



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACIÓN DEL RITMO
CIRCADIANO DE ACTIVIDAD
LOCOMOTRIZ EN EL RATÓN DE LOS
VOLCANES *Neotomodon alstoni alstoni***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA:

JAZMÍN SELENE SAMARIO ROMÁN



Director: Dr. Manuel Miranda Anaya

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de la alumna

**Samario
Román
Jazmín Selene
56026780
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
98040841**

2. Datos del tutor

**Doctor
Manuel
Miranda
Anaya**

3. Datos del sinodal 1

**Doctor
Baltasar
Barrera
Mera**

4. Datos del Sinodal 2

**Doctor
René de Jesús
Cárdenas
Vázquez**

5. Datos del Sinodal 3

**M en C
Enrique
Moreno
Sáenz**

6. Datos del Sinodal 4

**M en C
Agustín
Carmona
Castro**

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del ritmo circadiano de actividad locomotriz en el ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni*

**56 p
2007**

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la oportunidad de formarme entre sus aulas y recibir la mejor formación académica y humana.

A la Facultad de Ciencias por proporcionarme una formación en las ciencias.

Al Laboratorio de Biología Animal Experimental por el tiempo y el espacio brindado.

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias y a toda la valiosa gente que en él labora: Dr. Mario Ortega del que tanto aprendí en el manejo técnico y ético de los animales, gracias.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por todo su apoyo, comprensión y enseñanzas brindadas para la realización de este trabajo y mi formación profesional y personal. Por abrir un espacio a todos los interesados en encontrar los Zeitgebers.

Al Dr. Rene Cárdenas por su valioso tiempo y comentarios a este trabajo y por encaminarme al gusto por la fisiología animal.

Al M. en C. Enrique Sáenz por el tiempo brindado a este trabajo, por sus consejos y su gran apoyo proporcionado desde el Taller de Ritmos Biológicos.

Al M. en C. Agustín Carmona por sus enseñanzas y ayuda en la recolecta y manejo de los ratones y por el tiempo y comentarios a este trabajo.

Al Dr. Baltasar Barrera por sus comentarios y tiempo a este trabajo y sus aportaciones al estudio de los ritmos biológicos.

A mis padres que no solo me dieron la vida, me han dado lo que soy. A mi hermano que ha sido también mi amigo y me ha dado siempre su apoyo.

A Martín; Mi amor, muestra de que el amor enseña, apoya y da fuerzas para realizar.

A Ana mi gran amiga que ha estado ahí siempre. A Marisol mi amiga de toda la vida. A aquellas amigas que me han aconsejado y me han brindado su amistad.

Y a todos los Neotomodon que brindaron su vida para que se realizara este trabajo.

Apoyado por proyecto PAPIIT IN202808

*Para Dios, mis Padres
y Martín...*

Todo tiene su tiempo, y todo
lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora.
Tiempo de nacer, y tiempo de morir;
tiempo de plantar, y tiempo de arrancar
lo plantado;

Eccl 3

Índice

• Resumen.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
• Los ritmos biológicos.....	2
• Revisión general sobre la historia de los ritmos circadianos.....	3
CARACTERÍSTICAS GENERALES	
DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	4
• Libre curso (free running).....	4
• Variabilidad del periodo.....	6
• Historia previa, post efectos.....	8
• Regla de Aschoff.....	9
• Sincronización y Zeitgeber	10
• Enmascaramiento (masking).....	12
• Sincronización Paramétrica.....	12
• Sincronización no paramétrica.....	14
• Curva de respuesta de fase.....	15
• Coordinación Relativa.....	16
• Compensación a la Temperatura.....	16
ANÁLISIS EN EL ESTUDIO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.....	17
ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA CIRCADIANO EN MAMÍFEROS.....	21
• Núcleo Supraquiasmático.....	21
• Biología molecular del reloj circadiano en mamíferos.....	22
BIOLOGÍA GENERAL DE LA ESPECIE.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y MÉTODO.....	29
• Animales.....	29
• Sistema de registro de actividad.....	29
• Protocolo experimental.....	32
• Análisis de datos y tratamientos estadísticos.....	33

RESULTADOS	35
• Sincronización Paramétrica y condición constante (LO y OO).....	35
• Sincronización no Paramétrica (FE) y libre curso en OO.....	37
• Efecto de la luz constante sobre el ritmo de actividad locomotriz.....	38
ANÁLISIS INTEGRAL DE RESULTADOS	41
• Variabilidad del periodo.....	41
• Variación en la máxima actividad después del inicio de α en cada condición.....	42
• Variaciones en el promedio de la amplitud de la fase de máxima actividad en cada condición.....	43
• Variaciones en el promedio de la duración de la alpha.....	44
• Variaciones en los promedios de Rho (ρ), Relación de fase (Ψ) y Estabilidad de fase.....	45
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	52
• REFERENCIAS	53

RESUMEN

Un ritmo biológico es aquel proceso biológico que se repite con cierta periodicidad en el tiempo, la rama de la biología que se encarga de su estudio es la cronobiología. Existe un tipo de ritmo biológico cuya duración es cercana a un día por lo que recibe el nombre de ritmo circadiano, estos ritmos tiene una gran importancia en la conducta evolutiva, adaptativa y ecológica de los organismos.

Este trabajo comprende un estudio descriptivo del ritmo circadiano de actividad locomotriz del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni alstoni*, roedor endémico del eje Neovolcánico Transversal. Se llevó a cabo una caracterización del ritmo circadiano de actividad locomotriz obtenido mediante ruedas de ejercicio bajo distintas condiciones de iluminación. En este estudio se cuantificaron distintos parámetros en las diferentes condiciones de iluminación bajo las cuales fue expuesto: 12 horas luz y 12 horas oscuridad (LO), oscuridad constante (OO), Fotoperiodo esqueleto y luz constante (LL).

Los resultados indican que el ratón *Neotomodon alstoni alstoni* es un roedor nocturno y de fácil sincronización con distintas condiciones de iluminación y que este exhibe un periodo circadiano menor a las 24 horas en oscuridad constante.

El promedio del periodo en condición LO fue de 24.09 h, en OO posterior a LO fue de 23.96 h. En Sincronización no paramétrica (FE) la duración del periodo fue de 23.80 y OO posterior a FE fue de 23.89 h. En condición LL el valor del periodo fue de 24.47h y en OO posterior a LL fue de 23.54h. No hubo diferencias significativas en la máxima actividad después del inicio de alpha en todas las condiciones y la amplitud de la fase de máxima actividad fue significativamente menos en LL.

Los hallazgos de este trabajo permiten conocer más sobre la biología general de *N. alstoni alstoni*, así como de la conducta circadiana que presenta este roedor, lo cual puede ser de gran utilidad en los estudios cronobiológicos de esta especie.

INTRODUCCIÓN

Los ritmos biológicos

Un ritmo biológico puede ser definido como la repetición regular de una característica biológica a lo largo del tiempo (Gruart, et al. 2002). La disciplina biológica que se encarga del estudio de los ritmos biológicos es la Cronobiología, que analiza la estructura temporal de los organismos incluidos sus mecanismos y alteraciones (Moore-Ede et al, 1982; DeCoursey, 2004a).

Tal repetición está acoplada funcionalmente a la del ambiente, esto es, a la de los ciclos geofísicos determinados principalmente por los movimientos planetarios de rotación y traslación de la Tierra. Existe un oscilador primario o marcapasos que es el encargado de generar los ritmos biológicos, este marcapasos es un elemento neuronal que genera órdenes funcionales de carácter rítmico (Gruart, et al. 2002). Existe una variedad de ritmos biológicos presentes en los organismos vivos y estos se clasifican según la frecuencia en la cual se presentan y el ciclo geofísico al cual están acoplados.

Los ritmos circadianos son aquellos que se repiten con un periodo cercano a 24 horas y es el resultado de múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos; por ejemplo la alternancia diaria de sueño y vigilia se acompaña de numerosos ritmos diarios en la función neural y endocrina.

Los ritmos ultradianos son aquellos que tienen una duración menor a 20 horas, y es común que se presentan varios ciclos completos en un día. Por ejemplo, se producen variaciones diarias con periodo menor a 24 horas en la

temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardiaca, y en la presión y composición de la sangre, también aquí se encuentran los relacionados con los cambios de mareas, o circamareales.

Los ritmos biológicos con duración mayor a 30 horas reciben el nombre de infradianos, ya que se requieren de varios días para lograr un ciclo completo. Este tipo de ritmos incluye las variaciones estacionales y los ciclos relacionados con las fases de la luna también conocidos como circalunares y los circanuales. Los circalunares son aquellos ritmos biológicos con duración cercana a 28 días, el más claro ejemplo es el ciclo menstrual de la mayoría de los primates. Los ritmos circanuales son los ritmos que se presentan cada año como las conductas migratorias y de hibernación en diferentes grupos de animales (Aschoff, 1981).

Revisión general sobre la historia de los ritmos circadianos

Los primeros trabajos realizados para estudiar las conductas circadianas fueron mediante la exposición a diferentes condiciones de luz. Uno de los pioneros en incursionar en este tipo de estudios trabajando con plantas del género *Mimosa* fue Jean Jacques d'Ortois de Mairan en el año de 1729. Maynard S. Johnson fue el primero en trabajar con roedores en el año de 1926 (De Coursey, 2004a.)

Alrededor de la década de 1960 ocurrieron sucesos importantes para la consolidación de la Cronobiología, ya que en los primeros años de esta década hubo trabajos de gran aportación, ejemplo la discusión de si las causas del ritmo diario eran endógenas o exógenas, el descubrimiento de marcadores de ritmos en los insectos y en las propiedades básicas del Sistema Nervioso Central. Sin embargo el principal suceso que daría inicio a dicha unificación fue en 1960, el

primer Simposio de Cronobiología en Cold Spring Harbor, Nueva York. A éste congreso acudieron alrededor de 150 científicos y estudiantes, muchos de los cuales era la primera vez que discutían y conocían acerca de los ritmos biológicos, para muchos otros era el nacimiento de esta disciplina. Un acto memorable dentro de este simposio ocurrió cuando Pittendrigh (1960) leyó su discurso titulado “Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems” (los ritmos circadianos y la organización circadiana en los sistemas vivos) en donde, además de la importancia histórica, contenía aspectos que aún hoy en día siguen siendo reconocidos (DeCoursey, 2004a.) Este documento reconocía la existencia de la filogenia de los relojes internos, la importancia ecológica de los ritmos biológicos para todos los niveles de organización fisiológica (Aschoff, 1981, 1984) y presentó 16 propiedades de los ritmos circadianos, de entre las cuales destacan las que a continuación se mencionan.

Características generales de los ritmos circadianos

Libre curso (free running)

En algunas especies de mamíferos, bajo condiciones constantes de luz u oscuridad se presenta la persistencia de un ritmo del cual el periodo es cercano a 24 horas, lo que indica que el ritmo se encuentra en libre curso y se denota con la letra griega tau (τ) (Jonson, et al. 2004). La presencia de este ritmo en condiciones constantes es una evidencia de que la expresión de los ritmos

circadianos es generada por un reloj interno y no sólo por las señales ambientales. En algunos organismos, la anticipación en la presencia de un ritmo nos habla de adaptaciones conductuales que favorecen la supervivencia en sus medios naturales; o adaptaciones para disponibilidad de alimento, la presencia de depredadores, etc.

Existen variaciones en la duración de los periodos en libre curso entre especies diurnas y especies nocturnas además de otros factores también influyen en la duración las condiciones previas, la iluminación, la temperatura y el desarrollo.

En especies diurnas es mucho más claro observar con precisión la presencia y periodo de un ritmo en libre curso en comparación con algunas especies nocturnas (Aschoff, 1981).

La sustentabilidad de los ritmos circadianos bajo condiciones constantes puede persistir por largos periodos de tiempo, como años, en toda la vida de los organismos y aún en generaciones posteriores. Richter, en 1968, realizó trabajos con monos ardilla a los que primero sometió a un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (LO), y posteriormente, a condiciones constantes de oscuridad (OO) por casi tres años, al término del protocolo, los monos ardilla seguían mostrando un ritmo en libre curso. Sin embargo la persistencia de los ritmos en libre curso sólo pudo demostrarla mediante estudios por varios años y empleando generaciones completas de ratones que se mantuvieron expuestos a condiciones constantes de oscuridad. Richter observó que todas las generaciones posteriores se seguían presentando el ritmo en libre curso, pese a que los ratones de las nuevas generaciones jamás fueron expuestos a ciclo de luz-oscuridad. Sin embargo, este patrón no se

presenta en todos los ritmos ni en todas las especies, ni en todos los organismos de una misma especie. En algunas especies el ritmo de libre curso comienza a extinguirse al paso de días o semanas y sobre todo cuando estas son expuestas a condiciones de luz constante (LL). En algunos experimentos realizados con ratas Wistar, que fueron sometidas a condiciones constantes de luz, se analizó su ritmo de actividad locomotriz y se pudo observar que las ratas presentaban ritmos ultradianos. Esta conducta suele presentarse con diferencias en su frecuencia entre las distintas especies de roedores (Pittendrigh, 1981).

