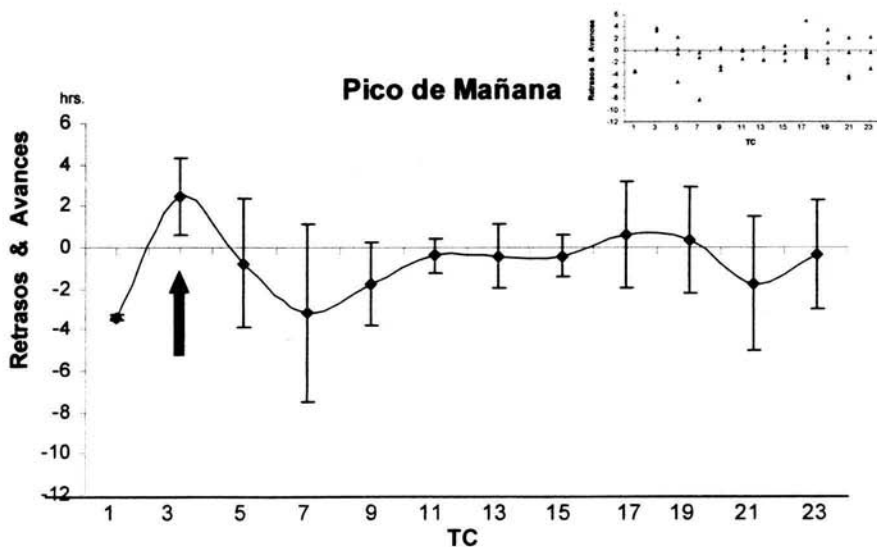


Figura 9.- Curva de Respuesta de Fase para el Pico de Mañana del ritmo de actividad locomotora en Pseudotrupes americana. Abajo se muestra CRF promedio con su desviación estándar, la flecha indica el punto que presentó diferencias significativas ($P < 0.05$). Todos los puntos obtenidos para la CRF se observan en el recuadro de la parte superior derecha.

Por lo que respecta a la Curva de Respuesta de Fase para el componente de actividad de tarde (Fig. 10), se observa una curva bimodal; con zonas de avance promedio en TC 03 de 1.7 ± 1.53 hrs y TC 11 de 2.09 ± 0.81 hrs.

Las zonas de retrasos van de TC 05-09 con un retraso promedio de -3.67 ± 4.24 hrs; y la noche subjetiva que se caracteriza por presentar una zona de retraso promedio de -2.17 ± 2.02 hrs. Lo puntos con mayores retrasos los encontramos en TC 01 con un retraso promedio de 5.65 ± 3.52 hrs y TC 07 con un retraso promedio de -6 ± 4.3 hrs.

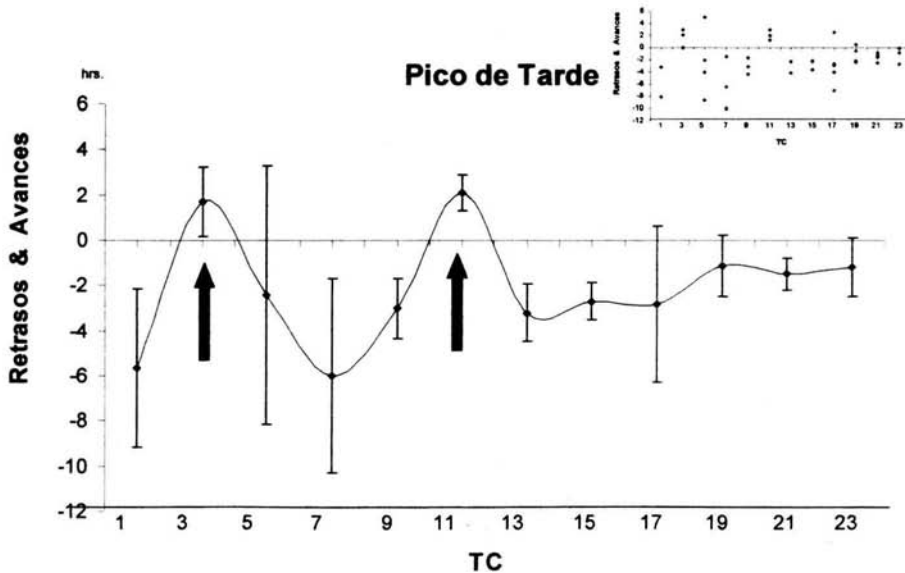


Figura 10.- Curva de Respuesta de Fase para el Pico de Tarde del ritmo de actividad locomotora en *Pseudothelphusa americana*. Abajo se muestra CRF promedio con su desviación estándar. Las flechas indica los puntos que presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Todos los puntos obtenidos para la CRF se observan en el recuadro de la parte superior derecha.

Las Curvas de Respuesta de Fase para el pico de mañana y tarde (Fig. 9 y 10) comparten el punto de inflexión en TC 01- 03. Esta similitud en el primer punto de inflexión puede observarse en los actogramas de la figura 11 y 12.

Así, en TC 01 hay una zona de retraso para ambos componentes de actividad (Fig.11). El actograma muestra un ritmo que se sincroniza a ciclos luz-oscuridad (LO) 12:12, lo cual es confirmado por el periodograma en LO $T=23.95$ hrs, en estas condiciones los picos de actividad presentan una fase estable. Después de dar el pulso de luz el ritmo en libre curso (OO) es $\tau=23.55$ hrs y se presentan cambios de fase para ambos picos. Así, el pico de mañana presenta un retraso de -3.33 hrs, y el pico de tarde un retraso de -3.16 hrs; esto es confirmado al comparar las curvas de actividad en LO y OO donde se observa el cambio en las fases de los picos de mañana y tarde (Fig.11).

En TC 03 encontramos una zona de avances (Fig. 12) El actograma muestra un ritmo que se sincroniza en LO con un periodo $T=23.78$ hrs, después de dar el pulso de luz el ritmo presenta un periodo en OO de $\tau=23.78$ hrs; y se observa el cambio de fase para ambos componentes; el pico de mañana presenta un avance de 3.28 hrs, y el de tarde un avance de 2.17 hrs; lo cual se confirma al comparar las curvas de actividad en ambas condiciones.

