



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DEL RITMO CIRCADIANO EN LA ACTIVIDAD
LOCOMOTRIZ DE LA RANA *Eleutherodactylus longipes*
(AMPHIBIA. BRACHYCEPHALIDAE) DE LA CUEVA DE LOS
RISCOS, QUERÉTARO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DÁVILA MONTES MAYRA JANETT



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Manuel Miranda Anaya**

2010



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

**Dávila
Montes
Mayra Janett
Teléfono: 50449244
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
No de Cuenta 099100849**

2. Datos del tutor

**Doctor
Manuel
Miranda
Anaya**

3. Datos del Sinodal 2

**Doctor
Juan Bibiano
Morales
Malacara**

4. Datos del Sinodal 3

**Doctora
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal**

5. Datos del Sinodal 4

**Doctora
Rosa Gabriela
Castaño
Meneses**

6. Datos del sinodal 5

**M en C
Enrique
Moreno
Sáenz**

Datos del trabajo escrito: Estudio del ritmo circadiano en la actividad locomotriz de la rana *Eleutherodactylus longipes* (Amphibia: Brachycephalidae) de la Cueva de Los Riscos, Querétaro. 54p. 2010

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios el haberme permitido llegar a esta etapa de mi vida. Este trabajo va dirigido a todas aquellas personas que me apoyaron y estuvieron conmigo en el transcurso de mi carrera.

Agradezco enormemente a mis padres Alfonso Dávila Casique y Gloria Montes Zúñiga, quienes económica y espiritualmente siempre me apoyaron para seguir adelante y conseguir gran satisfacción en mi vida, y quienes fueron mi mayor impulso en mi carrera. Ahora hay dos nuevas personitas que de igual forma me han ayudado a ver hacia adelante, mis hijas Hyadi Erándeni e Ixchel Mahetsi Lobato Dávila, que han motivado mi vida. También agradezco a toda mi familia, hermanos y amigos por su fiel apoyo.

A Miguel, Sara, Marisol, Itzel, Adriana y Yunuen del equipo del Taller de Biospeleología ya que sin ellos no estaría realizada esta Tesis. A mis profesores el Dr. Juan Morales Malacara, Laura y Rafa, y a los Doctores Ignacio y Lupita del laboratorio de Acarología por su gran apoyo, así como al Biólogo Ricardo Paredes y Gaby Castaño.

Y no puede faltar un agradecimiento muy especial al Dr. Manuel Miranda por su ayuda y apoyo en la dirección de esta Tesis, además de le agradezco por su gran apoyo en lo personal durante el tiempo que lo he conocido.

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS DE LAS CUEVAS.....	6
2.1.1 Biotopos y Biocenosis	7
2.1.2 Factores físicos, químicos y geográficos.....	8
2.2 ADAPTACIONES DE LA FAUNA CAVERNÍCOLA.....	10
2.3 ASPECTOS GENERALES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS.....	11
2.3.1 Características Generales de los ritmos biológicos.....	12
2.3.2 Oscilación espontánea o Libre curso.....	14
2.3.3 Compensación de temperatura.....	15
2.3.4 Sincronización.....	16
2.3.5 Enmascaramiento.....	17
2.4 ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA CIRCADIANO EN VERTEBRADOS NO MAMÍFEROS.....	18
2.4.1 La glándula pineal.....	19
2.4.2 La retina como oscilador circadiano.....	19
2.4.3 El núcleo supraquiasmático.....	20
3. ANTECEDENTES.....	21
4. ZONA DE ESTUDIO.....	24
4.1 CUEVA DE LOS RICOS, QUERETARO.....	24
4.1.1 Descripción de la cueva.....	24
4.1.2 Ciclos de energía.....	28
4.1.3 Condiciones fisicoquímicas.....	28
4.1.4 Biodiversidad.....	29
5. BIOLOGIA DE LA ESPECIE <i>Eleutherodactylus longipes</i> (Baird, 1959).....	30
6. OBJETIVOS.....	33
6.1 GENERAL.....	33
6.2 ESPECÍFICOS.....	33
7. METODO.....	34
7.1 OBTENCIÓN DE ANIMALES Y MANTENIMIENTO.....	34
7.2 REGISTRO DE DATOS DE ACTIVIDAD.....	35
7.3 PROTOCOLOS.....	36
7.4 ANALISIS DE DATOS.....	37
8. RESULTADOS.....	39
9. DISCUSIÓN.....	49
10. REFERENCIAS.....	52

1. RESUMEN

En el presente estudio se analizó el ritmo circadiano de la actividad locomotriz de la rana *Eleutherodactylus longipes*, que es un troglófilo de la Cueva de los Ricos, en el Estado de Querétaro.

Los resultados obtenidos indican que existe un ciclo endógeno expresado los primeros días de registro. El ritmo circadiano de actividad en los organismos colectados, es lábil y se pierde con el tiempo, de tal forma que no hay una reorganización aún ante ciclos ambientales de luz-oscuridad.

El ritmo de actividad locomotriz registrado mediante un sistema automatizado de adquisición de datos y en un ambiente controlado de iluminación y temperatura, ha mostrado ser de gran interés en cuanto a lo que significa presentar una respuesta circadiana en organismos expuestos pobremente a señales ambientales cíclicas, como en el caso de esta especie.

Este tipo de estudios nos permitirán conocer más sobre el desarrollo y adaptación a los ambientes cavernícolas de los ritmos circadianos, y si existe una oscilación en libre curso. Además de aportar una mayor información en su papel ecológico y comportamiento dentro de la cueva.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS DE LAS CUEVAS.

Las cavidades subterráneas que se encuentran en el territorio mexicano, son diversas en cuanto a su origen, edad y grado de desarrollo (Redell, 1981). Las hay desde pequeñas cuevas basálticas, hasta gigantescos sistemas cársticos de varios kilómetros de longitud (Hoffmann et al, 1989).

Las grandes cavernas generalmente contienen un gradiente de temperatura y luz, con tres zonas fácilmente demarcadas: de *luz*, de *penumbra* con temperatura variable, y de *oscuridad* con temperatura constante (De Coursey, 2004). La zona de luz tiene la mayor abundancia y diversidad faunística; en la zona de penumbra existen especies que también pueden estar en el exterior. La zona de oscuridad es la que presenta condiciones y fauna especiales (Hoffmann et al, 1989). La fauna cavernícola, generalmente se clasifica dentro de tres grupos. Los *trogloxenos* (“visitantes de las cuevas”), que es conformado por aquellas especies que utilizan a las cuevas como un refugio temporal, o incluso pueden llegar a ella de forma accidental. Los *troglófilos* (“amantes de las cuevas”), incluye especies que presentan una afinidad con las cuevas, además necesitan de ellas para completar una parte de su ciclo de vida. Y los *troglobios*, que son todas aquellas especies que están limitados a vivir en las cuevas, y presentan todo su ciclo de vida dentro de ella. Éstos últimos presentan adaptaciones, tanto morfológicas (troglomorfismos) como fisiológicas, para la vida en las condiciones de las cuevas (Barr, 1968).

Para referirnos a un ambiente cavernícola, también es común que utilicemos el término *hipogeo* (“bajo la tierra, subterráneo”), y para referirnos al ambiente exterior utilizamos el término *epigeo* (“sobre la tierra, superficie”) (Hoffmann et al, 1989).

2.1.1 Biotopos y Biocenosis.

Los recursos tróficos en cuevas son materiales orgánicos (hojas, ramas y suelo) transportados por el agua, el viento y la gravedad desde los ecosistemas del exterior, generalmente en forma de detritos. Cuando ingresan al hábitat subterráneo transportados por la filtración de agua, lo hacen en forma difusa (percolación a través de toda la superficie) o concentrada (ríos epigeos que ingresan a través de sumideros y aportan numerosos depósitos de crecida). La fauna troglóxena, en su conjunto, constituye así un aporte de materia orgánica, no sólo los organismos vivos, sino también sus cadáveres y sus excreciones. A ello puede agregarse una fuente interna de energía proveniente de la síntesis de bacterias quimioautótrofas), principalmente que viven en la arcilla. Estas bacterias autótrofas y algunos hongos poseen la capacidad de sintetizar vitaminas, oligoelementos y factores de crecimiento, que le sirve a la fauna cavernícola. En la zona tropical puede agregarse un limitado aporte de raíces de plantas que penetran a través de fisuras en busca de agua, y que eventualmente pueden alcanzar galerías subterráneas a poca profundidad (Galan y Herrera, 1998).

En las cuevas, generalmente existen biotopos distintos, aunque relacionados. El primero es el representado por los quirópteros, en los cuales está asociada una gran fauna de ácaros y de insectos. Además, los murciélagos son los habitantes

cavernícolas que aportan mayor cantidad de materia orgánica a las cuevas. El segundo es el guano depositado en el piso, en el cual se desarrolla una compleja biocenosis, los hongos y bacterias que ahí crecen sirven de alimento a ácaros, colémbolos y otros artrópodos. Éstos a su vez son devorados por artrópodos y otros animales que se pueden encontrar en dos biotopos, el suelo y la pared de la cueva. En algunas grutas, pueden encontrarse un biotopo más, como lo son los arroyos, ríos, charcos y estanques alimentados por agua filtrada, donde se encuentran desde protozoarios hasta peces (Hoffmann et al, 1989). Las cuevas por sí mismas no representan ecosistemas aislados, si no que forman parte del ecosistema exterior, ya que la energía casi en su totalidad proviene de él.

2.1.2 Factores físicos, químicos y geográficos.

Sin duda alguna, la falta de luz es una característica fundamental que separa a las cuevas de los demás hábitats de la superficie terrestre. El clima del interior de las cuevas es mucho menos variable que el de la superficie externa, en general, mientras que la temperatura es aproximadamente igual a la media anual de la región (Hoffmann et al, 1989).

Existe una elevada humedad relativa, sin importar latitud y altitud, la cual cuando baja es de un 80%, pero generalmente varía entre 95% y 100%. Los índices de evaporación generalmente son bajos, pero el aire no está siempre inmóvil. Pueden existir corrientes de aire y aún fuertes vientos a grandes distancias de la entrada, activados por efectos de chimenea y cambios de la presión barométrica (Galan y Herrera, 1998; Hoffmann et al, 1989).

La composición química del aire varía de acuerdo a la ventilación de la cueva, ya que en una gruta bien ventilada, el aire interno es el mismo que el del exterior, mientras que en los recintos donde circula lentamente, difiere del que circula en la superficie porque posee en ocasiones elevadas concentraciones de dióxido de carbono y otras mezclas de gases, incluyendo gases letales (Galan y Herrera, 1998). El origen de este gas reside primordialmente en la actividad biológica del suelo superficial, la respiración y las fermentaciones húmicas (Cruz et al, 2006)

Las principales rocas carstificables (caliza, dolomita, yeso) pueden contener pequeñas cantidades dispersas de uranio y torio. Uno de los miembros de la serie de desintegración del uranio, el gas radón, es capaz de difundirse en el interior de las cavernas a una tasa considerable, y la atmósfera subterránea puede contener altas concentraciones en comparación con la atmósfera externa (Galan y Herrera, 1998). Las filtraciones de agua al interior de la cueva, ocasiona que se formen cuerpos de agua (Morales-Malacara y Vázquez, 1986). El medio acuático se caracteriza, por lo regular, por un elevado pH, bajo contenido de oxígeno y altas concentraciones de carbonatos disueltos. Los arroyos con conexiones externas, tienen un pH más bajo, con frecuencia son insaturados con respecto a los carbonatos y tienen una fauna más rica (Hoffmann et al, 1989).