La causa de la pérdida en la presencia de algunos ritmos no se ha establecido con exactitud, en algunos animales no mamíferos se cree que pueda ocurrir por factores de regulación térmica, pero en el caso de los mamíferos no es aplicable esta explicación. Sin embargo, se cree que a pesar de que los ritmos circadianos no se presenten en algunos organismos, estos ritmos siguen oscilando, pero no se manifiestan en la conducta del organismo.

Variabilidad del periodo.

Los ritmos en libre curso varían en la uniformidad y la estabilidad del periodo. En algunos organismos, por ejemplo en roedores como el hámster o el ratón, sus relojes circadianos llegan a expresar con gran exactitud de tiempo su actividad mientras que en algunos otros llegan a tener retrasos y avances, ésta es una de las principales capacidades de los relojes biológicos; desde su utilidad como dador de tiempo hasta la habilidad de predecir eventos regulares en el ambiente (Pittendrigh y Daan, 1976).

Cuando se llevan a cabo mediciones de la uniformidad de los ritmos circadianos, se debe considerar si el marcapasos circadiano emite perfectamente señales regulares y si los procesos de transmisión fisiológica pueden mostrar ligeros retrasos. Considerando un ritmo circadiano de actividad, un reloj puede emitir señales perfectamente regulares de iniciación de actividad para que el animal inicie su ritmo diario; sin embargo, el tiempo real en el que se inicie la actividad del ritmo puede ser muy variable en distintos días. En consecuencia, el animal mostrará “ritmos sucios, con el intervalo entre los inicios de la actividad en los días sucesivos que variarán considerablemente.

Pittendrigh y Daan en 1976, buscaron como distinguir entre la uniformidad del reloj y la uniformidad de la transmisión del proceso (Moore-Ede et al. 1982), ellos encontraron que en ratones en un ciclo de actividad-reposo el periodo en cualquier día dado era más largo, con un promedio mayor a 50% de probabilidad que el periodo fuera más corto al siguiente día. De igual forma si el periodo es más corto que el promedio, al siguiente día el periodo tiende a ser mayor (Moore-Ede et al. 1982). Estos hallazgos en ratón muestran que el periodo del reloj (τ_c) es aproximadamente dos veces más uniforme que el período del ritmo de actividad (τ_r) que lo condujo.

Esto es que el reloj tiene una desviación estándar de alrededor de 9 minutos en estimaciones de 24 horas (0.6% de τ_c), mientras que el ritmo tiene una desviación estándar de casi 18 minutos (1.2% de τ_r). Además, la diferencia en los ratones entre los ritmos individuales sucios y aquellos con alta uniformidad no

es causada por una diferencia en la uniformidad del reloj circadiano subyacente sino por variabilidad en el proceso de la transmisión de la señal desde el reloj al ritmo expresado.

Historia previa y post efectos.

El periodo en libre curso de un ritmo circadiano en una condición ambiental constante puede ser influenciado por las condiciones a las cuales estuvo sujeto previamente a lo que se le llama post efectos. Este efecto puede durar por 100 días o más, y se dice que son historia-dependientes. En algunos casos, los postefectos pueden tomar muchos ciclos para que se establezca el periodo en libre curso después de un cambio en la intensidad de luz.

De manera similar, después de que un animal se somete en condiciones constantes después de haber estado sincronizado por señales ambientales, el periodo del ritmo circadiano en libre curso muestra influencia del periodo previo por algunos ciclos subsecuentes (Pittendrigh, 1981; Aschoff, 1981).

El número de horas de luz en un ciclo luz-oscuridad también produce postefectos en el periodo en libre curso. Cuando el fotoperiodo es largo (días largos; 18 horas luz-6 horas oscuridad, LD 18:6) el periodo en libre curso será mucho más corto que cuando los animales son expuestos a fotoperiodos más cortos (días cortos; LD 1:23), (Moore-Ede et al. 1982).

Los postefectos en el periodo del ritmo en libre curso también se observan después de un cambio de fase de un reloj circadiano. Por ejemplo, si el reloj es forzado a aumentar transitoriamente su periodo para resincronizarse con un ciclo luz-oscuridad (LD) donde el tiempo se retrasa, el post efecto de ese incremento

en el periodo puede presentarse haciendo más lento el periodo del reloj en libre curso. Si el animal es posteriormente expuesto a condiciones constantes, entonces su ritmo circadiano funcionará con un período más largo para un número de ciclos antes de recuperar su periodo original.

Estos postefectos nos indican que los acontecimientos que imponen un periodo en un ritmo del reloj circadiano, alteran las propiedades del reloj, de modo que los efectos se observan por algunos ciclos aún en periodos posteriores. Los postefectos nos sugieren que las señales ambientales pueden no solo arrastrar a los relojes circadianos a su periodo, sino que, también pueden moldear hasta cierto punto las características de los relojes circadianos y ser arrastrados más fácilmente. Así, los relojes con periodos endógenos cercanos 24 horas que son sincronizados a periodos de luz-oscuridad de 24 horas pueden presentar su propio periodo endógeno modificado a 23.5 horas, de tal modo facilita la sincronización (Pittendrigh y Minus, 1964).

Regla de Aschoff.

Un factor determinante de la longitud del periodo en libre curso, en un reloj circadiano, es la presencia de la luz y la intensidad a la cual esta expuesto el animal (Meijer, 2001). Aschoff demostró que los ritmos en libre curso bajo condiciones de luz constante (LL) son modulados en función de la intensidad de la iluminación, de tal forma que al incrementarse la intensidad de la luz tiende a acortarse el periodo del ritmo en organismos diurnos, mientras que en organismos nocturnos tiende a alargarse.

El primero en observar la influencia de la luz sobre el periodo fue Johnson en 1939, pero no fue hasta que Aschoff en 1960, estudio sistemáticamente los efectos en especies nocturnas, particularmente roedores, y en especies diurnas, de aves, que se hizo evidente tal influencia (DeCoursey, 2004a). Fue entonces, cuando Aschoff concluyó que bajo luz intensa el tiempo de actividad de un animal diurno aumenta pero disminuye en especies nocturnas. Finalmente, Aschoff observó que el periodo en libre curso es más largo que 24.0 horas para animales diurnos en oscuridad constante y más cercano a 24.0 horas para especies nocturnas bajo las mismas condiciones (Aschoff, 1981). A la relación de la luz con la actividad entre especies diurnas y especies nocturnas se les conoce como regla de Aschoff.

Sincronización y *Zeitgebers*

Los relojes circadianos tienen la capacidad de cambiar el periodo que expresan en libre curso (τ) y adoptar el periodo de las señales externas (T), a esta capacidad se le nombra *sincronización (entrainment)*. Las señales externas suelen ser fenómenos o sucesos naturales como son; la duración del día y la noche, provocado por la rotación de la tierra, cambios en la temperatura ambiental, disponibilidad de alimento y de agua e incluso factores sociales (Escobar et al, 1997). A estas señales que logran modificar el periodo de los relojes se les ha llamado *Zeitgebers* (Daan y Ashoff, 2001) que en alemán significa “dadores de tiempo”, siendo Aschoff el primero en acuñar el término en el año de 1951. El principal *zeitgeber* es el ciclo de luz oscuridad (Gorman, et

al. 2001) y logra sincronizar a casi todas las especies, dotándolas de conductas óptimas para su supervivencia, que tuvieron influencia a lo largo de su historia evolutiva y la conformación de su reloj biológico actual. (Moore-Ede et al, 1982).

Este zeitgeber es el que proporciona la principal señal en la gran mayoría de los ambientes naturales principalmente por ser el resultado de la rotación de la tierra y proporcionar estas señales regulares con periodo de 24 horas, sin considerar aquellos que se encuentran en alguna condición constante de luz u oscuridad, como zonas abisales, cavernas, en el Ártico o en el Antártico.

Para demostrar que el factor ambiental es un zeitgeber, se debe registrar experimentalmente el ritmo biológico en ausencia del zeitgeber y en presencia de éste. El periodo que presente el organismo en ausencia del zeitgeber debe ser distinto al que muestra el zeitgeber y en presencia del zeitgeber debe ser idéntico.

Otro factor ambiental que actúa como zeitgeber, especialmente en ectotermos (animales que no regulan metabólicamente su temperatura corporal) son los cambios en la temperatura, ya que en los endotermos (animales que regulan su temperatura corporal) es más difícil provocar una sincronización por variaciones en la temperatura ambiental. Diversos trabajos en mamíferos han demostrado que este zeitgeber no tiene la suficiente fuerza para sincronizar a los animales, sobre todo a los roedores, sin embargo algunos primates como el mono ardilla llega a sincronizarse con variaciones en la temperatura (Moore-Ede et al, 1982).

La disponibilidad de alimento, en forma de ciclos de comida-ayuno ha demostrado ser un zeitgeber con suficiente fuerza sobre todo en animales que se encuentran en condiciones ambientales naturales, donde la disponibilidad de

alimento se da a ciertas horas del día. En 1992, Richter fue el primero en demostrar que la disponibilidad de alimento actúa como zeitgeber en roedores a quien los exponía a condiciones constantes de oscuridad (OO) y les proporcionaba el alimento a ciertas horas del ciclo sincronizando un ritmo de actividad-reposo. Los ciclos de disponibilidad de agua, han demostrado ser menos consistentes para funcionar como zeitgeber. También los factores sociales pueden actuar como zeitgeber en algunas especies de mamíferos, teniendo efecto los olores, los ruidos y la actividad de los individuos del mismo grupo. Sin embargo no todos los mamíferos pueden ser sincronizados por factores sociales (Moore-Ede, et al; 1982).

Enmascaramiento (masking)

Existen señales que pueden producir respuestas de actividad directamente en los animales; sin embargo, estas respuestas no llegan a perdurar y son sólo temporales, no llegan a modificar el sistema circadiano, ya que al retirar las señales no se presenta el efecto que normalmente provocan estas señales en el marcapasos. En cambio se observa el ritmo que se presentaba bajo las condiciones anteriores. Existe el enmascaramiento positivo que es aquel en donde la señal induce la actividad (para lo cual la señal debe aplicar en el periodo de reposo). El enmascaramiento negativo es aquel en el que la señal inhibe la actividad, para lo cual la señal se debe aplicar en el periodo de actividad del animal. Las señales más comunes que llegan a causar enmascaramiento son pequeños cambios en la temperatura, factores sociales, ruidos o la presencia de alguna hembra en celo.

Estas respuestas pueden ser adaptaciones a los cambios en el ambiente, así el animal puede responder a estos cambios momentáneos sin afectar el sistema circadiano (Aschoff, 1999).

Sincronización Paramétrica.

Se le llama sincronización paramétrica o continua a aquella que se da cuando el factor sincronizador se encuentra en presencia continua durante la fase correspondiente del ciclo, Desde el momento en el cual el sincronizador incide sobre un organismo, el marcapasos adquiere el periodo del sincronizador, sin embargo el organismo llega a tardar algunos días en completar la sincronización, tiempo al que se conoce como “ciclos transitorios”.

La duración de los ciclos transitorios varía de especie a especie y también depende de la fuerza del zeitgeber (Pittendrigh, 1981).

La gran influencia de este tipo de sincronización es perfectamente notoria en la dependencia de la intensidad de luz en condiciones constantes de luz (Moore-Ede et al, 1982), donde la intensidad tiene gran influencia sobre la expresión del ritmo ya que a intensidades muy bajas no se logra una sincronización. Los organismos que si llegan a tener influencia en la sincronización paramétrica, muestran una gran dependencia a los ciclos completos de luz, incluso en algunos animales se presentan arritmias al ser expuestos a luz intensa constante. Por las pruebas que se han realizado en diferentes organismos se considera a la sincronización paramétrica como una sincronización fuerte, ya que, si pensamos en ambientes naturales con ciclos completos de luz y oscuridad, éste es el tipo de sincronización al cual están sujetos los organismos en la superficie de la tierra.

Sincronización no paramétrica.

Se ha observado en individuos que se encuentran en condiciones constantes de oscuridad, que al aplicar breves pulsos de luz, o algunas señales breves de algún otro zeitgeber, el ritmo circadiano en libre curso llega a ser sincronizado al del periodo del zeitgeber, lo que demuestra que el sincronizador tiene una acción breve sobre el oscilador, y que da la señal de inicio o termino de actividad. Esta señal ocasiona adelantos o atrasos sobre la fase del ritmo, lo que demuestra que los organismos pueden ser sincronizados por señales ambientales breves. A este tipo de exposición a pulsos breves de luz que representan solamente la señal del amanecer y del atardecer se les llama fotoperiodo esqueleto (Pittendrigh, 1981).

El estudio de los fotoperiodos esqueleto permite comprender como se llega a sincronizar un organismo mediante la sincronización no paramétrica y la sincronización paramétrica. También nos podría explicar que ocurre con los animales que se encuentran habitando en oscuridad constante y solamente tienen algún sincronizador no paramétrico como señal durante todo el día. Y por último los fotoperiodos esqueleto son muy útiles para observar y estudiar los fenómenos de enmascaramiento.