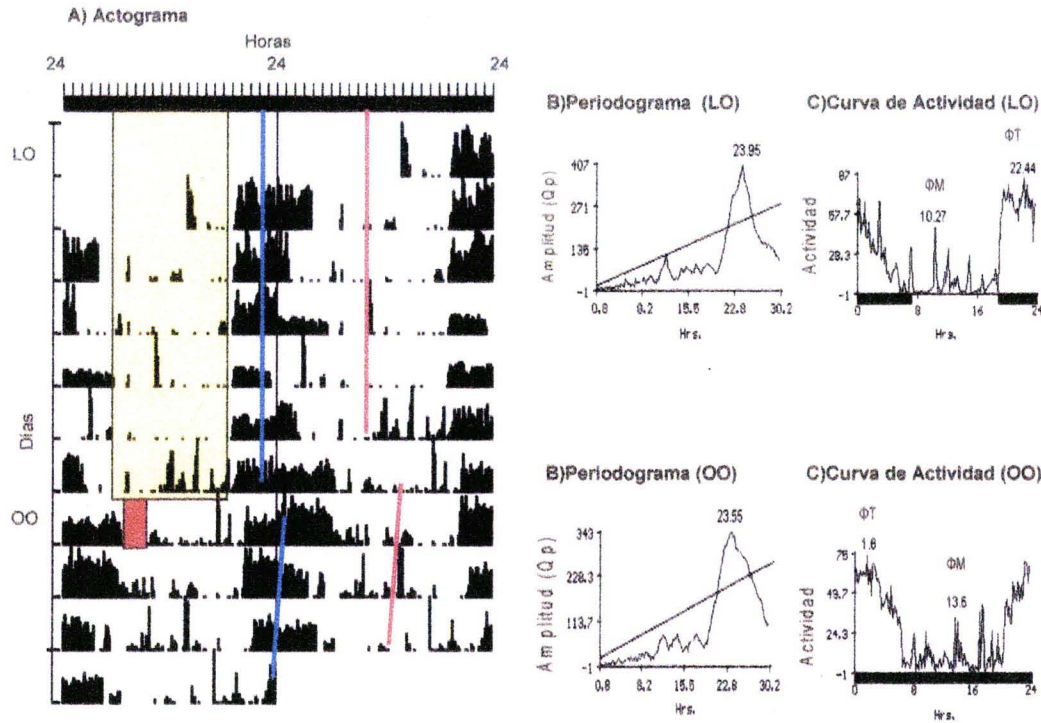


Figura 11.- A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz se aplica en TC 01. El cuadro amarillo indica la zona en la que el organismo recibe luz, el cuadro rojo el pulso de luz, las líneas rojas corresponden al pico de mañana y las azules al de atardecer. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad en horas para ambas condiciones, las barras negras indican las zonas de oscuridad.

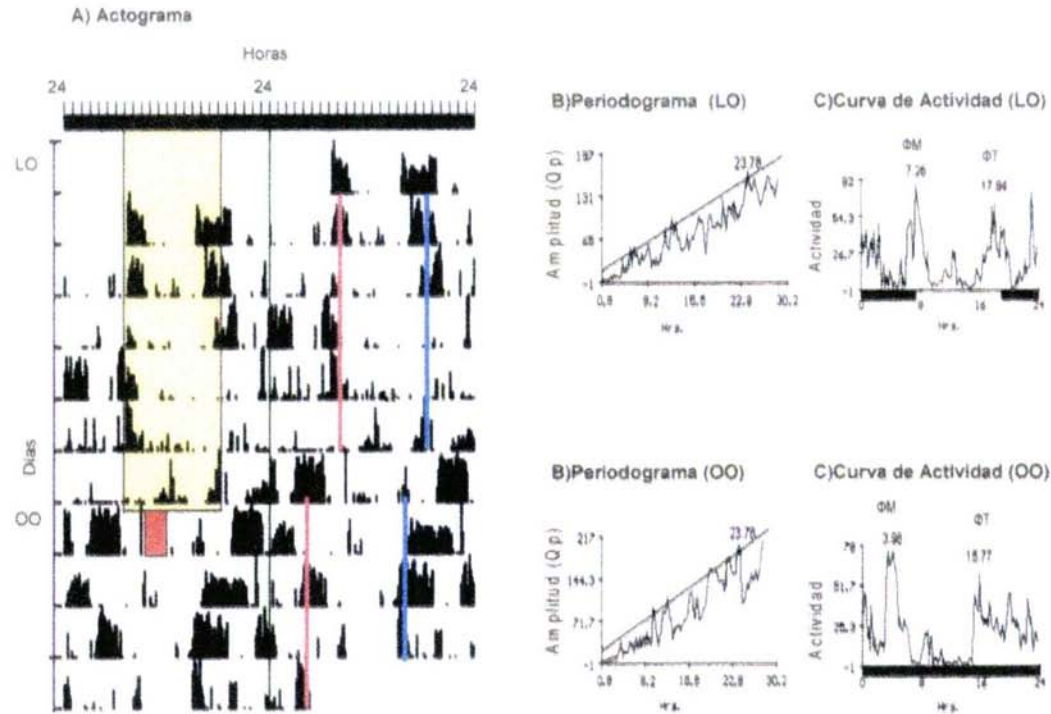


Figura 12. A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz se aplico en TC 03. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad, en horas, para ambas condiciones.

Por su parte, el pico de tarde presenta un segundo punto de inflexión en TC 07-11 (Fig.10), zona que para el pico de mañana presenta una sensibilidad menor (Fig.9). En la figura 13 observamos un ritmo que se sincroniza con un periodo de $T=23.89$ hrs y cuando el pulso de luz se aplica en TC 07, el pico de mañana presenta una respuesta nula al estímulo con un avance de 0.27 hrs, mientras que el pico de tarde presenta un retraso de fase de -1.48 hrs. El periodo en OO es " t "= 23.89 hrs; en este caso al observar las curvas promedios encontramos que la fase del pico de mañana no presenta grandes cambios, mientras que la fase del pico de tarde presenta un cambio mayor.

En la figura 14 se observa que cuando el pulso de luz es aplicado en TC 11 el pico de mañana presenta insensibilidad ante el estímulo con un retraso de 0.02 hrs, y el pico de tarde por el contrario presenta un avance de 1.99 hrs. El actograma muestra un ritmo sincronizado en LO con un periodo $T=24.4$ hrs, después del pulso de luz el ritmo en libre curso (OO) es " t "= 24.06 hrs; En este caso el pico de mañana permanece sin cambios y el pico de tarde presenta un avance de fase, lo cual se confirma al comparar las fases para ambos componentes en las curvas de actividad.

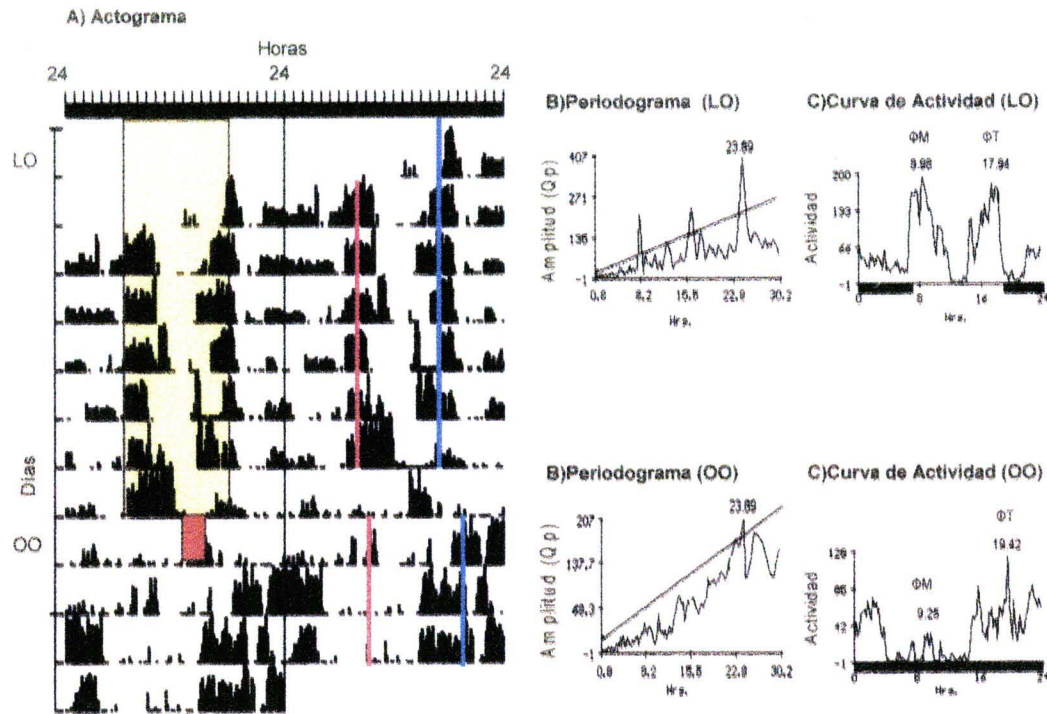


Figura 13. A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz es aplicado en TC 07. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad, en horas, para ambas condiciones.