Las fuentes de alimento generalmente son escasas y desigualmente distribuidas, predominan detritos de materia orgánica que son introducidos por percolación e inundación, junto con restos de troglóxenos. Morfológicamente presentan una compleja red tridimensional de espacios, conductos y galerías de muy diversos tamaños. Además, extensos sustratos rocosos, húmedos y con superficies verticales resbaladizas (Galan y Herrera, 1998).

2.2 ADAPTACIONES DE LA FAUNA CAVERNÍCOLA.

Debido a las características geofísicas que distinguen a las cuevas, y a sus condiciones ambientales estables (oscuridad, temperatura, humedad), la fauna cavernícola ha adquirido, durante un proceso de adaptación, cambios morfológicos y fisiológicos (Christiansen, 1982). Entre las características morfológicas que presenta la fauna troglobia se presentan los siguientes troglomorfismos, reducción en el tamaño, la forma del cuerpo y los apéndices son más alargados (gracilización), despigmentación, y en algunos casos anoftalmia (De La O-Martínez et al, 2004; Hoffmann et al, 1989; De Coursey, 2004).

La sensibilidad táctil está más afinada en un cierto número de animales troglobios ya que los receptores químicos y mecánicos son más grandes y más numerosos, además tienen un bajo valor de su tasa metabólica (Hoffmann et al, 1989). Presentan otras estructuras receptoras con gran capacidad para reconocer las condiciones ambientales, por ejemplo, un aparato sensorial fino para percibir vibraciones o incremento de electrosensibilidad (De La O-Martínez et al, 2004). Muchas formas cavernícolas, aunque carecen de ojos, son fotosensibles, y al ser iluminados con una fuente de luz, tienden a huir y esconderse; es decir que son fotofóbicos y su sensibilidad se debe a que su cutícula es translúcida y la luz hace un impacto directo sobre los centros nerviosos. Si a los troglobios se les somete a una luz intensa durante un tiempo largo, sufren una excitación y tratan de huir, si no lo logran al cabo de cierto tiempo mueren. Se sabe que algunos de los animales cavernícolas son capaces de resistir variaciones térmicas considerables, aunque las especies acuáticas prefieren las aguas frías (Hoffmann et al, 1989).

En cuanto a la actividad locomotriz, se ha visto que los troglobios se desplazan menos, son menos activos y se mantienen inmóviles mucho tiempo (Hoffmann et al, 1989). La ritmicidad en la actividad locomotriz puede tener una regresión en troglobios, ya que los ciclos son principalmente estimulados por factores externos como los ciclos de temperatura y fotoperiodo (Trajano et al, 2005).

Algunos de los animales, al carecer de la estimulación lumínica, no se ven afectados en sus ritmos circadianos, fotoperiodicidad y ritmos estacionales, los cuales tienen un papel muy importante en el medio epigeo. Sin embargo, algunos de ellos parecen haber perdido el ritmo circadiano y las épocas de reproducción son producidas por factores que aún no han sido completamente dilucidados (De La O-Martínez et al, 2004). De acuerdo con algunos autores, las formas troglobias tienen retenido algún ritmo circadiano que les ayuda a adaptarse a la estabilidad del ambiente. La presencia de la actividad circadiana se establece como atípica con respecto a las especies epigeas similares. Los ciclos vitales son más largos, por lo que la longevidad aumenta en comparación con las especies cercanas que viven en el exterior (De Coursey, 2004). Además, la vida es más pausada con frecuentes períodos de letargo, menor agresividad y menores reacciones de escape (Galan y Herrera, 1998).

2.3 ASPECTOS GENERALES DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS.

Augusto Forel sugirió en 1910, que los organismos poseían una memoria temporal o "*Zeitgedächtnis*", la capacidad de los organismos para medir el tiempo. Pero gracias a las observaciones reportadas por Aschoff (1960), Halberg (1960) y

Pittendrigh (1960), se generó y evolucionó el concepto de *reloj biológico*. El reloj biológico se concibe como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con un período regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna (Aguilar, 1993). Este sistema permite la adecuada interacción en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente.

Las diversas funciones de los seres vivos no se expresan en forma constante. Cuando se estudia un proceso orgánico en cualquier ser vivo durante un período prolongado de tiempo se puede observar que se alternan períodos de máxima actividad con períodos de actividad escasa o nula. Cuando estas variaciones se presentan con cierta periodicidad los denominamos *ritmos biológicos*. Algunos de estos ritmos se repiten en tan sólo unas milésimas de segundos, mientras que otros pueden repetirse hasta cierto número de años (Gruart et al, 2002). Los ritmos biológicos son una forma de adaptación al medio y de organización de las actividades fisiológicas y conductuales, los genes son quienes contienen la información necesaria para mantener a los ritmos y así poder regular la conducta (Pittendrigh, 1960). Además, esta ritmicidad puede sincronizarse a los estímulos geofísicos.

2.3.1 Características Generales de los ritmos biológicos.

Cuando una actividad biológica oscila con un periodo cercano a las 24 horas se denomina *ritmo circadiano* (del latín *circa*= cercano o próximo, *dies*= día), según la nomenclatura de Halberg (1960). Los ritmos circadianos se han tomado como referencia para clasificar a otros de acuerdo a su frecuencia y periodo, como los

ritmos ultradianos que tienen una mayor frecuencia que los circadianos y periodo menor a 19 h, y los *ritmos infradianos* con frecuencia menor a los circadianos y periodo mayor a 28 h. Los ritmos circadianos generalmente están asociados a algún ciclo geofísico, como la rotación de la Tierra y al periodo de iluminación, la duración del día y la noche.

Para el estudio de los ritmos es necesario tomar en cuenta algunas características que los describen. Una *oscilación* es un cambio cíclico medible que exhibe una forma de onda y periodo relativamente constante (Fig. 1). La característica más importante de una oscilación es el **periodo**, que se define como la duración de un ciclo completo, es decir, el intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos, otra forma de describir esta característica es a través de la **frecuencia**, refiriéndose al número de veces que ocurre el ciclo durante un intervalo de tiempo arbitrario. La **amplitud** es la magnitud del ciclo estimada del valor máximo (cresta) al valor mínimo (valle), y en ocasiones al valor medio (**mesor**). La **fase** es el valor instantáneo de una función periódica, es el tiempo estimado en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio. El **ángulo de fase**, es la diferencia de fases entre dos señales. Cuando se presentan cambios en la fase en que ocurre un hecho característico (marcador de fase), se llama adelanto o retraso de fase, si el cambio consiste en que el marcador de fase se realiza después de lo esperado, hablamos de un *retraso de fase*, si el cambio ocurre antes de lo esperado lo llamamos *adelanto de fase*.

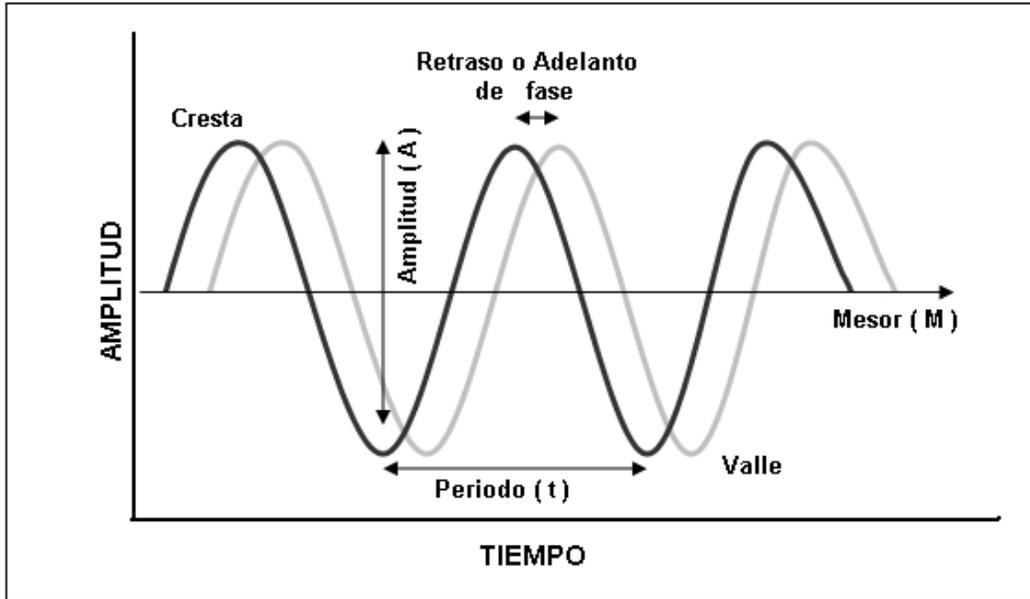


Figura 1. Componentes generales de una oscilación periódica (Modificado de Gruart, 2002).

En los animales se han identificado diversos tejidos y órganos que funcionan como oscilador, tales como el ganglio cerebroide en los insectos (Page, 2000), los ojos en insectos y crustáceos, la glándula pineal en aves y en vertebrados no mamíferos y el núcleo supraquiasmático en mamíferos, capaces de imponer el período y la fase de la ritmicidad biológica en diversos fenómenos estudiados. Estas estructuras son conocidas como marcapasos (Aguilar, 1993).

2.3.2 Oscilación espontánea o libre curso.

Se planteó el problema de esclarecer si los ritmos reflejaban la influencia del ambiente, o bien si el organismo era capaz de generar la ritmicidad en un ambiente arrítmico. Algunos factores como la luz, temperatura, humedad, ruido, presión atmosférica, radiaciones ionizantes y electromagnéticas, podrían ser

capaces de servir al organismo como estímulos que le impongan ritmicidad. El origen endógeno de la ritmicidad biológica, se basa en el hecho de que en las condiciones típicas de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persiste con una ligera pero significativa variación en el período que la caracteriza. Este fenómeno es denominado como *ritmo en libre curso* (*free running* en inglés) u *oscilación espontánea* (Aguilar, 1993).

Existe un intervalo de variación en el periodo del ritmo en libre curso entre individuos de la misma especie y después de varios ciclos, los sujetos se desincronizan entre sí, aunque el periodo en oscilación espontánea sea muy preciso en cada individuo. Los organismos son capaces de generar los ritmos biológicos gracias a los ya mencionados relojes biológicos, que les permiten medir el tiempo con gran precisión. Aschoff (1960) demostró que los relojes circadianos son sensibles a la intensidad de iluminación ambiental, y en general, el incremento de la intensidad de la luz produce la disminución del periodo en libre curso en animales diurnos, y el alargamiento en animales nocturnos. Por otra parte, la oscuridad continua en animales diurnos alarga el periodo, y en animales nocturnos lo acorta (Aguilar, 1993).

2.3.3 Compensación de temperatura.

Otra característica del ritmo en oscilación espontánea es la compensación de temperatura, que consiste en que el período endógeno se mantiene relativamente constante a pesar de los cambios de temperatura del ambiente, y que pueden afectar el funcionamiento biológico. Lo cual sugiere que a nivel metabólico existen sistemas específicos que compensan los efectos de la variación de temperatura,

un caso de la conservación homeostática de la frecuencia de las oscilaciones circadianas. El fenómeno de compensación de temperatura permite que la medición del tiempo por los organismos pueda realizarse con la precisión en ciclos sucesivos, sin importar los cambios térmicos ambientales que pudieran ocurrir entre éstos (Aguilar, 1993).

La temperatura es un factor importante en la regulación de la actividad enzimática. Si la temperatura aumenta, también lo hace la actividad de las enzimas, y si disminuye, la actividad de las enzimas de igual forma. Por lo tanto se ha sugerido que la función de un reloj biológico depende de un grupo de enzimas con distintas temperaturas óptimas ajustadas entre sí, así presenta la misma cinética a diferentes temperaturas (Gruart et al, 2002).