Los criterios para establecer una sincronización por fotoperiodos esqueleto se basan en la siguiente ecuación: $\Delta\phi_1 + \Delta\phi_2 = \tau - T$, donde $\Delta\phi_1$ y $\Delta\phi_2$ son los desplazamientos de fase sucesivos causados por los dos pulsos que definen el esqueleto.

Curva de respuesta de fase.

La curva de respuesta de fase es una herramienta de apoyo para analizar los efectos de pequeños y breves estímulos aplicados al oscilador (al ocurrir una sincronización recibe el nombre de sincronización no paramétrica). La manera en la cual se lleva a cabo una curva de respuesta de fase (CRF) es exponiendo al individuo a una condición constante de oscuridad en la que expresará su libre curso, posteriormente se aplican breves pulsos de luz a lo largo del día y de la noche subjetiva esperando la reacción del individuo ésta puede ser en forma de un atraso o un adelanto en el ritmo. Se repiten los pulsos a diferentes horas del día para lograr observar las diferentes reacciones del individuo a diferentes horas. De manera general, se observan tres zonas en la CRF; una zona en la cual los pulsos causan retrasos de fase, esta zona se localiza regularmente en la noche subjetiva temprana, otra zona donde los pulsos causan avances de fase, esta zona se localiza comúnmente en la noche subjetiva tardía, y la última zona es un punto en el cual el organismo no presenta cambio alguno, ésta se localiza a lo largo del día subjetivo y recibe el nombre de zona muerta. Las horas que se observan en la curva de respuesta de fase en los cuales reaccionan los organismos pueden variar de especie a especie e incluso de individuo a individuo (Daan y Aschoff, 2000; Pittendrigh, 1981).

Coordinación Relativa.

En el ambiente existen algunos factores que no llegan a tener la suficiente fuerza para actuar como sincronizadores pero si pueden ejercer algún efecto en la fase del ritmo, provocando que un ritmo dado pueda adelantar la fase o atrasarla por algún momento teniendo un efecto de una sincronización no lo bastante fuerte para permanecer, por lo que es llamada coordinación relativa. La intensidad de la luz es un factor que suele provocar coordinación relativa ya que a intensidades muy bajas no llega a tener la fuerza de un zeitgeber, y no lo logra al no ser lo suficientemente fuerte para sincronizar el ritmo circadiano (Moore-Ede et al, 1982).

Compensación a la Temperatura.

La compensación a la temperatura es una característica de los relojes biológicos que se ha mantenido a lo largo de la historia evolutiva. Dicha adaptación ha permitido que los ritmos circadianos tengan un periodo uniforme, amortiguando las variaciones térmicas a lo largo del día.

Las reacciones bioquímicas se llevan a cabo dentro de un rango de temperatura. Un aumento de la temperatura en 10° C, acelera al doble o al triple los procesos de reacción ($Q_{10} = 2$ o 3), mientras que un decremento de temperatura los retrasa. En los organismos vivos a lo largo de un día existen muchos procesos bioquímicos; sin embargo, pese a que los ritmos circadianos se sustentan también en reacciones químicas, existe un mecanismo desconocido que les brinda un rango de compensación a los cambios de temperatura. Es decir que el periodo del ritmo muestra un Q_{10} muy cercano a 1.

Los mamíferos se presentan una regulación térmica reciben el nombre de organismos homeotermos, en ellos es muy claro observar como la compensación de la temperatura es una adaptación que les permite expresar ritmos biológicos independientes de la temperatura. El caso de los mamíferos que hibernan, los cambios en la temperatura son la señal de inicio de la conducta de hibernación. Algunos mamíferos muestran adaptaciones a temperaturas extremas, altas o bajas, en las cuales siguen expresando ritmos circadianos (Pitendrigh, 1981; Daan y Aschoff, 2000, More Ede et al, 1982).

Análisis de las características de los ritmos circadianos

La caracterización y el estudio de los ritmos se ha realizado tanto en bacterias, plantas y animales, y es en estos últimos en los que más estudios se han llevado a cabo en las últimas décadas. Entre las especies animales que se han empleado se incluyen moscas, moluscos, aves, diferentes roedores e incluso humanos. El primero y el más común de los métodos para estos trabajos ha sido la exposición a diferentes condiciones de luz. Entre los animales más usados en el estudio de los ritmos circadianos, se encuentran los roedores, siendo uno de los primeros estudios el de Maynard S. Johnson en 1926, que trabajo con hámster en rueda de actividad para encontrar el ritmo circadiano de actividad (DeCoursey, 2004a). Los conceptos básicos para comprender las estructuras principales de los ritmos son relativamente simples, si comprendemos que un ritmo biológico es la repetición regular de alguna

característica biológica, lo podemos plantear como una oscilación (fig. 1) donde podemos identificar; la amplitud, que es independiente del tiempo.

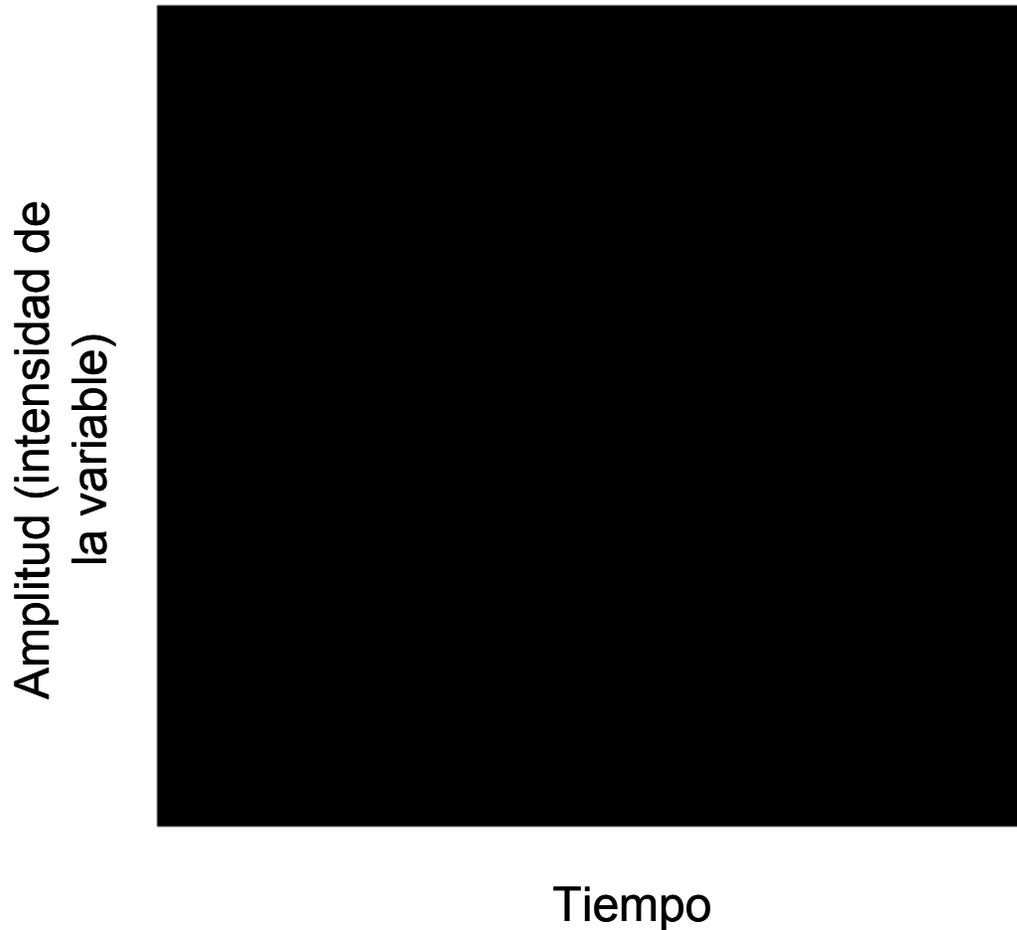


Fig.1. Las características presentes en un ritmo circadiano, Periodo: es el lapso en el cual ocurre la repetición del fenómeno biológico, Alpha: definida por los niveles de actividad. Rho: parte del ritmo en reposo. Amplitud: intensidad de la actividad.

En la descripción de un ritmo circadiano se observa un periodo de actividad continuo llamado **alfa** y un periodo de reposo llamado **rho**, ambos completan un ciclo. Las diferencias en la duración de estos dos indicadores son muy variables y depende de muchos factores incluso de los ambientales, principalmente de la duración a la exposición de luz.

Para poder observar los componentes del ritmo circadiano, en principio suele sincronizarse el ritmo de los animales a periodos de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz (LO), donde el animal adoptará estos periodos para manifestar sus fases de actividad y de reposo, respectivamente, ello dependerá de la naturaleza del animal, y si éste es de actividad diurna o nocturna. Al periodo de luz se le llama fotoperiodo y al periodo de oscuridad se le llama escotoperiodo. Si se desea observar estos parámetros en un ritmo en libre curso, debe buscarse una serie de días en los cuales la oscilación sea suficientemente estable.

Para facilitar el análisis de un ritmo, es de gran ayuda el uso de los actogramas, en los cuales, los días se grafican de forma consecutiva, uno debajo del otro, y ello permite observar el curso del ritmo donde se observan claramente las diferencias entre ritmo circadiano en exposición a LO 12:12 y en condiciones de oscuridad constante (OO). Un actograma consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos como se muestra en la figura 2. (Vega, 1993).

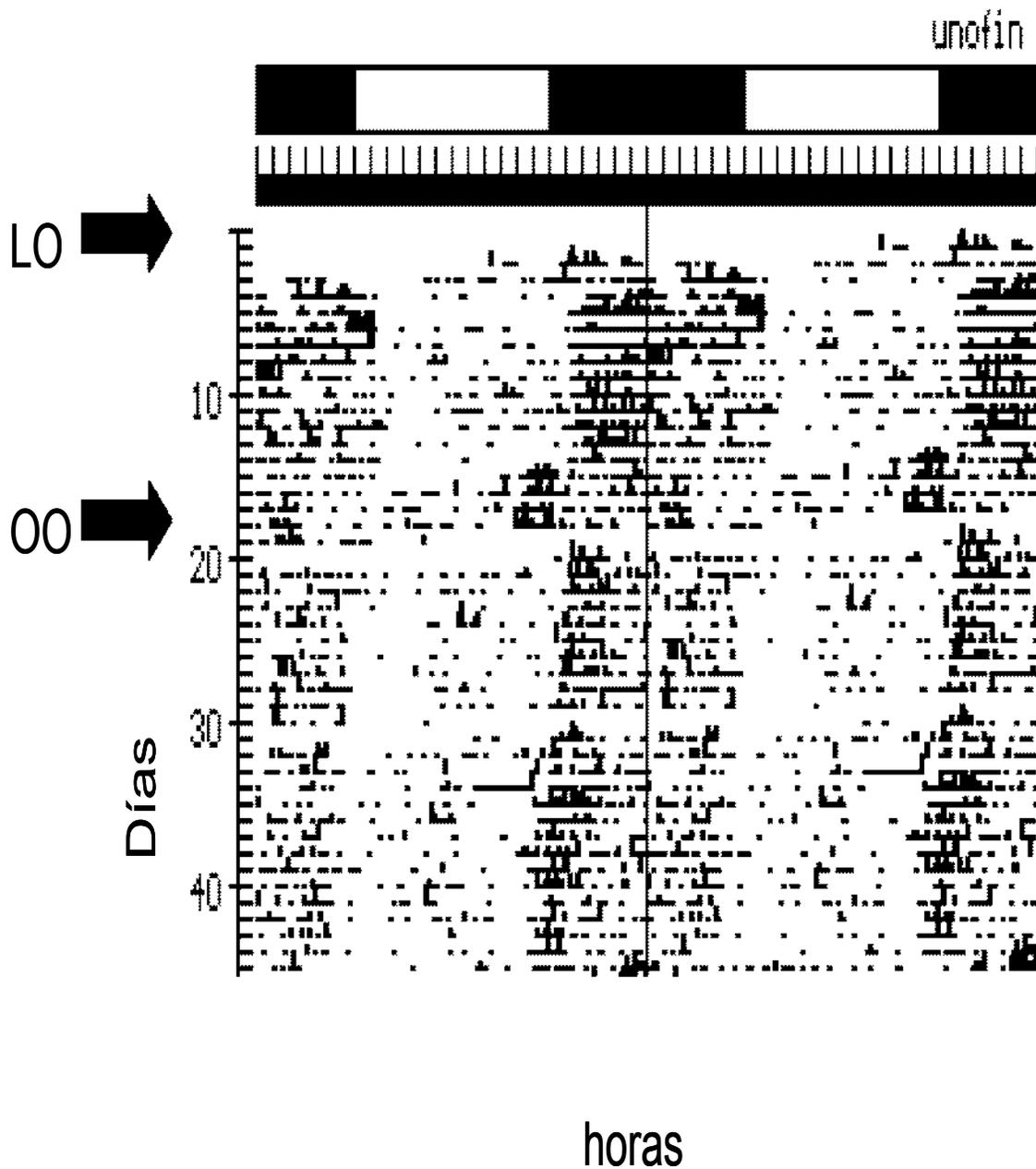


fig. 2. Actograma que contiene los datos de actividad en forma de histograma. En las abscisas se muestran las horas (48 en línea) y las ordenadas los días de registro. El primer día en el lado derecho, se repite en el segundo día de lado izquierdo, y éste a su vez presenta continuidad con el tercero; de esta forma es más fácil visualizar el bloque de actividad que se manifiesta al centro de la gráfica. Este actograma muestra el ritmo de actividad en oscuridad constante de un ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*. Del día 1 al día 14 se encuentra en condición LO (12-12), del día 14 en adelante cambia a OO que representa oscuridad constante.