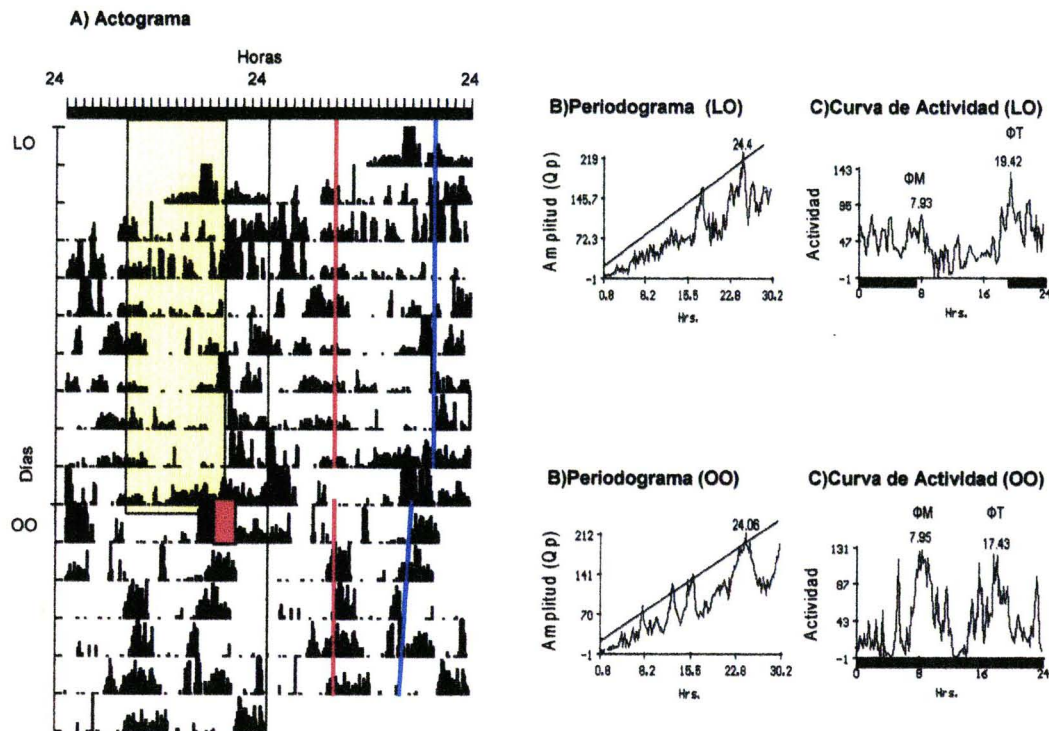


Figura 14.- A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz se aplico en TC 11. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad, en horas, para ambas condiciones

• Respuesta Diferencial a Pulsos de Luz

Las Curvas de Respuesta de Fase para los componentes de actividad de mañana y tarde del ritmo de actividad locomotora en Pseudothelphusa americana son diferentes (Fig. 8 y 9), así, mientras la CRF del pico de mañana es unimodal; la correspondiente al pico de tarde es bimodal. Por otra parte existen diferencias al obtener el área bajo la curva de los retrasos y avances (D-A), en el caso del pico de mañana el área bajo la curva es 11.74 y para el pico de tarde 42.35; es decir, ambas curvas presentan una zona predominante de retrasos, sin embargo, el área de retrasos es aproximadamente 3 veces mayor para el pico de tarde.

Podemos decir que salvo TC 23-03, en el resto del ciclo circadiano se presenta una respuesta diferencial a la luz (Fig. 15)

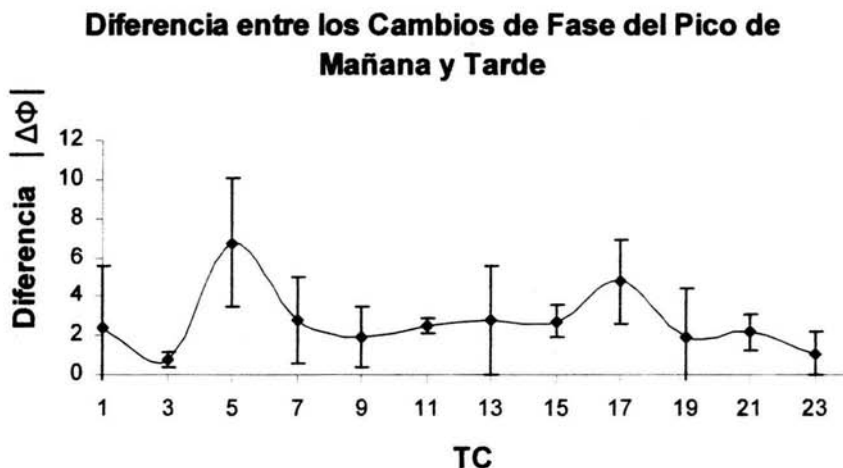


Figura 15.- Gráfica que muestra la diferencia absoluta promedio con desviación estándar, entre los cambios de fase para el pico de mañana y tarde. El eje horizontal se presentan los valores del tiempo circadiano en el que se aplica el pulso de luz y la diferencia es presentada en el eje vertical.

Al comparar las CRF (Fig. 9 y 10) notamos que un área en donde la respuesta al pulso de luz es diferente es TC 07-11, área que corresponde al segundo punto de inflexión en el pico de tarde. En la región de TC 05-09 los retrasos son de -1.78 ± 3.07 hrs para el pico de mañana y de -3.67 ± 4.2 hrs para el pico de tarde (Fig. 13), por otra parte, en TC 11 el pico de mañana presenta respuesta nula a la luz con un cambio de fase promedio de -0.39 ± 0.82 hrs, mientras que el pico de tarde presenta un avance de 2.09 ± 0.81 hrs (Fig. 14).

Por último, la noche subjetiva TC 13-21 se caracteriza por presentar poca sensibilidad a la luz para el pico de mañana con un cambio de fase promedio de -0.26 ± 2.32 hrs, mientras que el pico de apagado presenta una amplia zona de retrasos con un promedio de -2.17 ± 2.02 hrs.

Cuando el pulso de luz se aplica en TC 13 el pico de mañana presenta un retraso de -1.5 hrs y el pico de tarde un retraso de -2.31 hrs (Fig.16). El actograma muestra un ritmo sincronizado en LO con un periodo $T=23.89$ hrs, después del pulso de luz el ritmo en libre curso (OO) es $t^*=27.06$ hrs. En este caso el pico de mañana presenta un cambio de fase menor respecto al pico de tarde, lo cual se confirma al comparar las fases para ambos componentes en las curvas de actividad.

En la figura 17, el actograma muestra un ritmo sincronizado en LO con un periodo $T=23.89$ hrs, después de aplicar un pulso de luz en TC 21, el ritmo en libre curso (OO) es $t^*=24.68$ hrs. En este caso el pico de mañana no presenta un cambio de fase -0.29 hrs, como se observa al comparar las curvas de actividad, mientras que el pico de tarde presenta un retraso de fase de -1.51 hrs.