2.3.4 Sincronización.

En condiciones naturales, la ritmicidad biológica presenta una estrecha relación temporal con las variaciones cíclicas del ambiente geofísico, manifestándose en el período de ritmo biológico y en su relación de fase con los ciclos ambientales. A este ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico lo llamamos *Sincronización* y al agente físico que causa la sincronización se le conoce como "*Zeitgeber*" (del vocablo alemán *Zeit*= tiempo y *geber*= dador). La sincronización provee a los relojes biológicos de un mecanismo por el cual éstos son capaces de reconocer la hora local, propiedad sin la cual los relojes no tendrían relevancia adaptativa. Además, sin la sincronización el individuo no podría ajustar sus funciones a los cambios que ocurren en el ambiente, se vería afectada la migración y localización geográfica. Gran variedad de fenómenos ambientales

pueden funcionar como zeitgebers como el magnetismo terrestre, radiaciones cósmicas, la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento y las señales sociales. Entre estas señales, las variaciones de iluminación del ciclo día-noche presenta la mayor estabilidad en su período y fase, lo que las hace las más predecibles, y se consideran como la principal señal de sincronización ambiental, por lo menos en los organismos epigeos. Cuando un ritmo en oscilación espontánea se encuentre fuera de su rango de sincronización, se observa que el periodo endógeno es modulado por el sincronizador, cuando ambos se encuentran en una cierta relación de fase, a este fenómeno se le conoce como *coordinación relativa* (Aguilar, 1993).

Los efectos sincronizadores de estímulos ambientales sobre los osciladores biológicos se pueden explicar por dos mecanismos de acción, *sincronización paramétrica* y *sincronización no paramétrica*. En la sincronización paramétrica o *continua* se propone que el estímulo ambiental afecta de manera continua la velocidad angular del oscilador. En la sincronización no paramétrica o *discreta* sólo se afecta la fase del oscilador en las transiciones del inicio y fin del estímulo. (Aguilar, 1993)

2.3.5 Enmascaramiento

Los estímulos sincronizadores pueden afectar al organismo sin necesidad de actuar sobre los osciladores biológicos, en estas circunstancias el estímulo actuaría directamente sobre los sistemas efectores de la ritmicidad manifiesta, a este fenómeno se le denomina efecto de enmascaramiento y se caracteriza cuando el ritmo enmascarado se libera a condiciones de oscilación espontánea, la

fase y el período del ritmo en estudio se predice por las condiciones del oscilador previas a la presencia del estímulo ambiental que produjo el enmascaramiento (Aguilar, 1993). El estímulo ambiental no afecta ni el periodo ni la fase del oscilador biológico.

2.4 ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA CIRCADIANO EN VERTEBRADOS NO MAMÍFEROS.

La compleja organización del sistema circadiano de los vertebrados se pudo apreciar desde los primeros estudios orientados a localizar los relojes biológicos (De Coursey, 2004). Hay tres estructuras relacionadas con sistemas de fotorrecepción que están asociadas en los vertebrados a la regulación de los ritmos circadianos: la glándula pineal o epífisis, la retina y el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

En algunos estudios en vertebrados, se señala a la glándula pineal como un reloj biológico presente en peces, anfibios, reptiles y aves. En algunos reptiles se ha descrito un ojo primitivo asociado con la glándula pineal. La retina y el núcleo supraquiasmático en algunas especies de reptiles y aves cumplen también funciones de reloj biológico, y se ha mostrado que la retina funciona como un oscilador circadiano (Underwood, 2000). La diferencia entre el sistema circadiano de los diversos vertebrados no radica en sus componentes y su organización anatómica, sino más bien en la función que tiene cada uno de ellos en sistema (Gruart et al, 2002).

2.4.1 La glándula pineal.

El primer reloj biológico claramente demostrado en vertebrados fue la glándula pineal. Hacia 1968 se encontró que la extirpación de la glándula pineal elimina el ritmo circadiano de locomoción en el canario (*Passer domesticus*), y al transplantarle la glándula pineal se restablece el ritmo, aunque la fase del ritmo reestablecido correspondía a la del donador. Con esto se demuestra que hay un reloj localizado en la glándula pineal trasplantada. Actualmente, se han acumulado datos que evidencian la presencia de un reloj circadiano en la glándula pineal de algunos peces (*Esox lucius*, *Heteroneuphis fossilis*, *Lamprata japonica*), reptiles (*Anolis carolinensis*, *Gallo tiagalloti*) y aves (*Padda oryzivora*, *Sturnus vulgaris*) (Underwood, 2000). En todas estas especies se ha demostrado que la extirpación de la glándula pineal elimina los ritmos circadianos. La extirpación de la glándula pineal en la lagartija *Podarcis sicula* altera el período de los ritmos biológicos pero no los elimina, mientras que el trasplante de esta glándula induce cambios en el sentido opuesto de la alteración inicial (Gruart et al, 2002).

2.4.2 La retina como oscilador circadiano.

Diversos estudios experimentales han permitido concluir que también existen relojes biológicos en la retina. En aves (*Gallus domesticus*, *Coturnix coturnix*, *Columbia livia*) y reptiles (*Sceloporus olivaceus*, *Sceloprus occidentalis*, *Podarcis sicula*), se requiere la extirpación de ambos ojos, además de la glándula pineal, para eliminar por completo la producción de ritmos circadianos. Además, se ha demostrado la persistencia del ritmo circadiano de secreción de melatonina por células de la retina mantenidas en cultivo (Underwood, 2000). Un estudio en la

rana africana (*Xenopus laevis*) demuestra la presencia de un reloj circadiano en la retina (Anderson y Green, 2000). Otro estudio en *Iguana iguana* demuestra que existen osciladores circadianos en la retina, la glándula pineal y el ojo parietal, los diversos osciladores detectados funcionan como reloj para procesos diferentes. Así, mientras que la glándula pineal controla el ritmo de temperatura corporal, su participación es marginal en la generación del ritmo de actividad locomotriz (Underwood, 2000).

2.4.3 El núcleo supraquiasmático.

También existe evidencia de que el núcleo supraquiasmático funciona como un reloj circadiano en algunas especies de reptiles y aves (Underwood, 2000). Se ha demostrado que la lesión del núcleo supraquiasmático elimina la expresión del ritmo circadiano de locomoción en los reptiles (*Dipsosaurus dorsalis*, *Podarcis sicula*) y en las aves (*Passer domesticus*, *Padda oryzivora*, *Coturnix coturnix*). La organización del sistema circadiano en estas especies supone no sólo la presencia de varios relojes circadianos, sino también una compleja interacción entre éstos. Se ha propuesto que la glándula pineal, la retina y el núcleo supraquiasmático, interactúan formando un asa neuroendocrina. Así, la luz afecta directamente los osciladores circadianos de la retina y la glándula pineal mediante sus propios fotorreceptores. El núcleo supraquiasmático recibe la influencia de la luz ambiental por vía nerviosa desde la retina, y por vía endocrina desde la glándula pineal, a través de la hormona melatonina. A su vez, el núcleo supraquiasmático podría influir sobre la glándula pineal y la retina por su inervación a través del ganglio cervical superior (Underwood, 2000).

3. ANTECEDENTES

En los estudios realizados por De La O-Martínez y colaboradores (2004) con el estado adulto del acocil cavernícola *Procambarus cavernicola*, y estadios juvenil y adulto de su especie hermana epigea *Procambarus clarkii*, se que el adulto epigeo demostró tener una mayor actividad y un ritmo mejor expresado en periodos de oscuridad, lo que indica que se trata de una especie nocturna. El acocil juvenil epigeo y el cavernícola, por el contrario, demostraron mayor actividad en condiciones de luz, comportamiento típico de especies diurnas. En estas especies el sistema nervioso se desarrolla tempranamente, lo que puede ser la causa de la capacidad del acocil juvenil para ajustarse a un régimen de fotoperiodo. Las similitudes entre el comportamiento circadiano del acocil juvenil epigeo y el acocil cavernícola, sugiere que el acocil cavernícola tiene poco desarrollado el sistema neuroendócrino, debido a las condiciones estables del ambiente (De La O-Martínez et al, 2004).

En los estudios realizados por Trajano y Menna-Barreto (2000), sobre el aspecto evolutivo entre cinco ejemplares de *Taunayia* sp. (cavernícolas) y dos ejemplares de *Taunayia bifasciata* (epigea, nocturna), se encontró que la especie troglóbia presenta una reducción en la actividad locomotriz, con la pérdida de componentes circadianos en todos los especímenes estudiados, y que son completamente arrítmicos en condiciones de libre curso (Trajano y Menna-Barreto 2000). La arritmicidad en *Taunayia* sp. es más acentuada que en el pez de las cuevas de México del género *Astyanax*, el cual la mantiene retenida, probablemente por una sincronización de múltiples osciladores (Espinasa y Borowsky, 2000). Continuando

con sus estudios sobre *Taunayia* sp. Trajano y colaboradores (2005), fortalecen sus resultados sobre esta especie, y sugieren un patrón para especies troglóbias altamente especializadas, con una progresiva reducción de mecanismos circadianos. Con frecuencia, las especies troglóbias constituyen un excelente material para los estudios de cronobiología. Las diferencias en el tiempo de aislamiento y en las condiciones ecológicas observadas en el hábitat subterráneo permiten la comparación entre especies sobre diferentes contrastes. Estos estudios demuestran el potencial de los organismos subterráneos para investigación de origen, evolución, funcionamiento y genética de los ritmos circadianos (Trajano et al, 2005).

También se han realizado estudios en artrópodos, como el caso del grillo *Strinatia brevipennis* por Hoenen (2005). Los grillos han demostrado una respuesta fotofóbica, y a diferencia de otras especies del Orden Orthoptera, no realizan migraciones al exterior de la cueva, aunque sí las hacen del interior a las entradas (Hoenen, 2005). Es una especie nocturna, y su actividad rítmica circadiana parece ser estimulada por la temperatura y la humedad relativa de la zona (Hoenen et al 2001). Otro trabajo más con artrópodos, realizado por Oda y colaboradores (2000), acerca del acoplamiento de dos ciclos (muda y ovoposición) del colémbolo *Folsomia candida*. Estos ciclos presentan periodos regulares, muda 4 días y ovoposición 8 días, para los que sólo presentaron ciclos de muda el periodo era de 5 días, y respondieron a pulsos de temperatura dirigidos cada 24 h, demostrando así una organización temporal interna (Oda et al, 2000)

Al determinar los ritmos circadianos en la actividad locomotriz de la rana *Eleutherodactylus longipes*, un troglófilo de la Cueva de Los Ricos, nos permitirán

conocer más sobre el desarrollo y adaptación a los ambientes cavernícolas de los ritmos circadianos, y si existe una oscilación en libre curso. Además de aportar una mayor información en su papel ecológico y comportamiento dentro de la cueva.

4. ZONA DE ESTUDIO

4.1 CUEVA DE LOS RISCOS, QUERETARO.

La cueva de Los Riscos (21° 11' 797" N -99° 30' 972" W) se localiza a 3 kilómetros de Puente de Dios, río Jalpan, dentro del municipio de Jalpan de Serra, Querétaro, a una altitud de 1122 m snm. Las características geomorfológicas de la zona son las montañas fuertemente plegadas con presencia de cañadas, por donde corren los arroyos que se unen al río Jalpan. El tipo de suelo desarrollado en esta zona es de roca caliza debido a la formación El Abra. Los factores que determinan las características de la cueva de Los Riscos están asociados a los factores externos dados por el clima de la región y los períodos de precipitación. La permanencia del agua es variable debido a la diferencia de períodos de seca y lluvia. El período de máxima precipitación es entre los meses de Junio y Noviembre, y la época más seca va de los meses de Diciembre a Mayo. El clima que presenta este tipo Cálido Subhúmedo (A) C (wo) (w), la precipitación media anual es de alrededor de 600mm y la temperatura media anual es de 22°C (Espino del Castillo et al, 2009). El tipo de vegetación en el área es selva baja subcaducifolia (Morales-Malacara y Vázquez, 1986).