La mayoría de los estudios sobre ritmos biológicos en pequeños mamíferos se realizan mediante el registro de su ritmo de actividad con la ayuda de rueda de actividad. De esta manera se ha observado que la gran mayoría de los roedores tiene un ritmo circadiano de actividad claro, siendo el periodo de actividad durante la noche y de reposo durante el día, típico de un animal nocturno.

Organización del sistema circadiano en mamíferos

Se conoce como sistema circadiano, al conjunto de elementos que participan en la organización y manifestación de los ritmos circadianos en un organismo.

El sistema circadiano en mamíferos está constituido por receptores sensoriales y vías aferentes al marcapaso; los elementos osciladores llevan a cabo repeticiones rítmicas de eventos biológicos y las vías eferentes regulan el proceso de transmisión de la ritmicidad a los sistemas efectores (More-Ede et al, 1982).

Núcleo Supraquiasmático

El núcleo supraquiasmático (NSQ) localizado en el hipotálamo anterior es considerado el oscilador principal de los mamíferos. Esta estructura cerebral está constituida por un conjunto de células neuronales ubicadas a los lados del tercer ventrículo (Bouskila, et al. 2001). Al localizar y estudiar la arquitectura del NSQ se llegó a la conclusión de la importancia de este oscilador en la presencia de ritmos circadianos de los mamíferos. Así mismo, se estableció su relación con la retina a través del tracto retino-hipotalámico, y su papel en la transmisión de la información

de los fotorreceptores hacia el marcapasos en los mamíferos. La ausencia del NSQ en animales provoca que dejen de presentarse diversidad de ritmos en parámetros fisiológicos, como por ejemplo los ritmos relacionados con el contenido de corticosterona adrenal (Moore, R. y Leak, R., 2001). y del ritmo circadiano de actividad-reposo. Aunque el NSQ no es el único marcapasos en los mamíferos, éste tiene un papel relevante en la modulación de la conducta adaptativa circadiana.

El NSQ se relaciona con otras áreas del cerebro, estas interacciones crean conexiones aferentes que trabajan en conjunto para una óptima regulación de los relojes circadianos. Las conexiones aferentes llegan a crear un número aproximado de 14 surcos, los cuales pueden ser divididos en 4 grupos: Tracto retino-hipotalámico, tracto genículo-hipotalámico, tracto retino-hipotalámico y aferentes no visuales.

Las neuronas del NSQ siguen presentando ritmos circadianos *in vitro* y al aislarlas unas de otras estas neuronas siguen presentando ritmos propios, lo que les llevó a la conclusión de que las células del NSQ están dotadas de marcapasos propios que trabajan en equipo para funcionar como un marcapasos principal. Al realizarse trasplantes de NSQ a animales a los que previamente se les había extirpado el propio, se restablece el ritmo de actividad (Moore, R. y Leak, R. 2001).

Biología molecular del reloj circadiano en mamíferos

El reloj circadiano funciona con bases genómicas que consisten en asas de retroalimentación negativa de la transcripción-traducción autorregulatoria (Ralph y

Hotz, 2000; Ko y Takahashi, 2006). Existen genes que expresan proteínas que estimulan la activación de otros genes y otras proteínas que inhiben la expresión de los genes que les dieron origen. Este modelo consta de un elemento positivo: constituido por los genes *clock* y *Bmall*, y uno negativo: los genes *period* y *tímeles* (Green and Menaker, 2003). Las proteínas PERIOD y TIMELES codificadas por los genes *period* y *tímeless*, son las que impiden la expresión de los genes *clock* y *Bmall* al entrar al núcleo de la célula, estas proteínas terminan degradándose dejando de reprimir la expresión de los genes positivos.

En la primera asa de retroalimentación se encuentran involucrados elementos positivos, los factores de transcripción, CLOCK y BMAL1, que dimerizan y activan la transcripción en genes diana que contienen secuencias cis-reguladoras del E-box, incluyendo *periodo* (en ratones *Per1*, *Per2* y *Per3*) y criptocromo (*Cry1* y *Cry2*). En la retroalimentación negativa participa el heterodímero de PER:CRY que entran al núcleo de la célula y reprimen su propia transcripción una vez que se eleve su concentración, a través de reprimir al complejo CLOCK:BMAL1. Una vez que los niveles en el núcleo de los complejos PER:CRY disminuyen y no son suficientes para la represión, comenzara un nuevo ciclo de transcripción de *per* y *cry*. Esto ocurre en un lapso de 24 horas aproximadamente, lo que constituye un ciclo circadiano (figura 3, modificada de Ko y Takahashi, 2006). los receptores huérfanos retinoicos (*Rev-erb α* y *Ror α* . *REV-ERB α* y *ROR α*) son activados por el heterodímero CLOCK:BMAL1, estos a su vez lizan elementos de respuesta presentes en el promotor de *Bmal*

activando su transcripción. Por lo tanto, la oscilación circadiana de *Bmal* es regulada tanto positiva como negativamente por RORs y REV-ERBs, respectivamente.

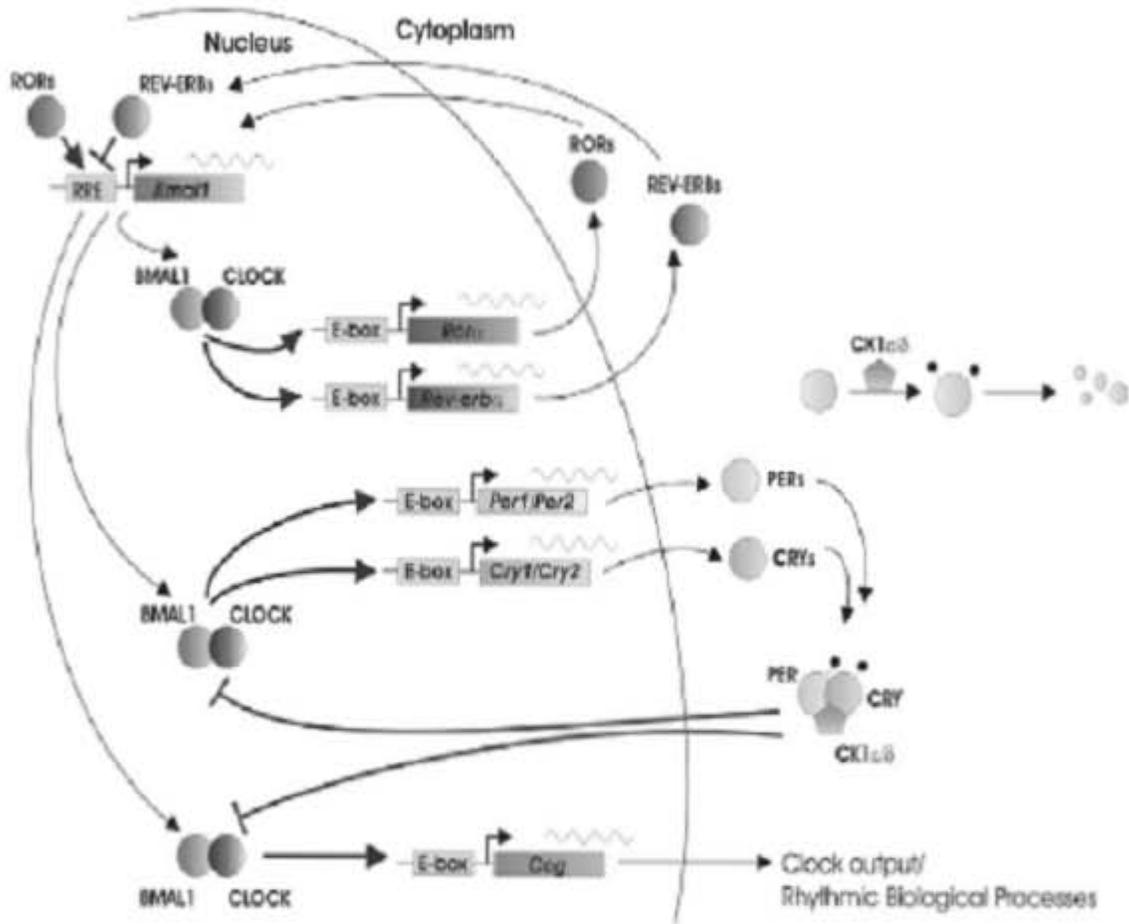


Figura 3. Asas de retroalimentación que constituyen el reloj molecular en mamíferos (modificado de Ko y Takahashi, 2006).

Biología general de la especie

El ratón *Neotomodon alstoni alstoni*, habita en las montañas del Eje Neovolcánico Transversal de México. En el adulto la longitud del cuerpo (cabeza-ano) está entre los 10 y 13 cm, la longitud de la cola es aproximadamente de 8-10cm, y su peso es generalmente 40-55 gramos. La piel es suave y densa. La parte dorsal de su cuerpo es grisáceo pero también puede ser marrón. La parte ventral es blanquecina, y la cola es dorsalmente blanca. Las orejas son grandes y casi desnudas. Las hembras tienen seis pezones.

El ratón de los volcanes vive entre zacatonales en bosques con una elevación de 2 600-4 300 metros. Generalmente solo cava un cause, su madriguera tiene un ancho de 38 milímetros de ancho y una longitud de 1.8 metros. Basándose en las observaciones en campo que se han hecho de la actividad diaria de este ratón, se ha establecido que es un roedor de hábitos nocturnos (Ayala et al, 1998) comenzando su actividad al atardecer y terminando cerca de la media noche, con un máximo de actividad entre las 8 y las 9 de la noche (Davis y Follansbee, 1945). Respecto a sus hábitos alimenticios, este roedor es considerado un animal omnívoro pues se alimenta de mariposas, insectos, semillas y diversos vegetales, por ejemplo tallos, brotes y hojas herbáceas.

Se ha observado en cautiverio y en condiciones naturales que presenta periodo reproductivo durante todo el año; sin embargo, de abril a septiembre se presentan un mayor número de nacimientos. El periodo de gestación es de 25 a 35 días y el número de crías es de 3 a 5. Las crías nacen sin pelo, son de color rosado con vibras y pequeños pelos alrededor de la boca. La talla de un recién nacido es de 52. a 57 mm y su peso es alrededor de 3.8 gr. Las crías pasan por

un periodo de lactancia de 30 días aproximadamente (Chávez, 2005). Ambos sexos pueden reproducirse aproximadamente a los seis meses de edad, ya que es en este tiempo cuando alcanzan la madurez sexual. Observaciones en cautiverio demuestran que el ratón de los volcanes presenta cuidado parental y monogamia estacional (Luis *et al*, 2000).

En cautiverio se ha percibido que existe un comportamiento de jerarquización entre los machos (Huereca, 2002). También se ha observado en algunos casos que al mostrarse conductas de el cuidado parental por parte de las hembras los machos manifiestan subordinación hacia las parejas (Luis *et al*, 2000).

En el estudio en el laboratorio *Neotomodon alstoni alstoni* ha mostrado ser un roedor de fácil adaptación a condiciones de cautiverio. Por las características que muestra en estas condiciones, como ejemplo su facilidad de adaptación a las condiciones ordinarias de laboratorio, su extraordinaria docilidad, así como su fertilidad y longevidad (Granados y Hoth, 1989).



Fig. 4. Adulto *Neotomodon alstoni alstoni*

JUSTIFICACIÓN

El ratón *Neotomodon alstoni alstoni* como posible modelo de interés en el estudio de los ritmos circadianos.

El *Neotomodon alstoni* es un roedor, que por su carácter endémico, requiere de ser conocido en diversos aspectos de su biología para su conservación. Hasta el momento no existen trabajos publicados acerca de la fisiología y conducta circadiana en esta especie, por lo cual no se conocen las características en detalle del ritmo circadiano de actividad locomotriz en cautiverio. En general son pocos los trabajos que se han hecho sobre la biología general de la especie: Hábitat, ecología, reproducción y fisiología (Granados y Hoth, 1989, Fuentes granados et al 2007).