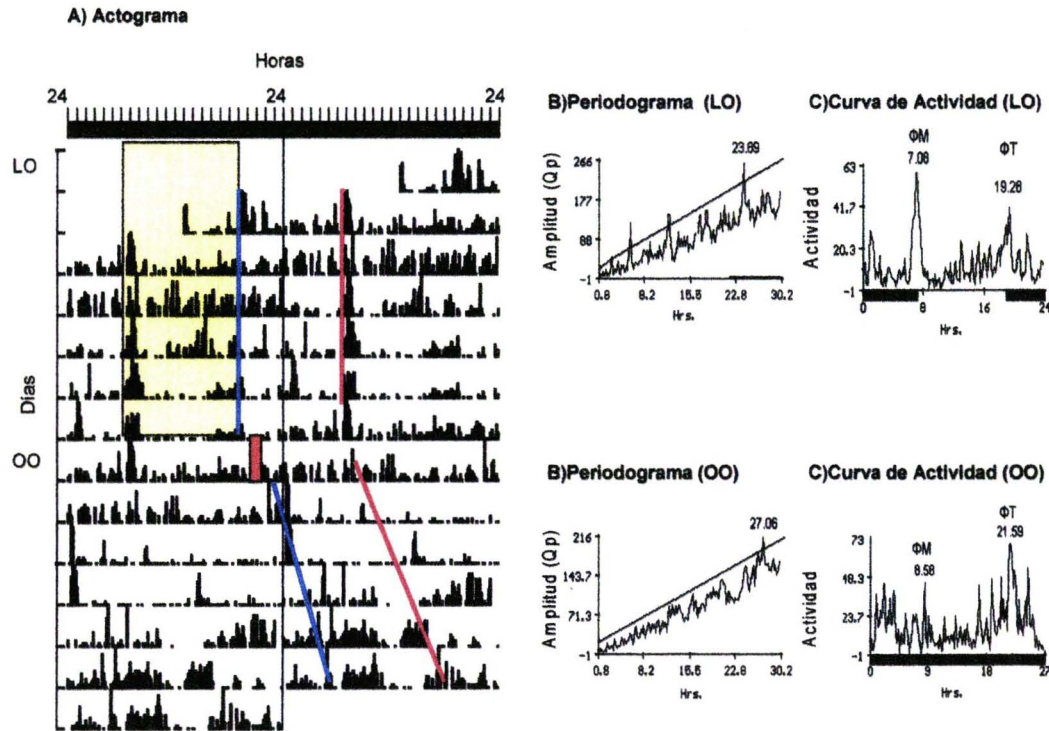


Figura 16.- A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz se aplica en TC 13. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad, en horas, para ambas condiciones

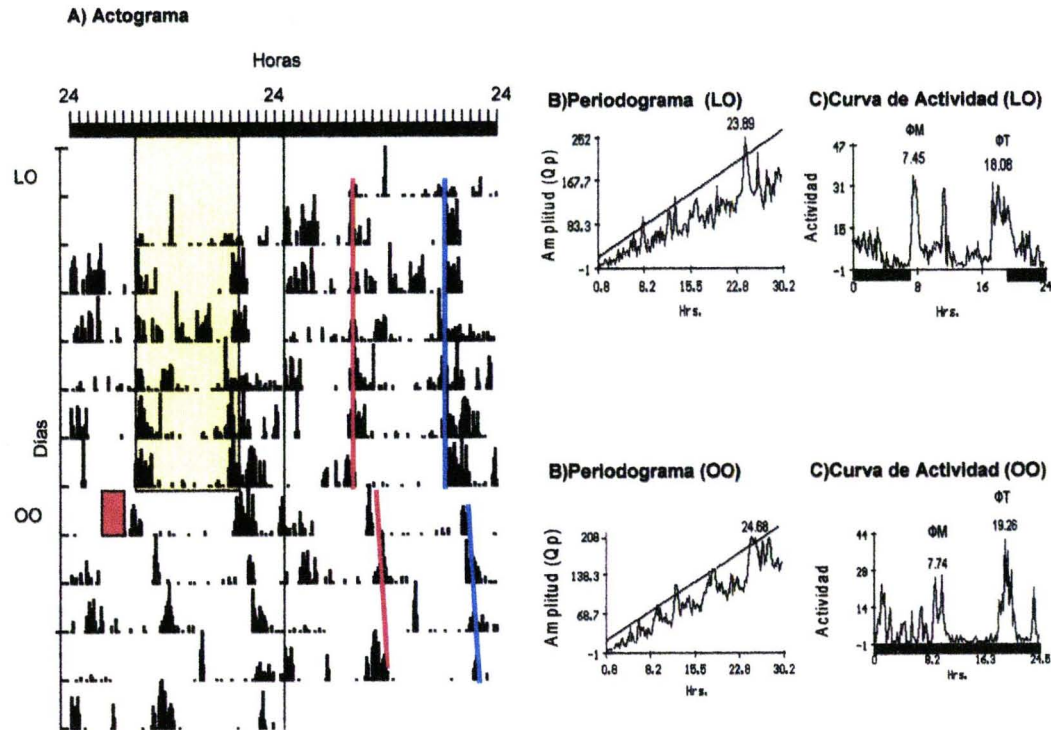


Figura 17.- A) Actograma que muestra el cambio de fase del ritmo de actividad locomotora cuando el pulso de luz se aplica en TC 21. B) Periodogramas para ambas condiciones LO y OO. C) Las Curvas de Actividad promedio muestran los picos de actividad, en horas, para ambas condiciones

Al hacer la gráfica de las Curvas de Transición de Fase (CTF) se observa que en la CTF para el pico de mañana la pendiente es 0.96 y para la CTF del pico de tarde la pendientes es 0.80, es decir, ambas curvas son tipo 1 (Fig. 18).

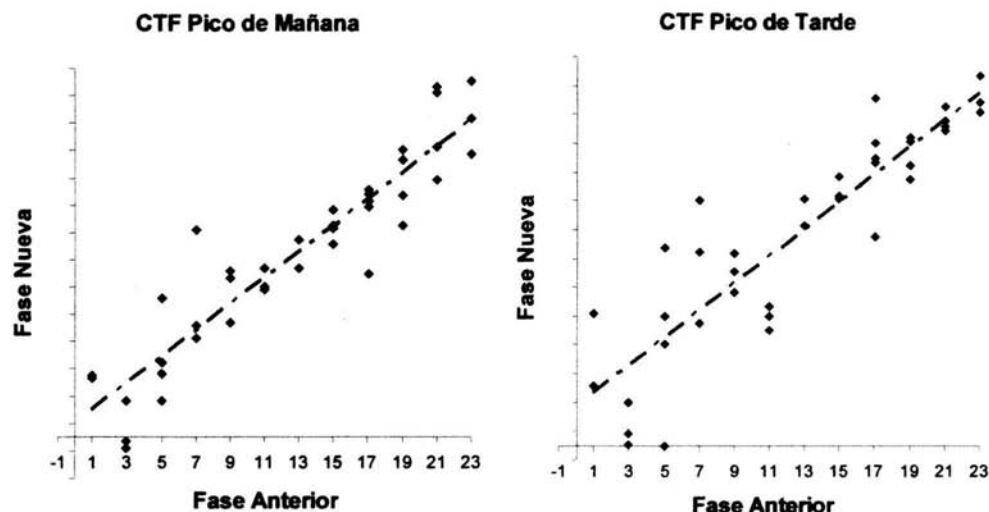


Figura 18.- Curvas de Transición de Fase (CTF) para pulsos de luz en el ritmo de actividad locomotora. A la derecha CTF para el pico de tarde. A la izquierda CTF para el pico de mañana. Las líneas negras indican la isolínea y las líneas punteadas la tendencia de los datos.