4.1.1 Descripción de la Cueva

Es una cavidad horizontal con una profundidad de 35 m y una longitud de 440 m (Lazcano, 1986 I). La cueva se dividió en ocho zonas principales (A-H) incluyendo túneles y galerías, estas zonas se delimitaron de acuerdo a la topografía de la cueva (Espino Del Castillo et al, 2009). Según la zonación básica de las cuevas,

en la zona de *luz* se encuentra la zona A, en la zona de Penumbra se encuentra la zona B y partes de la zona C, D, E, F y H, y la zona de Oscuridad se encuentra la zona D y parte de las zonas C, D, E, F y H (Fig. 2). El sistema tiene cuatro entradas que se abren una depresión de unos 25 m de diámetro, las tres cavidades se abren a la misma zona (zona A). La entrada principal forma un puente natural, que accede a una amplia boca que se abrió debido a un antiguo colapso, la cual presenta aproximadamente 20 m de altura por 20 m de ancho. Al descender por los 20 m entre grandes bloques rocosos, se llega a una galería que tiene 100 m de largo, 25 m de ancho y 18 m de alto, y accede a un espacioso salón que presenta gran cantidad de concreciones. Esta entrada de la gruta limita a la zona A. El brazo derecho lleva a la zona B que es un túnel cerrado de unos 40 m de longitud total, después de recorrer 25 m se sube por una pendiente hasta una altura de 11 m. Al final de ésta se encuentra un túnel de 2 m de ancho por 5 m de largo que termina en una bifurcación que comunica a una grieta de 1.70 m de ancho por 15 m de longitud y a dos pequeñas cámaras de forma irregular. El techo de toda la zona presenta gran cantidad de estalactitas. Como a 30 m del lado izquierdo de la entrada principal, se abre la zona E, se asciende por 8 m de alto y se llega a un descanso, es una zona de irregular amplitud. Las paredes que rodean al descanso se angostan hasta 3.5 m a lo que sigue una pendiente de 4 m. En el fondo hay un túnel de 13 m de alto hasta llegar a una pared de 12 m de altura, se sube por un piso inclinado a lo largo de 13 m, hay una pared no muy alta donde se encuentra un segundo descanso de 2 m y hay otra pared de 6 m de alto; 4 m adelante se observa la segunda entrada. La zona F es la tercer entrada y se encuentra entre las entrada que llevan a la zona A y E. Al entrar, a 16 m se

encuentra una pared con 2 m de altura que lleva a una cámara que se bifurca y cuyos brazos se comunican más adelante, en la unión hay una gatera de 6 m de largo y unos 40 cm de altura. La cuarta entrada se encuentra del lado izquierdo de la entrada principal y corresponde a la zona H, que representa un corredor vertical estrecho de difícil acceso. Al interior de la cueva se encuentran dos túneles (C y D) los cuales tienen gours en su interior y las elevaciones varían en el interior de éstos (Morales-Malacara y Vázquez, 1986).

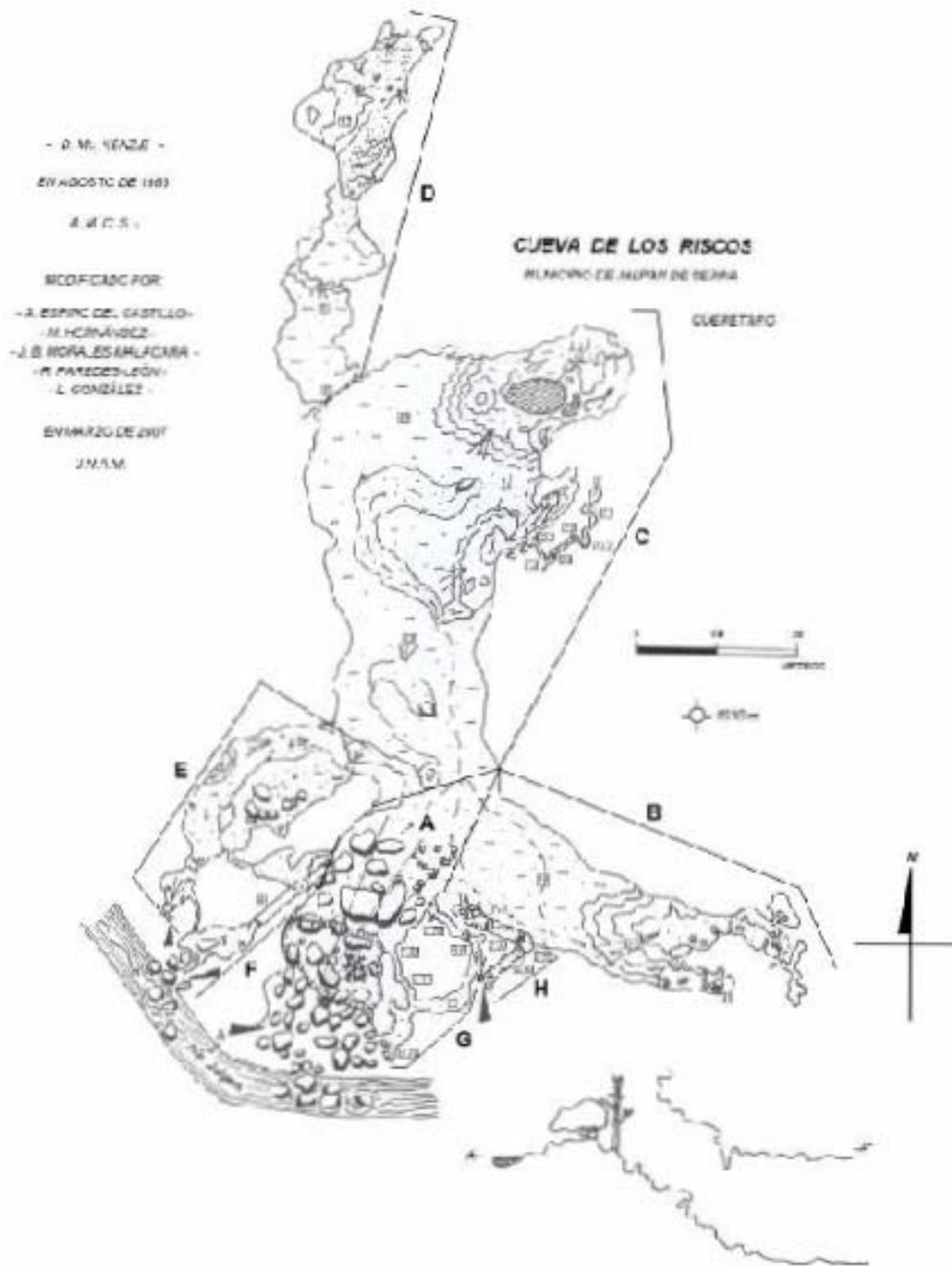


Figura 2. Zonación de la cueva de Los Riscos, Jalpan, Querétaro (Tomado de Espino Del Castillo et al, 2009).

4.1.2 Ciclos de energía.

Como factores que pueden influir en el ciclo de energía de acuerdo a las características de la cueva son: la composición de la roca predominante está constituida por caliza arrecifal, la presencia de cuatro entradas le proporcionan ventilación, la textura del suelo es migajón arenoso con casi los mismos porcentajes de limos y arcillas (Morales-Malacara y Vázquez, 1986). La fauna es muy diversa en artrópodos, se encuentra una especie de anfibio y dos especies de murciélagos hematófagos, que proporcionan guano rico en compuestos nitrogenados, además la entrada se encuentra rodeada por una gran cantidad de vegetación. Cuando el Río Jalpan tiene crecidas, penetra algo de agua en esta caverna. Las numerosas filtraciones producidas por las lluvias, han originado gran cantidad de concreciones (Lazcano, 1986 I).

4.1.3 Condiciones fisicoquímicas

El suelo de la Cueva de los Riscos presenta un 12% de materia orgánica, con pH 5, siendo un suelo ácido de textura de migajón arenoso, ya que tiene 40% de arena, 32% de limo y 28 % arcilla (Morales-Malacara y Vázquez, 1986).

La zona B y E, son dos de las zonas que presentan una mayor variación morfológica dentro de la cueva, por lo que sus condiciones fisicoquímicas son muy particulares. La circulación del aire en el caso de la zona E toma el efecto de tubo de viento, aunque la influencia de los agentes refrigerantes como la roca y la humedad, minimizan los efectos de las variaciones de la temperatura epigea. En las partes profundas de los túneles de la zona B y D la temperatura permanece constante (Morales-Malacara y Vázquez, 1986). La temperatura en la zona B es

aproximadamente entre 15°C a 17°C con una humedad aproximada de 83%, en la zona D la temperatura también varía entre 15°C a 17°C pero la humedad es de 96%, en la zona E la temperatura varía entre 13°C a 17°C con una humedad aproximada de 78%.

La humedad relativa en el exterior es irregular debido al régimen de lluvias en la región, sin embargo en los túneles de la cueva se conserva siempre más alta que en el exterior (Morales-Malacara y Vázquez, 1986). Hay una gran variación de la humedad en las zonas E y F por su comportamiento como túnel de viento, y la zona B por las precolaciones de agua que provocan un aumento en la saturación del medio en ciertos períodos del día y el desplazamiento de esta masa de aire cargado de humedad hacia otra área de la cueva por otras masas de aire. La cueva presenta precolaciones de agua durante todo el año en las zonas B, C y D. El pH del agua en la cueva es de 6 y 7 dependiendo la hora del día.

4.1.4 Biodiversidad

La Cueva de los Riscos presenta una gran diversidad de organismos troglobios, troglófilos y trogoxenos que tienen un importante papel en las cadenas tróficas y en la vida de la caverna. Los organismos que ahí se encuentran son: hongos, protozoarios, nemátodos, anélidos (oligoquetos), moluscos (gasterópodos), crustáceos (isópodos), chilópodos, diplópodos, sínfilos, arácnidos (arañas y opiliones y ácaros), insectos de la clase Collembolla, Thysanura, Dictyoptera, Dermaptera, Blattaria, Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera, y vertebrados como peces del género *Astyanax*, anfibios de la especie *Eleutherodactylus longipes* y quirópteros hematófagos de las especies

Desmodus rotundus y *Diphylla ecaudata* (Lazcano, 1986 I; Espino del Castillo, 2009).

5. BIOLOGIA DE LA ESPECIE *Eleutherodactylus longipes* (Baird, 1859).

Este anuro pertenece a la familia Brachycephalidae, siguiendo la clasificación propuesta por Frost et al, (2006). *Eleutherodactylus longipes* (Fig. 3) ha tenido una serie de conflictos taxonómicos, se le ha aplicado el nombre de *Batrachyla longipes* por Baird (1959), y de *Syrrophus latodactylus* descrita por Taylor (1939), ésto se debe al patrón de coloración que predomina en la parte sur de la zona de distribución, ya que presenta grandes manchas, a diferencia de las del norte, cuyas manchas son pequeñas (Lynch, 1970), la mayoría son ranas pequeñas, de cabeza angosta, crestas craneales ausentes, la membrana timpánica y *annulus* prominentes, presentan tubérculos prominentes y el dedo V de la pata trasera más pequeño que el dedo III (Lynch y Duellman, 1997). Las ranas del género *Eleutherodactylus*, presentan un dimorfismo sexual marcado, por que en los machos son regularmente de dos tercios de tamaño que las hembras (Lynch y Duellman, 1997).