Hipótesis

El ratón *Neotomodon* es un roedor de hábitos nocturnos por lo tanto se espera que en condiciones constantes de oscuridad presente un ritmo circadiano con periodo menor a las 24 hrs, así como una eficiente sincronización tanto paramétrica como no paramétrica. Sin embargo, en condiciones de luz constante, se espera observar una inversión del periodo como lo establece la regla de Aschoff, y/o arritmia.

Objetivo general

Caracterizar el ritmo circadiano de actividad locomotriz en ruedas de actividad bajo distintas condiciones de iluminación en el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*) mantenido en cautiverio.

Objetivos específicos

1. Analizar el ritmo en libre curso en cuanto a su periodo, relación alfa-rho y estabilidad de fase en condiciones de oscuridad o luz constantes.
2. Cuantificar los parámetros anteriormente mencionados en condiciones de sincronización paramétrica y no paramétrica, así como las respectivas relaciones de fase que existieran entre el sincronizador y los ciclos del sincronizador
3. Determinar si las distintas condiciones de iluminación dan lugar a post-efectos estadísticamente significativos.

Material y Método

Animales

Se usaron 8 ratones machos de aproximadamente 45 g de peso, los cuales fueron obtenidos mediante colectas en el poblado de Parres, Tlalpan D.F. (km 48 carretera Federal México Cuernavaca).

La captura de los ratones se realizó durante la noche, empleando trampas tipo Sherman y hojuelas de avena como cebo. A la mañana siguiente los ratones fueron colectados.

En el laboratorio los animales fueron desparasitados y sexados. Todos los ratones machos experimentales fueron alimentados con agua y nutricubos para roedor marca Purina *ad libitum* y se mantuvieron individualmente.

Sistema de registro de actividad

El registro de actividad se realizó en una gaveta de madera, acondicionada con extracción continua de aire y luz artificial, y controlada por un interruptor programable. Cada lámpara se encontraba en la parte superior de cada gabinete y al estar encendida, iluminaba con una intensidad de aproximadamente 250-300 luxes.

Cada gabinete consto de cuatro divisiones; donde cada una contenía dos jaulas de vidrio. Las jaulas de vidrio utilizados en este estudio tuvieron una dimensión de 28.5 x 21 x 18 cm y piso de maya de 0.5 cm de luz. Dentro de ellos, se colocó un comedero y un bebedero, así como el sensor en el que se llevó a cabo

el registro de los movimientos realizados por la rueda de actividad. Una revolución completa de la rueda fue considerada un evento de actividad. Durante la fase oscura utilizada en todos los experimentos, se usó una luz roja de baja intensidad (2lx), la cual no modifica las características del ritmo en otros roedores y permite darle un mantenimiento adecuado a los animales en experimentación, mediante sensores infrarrojos que se encontraban en la parte superior de jaulas de vidrio, modificados para este propósito (figura 5).

Mecanismo del sistema del sensor infrarrojo.

El sensor infrarrojo envía la señal de la actividad de la rueda a una tarjeta de adquisición de datos (NAFRI SA de CV), con la ayuda de una computadora personal (PC), se capturaron de los datos cada 10 minutos, mediante el programa RALM15.

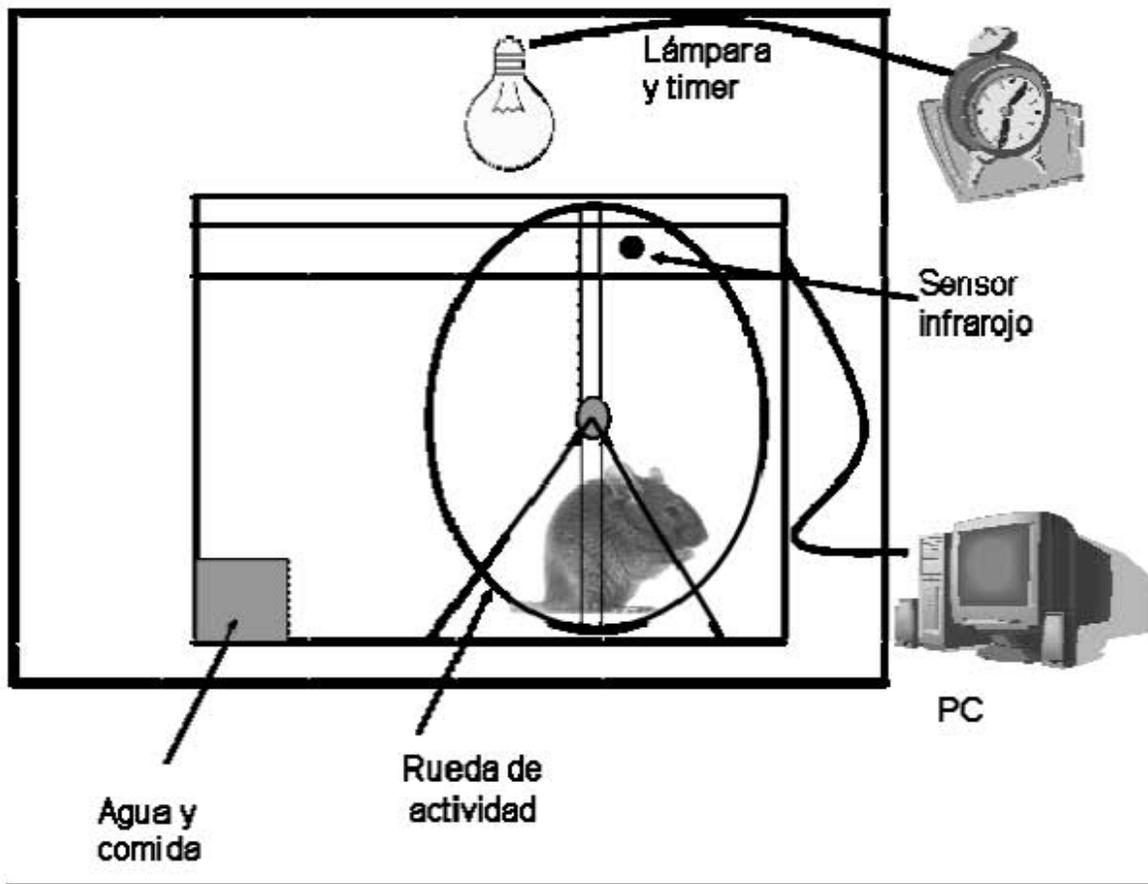


Fig. 5. Sistema automatizado utilizado para la recolecta de datos de registro de actividad. El constó de una jaula adaptada con sensores laterales, los cuales recibían la señal interruptora del movimiento de la rueda de actividad. Los sensores se encontraban conectados a una tarjeta de computadora.

Protocolo experimental

Inicialmente los ratones fueron expuestos durante 20 días a ciclos de 12 hr de luz blanca (250-300 lx) y 12 hrs. de oscuridad (LO 12:12). El encendido de la luz fue a las 07:00 y el apagado a las 19:00 hrs. Posteriormente los animales fueron mantenidos en oscuridad constante (OO) durante al menos 15 días.

Al termino del periodo en libre curso los ratones fueron expuestos a un protocolo de fotoperiodo esqueleto (pulso de mañana de 07:00 a 08:00, pulso de la tarde de 19:00 a 20:00 h) durante dos semanas, para después ser expuestos a condiciones constantes (OO) por quince días más.

Finalmente, los animales fueron expuestos durante 15 días a luz blanca continua (250-300 lx), para terminar en condiciones de oscuridad constante (fig 6).

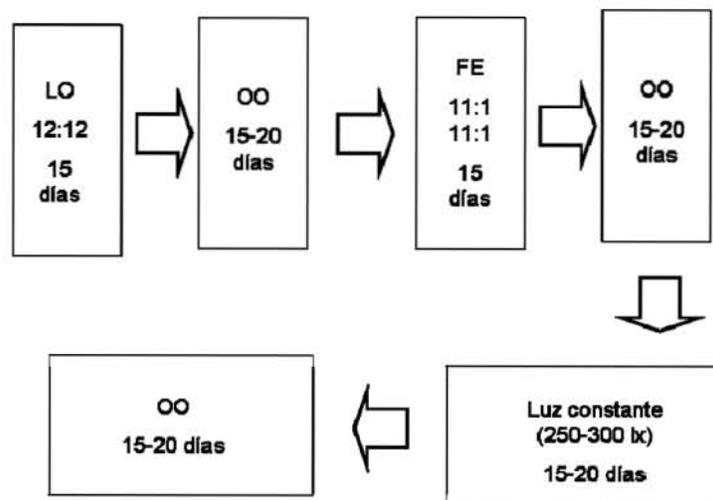


Figura 6. Diagrama del diseño experimental desarrollado en el presente trabajo. LO=ciclo de Luz Oscuridad, OO=oscuridad constante, FE=Fotoperiodo esqueleto.

ANÁLISIS DE DATOS Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos colectados se analizaron en forma de actogramas de doble gráfica, mediante la ayuda del programa DISPAC (IFC, UNAM, México D. F.). Estos se dividieron según cada tratamiento y en cada caso se analizó la serie de datos mediante periodograma de X^2 . Se obtuvo una curva de actividad promedio para cada actograma, ajustada a las 24 h cuando existían ciclos de luz y oscuridad, y al periodo dominante en caso de estar en condiciones constantes.

Se analizaron además las siguientes características:

Análisis para ciclos LO y FE

- Máxima actividad promedio respecto a LO o FE
- alfa (segmento diario de actividad)
- rho (segmento diario de reposo)
- Periodo
- Relación de fase con el sincronizador
- Estabilidad de la fase
- Transitorios

Análisis para ciclos OO y LL

- Periodo
- Máxima actividad después del inicio de alfa
- alfa (segmento diario de actividad)
- rho (segmento diario de reposo)
- Estabilidad de la fase

Los resultados entre situaciones experimentales similares, fueron comparados estadísticamente mediante t de Student. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Sincronización Paramétrica y condición constante (LO y OO)

La figura 7, muestra un actograma representativo de los datos obtenidos en esta condición experimental. En la primera parte de la gráfica, de los días 1 al día 15, se mantuvieron las condiciones de ciclo LO. En el registro presente se observa que el inicio de la fase de actividad es aproximadamente a las 19:38 pm, poco después del apagado de la luz (19:00 h) y el término de la actividad es aproximadamente a las 7:26 am poco después del encendido de la luz (07:00). Diariamente se presentó en éste organismo un punto máximo promedio de actividad a las 21:36 pm. En el análisis por periodograma correspondiente a este segmento se observó un periodo de 23.9 h.

La segunda parte del actograma, del día 20 en adelante, muestra el cambio de la condición de LO a oscuridad constante (OO), en la cual claramente se observa un ritmo en libre curso con un periodo de 23.6 h. Durante el libre curso, el inicio de actividad mantiene una estabilidad de fase de $0.01 \pm$ hrs.

La máxima actividad durante el libre curso se presenta 4.9 horas después del inicio de alfa. Aunque la fase de actividad es robusta, existen brotes aislados a lo largo de todo el ciclo circádico. La relación entre la actividad y el reposo en éste fue de 1.36 y la arquitectura del perfil de actividad es bimodal, con un pico principal de actividad al inicio de la noche subjetiva y un pico secundario de menor intensidad al final de la noche subjetiva.