En la CTF para el pico de mañana, la mayor parte del ciclo circadiano presenta cambios de fase pequeños, esto por la poca dispersión con respecto a la isolínea, y la zona de mayores cambios se da de TC 19-05. Por lo que respecta a la CTF para el pico de tarde, presenta cambios de fase mayores.

• Organismos en Oscuridad Constante

El periodo en oscuridad constante fue de 24.98 ± 1.73 hrs y se observa una tendencia a cambiar dependiendo de la hora en la cual se aplica el pulso de luz (Fig. 19), donde los periodos menores o cercanos a 24 horas los encontramos en los organismos que recibieron pulsos de luz en el día subjetivo "t" 24.62 ± 1.52 hrs, mientras que los periodos largos "t" 25.27 ± 1.80 hrs, se presentaron al aplicar pulsos de luz en la noche subjetiva. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas al aplicar t-student.

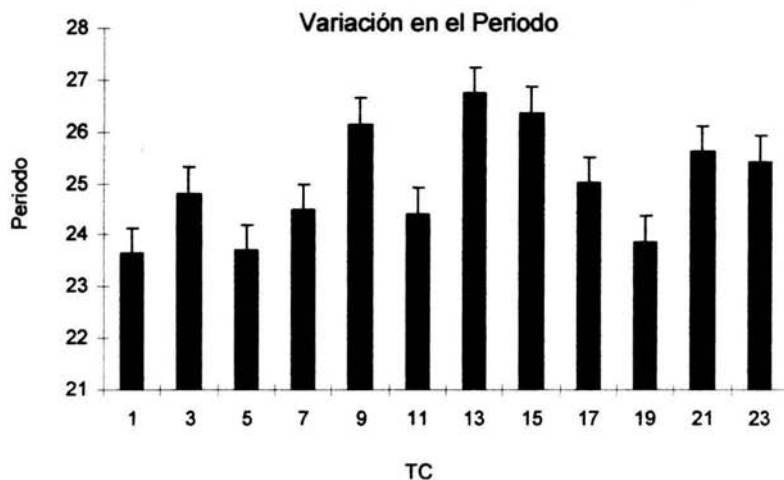


Figura 19. Gráfica que muestra la variación promedio del periodo en oscuridad constante dependiendo de la hora de tiempo circadiano en la cual se aplica el pulso de luz.

La distancia entre los picos de mañana (M) y tarde (T) fue de $\psi_{MT} 12 \pm 0.52$ hrs.

DISCUSION

Uno de los ciclos ambientales más importantes a los cuales se sincronizan los ritmos circadianos es el ciclo de luz-oscuridad (Daan y Aschoff, 2001). El cangrejo de río Pseudothelphusa americana presenta un ritmo circadiano bimodal de actividad locomotora en oscuridad constante (Ramírez-Lomelí, 2002). Así, bajo ciclos de luz-oscuridad (12:12) el 83.33% de los organismos se sincronizó con un periodo promedio de $T=23.94\pm 0.22$ hrs. En estas condiciones, uno de los componentes de actividad se encuentra alrededor del encendido de la luz (Pico de Mañana) $\Phi_M=7.93\pm 1.12$ hrs y el segundo componente anticipa el apagado de la luz (Pico de Tarde) $\Phi_T=18.43\pm 1.67$ hrs, lo que confirma las observaciones hechas por Miranda-Anaya et.al (2003a) y Ramírez-Lomelí (2002).

Un porcentaje relativamente alto de organismos (16.67%) no se sincronizó. En estos casos no se encontró un patrón definido en la actividad locomotora, por lo que es probable que estos individuos presentaran un patrón arrítmico desde el periodo de aclimatación y esta condición pudo perdurar durante la etapa en ciclos de luz-oscuridad (LO).

Pseudothelphusa americana ha sido caracterizada como una especie crepuscular (actividad en el amanecer y en el ocaso), cuyo comportamiento bajo fotoperiodos completos (12:12) se asemeja a lo observado para el cangrejo intermareal Uca subcylindrica, el cual presenta un ritmo de actividad locomotora circadiano bimodal con los picos de actividad asociados al encendido y apagado de las luces (Thurman y Broghammer, 2001), lo anterior sugiere que en cangrejos semiterrestres la organización del sistema circadiano podría ser semejante.

A pesar de que Pseudothelphusa americana es una especie crepuscular, se observó que el 72.5% de los organismos puede presentar actividad durante el día (hábitos diurnos) y el 27.5% presentan actividad durante la noche (hábitos nocturnos). Este comportamiento también se ha observado en Uca subcylindrica (Thurman, 1998) en donde los hábitos diurnos se observan en los meses de invierno (días cortos) y los hábitos nocturnos se presentan en los meses de verano (días largos), sugiriendo que la nocturnidad o diurnidad de los individuos está en función de los días largos y cortos.

Pseudothelphusa americana podría presentar un comportamiento parecido en la naturaleza al presentado por Uca subcylindrica, por desgracia no existen observaciones de este tipo para Pseudothelphusa americana realizadas en el campo. En este trabajo los experimentos se realizaron durante los meses de mayo a noviembre; los hábitos diurnos fueron encontrados principalmente entre los meses de julio a agosto y los hábitos nocturnos se presentaron solo durante los meses de mayo a julio, lo que nos indica una posible regulación estacional en los hábitos de esta especie, sin embargo, es necesario realizar estudios de sincronización a ciclos luz-oscuridad en diferentes épocas del año para corroborar esta hipótesis.

Por lo que respecta a los componentes de actividad, encontramos que la fase del pico de mañana es la misma para organismos con hábitos diurnos y nocturnos, por su parte el pico de tarde presenta una relación de fase diferente en ambas conductas, en organismos diurnos es de $\Phi_T=17.97\pm 1.4$ hrs y en nocturnos $\Phi_T=19.65\pm 1.7$ hrs, es decir, el pico de tarde retrasa su fase en organismos nocturnos.

Esto indica que probablemente es el pico de tarde el que cambia su fase para ajustarse a los días largos y cortos, lo que es apoyado por los resultados que Miranda-Anaya et.al (2003b) encontraron al someter a Pseudothelphusa americana a fotoperiodos largos y cortos, donde la fase para el pico de mañana es semejante en las diferentes condiciones de luz-oscuridad (12:12, 16:8, 8:16); mientras que el pico de tarde presenta cambios en la fase, retrasándose en fotoperiodos largos (16:8).

Pittendrigh y Daan (1976c) propusieron un modelo para el sistema circadiano el cual consta de dos osciladores, un oscilador de mañana (M) el cual corresponde al pico de encendido y un oscilador de tarde (T) correspondiente al pico de Tarde. En la actualidad el modelo de dos osciladores M y T parece confirmarse en roedores (Daan, et.al, 2001; Jagota, et.al, 2000) y se ha propuesto que el sistema circadiano de insectos como: Trigonoscelis gigas (Rietveld et.al; 1999); el cangrejo Uca subcylindrica (Thurman, 1998) y el cangrejo de río Pseudothelphusa americana (Ramírez-Lomeli, 2002), pueden presentar una organización circadiana de este tipo.

En invertebrados como el coleóptero Trigonoscelis gigas, se ha observado que los picos de actividad de mañana (M) y tarde (T) pueden presentar relaciones de fase diferentes con el zeitgeber (Rietveld et.al, 1999) lo cual se ha propuesto como evidencia de un sistema multioscilariorio; el hecho de que en Pseudothelphusa americana los componentes de actividad M y T también establezcan relaciones de fase diferentes con el zeitgeber sugiere un sistema multioscilariorio como el propuesto por Pittendrigh y Daan (1976c) .