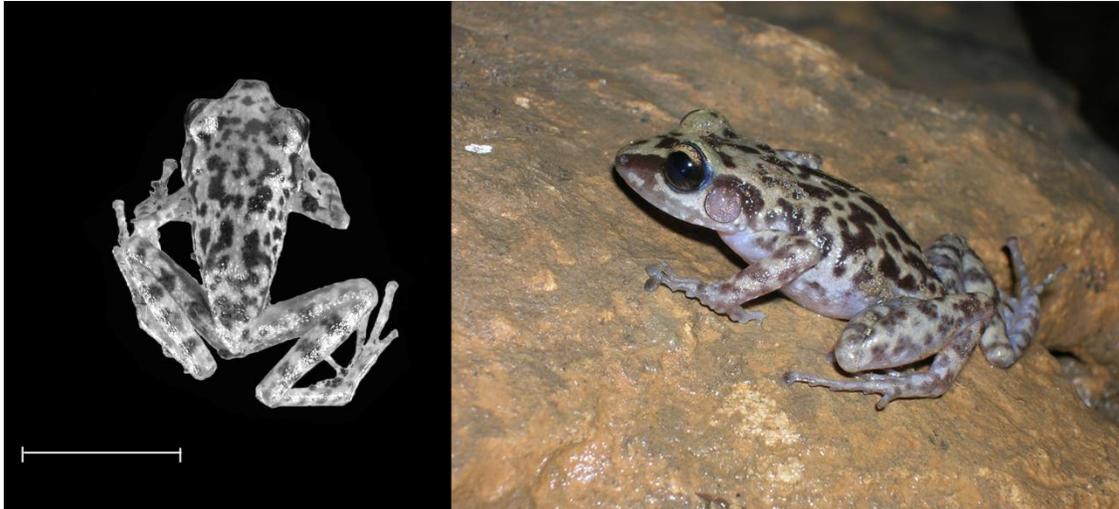


Figura 3. *Eleutherodactylus longipes*. La barra muestra la escala de 2 cm (Foto de la izquierda tomada en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM, foto de la derecha tomada de Espino del Castillo et al, 2009)

Sus caracteres taxonómicos son: terminal de falanges se expanden en forma de T, los machos miden de hocico-cloaca entre 22.1-33.2mm, y las hembras entre 26.8-39.6mm., la hendidura vocal está ausente en machos, primer dedo de las patas delanteras más corto que el segundo, la piel del dorso es más áspera, la piel del vientre es más lisa, diámetro del tímpano en machos es de 61.1-87.2% que del ojo, y en hembras es de 49.5-72.1% (Lynch, 1970).

Es un grupo Neotropical, presenta desarrollo directo. El desarrollo directo permite que la reproducción se realice fuera del agua, depositando sus huevos en la tierra, y con ello la subsecuente exploración de nuevos y diversos hábitats (Hedges, 1989). En México, hay 27 especies de anuros viven en cuevas, los cuales corresponden aproximadamente al 7% del total de las especies de anfibios del país (Reddell, 1981; Hoffmann et al., 1989). Esta especie es endémica de México, en la lista roja de la IUCN (2009) se encuentra como vulnerable y se considerara

que su población se encuentra decreciendo. Su distribución (Fig. 4) descrita para la Sierra Madre Oriental, abarca desde el centro de Nuevo León al oeste de Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro y el extremo noroeste de Hidalgo (Santos-Barrera y Canseco-Márquez, 2004). En Querétaro se le encuentra en la Cueva de los Riscos, cerca de Pinal de Amoles (Lazcano, 1986 I y II). Habita elevaciones de 650 a 2000 m y presenta una marcada tendencia a ocupar cuevas, dado que frecuentemente se les ha colectado en ellas (Taylor, 1939; Lynch, 1970). Dentro de la Cueva de los Riscos se ha encontrado durante el día en las zonas A, B, E y F, siendo más abundantes en las zonas de penumbra de dichas zonas.



Figura 4. Distribución de *Eleutherodactylus longipes*. (Modificado de Lynch, 1970)

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Con base en la afinidad y preferencia del anuro *Eleutherodactylus longipes* al ambiente de la Cueva de los Riscos; este estudio pretende, encontrar la persistencia de los ritmos circadianos, a través de la actividad locomotriz, y su capacidad de sincronizar a ciclos artificiales de luz y oscuridad. La importancia del presente estudio contribuye al conocimiento de las adaptaciones en la fisiología circadiana de esta especie troglófila, desde condiciones controladas de laboratorio

6.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el ritmo de actividad locomotriz en *Eleutherodactylus longipes*, mediante un sistema de detectores infrarrojos.
2. Evaluar la ritmicidad del ritmo de actividad mediante el análisis por periodograma.
3. Evaluar la fotosensibilidad circadiana en estas especies mediante su exposición a ciclos completos de luz y oscuridad.

7. METODO

7.1 OBTENCIÓN DE ANIMALES Y MANTENIMIENTO.

Se capturaron un total de nueve ejemplares adultos de *Eleutherodactylus longipes* sin distinción de sexo ni talla, durante colectas realizadas el 20 de diciembre del 2006 (Identificando a cada ejemplar como S₁, S₂, S₃, S₄), el 10 de marzo del 2007 (S₅, S₆, S₇ y S₈) y el 14 de marzo del 2008 (S₉). Las ranas colectadas se encontraban dentro de las zonas B y E, su captura fue manual y azarosa. Inmediatamente después de su captura, las ranas fueron colocadas en sacos de manta humedecidos con un poco de agua embotellada para mantener la humedad. Para su transporte de la Cueva al laboratorio, los sacos fueron colocados en una hielera doble, la cual consta de dos hieleras de unicel colocadas una dentro de la otra (Fig. 5), con hielo machacado entre ambas hieleras, y evitar con ésto que subiera la temperatura durante el viaje y así mantenerla junto con la humedad casi constante, y mantener a los organismos en condiciones óptimas.

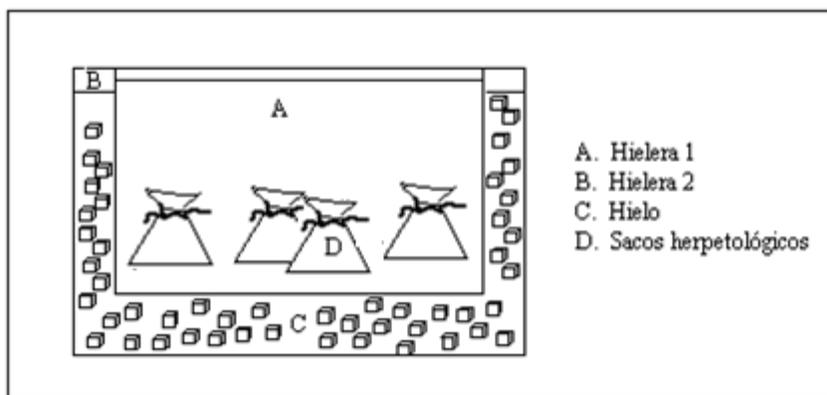


Figura 5. Hielera para transportar los ejemplares de la Cueva de los Riscos al laboratorio.

7.2 REGISTRO DE DATOS DE ACTIVIDAD.

En el laboratorio los organismos se colocaron individualmente en acuarios pequeños dentro de una cámara de ambiente controlado. Cada acuario está conectado a una serie de fotosensores infrarrojos conectados a un sistema de registro de PC. Además, cada acuario tiene una lámpara (Philips 150 lux) que suministra las condiciones de luz. Para que la luz fuese más tenue, ya que presenta una mayor intensidad de luz que la registrada en la cueva, las lámparas fueron forradas en forma de espiral con cinta de aislar. En condiciones de oscuridad se colocó un foco de luz roja, forrado con cinta de aislar de la misma forma, el cual era prendido para poder realizar las observaciones y mantenimiento de los ejemplares. El fotoperiodo se controló a través de un reloj interruptor, el cual se programó para un fotoperiodo de 12:12 (Fig. 6).

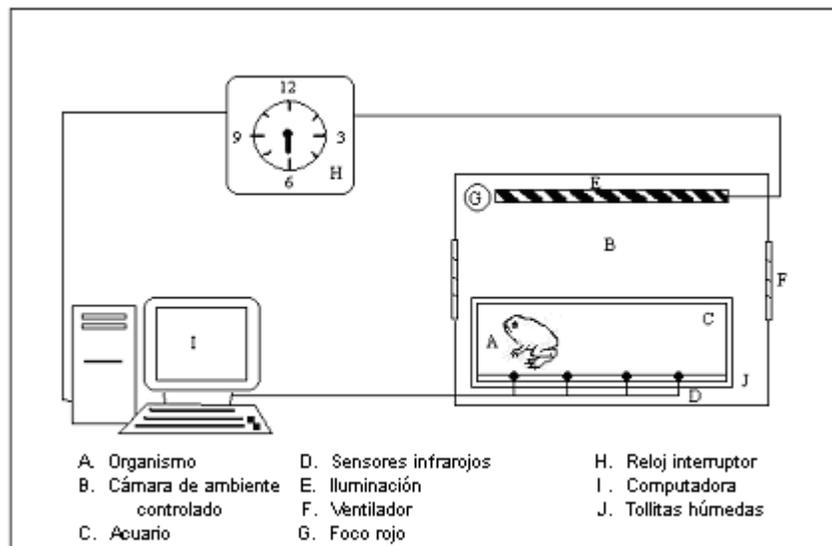


Figura 6. Dispositivo individual para tomar el registro de actividad.

Los acuarios fueron adaptados para la especie empleada, se colocó una pequeña capa de toallas absorbentes en la parte inferior del acuario, la cual era

humedecida cada vez que era necesario. Se les dio alimento de dos a tres veces por semana alternando los días y las horas para no provocar ritmicidad a este evento. Se les alimentaba principalmente con grillos, larvas de tenebrios y moscas de fruta. El mantenimiento de los acuarios se realizó de una a dos veces por semana, dándole limpieza y revisión al equipo.

7.3 PROTOCOLOS

Los datos de registro se dividieron en tres grupos (Fig. 7). Protocolo 1, correspondiente a los datos de registro del grupo de ranas colectadas el 20 de diciembre del 2006; Protocolo 2, correspondiente al registro de las ranas de la colecta del 10 de marzo del 2007; y Protocolo 3, para la rana colectada el 14 de marzo del 2008. El Protocolo 1 constó de un registro de actividad de 48 días después de la llegada de los ejemplares, iniciando el registro el 21 de diciembre del 2006 en condiciones de oscuridad continua (OO) y con una duración de nueve días. En los siguientes ocho días se continuó en condiciones de luz y oscuridad (LO) en periodos de 12:12 h. Los siguientes diez se mantuvieron en condiciones OO, los siguientes diez días en condiciones LO y los últimos once días en condiciones de OO. El Protocolo 2 constó de un registro de actividad con duración de 57 días, iniciando el registro el 12 de marzo del 2007 en condiciones de OO durante los primeros veintinueve días, los siguientes veintiocho días se mantuvieron en condiciones de LO 12:12 h. El Protocolo 3 constó un registro de actividad con duración de 37 días, iniciando el 16 de marzo del 2008 en condiciones de OO durante los primeros treinta y un días, los últimos seis días se mantuvo en condiciones de LO 12:12h.

Después de los registros, los animales fueron donados para la colección del Instituto de Biología de la UNAM.