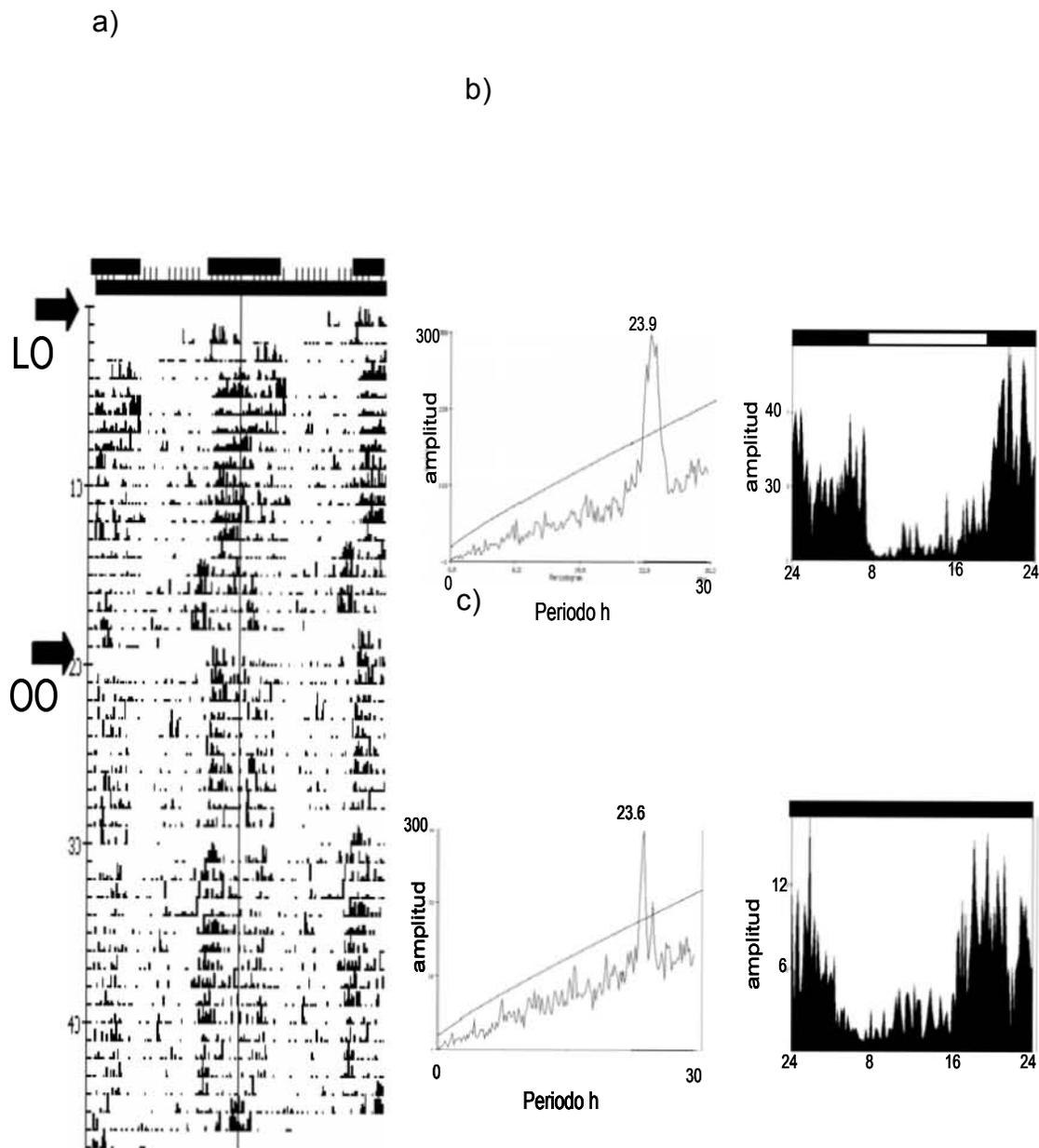


Figura. 7. a) Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LO y OO. b) Los periodogramas correspondientes a la sincronización c) y periodogramas correspondientes al libre curso, se muestran adjuntos con las curvas promedio de actividad. Los espacios vacíos entre los días 19 y 20 se deben a una falla en el sistema de registro. Durante la condición de OO, el ritmo oscila con periodo corto, aunque el periodograma detecta un segundo componente con un periodo diferente; 23.89 h.

Sincronización no Paramétrica (FE) y libre curso en OO

En la figura 8, se muestra en forma de actograma el ritmo circadiano en libre curso de actividad locomotriz en OO durante los primeros 18 días con un periodo de 23.89 horas, antes de exponerse a condiciones de fotoperiodo esqueleto a partir del día 20 hasta aproximadamente el día 45 antes de volver a condiciones constantes de oscuridad.

En la parte en que se aplicó el fotoperiodo esqueleto, el primer pulso de luz se presentó de las 7:00 a las 8:00 am y el segundo de las 19:00 a las 20:00 h. Se observa en el actograma que el ritmo de actividad locomotriz, presenta 4 ciclos transitorios antes de alcanzar una fase estable con el FE. Para el día 20 una vez que alcanza una sincronización completa, el inicio de la actividad se presentó después del primer pulso de luz, a las 16:54 pm y el término de la actividad se dio a las 2:08 am. El punto máximo de actividad ocurrió a las 17:11 pm. Desde el día 32, se nota un cambio de fase, debido a un adelanto en el *timer* (falla técnica) que llevó a una resincronización por adelantos, la cual toma aproximadamente 7 ciclos antes de ajustarse a una nueva fase estable para el día 37. Esta diferencia provocó que en el periodograma se detecten valores de periodo como el que se muestra en la figura 8. En la última parte del actograma, desde el día 43, el animal se mantuvo en oscuridad constante, el ritmo circadiano de actividad locomotriz, después de fotoperiodo esqueleto, presentó un ritmo de libre curso el primer día, un inicio de actividad a las 15:00 pm y el término de ésta a las 2:50,

por lo que se observa que existió control de fase durante la sincronización no paramétrica. El ritmo en libre curso presenta un periodo de 22:42 h.

De los 8 animales estudiados en esta condición, se observó que 5 se sincronizaron en el FE; sin embargo, para lograr una fase estable, se requirió de 4 ciclos en promedio antes de lograr la estabilidad del periodo. La relación de fase con el sincronizador (respecto al inicio de actividad) fue de -3.46 h. Durante la sincronización se observó que la estabilidad de la fase de inicio de alfa fue de 0.01. La relación de alfa-rho fue en promedio de 0.90. Y el nivel máximo de actividad fue de 1.523 h después del inicio de actividad

Efecto de la luz constante sobre el ritmo de actividad locomotriz.

En la figura 9 se muestra un actograma representativo de la condición: luz constante (LL) durante 10 días y posteriormente oscuridad constante (OO). En LL se observó que la magnitud de la actividad es corta respecto a la que se presentó posteriormente en OO. El periodo de acuerdo con el periodograma fue de 25.93 hrs. Cuando se liberó el ritmo de actividad en OO, el ritmo alargó alfa y disminuye el periodo, a 24.06 hrs. Del grupo de 8 animales expuestos a LL, 7 de ellos mostraron un ritmo de actividad con periodo largo, con un promedio de 24.47 ± 0.14 h. El valor de alfa fue de $12.08 \pm$ y la estabilidad de la fase en libre curso se presentó con valores de 0.91. También se detectó en 2 de ellos tendencia a la falta de ritmicidad.

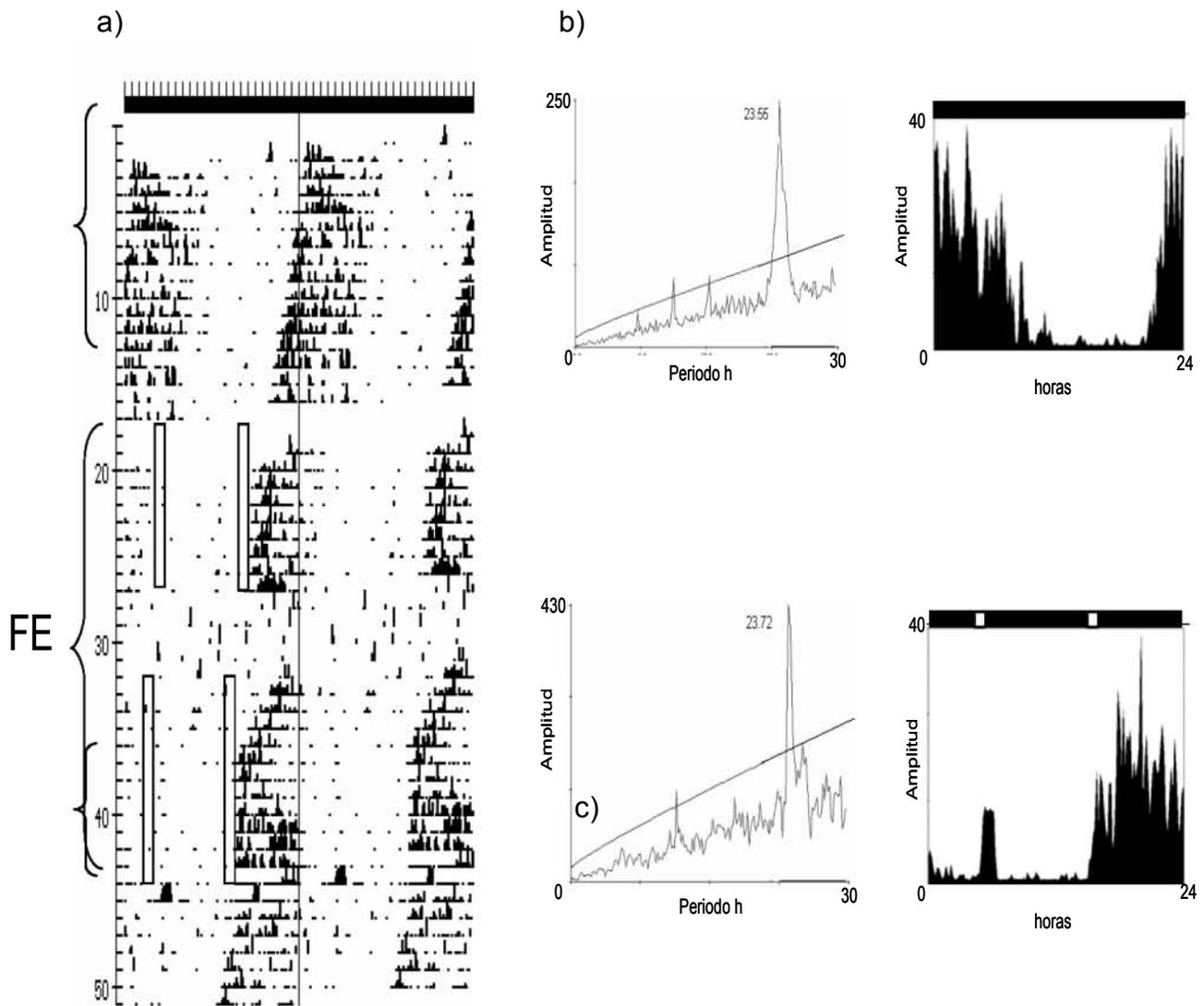
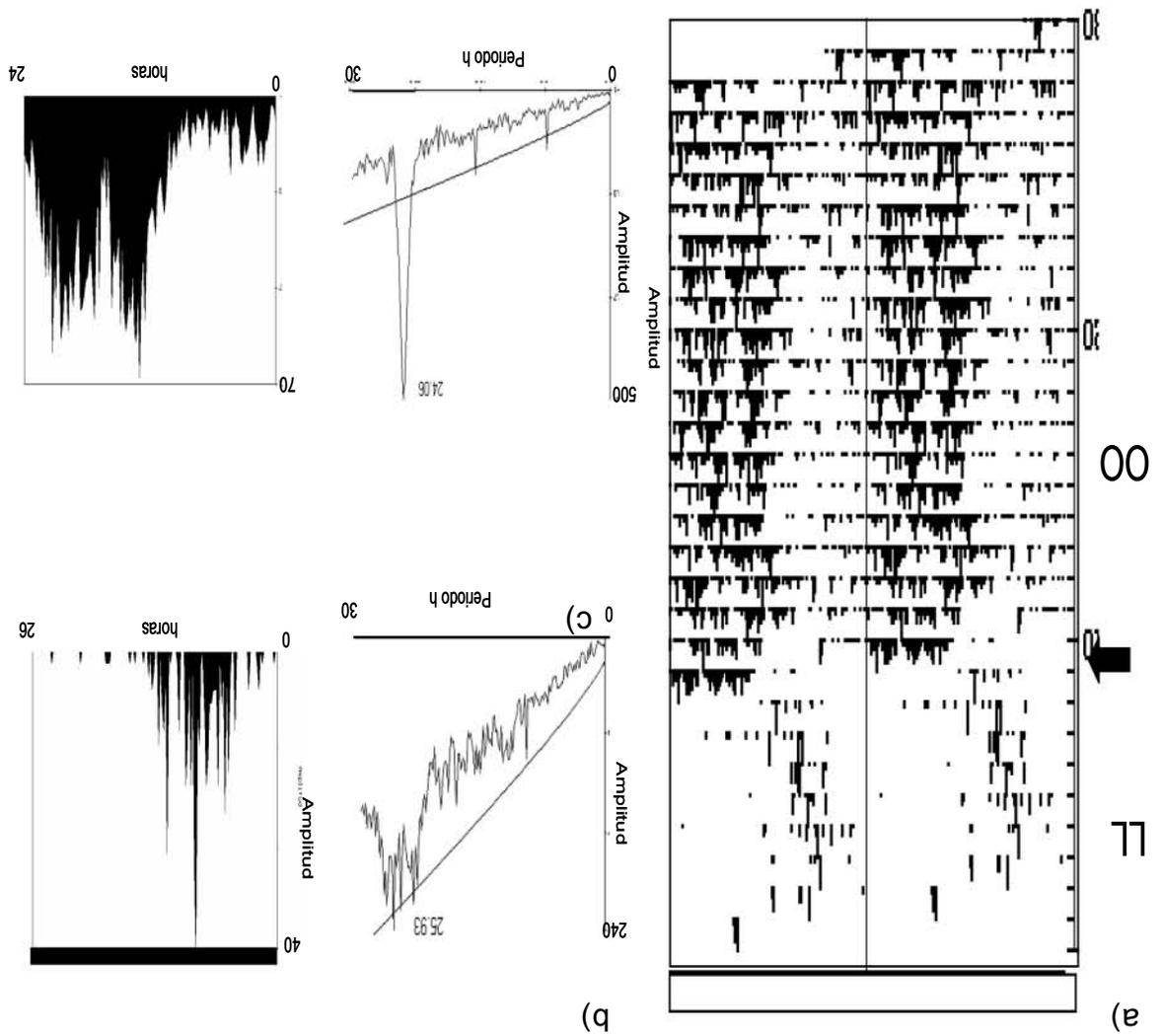


Figura 8. a) Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad OO (del día 1 al 17), FE (del día 17 al 45) y OO (del día 45 al 51) b) el periodograma correspondientes a OO y la curva promedio de actividad c) periodograma correspondientes a FE y la curva promedio de actividad. Del día 28 al 33 se presentaron errores técnicos que desfasaron el horario del fotoperiodo esqueleto. Los fotoperiodos esqueleto son representados con rectángulos vacíos en el lado izquierdo del actograma.