La importancia de este modelo radica en que muchos animales presentan una actividad crepuscular con una compresión y descompresión de α (actividad) con los cambios estacionales; y este modelo permite explicar el ajuste a las demandas ecológicas por cambios en el fotoperiodo, a través de las distintas relaciones de fase que pueden existir entre estos osciladores, ya que ambos osciladores responden diferencialmente al encendido y apagado de las luces (Pittendrigh y Daan, 1976c), lo que confiere al organismo la capacidad para medir la longitud del día a lo largo del año y ajustar su actividad a las diferentes estaciones del año.

Por otra parte, este modelo propone que los osciladores presentan diferente sensibilidad a la luz, por lo que la Curva de Respuesta de Fase (CRF) para el oscilador T es diferente a la CRF para el oscilador M (Pittendrigh y Daan, 1976c). En este trabajo se encuentra que las CRF a pulsos de luz obtenidas para el pico de mañana (M) y tarde (T) del ritmo de actividad locomotora en Pseudothelphusa americana, son diferentes en forma y amplitud, es decir, M y T presentan una respuesta diferencial a la luz. Así, mientras la CRF para el pico de mañana es unimodal con un punto de inflexión en TC 01-03, la del pico de tarde es bimodal con puntos de inflexión en TC 01-03 y TC 07-11.

La forma inusual de la Curva de Respuesta de Fase para el pico de tarde en el ritmo de actividad locomotora de Pseudothelphusa americana, recuerda la curva bimodal para el ritmo circamareal de actividad locomotora en el crustáceo Excirolana (Enright, 1976). La naturaleza de la regulación rítmica en cangrejos ha sido discutida en el contexto de la presencia de actividad circamareal y circadiana, debido a que algunos cangrejos expuestos a mareas despliegan ambos tipos de ritmos (Naylor 1997), sin embargo, se ha dado otra interpretación que sugiere la presencia de ritmo circalunares. Estudios en cangrejos marinos demuestran que los ritmos circamareales en libre curso exhiben al menos dos intervalos de actividad con periodos diferentes, indicando que la actividad en estas especies puede estar controlada por más de dos osciladores con periodos circalunares débilmente acoplados entre sí (Palmer 2000).

Sin embargo, Excirolana es un organismo con un ritmo circamareal, mientras que Pheseudothelphusa americana presenta un ritmo circadiano que en libre curso no presenta componentes con un periodo circamareal ($t=12.4$ hrs) además de los circadianos, los cuales pudieran explicar la bimodalidad de la CRF para el pico de tarde (T). Además, Pheseudothelphusa americana al ser un cangrejo de río no está expuesto a mareas, por lo que la presencia de ciclos circamareales o circalunares resulta poco probable.

Por otra parte, el comportamiento de actividad locomotora de Pheseudothelphusa americana recuerda el de la especie Uca subcylindrica, la cual presenta un ritmo circadiano de actividad locomotora bimodal, donde los picos de actividad están asociados al encendido y apagado de las luces (Thurman, 1998); esto, aunado al hecho de que Pheseudothelphusa americana se sincroniza a ciclos de luz-oscuridad de 24 hrs, descarta la posibilidad de que el ritmo observado sea en realidad un ritmo circamareal (Thurman y Broghammer, 2001)

La estructura bimodal de la Curva de Respuesta de Fase para el pico de tarde en Pheseudothelphusa americana puede permitir cambiar los patrones de actividad de diurno a nocturno dependiendo de la longitud del día como lo ha propuesto Thurman (1998) para Uca subcylindrica, esto es apoyado también por el hecho de que, en condiciones de luz-oscuridad, los organismos pueden presentar ambos patrones de actividad. Por otra parte, la sensibilidad durante la noche subjetiva para el pico de la tarde puede estar relacionada con la variabilidad de la relación de fase entre el pico de actividad y la longitud del día.

Al observar las CRF en Pheseudothelphusa americana, encontramos que durante la primera parte del día subjetivo TC 01-03, la CRF para el pico de mañana (M) y las CRF para el pico de tarde (T) presentan un punto de inflexión similar, lo cual puede sugerir que ambos picos son conducidos por el mismo oscilador. Sin embargo, el resto de la curva muestra una respuesta diferencial a la luz, lo cual sugiere la presencia de un sistema multioscilariorio.

Así al comparar las CRF, encontramos que el resto de día subjetivo TC 05-09 presenta retrasos, los cuales son menores para el pico de mañana -1.78 ± 3.07 hrs. y mayores para el pico de tarde -3.67 ± 4.2 hrs. Con respecto a la noche subjetiva encontramos que durante la primera parte (TC 11-19) el pico de mañana presenta una zona muerta en la cual la respuesta al estímulo es muy baja, y una zona de retrasos pequeños que va de TC 21-01 -1.65 ± 2.68 . Por su parte, el pico de tarde presenta un avance de 2.09 ± 0.81 hrs. en TC 11 y una zona amplia de retrasos durante el resto de la noche subjetiva -2.17 ± 2.02 hrs.

Todo lo anterior nos indica una respuesta diferencial ante la luz de los picos de mañana (M) y de tarde (T), lo cual es corroborado al obtener el área bajo la curva, la cual es tres veces mayor para el pico de tarde, sugiriendo, que aunque ambos picos presentan zona predominante de retrasos, la amplitud de las cambios es mayor para el pico T, es decir, el pico T presenta mayor sensibilidad a la luz. Por otra parte, las Curvas de Transición de Fase (CTF) son tipo 1 para ambos picos, lo que habla de una sensibilidad a la luz que provoca cambios de fase menores de 8 hrs. (Johnson, 1999); sin embargo, la mayor dispersión de los datos, en la CRF para el pico de tarde, con respecto a la isolínea de cambio de fase, confirma que el pico de tarde es mas sensible a la luz.

Por último, al observar el periodo en oscuridad constante después del pulso de luz encontramos una tendencia del periodo a cambiar dependiendo de la hora en la cual se aplica el pulso de luz, donde los periodos menores o cercanos a 24 horas los encontramos en los organismos que recibieron pulsos de luz en el día subjetivo, y los periodos largos, se presentaron al aplicar pulsos de luz en la noche subjetiva. Esto podría indicar que los pulsos de luz causan post-efectos, sin embargo para corroborar estas observaciones se debe observar el ritmo en oscuridad constante antes del ciclo de luz oscuridad. Otros post-efectos que se han observado para esta especie son un alargamiento del periodo después de encontrarse bajo ciclos de luz oscuridad (Miranda Anaya et al; 2003a)

Una de las premisas del modelo de dos osciladores mañana (M) y tarde (T) propuesto por Pittendrigh y Daan (1976c), es que ambos osciladores presentan una respuesta diferencial a la luz; lo que se corrobora al encontrar Curvas de Respuesta de Fase (CRF) diferentes.

Lo anterior se ha encontrado en CRF parecidas, como el caso de el escarabajo del desierto Trigonoscelis gigas donde el área bajo la zona de avances y retrasos para el pico de actividad de M y T es diferente (Alpatov et.al; 1999), lo mismo se ha observado en el hámster donde la amplitud de los cambios de fase es diferente para el inicio y apagado de la actividad (Meijer y DeVries, 1995).