Días	PROTOCOLOS		
	1	2	3
1			
2			
3			
4	OO		
5	OO		
6	OO		
7	OO		
8	OO		
9	OO		
10	OO		
11	LO	OO	OO
12	LO	OO	OO
13	LO	OO	OO
14	LO	OO	OO
15	LO	OO	OO
16	LO	OO	OO
17	LO	OO	OO
18	LO	OO	OO
19	LO	OO	OO
20	LO	OO	OO
21	LO	OO	OO
22	LO	OO	OO
23	LO	OO	OO
24	LO	OO	OO
25	LO	OO	OO
26	LO	OO	OO
27	LO	OO	OO
28	LO	OO	OO
29	LO	OO	OO
30	LO	OO	OO
31	LO	OO	OO
32	LO	OO	OO
33	LO	OO	OO
34	LO	OO	OO
35	LO	OO	OO
36	LO	OO	OO
37	LO	OO	OO
38	LO	OO	OO
39	LO	OO	OO
40	LO	OO	OO
41	LO	OO	OO
42	LO	OO	OO
43	LO	OO	OO
44	LO	OO	OO
45	LO	OO	OO
46	LO	OO	OO
47	LO	OO	OO
48	LO	OO	OO
49	LO	OO	OO
50	LO	OO	OO
51	LO	OO	OO
52	LO	OO	OO
53	LO	OO	OO
54	LO	OO	OO
55	LO	OO	OO
56	LO	OO	OO
57	LO	OO	OO

Figura 7. Duración de las condiciones OO y LO en cada uno de los protocolos.

7.4 ANÁLISIS DE DATOS

El programa para tomar el registro fue diseñado por la compañía NAFRI S.A. de C.V México, el cual permite capturar los datos en lenguaje ASCII. Posteriormente son procesados en el programa Excel (Microsoft Office, 2003), y analizados en el programa DISPAC para análisis de ritmos circadianos (IFC UNAM) en el cual los

resultados son analizados por los métodos de *Actograma*, *Periodograma* y el *Perfil de Actividad*. El actograma es una de las formas más comunes de representar un registro de actividad, consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficos de ocurrencia de eventos en una serie de tiempo. La técnica de doble ploteo, consiste en que a partir de una serie de datos, se agrupan los datos en subintervalos y se escalan para construir una gráfica de barras, esta gráfica se repite al lado izquierdo de la misma, pero recorrida un periodo sobre la escala de las ordenadas, ésto permite una mejor observación sobre la ritmicidad y el periodo. Para el análisis del periodo, se utiliza la técnica matemática del periodograma, ya que nos permite estimar el periodo de los componentes responsables de la periodicidad del fenómeno. Este análisis consiste en tomar una cantidad de mediciones a intervalos regulares, para ver si existe un componente armónico principal de periodo, el valor de la desviación estándar de las observaciones hechas, es un buen estimador de la función periódica durante este tiempo. Representado en la gráfica se encuentra la amplitud de los estimadores (ordenadas) contra los periodos propuestos (abscisas), el estimador de la mayor amplitud indicará que ese periodo es el componente principal de la función (Vega, 1993).

Los resultados de los periodogramas, que presentaron un valor circadiano significativo, fueron comparados entre grupos de cada protocolo con una prueba de T de student, mediante el programa STATISTICA.

8. RESULTADOS

La actividad locomotriz de las ranas del Protocolo 1 y del Protocolo 2, tuvieron registros muy semejantes, a pesar de haber tenido diferentes tiempos en las condiciones de luz y oscuridad.

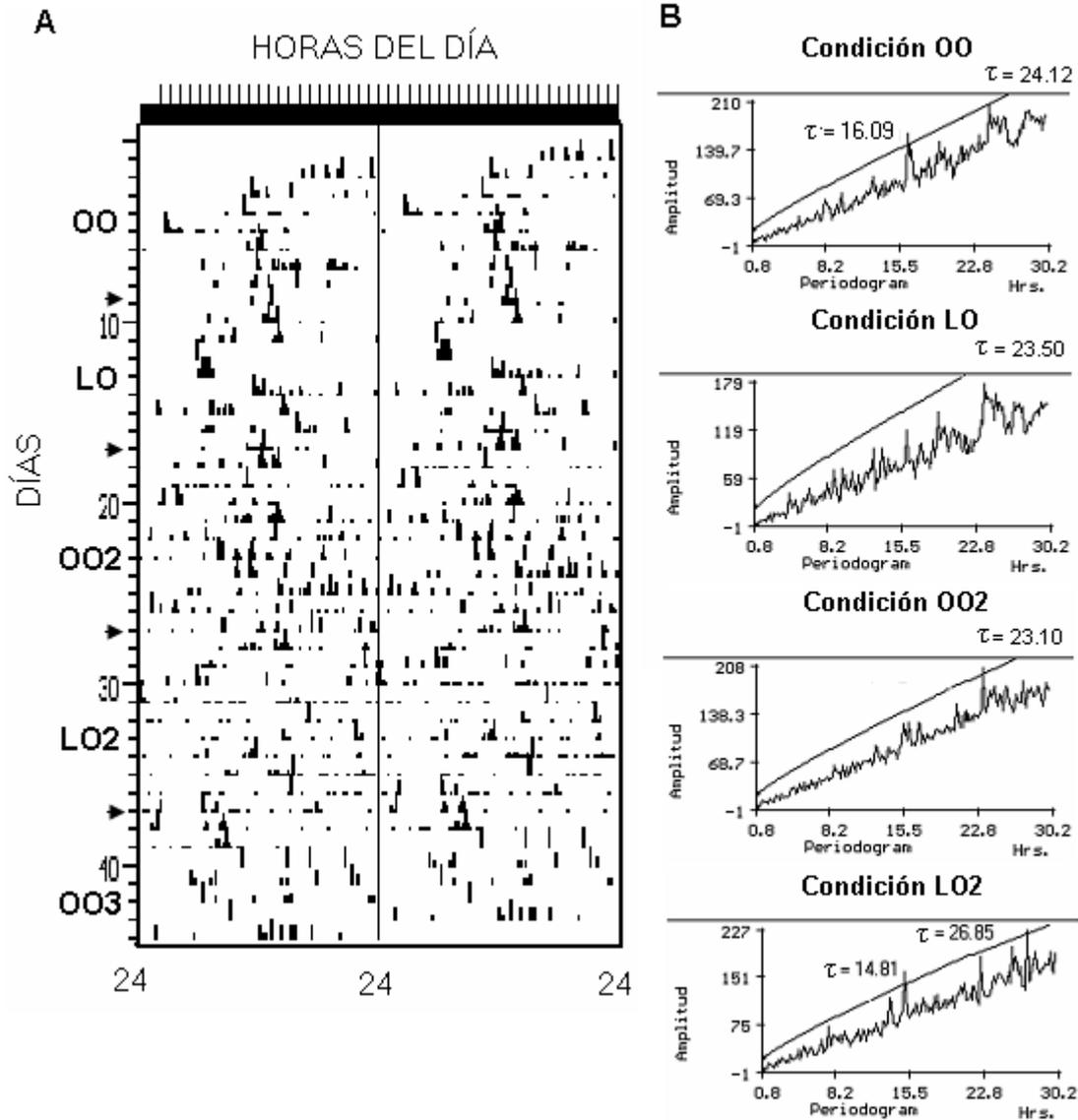


Figura 8. Registro de la rana S1 del Protocolo 1, colectada en época de lluvias. A la izquierda (A) Muestra el actograma de doble gráfica marcado con flechas en el inicio de cada condición experimental. A la derecha (B) Muestra los periodogramas correspondientes a cada condición. Cada flecha indica el inicio de una nueva condición.

En la Fig. 8 se muestra el actograma en doble gráfica, con sus respectivos periodogramas de una rana del Protocolo 1. La actividad locomotriz de la rana muestra un ritmo circadiano en libre curso durante los primeros 9 días que dura la condición de OO con periodo de $\tau=24.12$ h, y un segundo valor de $\tau= 16.09$ h, los cuales son estadísticamente significativos. En los siguientes 10 días al entrar a ciclos de LO, su actividad muestra un periodo de $\tau= 23.50$ h el cual pierde amplitud y aunque no es significativo, indica una tendencia a mantener la ritmicidad circadiana. Durante estas primeras condiciones, la actividad de la rana se mantiene en un ciclo diurno. La rana muestra valores de periodos significativos en las siguientes condiciones de fotoperiodos (OO2 $\tau= 23.10$ h, LO2 $\tau= 26.85$ h y $\tau=14.81$ h), aunque su actividad se ve fragmentada a lo largo del día.

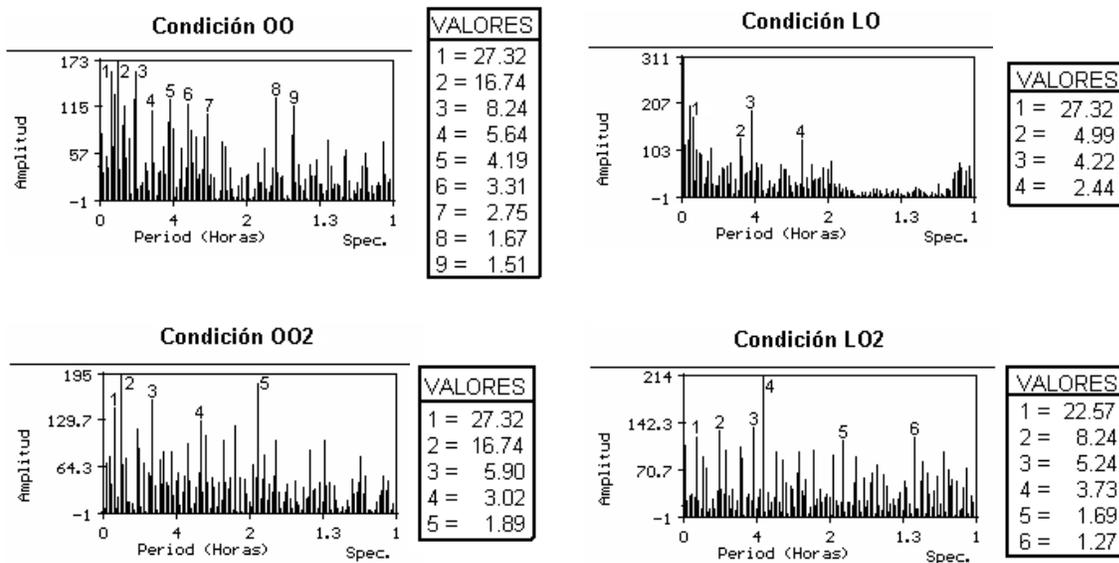


Figura 9. Análisis espectral correspondiente al registro de la rana S1 del protocolo 1.

El análisis espectral correspondiente a éste registro, y para cada condición, se muestra en la Fig. 9. Los resultados indican cómo los primeros valores de amplitud alta 27.32 h, para las tres primeras condiciones (OO, LO y OO2) y 22.57 h para la condición LO2. Para las condiciones de total oscuridad (OO y OO2) el valor de mayor amplitud es 16.74 h. Para condición de LO2, encontramos que el valor con mayor amplitud es 3.73 h.