Figura 9. a) Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad LL (del día 1 al 10) y OO (del día 11 al final del actograma) b) periodograma correspondiente a LL con la curva promedio de actividad c) periodograma correspondiente a OO con la curva promedio de actividad.



ANÁLISIS INTEGRAL DE RESULTADOS

Variabilidad del periodo.

La figura 10 muestra el promedio del periodo en cada una de las condiciones a las cuales fueron expuestos los animales. En LO, la variabilidad en el promedio del periodo permite suponer que los animales no estuvieron en esta condición lo suficiente como para lograr un ajuste total del su ritmo a las 24 h del ciclo LO. La condición e en OO indica que el promedio del periodo fue de 23.96, el cual corresponde al de un roedor nocturno. Durante el fotoperiodo esqueleto (FE) se observó un periodo muy cercano a las 24 horas, lo que nos muestra que el ratón *Neotomodon* se sincroniza a fotoperiodos esqueleto. Finalmente, es conveniente señalar que el periodo en LL es significativamente mayor, lo cuál concuerda con la regla de Aschoff.

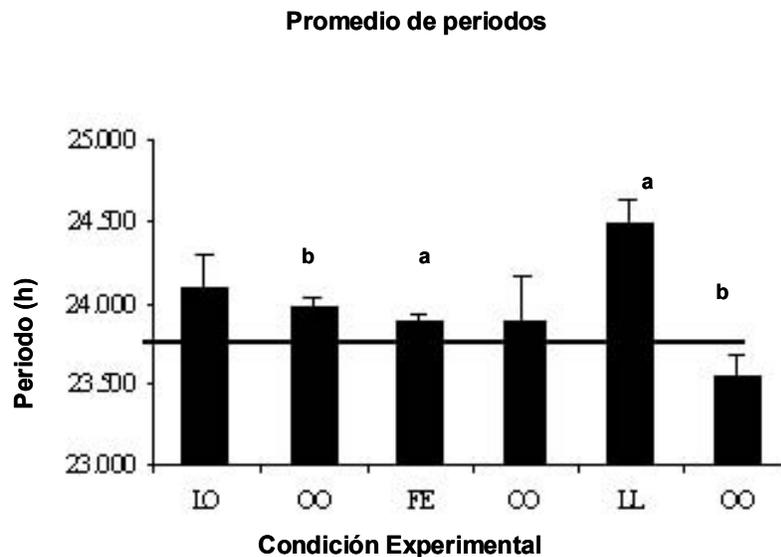


Fig.10 .Promedio del periodo (\pm Error) del ritmo circadiano de *N. alstoni*. Las diferencias significativas se muestran entre los grupos señalados con la misma letra. La línea horizontal indica las 24 hs.

Variación en la máxima actividad después del inicio de α en cada condición.

La figura 11 muestra las variaciones (promedio \pm error) en la máxima actividad después del inicio de α en cada condición. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. En general, la máxima actividad se presentó entre 3 y 5 hrs después del inicio de alfa. Se observó un intervalo más corto en FE, y uno más largo en LO, en donde la máxima actividad se presenta aproximadamente a las cinco horas de iniciada ésta, lo cuál fue casi la mitad de la duración total de alfa, (11.7 h). En la condición de FE en la que $\alpha = 7.8$ h, el punto actividad máxima ocurrió 3.2 h después. En LL el punto máximo de actividad ocurrió a las 3.7 h de iniciada la actividad y en la siguiente condición OO la máxima actividad se observó 4.5 h.

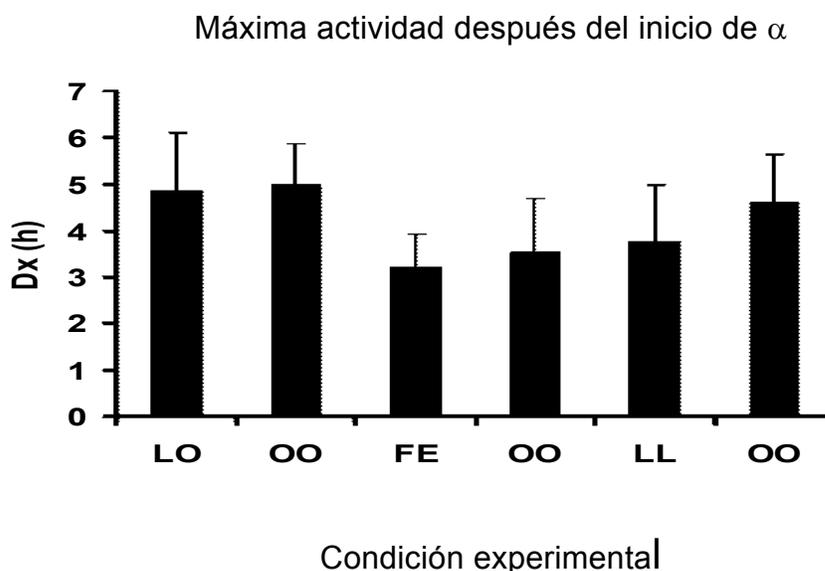


Fig.11. Gráfica que ilustra las variaciones en el promedio de la máxima actividad después del inicio de α obtenidas en cada condición, pese a que no se detectaron diferencias significativas, en las primeras tres condiciones el punto máximo de actividad se presenta cerca de la mitad del total de la actividad. Dx=Horas en que se presenta el punto máximo de actividad después del inicio de la noche subjetiva.

Variaciones en el promedio de la amplitud de la fase de máxima actividad en cada condición.

La figura 12 muestra el promedio en la amplitud de la fase de máxima actividad. El eje de las abscisas muestra las diferentes condiciones de iluminación y en el eje de las ordenadas el número de las interrupciones del detector infrarrojo por cada 10 minutos. El análisis estadístico de t de student arrojó diferencias significativas entre las condiciones que se encuentran marcadas con la misma letra. Se aprecia que la actividad disminuye significativamente en la condición de LL comparada con las de fotoperiodo completo y esqueleto. En la condición de OO posterior a FE se presentó un incremento en la amplitud. Las diferencias entre OO después de LO comparándolo con OO después de FE, pueden ser postefectos de las condiciones a las que fueron expuestas con anterioridad.

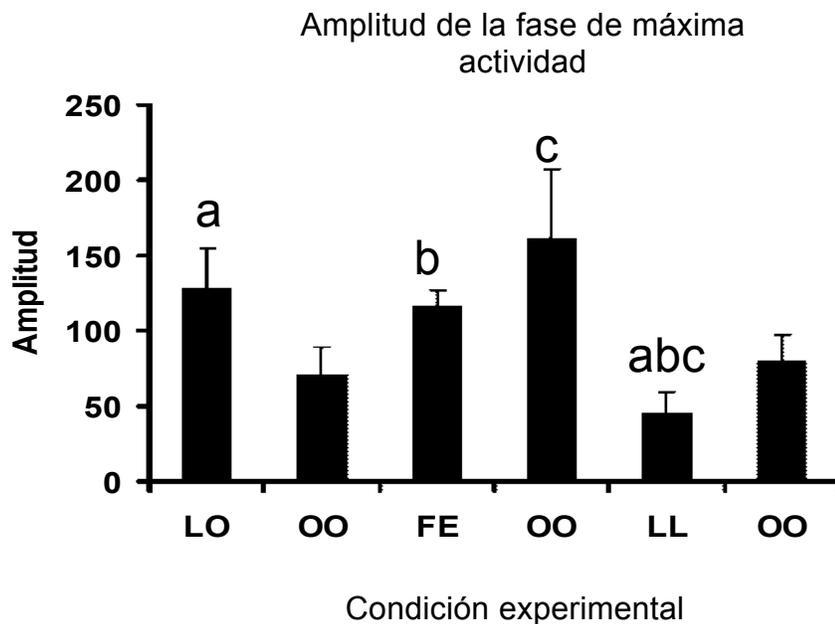


Fig.12. Grafica que ilustra la amplitud de la fase de máxima actividad en todas las condiciones experimentales. Se encontraron diferencias significativas en las condiciones marcadas con la misma letra (a,b y c), La condición LL muestra una menor amplitud respecto a la observada en LO y FE.

Variaciones en el promedio de la duración de la alpha.

La figura 13 muestra las variaciones en el promedio de la duración del periodo de actividad (α) entre las distintas condiciones experimentales, en donde se observa que existieron diferencias significativas en la primera condición de OO con respecto a la condición FE (marcadas con la letra a). En todas las condiciones, con excepción de FE, el promedio de la duración de alpha fue aproximadamente la mitad de la duración total del periodo (fig. 10). En LL se muestra un valor cercano a las 12 hrs, el cuál en los registros representa actividad de baja amplitud pero dispersa durante toda la franja de las 12 hs que dura α .

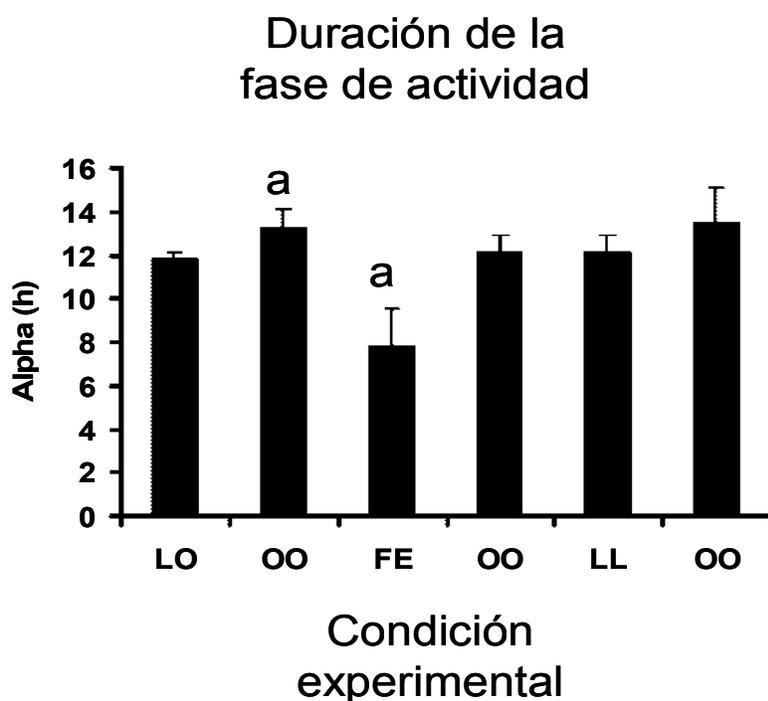


Fig. 13. Se muestran las variaciones en el promedio de la duración de la fase de actividad. Como puede observarse, hubieron diferencias significativas entre las condiciones OO y FE (marcadas con la letra a).

Variaciones en los promedios de Rho (ρ), Relación de fase (Ψ) y Estabilidad de fase.

En la tabla 1 se muestran las variaciones en los promedios de Rho (ρ), relación de fase (Ψ) y estabilidad de fase. Como se observa, hubieron diferencias significativas de la relación de fase entre las condiciones LO y FE. La duración de los promedios de ρ fueron similares en todas las condiciones experimentales, excepto en FE, pues el periodo, al ser menor de 24 horas, mostró menos horas tanto de actividad como de reposo.

	ρh	Ψh	Estabilidad de fase h
LO	12,31 (\pm 0.49)	- 0.45 (\pm 0.05)	0.28 (+ 0.06)
OO	10,44 (+ 0.79)	NA*	0.30 (+ 0.10)
FE	9,676 (+ 1.60)	- 2.7 (\pm 0.24)	0.35 (+ 0.21)
OO	11,79 (+ 0.83)	NA	0.08 (+ 0.03)
LL	12,39(+ 0.98)	NA	0.91 (+ 0.48)
OO	10,06(+ 1.69)	NA	0.34 (+ 0.11)

Tabla 1. Tabla que muestra las variaciones en los promedios de Rho (r), Relación de fase (Ψ) y Estabilidad de fase, en donde se encontraron diferencias significativas en relación de fase entre las condiciones LO y FE. *NA: No Aplica.

DISCUSIÓN

Modalidad del registro de la actividad locomotriz.