Al observar las CRF obtenidas en éste trabajo encontramos que los picos de actividad de mañana y tarde en Pseudothelphusa americana, también presentan una respuesta diferencial a la luz, por lo que el ritmo de actividad locomotora en esta especie puede estar conducido por un mecanismo semejante al propuesto por Pittendrigh y Daan (1976c). Sin embargo, en esta especie la CRF no es sólo diferente a nivel de la amplitud de los cambios, sino también en la forma, por lo que el mecanismo que conduce este ritmo puede ser más complejo.

Al parecer el pico de mañana presenta sensibilidad a la luz durante el día subjetivo y el pico de tarde presenta sensibilidad a la luz tanto en el día como la noche subjetiva. Lo que sugiere que un mismo oscilador (M) puede regular el componente de mañana y tener influencia sobre el componente de la tarde, y otro oscilador con sensibilidad durante la noche subjetiva (T), puede regular el componente de tarde.

Otra posibilidad para explicar las diferencias en las CRF para el componente de mañana (M) y el componente de tarde (T), sería que los osciladores M y T, sean sensibles a diferentes estímulos y por tanto los picos de actividad M y T se sincronizan con diferentes zeitgebers, lo cual se ha encontrado en roedores (Kennedy, 1998) y en acociles como Procambarus clarkii (Fernández de Miguel y Aréchiga, 1990), donde uno de los componentes de actividad se sincroniza con ciclos de luz oscuridad y el otro con ciclos de alimentación.

En el caso de Pseudothelphusa americana el pico de mañana podría sincronizarse con otro factor ambiental diferente a la luz; esto, por su poca sensibilidad a pulsos de luz, como se observa en su CRF, y apoyado por el hecho de que la fase del pico de mañana de actividad es muy estable al someterlo a diferentes fotoperiodos (Miranda-Anaya et.al, 2003b); sin embargo, si el pico de mañana presentara sensibilidad a un zeitgeber diferente a la luz, éste componente de actividad no se sincronizaría ante ciclos luz-oscuridad como en el caso de M y presentaría libre curso.

Podemos concluir, que los componentes de mañana y tarde en el ritmo circadiano de actividad locomotora del cangrejo de río Pseudothelphusa americana presenta una respuesta diferencial ante pulsos de luz. Observaciones en el campo sugieren que después del primer pico de actividad, el cangrejo permanece bajo el sedimento o piedras y sale de su refugio nuevamente hasta el atardecer. Durante la noche, los cangrejos se localizan en la orilla de los ríos expuestos en la superficie (Barrera-Mera, observaciones no publicadas). Lo anterior indica que durante el día subjetivo el animal no está expuesto a una iluminación directa, sugiriendo que la sincronización en esta especie puede llevarse a cabo por mecanismos no paramétricos; por lo que las diferencias encontradas en las Curvas de Respuesta de Fase pueden ser importantes para entender los mecanismos por los cuales el ritmo se ajusta al ciclo de rotación de la tierra.

CONCLUSIONES

1. Los Picos de Mañana y Tarde presentan una respuesta diferencial a la luz, lo cual es comprobado por las CRF que difieren en forma y amplitud. Por lo que el sistema circadiano en esta especie que puede estar controlado por más de un oscilador.
2. Se sugiere que un mismo oscilador (M) puede regular el pico de mañana y tener influencia sobre el pico de la tarde, y otro oscilador con sensibilidad durante la noche subjetiva (T) regula el pico de tarde.
3. Pseudothelphusa americana presenta hábitos diurnos y nocturnos los cuales puede permitir el ajuste a fotoperiodos largos y cortos por las relaciones de fase establecidas
4. El Pico de Tarde presenta una mayor sensibilidad a la luz, por lo que puede ser este el que cambie su relación de fase para ajustarse a las diferentes longitudes del día a lo largo del año.
5. La diferencia en la sensibilidad para los picos de mañana y tarde en el ritmo de actividad locomotora puede ser una adaptación que permite a los organismos ajustarse a los cambios estacionales.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Roblero, R; 1993; **Teorías Básicas de los Ritmos Biológicos**; *Psiquis*; 2(6):121-132pp.
- Alpatov, A.M; W.J. Rietveld y E.G. Tumurova; 1999; **Phase and Period Responses of the Two-Peak Circadian Rhythm of *Trigonoscelus gigas* Reitter (Coleoptera: Tenebrionidae) for 6-hr Light Pulses**; *Biological Rhythms Research*; 30(2):122-134pp.
- Álvarez, F. y J.L. Villalobos; 1997; **Pseudothelphusidae y Trichodactylidae (cangrejos)**; En: *Historia Natural de los Tuxtlas*; González S.E, R. Dirso y R.C. Voght (eds.); Instituto de Biología; UNAM-CONABIO; México; 415-418pp.
- Álvarez, F; J.L. Villalobos y E. Lira; 1996; **Decapoda**; En: *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México. Hacia una síntesis del conocimiento*; J. Llorente, A.N. García-Aldrete y E. González (eds.); Instituto de Biología UNAM-CONABIO; México; 103-129pp.
- Aréchiga H., F. Fernández-Quiroz, F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa; 1993; **The Circadian System of Crustaceans**; *Chronobiology Internacional*; 10(1):1-19pp.
- Aschoff, J; 1960; **Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms**; En: *Symp. Quant. Biol.*; Vol. 25; Cold Spring Harbour 11-26pp.
- Aschoff, J; 1965; **Response Curves in Circadian Periodicity**; En: *Circadian Clocks*; J. Aschoff (ed.); North-Holland, Amsterdam; 95-111pp.

- Brown, A.F; 1983; **Physiological Rhythms Cap.11**; En: The Physiology of Crustaceans, Sense Organs, Integration and Behavior; Waterman T.H (ed.); Academic Press; E.U.; Vol.7; 401-455pp.
- Bruce, V.G; 1960; **Environmental Entrainment of Circadian Rhythms**; En: Symp. Quant. Biol.; Vol. 25; Cold Spring Harbour; 29-48pp.
- Daan, S., U. Albrecht, G.T.J. van der Horst, H. Illnerova, T. Roenneberg, T.A. Wehr y W.J. Schwartz; 2001; **Assembling a Clock or All Seasons: Are There M and E Oscillators in the Genes?**; Journal of Biological Rhythms; 16(2):105-116pp.
- Daan, S. y J. Aschoff; 2001; **The Entrainment of Circadian Systems Cap.1**; En: Handbook of Behavioral Neurobiology Circadian Clocks; Vol.12; J.S. Takahashi, F.W. Tore, R.Y. Moore (eds.); Kluwer Academic, Plenum Publishers; New York; 7-35pp.
- Daan, S. y C.S Pittendrigh; 1976; **A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents II: The Variability of Phase Response Curves**; Journal Comparative Physiology A; 106:253-266pp.
- DeCoursey, J.P; 1983; **Biological Timing**; En: The Biology of Crustacea; Vol. 7; Bliss E.D; F.J. Vernberg y B.W. Vernberg (eds.); Behavior and ecology; Academic Press; E.U; 210-277pp.
- Enright, J.T.; 1976; **Resetting a Tidal Clock: A Phase-Response Curve for Excitrolana**; En. Biological Rhythms in the Marine Environment; DeCoursey, P. J. (ed.); University of South Carolina Press, Columbia South Carolina; 103-144pp.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Fanjul-Moles, M.L.; 1998; **Ontogenetic Study of a Circadian Rhythm in Crayfish: Clock Pacemaker and entrainment**; Comparative Biochemistry & Physiology; 5:153-160pp.
- Fanjul-Moles, M.L, O. Castañón-Cervantes y J. Prieto-Sagredo; 1998; **Effect of Skeleton Photoperiods upon the Circadian Locomotor Activity Rhythm During Development in Crayfish *Procambarus clarkii***; Biological Rhythms Research; 29(3):1-15pp.
- Fernandez de Miguel, F. y H. Arechiga; 1990; **Circadian Locomotor Activity and its Entrainment by Food in the Crayfish *Procambarus clarkii***; Journal Experimental Biology; 190:9-21pp.
- Fuentes-Pardo, B, M. Lara-Aparicio, S. López de Medrano y J. Viccon-Pale; 1996; **Motor Circadian Rhythm in Crayfish. An Experimental and Theoretical Study**, Comparative Biochemistry & Physiology; 2: 113-127pp
- Gruart, A., J.M. Delgado, C. Escobar y R. Aguilar-Roblero; 2002; **Los Relojes que Gobiernan la Vida**; Col. La ciencia para todos; Vol.188; SEP, Fondo de Cultura Económica y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; México, D.F; 197pp.
- Haaser, B. N., J.P. LaSalle y J.A. Sullivan; 1976; **Método de Integración Cap.15**; En: Análisis matemático. Curso de Introducción; Vol.1; Editorial Trillas; México; 719-760pp.
- Infante-Gil, S, y G. P. Zárate de Lara; 1984; **Métodos Estadísticos un enfoque interdisciplinario**; Editorial Trillas; México; 643pp.