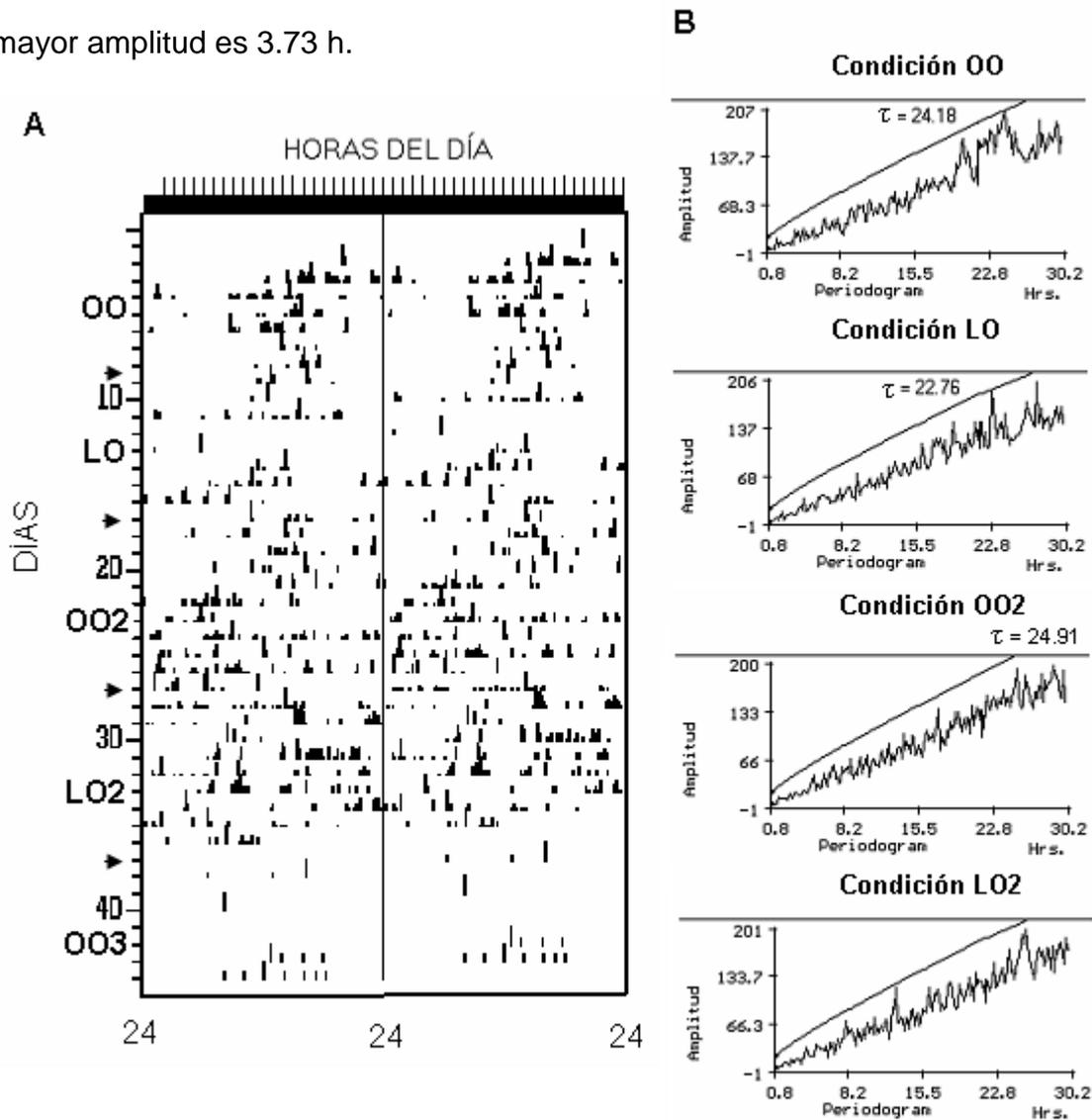


Figura 10. Registro de la rana S2 del Protocolo 1. A) Actograma en doble gráfica, señalado en el inicio de cada condición experimental (izquierda). B) Periodogramas correspondientes a cada condición del registro (derecha).

El actograma de la Fig. 10, muestra un patrón de actividad locomotriz muy semejante al de la rana S1, y presencia de un ritmo circadiano en libre curso, reflejado en un valor de $\tau = 24.18$ h significativo, durante la primer condición de OO, con actividad diurna. Para las siguientes condiciones de fotoperiodos, los valores de los periodos son estadísticamente significativos (LO $\tau = 22.76$ h y OO2 $\tau = 24.91$), con actividad durante todo el día. En la Fig. 11 se muestran los resultados del análisis espectral que corresponden a este registro, los cuales nos muestran una gran similitud entre las condiciones de completa oscuridad, con valores de mayor amplitud de 27.32 h y 22.57 h, para la condición de LO2, el valor de mayor amplitud es 8.11. Estos valores son muy parecidos a los de la rana S1.

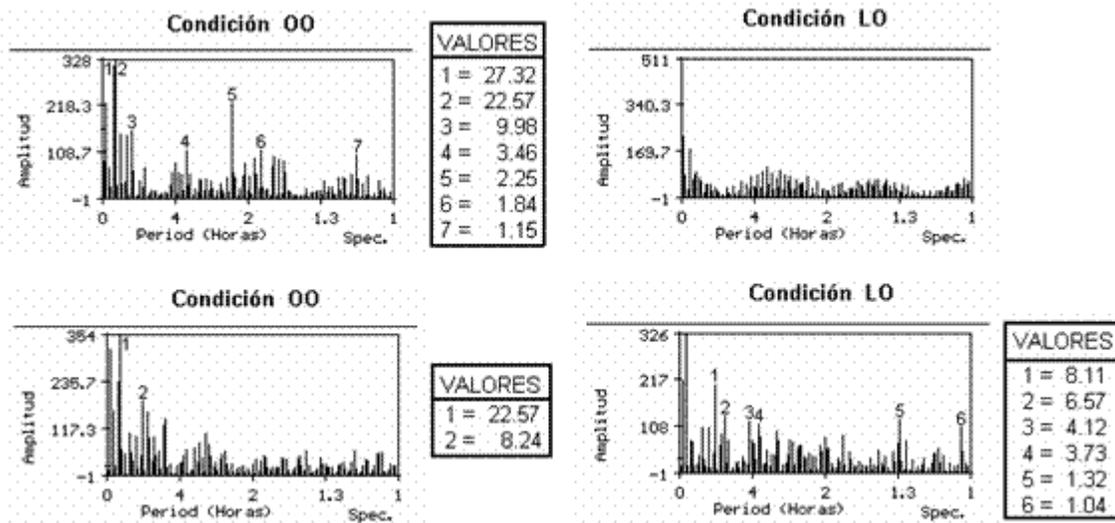


Figura 11. Análisis espectral correspondiente al registro de la rana S2 del Protocolo 1.

Las ranas del Protocolo 2, estuvieron durante 29 días en la primera condición de OO. Durante los primeros días de registro, mostraron un ciclo circadiano en su actividad locomotriz, muy semejante al mostrado en las ranas del protocolo 1.

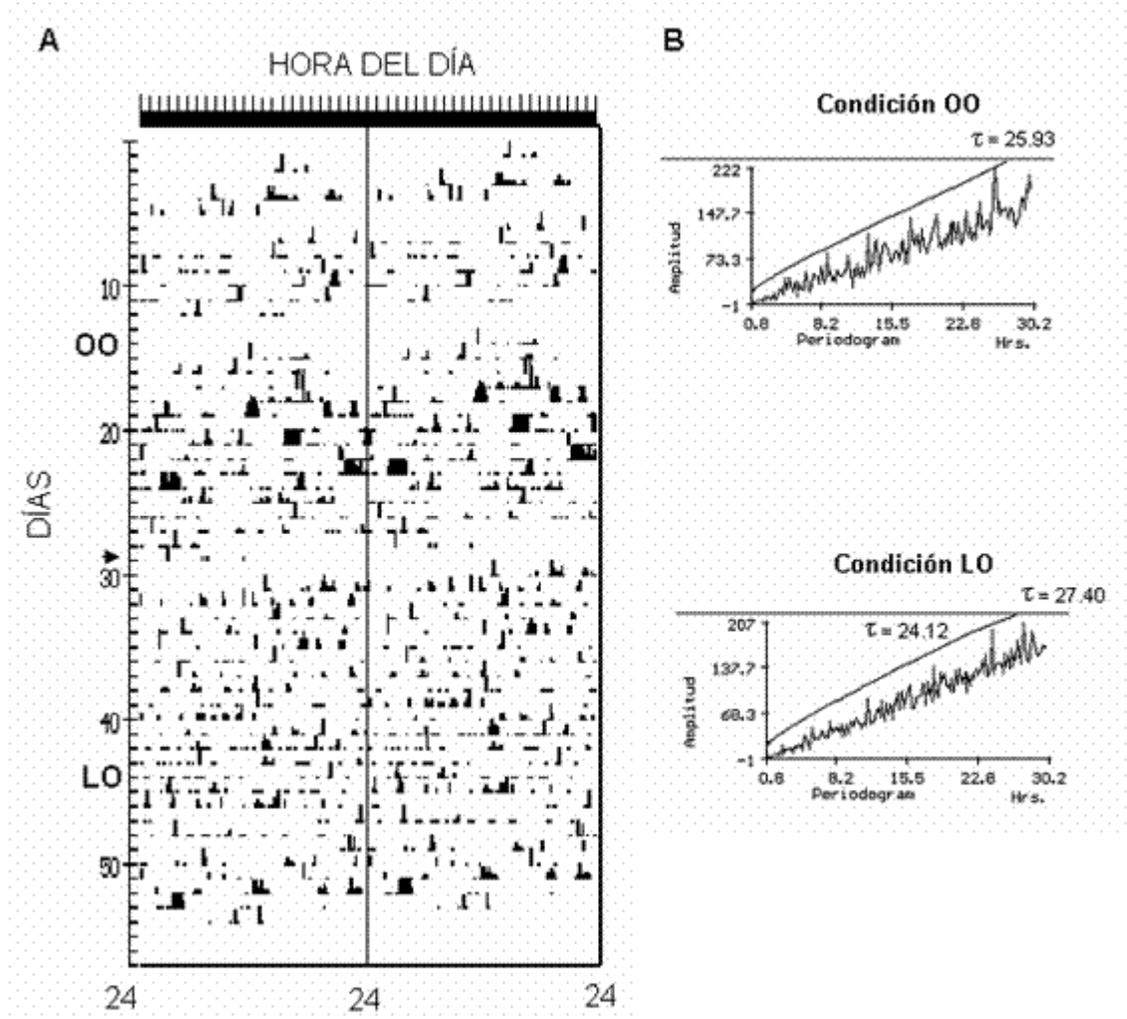


Figura 12. Registro de la rana S5 del Protocolo 2. A) Actograma en doble gráfica señalando el inicio de cada condición experimental (izquierda). B) Periodogramas correspondientes a las condiciones de fotoperiodos (derecha).

En la Fig. 12, se muestra el actograma y periodogramas de la rana S5 del Protocolo 2, colectada en época de secas, la cual muestra en su actividad locomotriz un periodo de $\tau= 25.93$ h para la condición de OO,. Para la condición de LO, el valor del periodo es de $\tau= 24.12$, y un segundo valor de $\tau= 27.40$, que no alcanzan el nivel de significancia establecido en el análisis

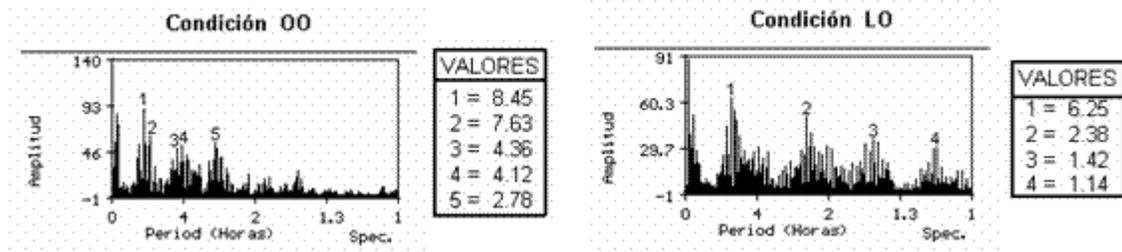


Figura 13. Análisis espectral correspondiente al registro de la rana S5 del Protocolo 2.