Para llevar a cabo el registro de actividad del ritmo circadiano del ratón de los volcanes se revisó de manera preliminar la actividad en dos grupos de 4 ratones cada uno. En el primer grupo el registro de actividad se realizó con una rueda de ejercicio colocada dentro de la jaula, de tal manera que al ser usada, los ratones, activaban los sensores de luz infrarroja una vez cada medio ciclo (ver fig. 5). A los animales del segundo no se les proporcionó rueda de ejercicio y en cuatro de los ratones de este grupo los sensores infrarrojos detectaban la actividad a nivel del piso. Al analizar los datos y convertirlos a actogramas se encontró que los registros de los ratones con rueda de ejercicio y sin ésta fueron muy dispersos y enmascararon una fase estable del ritmo (no se muestran los datos en este trabajo). El grupo con rueda de mostró registro mucho más limpio y conciso de su ritmo circadiano. Las causas de dichas diferencias podrían ser atribuidas a la mayor sensibilidad de los sensores a una interrupción superior por parte de la rueda de actividad. Comparativamente con la sola interrupción del movimiento del ratón, podría ser que la disponibilidad de una rueda de ejercicio incitara a los ratones bajo ésta condición a ejercer mayor actividad a diferencia de los animales que no disponían de una rueda de ejercicio.

Respuestas a fotoperiodo completo y fotoperiodo esqueleto

Durante la sincronización paramétrica (por fotoperiodo completo) desde el momento en el cual el sincronizador incide sobre un organismo (pudiendo existir ciclos transitorios), el marcapaso adquiere el periodo del sincronizador, mientras que en la sincronización no paramétrica (por medio de fotoperiodo esqueleto) al aplicar breves pulsos de luz, el ritmo circadiano en libre curso llega a ser sincronizado mediante consecutivos adelantos o atrasos de la fase del ritmo provocadas por la incidencia de cada uno de los pulsos de luz (Moore-Ede et al, 1982).

Al exponer a los animales a los tratamientos de sincronización paramétrica (LO) y posteriormente a la sincronización no paramétrica; la comparación del ritmo circadiano en ambas condiciones mostró cambios en la duración de α , y el tiempo transcurrido entre el inicio de la actividad y el nivel máximo de actividad, lo cual sugiere que la integración de la señal ocurrió de manera diferente en el mismo organismo. Al comparar el promedio de los periodos en LO y FE no se encontraron diferencias significativas, ya que estos tuvieron valores similares, ambos cercanos a 24 hrs, sin embargo, no se observaron valores idénticos al periodo del sincronizador, posiblemente por no haber descartado completamente los transitorios, o bien por la misma variabilidad tanto en el pico de actividad como en el inicio de α (Pittendrigh, 1982).

Aschoff y Daan demostraron que durante la sincronización de un ritmo circadiano, existe una dependencia de la intensidad de la luz. En el presente trabajo, se usó una cantidad de luz que incidía heterogéneamente en las distintas jaulas de registro (200-300 lx), por lo que es posible que fuera la causa por la cual en este trabajo se encontraron diferencias en la duración de α en las condiciones LO y FE. Aschoff y Daan demostraron que durante la sincronización de un ritmo circadiano, existe una dependencia de la intensidad de la luz. En el presente trabajo, se usó una cantidad de luz que incidía heterogéneamente en las distintas jaulas de registro (200-300 lx), por lo que es posible que fuera la causa por la cual en este trabajo se encontraron diferencias en la duración de α en las condiciones LO y FE (Moore-Ede, et. al, 1982).

El efecto de la luz constante

La organización del sistema circadiano se ve afectada por la luz constante, resultando en arritmicidad conductual o partición del ritmo de actividad y reposo. Mediante estudios realizados por medio de bioluminiscencia en neuronas del NSQ de ratón, se ha observado que la luz constante desincroniza el acoplamiento entre las neuronas del NSQ (Ohta et al, 2005). En el caso de *Neotomodon alstoni*, se observó que la condición de LL, provoca alargamiento del periodo y disminución de la amplitud de α lo que es acorde con la regla de Aschoff (1960), sin embargo no pareció ser tiempo suficiente para observar arritmia y/o partición del ritmo (splitting).

Análisis de la estabilidad de la fase.

En el presente trabajo se observó que, ciclo tras ciclo la precisión con la que se presenta el ritmo en las distintas condiciones fue de cerca de 0.3 h (estabilidad de fase), Lo que indica una variabilidad de aproximadamente 20 minutos en la precisión de la aparición de la siguiente fase en el siguiente ciclo de actividad. Comparado con roedores como el hámster o el ratón C57, esta variabilidad es grande y es mayor aún en luz constante, donde el valor de la varianza fue de 0.91 h. Esta última condición, por su carácter de desacoplador de los osciladores que integran el ritmo circadiano coincide con la idea de que la inestabilidad de la fase en un ritmo sea consecuencia de la fuerza con la que los acopladores se mantienen (Aschoff, 1981).

Interpretación del significado ecológico de los ritmos circadianos en *Neotomodon alstoni*.

La capacidad de anticipación para algunos sucesos del medio ambiente es una herramienta evolutiva y conductual muy útil para cualquier organismo en su medio ambiente, ésta les provee de una adaptación para las diferentes necesidades biológicas de cualquier organismo como son; alimentación, resguardo y los roles ecológicos que juega un organismo en un ecosistema, ya que todo organismo cumple procesos biológicos en su entorno. Al hablar de vertebrados, y en particular de los mamíferos, encontramos una variedad y complejidad de conductas. En éstos, resulta mucho más útil poseer conductas de anticipación principalmente por sus demandas metabólicas, lo cuál confiere ser eficientes en la búsqueda de alimento; tanto en el caso de aquellos animales que necesitan cazar, como en aquellos que necesitan protegerse de depredadores. Las conductas reproductivas también se encuentran ligadas con disponibilidad de alimento para las crías; mientras que las conductas de protección son una respuesta a los cambios del medio ambiente (De Coursey, 2004b y c).

Los ritmos biológicos proporcionan herramientas a los organismos para todos estos casos, dotándolos a nivel molecular, a la adaptación a pequeños y grandes cambios en el ambiente, como aquellos que son momentáneos o permanentes. En el caso del organismo con el cual se llevó a cabo este trabajo, nos arroja una información valiosa, no sólo de su conducta circadiana y de diversas características cronobiológicas, sino también en el enriquecimiento del

conocimiento biológico de la especie, al comenzar a plantearse como es su conducta cronobiológica en su hábitat, a que horas del día y en que época del año las desarrolla, como pudiera interactuar con la presencia de posibles depredadores, que factores ambientales necesita para presentar conductas reproductivas y la capacidad que tiene este roedor para adaptarse a los cambios en su hábitat.

Neotomodon alstoni resultó ser un buen modelo de estudio de ritmos biológicos por su fácil adaptación al cautiverio, pues muestra facilidad de sincronización al ser sometido a una sincronización paramétrica, exhibe un ritmo endógeno claro y persistente bajo condiciones constantes tanto de luz como oscuridad y presenta sincronización no paramétrica (FE) estas evidencias sugieren una línea de estudio para trabajos posteriores; como la elaboración de la curva de respuesta de fase, comparación del ritmo circadiano de actividad locomotriz con algún ritmo de secreción endocrina o algún ritmo fisiológico o las respuestas fotoperiódicas de estos organismos. Sin embargo, cabe señalar que la variabilidad en los datos obtenidos, pueden ser reflejo de distintas variables tales como la edad aunque en este trabajo se consideró únicamente una talla de animales relativamente semejantes. Por otra parte, es importante señalar que el uso de organismos silvestres evita las ventajas que tiene el uso de especies de bioterio genéticamente controladas, como es el caso de diversos roedores de laboratorio.

CONCLUSIONES

El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* mostró tener características muy similares a otros roedores con los cuales se han realizado estudios de ritmos circadianos, es un roedor nocturno que se sincroniza fácilmente en condiciones LO presentando su parte de actividad durante la noche, se comporta según la regla de Aschoff tanto en condiciones constantes de luz como de oscuridad, muestra un periodo cercano a las 24 horas en FE y en condiciones de oscuridad constante persiste su ritmo endógeno. Los ritmos en libre curso que se observaron después de cada condición de iluminación, no difieren significativamente en sus propiedades de periodo, alfa y rho.

REFERENCIAS

- Achoff, J. (1981). Free-running and entrained circadian rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 4: Biological rhythms, Achoff, J. (ed). Plenum, New York.
- Aschoff, J. 1984. Circadian Timing. Ann NY Acad. Sci. 423: 442-468.
- Aschoff, J. 1999. Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. Jpn. J. Physiol. Feb; 49(1): 11-28.
- Ayala-Guerrero F. Vargas-Reyna L; Ramos JI, Mexicano G. (1998). Sleep patterns of the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). Physiol Behav. 64(4):577-80.
- Bouskila, Y., Sttrecjer, G. J. and Dudek, F.E. (2001). Cellular Mechanisms of circadian Function in the Suprachiasmatic Nucleus. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 12: Circadian Clocks, Takahashi, J.S (ed)
- Chávez, C.B. (2005). Ratón de los volcanes. Pp 699-701. En: Cevallos, G. Y Oliva, G., coords. (2005). Los mamíferos silvestres de México. FCE, CONABIO. México, D.F. 1986 p.
- Daan S. and Ashoff, J. (2001) The Entrainment of Circadian Systems. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 12: Circadian Clocks, Takahashi, J.S (ed)
- Davis W.B. y Follansbee, L.A. (1945). The Mexican volcano mouse, *Neotomodon*. *J. Mammal.* 26: 401-411.
- DeCoursey, P. J. (2004a). Overview of Biological Timing from Unicells to Humans. En: Chronobiology: Biological Timekeeping. Dunlap, J. C., Loros, J.J. y DeCoursey. . Sinauer Associates Pub. Sunderland Massachusetts, U.S.A. 402p.

DeCoursey, P. J. (2004b). The Behavioral Ecology and Evolution of Biological Timing Systems. En: Chronobiology: Biological Timekeeping. Dunlap, J. C., Loros, J.J. y DeCoursey. . Sinauer Associates Pub. Sunderland Massachusetts, U.S.A. 402p.

DeCoursey, P. J. (2004c). Cell Physiology of Circadian Pacemaker Systems in Metazoa Animals. En: Chronobiology: Biological Timekeeping. Dunlap, J. C., Loros, J.J. y DeCoursey. . Sinauer Associates Pub. Sunderland Massachusetts, U.S.A. 402p.

Escobar, C., Salazar, A., Granados, D. Y Aguilar R. (1997) La sincronización: Características y Mecanismos. En: Il Curso Latinoamericano de Cronobiología. Facultad de Ciencias.

Gorman, M.R., Borman, B.D. and Zucher, I. (2001) Mamalian Photoperiodism. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 12: Circadian Clocks, Takahashi, J.S (ed)

Granados H y Hoth J. (1989). Estudios sobre la biología del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni alstoni*). XVI. Comparación de la capacidad reproductora de las hembras silvestres en el laboratorio, siguiendo tres sistemas de apareamiento. Arch Invest Med (Méx) 20: 95-05.

Green, C. B., y Menaker, M. (2003). Clocks on the Brain. Sciencexpress 1/10.1126/science.1087824.

Gruart A., Delgado, J.M., Escobar C., Aguilar Roblero, R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida. La Ciencia para todos 188. Fondo de Cultura Económica. Pp197, México.

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/Neotomodon_alstoni.html

Huereca, D. (2002). "*Neotomodon alstoni*" (on-line), Animal Diversity Web.

- Johnson, C. H., Elliott, J., Foster, R., Honna, K-I. And Kronauer, R. (2004). Fundamental Properties of Circadian Rhythms. En: Chronobiology: Biological Timekeeping. Dunlap, J. C., Loros, J.J. y DeCoursey. . Sinauer Associates Pub. Sunderland Massachusetts, U.S.A. 402p.
- Ko, C.H. y Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15 (2): 271-277
- Luis, J., A. Carmona, J. Delgado, F. Cervantes, R. Cardenas. 2000. Parental Behavior of the Volcano Mouse, *Neotomodon alstoni* (Rodentia:Muridae), in Captivity. *Journal of Mammalogy*, 81(2):600-605.
- Moore, R. and Leak, R. (2001). Suprachiasmatic Nucleus. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 12: Circadian Clocks, Takahashi, J.S (ed).
- Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M., Fuller, C.A. (1982). *The Clocks That Time Us*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, and London, England. 446p.
- Ohta, H., Yamazaki, S. and McMahon, D. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature neuroscience* 8(3)267-9.
- Pittendrigh C y Daan S. , 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents I. Satability and lability of spontaneous frequency. *J Comp. Physiol.* 106:233-252
- Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Herb. symp. Quant. Biol.* (25) : 159-184.
- Pittendrigh, C. S. 1981. Circadian System: Entrainment. *In* Aschoff, J (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms.* Pp 95-121. New York, Plenum Press.
- Pittendrigh, C. S.y D.H. Minus. 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *AMER. Nat.* (98): 261-294.

Ralph, M.R. and Hotz, (2001) M. Mammalian Clock Genetics. En: Handbook of Behavioral Neurology Volumen 12: Circadian Clocks, Takahashi, J.S (ed)

Vega, A. (1993). Análisis estadístico en cronobiología. Psiquis2(6) 139-149.