- Jagota, A., H.O. de la Iglesia y W. J. Schwartz; 2000; **Morning and Evening circadian Oscillations in the Suprachiasmatic Nucleus *in vitro***; *Nature Neuroscience*; 3(4):372-306pp.
- Johnson, C.H; 1999; **Forty Years of PRCs- What Have We Learned?**; *Chronobiology International*; 16(6):711-743pp
- Johnson, C.H; 1992; **Phase Response Curves: What Can They Tell Us about Circadian Clocks?**; En: *Circadian Clocks from Cell to Human*; T. Hiroshige y K. Honma (eds.); Sapporo, Japan Hokkaido; University Press; 209-246pp.
- Johnson, C.H; J. Elliot, R. Foster, K. Honma y R. Kronauer; 2003a; **Fundamental Properties of Circadian Rhythms Cap. 3**; En: *Chronobiology Biological Timekeeping*; Dunlap, J.C; J.J. Loros; P.J. DeCoursey (eds.) Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland; Massachussets, USA; 67-106pp
- Johnson, C.H; J. Elliot, R. Foster; 2003b; **Entrainment of Circadian Programs**; *Chronobiology International*; 20(5): 741-774pp.
- Kennedy, G.A; 1998; **Biological Rhythms**; En: *Bases Neurológicas y Ecológicas de la Conducta*; Martínez-Gómez M y Velásquez-Moctezuma J (comp.), UAT, UAM, UV, UNAM; México; 117-152pp.
- Liu, Y; C. Heintzen, J. Loros y J. C. Dunlap; 1999; **Regulation of Clock Genes**; *Cell. Mol. Life Sci*; 55:1195-1205.
- Meijer, J. H. y M. J. De Vries; 1995; **Light-Induced Phase Shifts in Onset and Offset of Running-Wheel Activity in the Syrian Hamster**; *Journal of Biological Rhythms*; 10(1):4-16pp.

- Miranda-Anaya M., B. Barrera-Mera y E. Ramírez-Lomeli; 2003a; **Circadian Locomotor Activity in the Freshwater Crab *Pseudothelphusa americana* (De Saussure, 1857): Effect of Eyestalk Ablation**; Biological Rhythms Research; 34(2):167-176pp.
- Miranda-Anaya M., E. Ramírez-Lomeli y V. P. Carmona-Alcocer; 2003b; **Circadian Locomotor Activity Under Artificial Light in the Freshwater Crab *Pseudothelphusa americana***; Biological Rhythms Research; En prensa.
- Miranda-Anaya M., y M.L. Fanjul-Moles; 1997; **Nonparametric Effects of Monochromatic Light on the Activity Rhythm of Juvenile Crayfish**; Chronobiology International; 14(1):25-34pp.
- Moore-Ede, M.C., F.M Sulzman; C.A Fuller (eds.); 1982a; **Characteristics of the Circadian Clocks. Cap.2**; En: The Clocks That Time us: Physiology of the Circadian Timing System; Harvard University Press; Cambridge, U.S.A.; 30-112pp.
- Moore-Ede, M.C., F.M. Sulzman y C.A. Fuller (eds.); 1982b; **Organization of the Circadian Timing System. Cap.3**; En: the Clocks That Time us: Physiology of the Circadian Timing System; Harvard University Press, Cambridge, U.S.A. 113-151pp.
- Naylor, E; 1997; **Crab Clocks Rewound**; Chronobiology International, 14(4):427-430pp.
- Palmer, J.D.; 2000; **The Clocks Controlling de Tide-associated Rhythms of Intertidal Animals**; BioEssays; 22:32-37pp.

- Page, T.L.; 2001; **Circadian Systems of Invertebrates**; En: Handbook of Behavioral Neurobiology Circadian Clocks; Vol.12; J. S. Takahashi, F.W. Tore, R.Y. Moore (eds.); Kluwer Academic, Plenum Publishers; New York; 79-103pp.
- Page, T.L. y J.L. Larimer; 1975; **Neural Control of Circadian Rhythmicity in the Crayfish. I. The Locomotor Activity Rhythm**; Journal Comparative Physiology; 97:59-80pp.
- Pittendrigh, C.S y S. Daan; 1976a; **A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents I: The Stability and Lability of Spontaneous Frequency**; Journal Comparative Physiology A; 106:223-252pp.
- Pittendrigh, C.S y S. Daan; 1976b; **A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodent IV. Entrainment: Pacemaker as Clock**; Journal Comparative Physiology A; 106:291-331pp.
- Pittendrigh, C.S y S. Daan; 1976c; **A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodent V: Pacemaker Structure: A Clock for All Seasons**; Journal Comparative Physiology A; 106:333-355pp.
- Ramírez-Lomelí, E. 2002; **Caracterización del Sistema Circadiano que Regula el Ritmo de Actividad Locomotora del Cangrejo del Río Pseudothelphusa americana**; Tesis de Maestría; Biología; Facultad de Ciencias; UNAM; 62pp.
- Rietveld, W.J., A.M. Alpatov y E.G. Tumurova; 1999; **Entrainment of the Two-Peak Circadian Rhythm of *Trigonoscelus gigas* Reitter (Coleoptera: Tenebrionidae) with non-24-hr Zeitgebers**; Biological Rhythms Research; 30(2):113-122pp.

- Ruppert, E. E. y R.D. Barnes; 1996; **Crustáceos Cap14**; En: Zoología de los Invertebrados; 6ta edición; Mc Graw Hill; México, DF; 682-805pp.
- Thurman C.L; 1998; **Locomotor Rhythms in the Fiddler Crab, *Uca subcylindrica***; Biological Rhythms Research; 20(2):179-196pp.
- Thurman C.L. y A.M. Broghammer; 2001; **Locomotor Activity of the Fiddler Crab, *Uca subcylindrica*, Under Artificial Illumination**; Biological Rhythms Research; 32(1):85-99pp.
- Vega, G.A; 1994; **Diseño e implementación de un sistema de análisis de señales en cronobiología**; Tesis de Licenciatura; Facultad de Ingeniería; UNAM:
- Viccon-Pale J.A. y B. Fuentes-Pardo; 1994; **Synchronization by Light of the Circadian Rhythm of Motor Activity in the Crayfish**; Biological Rhythms Research; 25(3):267-276pp.