El análisis espectral de este registro, se muestra en la Fig. 13. Los valores de mayor amplitud en la condición de OO se encuentran entre 2.78 h y 8.45 h, por lo que la actividad locomotriz de la rana se refleja en ritmos ultradianos. Para la condición de LO, los valores fajan de amplitud y se encuentran entre 1.14 h y 6.25 h. La actividad locomotriz de la rana S6, presenta actividad circadiana con valor de periodo de $\tau= 24.23$ estadísticamente significativo en la condición de OO, mostrado en la Fig. 14. Al estar en condiciones de LO muestra un valor primario de $\tau= 28.75$ y uno secundario de $\tau= 18.47$. En el análisis espectral de dicho registro Fig. 15, encontramos para la condición de OO valores de mayor amplitud

de 27.32 h y 19.22 h, y para la condición de LO presenta el valor de amplitud alta de 6.41 h.

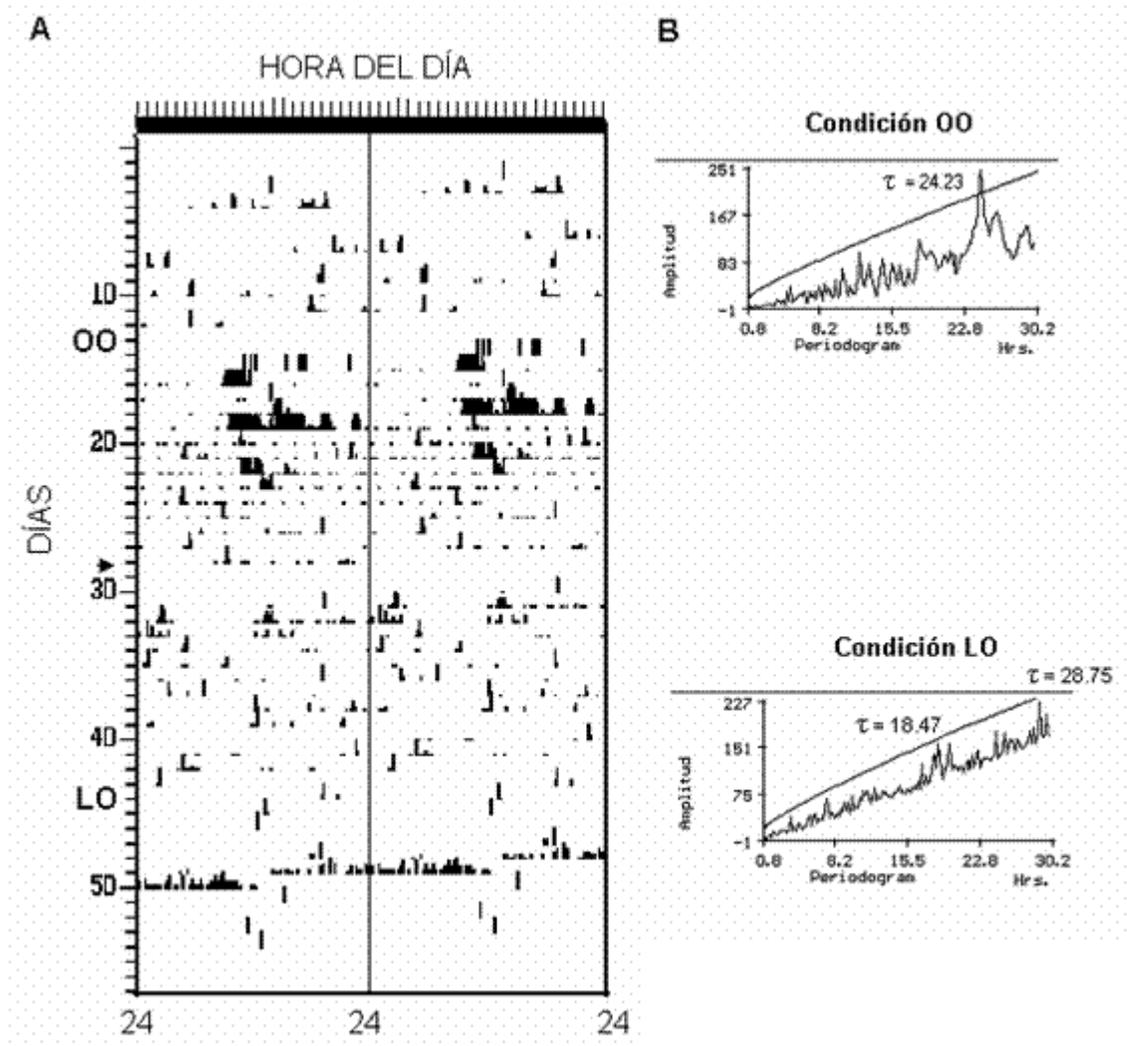


Figura 14. Registro de la rana S6 del Protocolo 2. A) Actograma en doble gráfica, señalando el inicio de las condiciones experimentales (izquierda). B) Periodogramas correspondientes a cada condición.

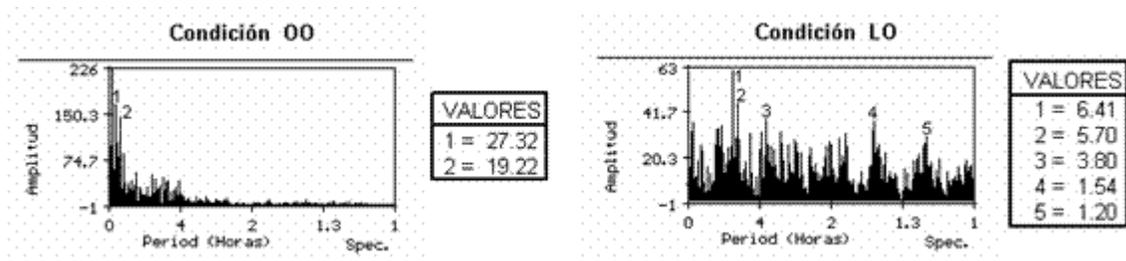


Figura 15. Análisis espectral correspondiente al registro de la rana S6 del Protocolo 2.

La Tabla 1 nos muestra los valores individuales de periodos correspondientes a cada condición experimental. Se observa de manera general, que 8 de 9 ranas mostraron ritmo de actividad circadiano, con periodo variable; sin embargo, al registrar la actividad ante ciclos LO, solamente 1 rana (S5) logra cambiar el periodo, acercándose al que presenta el sincronizador (24 h), lo que indica que sólo este organismo, tuvo una tendencia a la sincronización con los ciclos de luz-oscuridad. Las comparaciones del promedio de los periodos con al análisis de T de student, no mostraron diferencias significativas. El promedio de los periodos en OO inicial, I vs II ($23.32 \text{ h} \pm \text{DE } 0.92$, $24.85 \text{ h} \pm \text{DE } 0.76$, respectivamente), El promedio de periodos en OO VS LO ($23.26 \text{ h} \pm \text{DE } 0.79$ vs $26.14 \text{ h} \pm \text{DE } 2.17$ respectivamente).

TABLA 1.

PROTOCOLO	ORGANISMO	PERIODO (h)				
		OO	LO	OO	LO	OO
I 20-dic-06 (Final de lluvias)	rana S1	24,12	23,5	23,1	26,85	arr
	rana S2	24,18	22,76	24,91	arr	arr
	rana S3	23,1	sd	sd	sd	sd
	rana S4	21,91	sd	sd	sd	sd
II 10-mar-07 (Secas)	rana S5	25,93	24,12			
	rana S6	24,4	29,43			
	rana S7	24,23	28,75			
	rana S8	sd	sd	sd	sd	sd
14-mar.08 (Secas)	rana S9	21,46				

Tabla 1. Valores de periodo calculados por periodograma, para cada uno de los individuos estudiados en distintas condiciones: OO y LO.

Los valores de mayor amplitud de las primeras dos condiciones experimentales de OO y LO, mostrados en el análisis espectral de cada uno de los registros de los Protocolos 1 y 2, se representan en las gráficas de la Fig. 16. Para la condición de OO, los valores de mayor amplitud se encuentran con mayor frecuencia entre las 10 y 2 h, demostrando la presencia de ritmos ultradianos, los valores que se encuentran entre 30 y 16 h, aunque no tengan una mayor frecuencia, tienen una mayor amplitud (Figs. 9, 11, 13 y 15). En la condición de LO, aumenta la frecuencia de los valores de mayor amplitud entre las 4 a 1 h, y disminuye o desaparece entre las 30 y 8 h. Al estar en esta segunda condición, los ritmos ultradianos están más presentes.

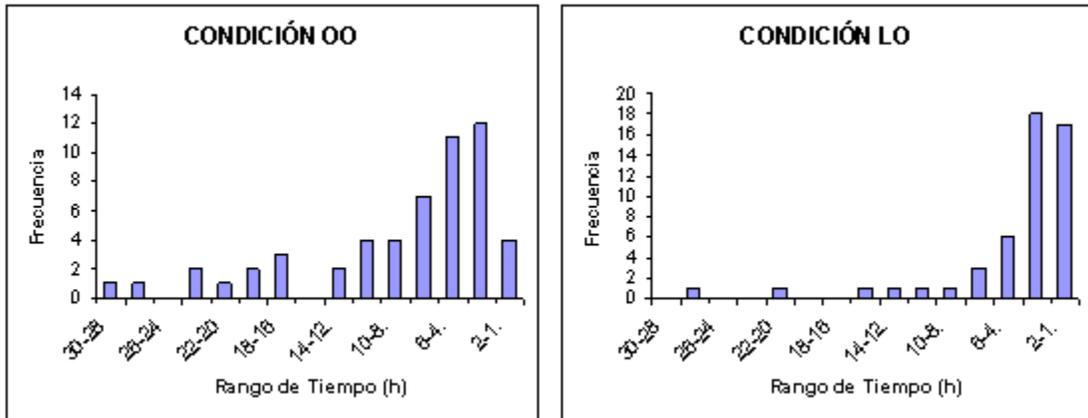


Figura 16. Histogramas que representan la frecuencia de los valores de mayor amplitud en el análisis espectral para las condiciones de OO y LO, del registro de todas las ranas.

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede decir que el ritmo de actividad locomotriz en adultos de la rana *Eleutherodactylus longipes*, es típicamente diurno. Los ejemplares estudiados mostraron actividad circadiana diurna en libre curso durante los primeros días de registro en condiciones de OO, lo que indica la existencia de un reloj circadiano funcional así como las vías de salida a sus efectores.

El ritmo de actividad registrado en el laboratorio, presenta una fase de inicio estable, lo que permitió proyectar la fase que tenían los animales antes de ser transportados al laboratorio. Para confirmar los hábitos diurnos, la exposición a la luz indica que la mayor proporción de actividad se encuentra durante la fase luminosa del ciclo de luz-oscuridad.

Sin embargo, la sensibilidad de la especie a condiciones en cautiverio indicó que las condiciones ambientales no fueron capaces de reinducir la ritmicidad ni lograr un enmascaramiento por los ciclos de luz-oscuridad. En consecuencia, se observa actividad fragmentada y dispersa sin un aparente patrón, después de aproximadamente 10 días de registro. Un factor importante que pudo provocar su arritmicidad es la intensidad luminosa de las lámparas utilizadas, ya que era mayor que la registrada en las zonas de la cueva en las que se distribuye la rana. Es posible que la intensidad de la luz induzca modelos arrítmicos en estos animales y exprese ritmos ultradianos, esto pasa en otros animales expuestos a la luz continua (Aschoff 1960).

Dentro de la Cueva de Los Riscos, las ranas se distribuyen en relación a factores ambientales tales como la humedad y luminosidad (Espino del Castillo et al, 2009), estos factores pueden ser los sincronizadores en el ambiente cavernícola.

Algunas observaciones preliminares, indican que en la zona B, donde hay una mayor abundancia de ranas, también lo hay de grillos y arañas, las cuales pueden ser las posibles presas de la especie de rana. La interacción con otras especies es un estímulo más que induce una actividad circadiana en un medio natural (Oda et al, 2000), y los experimentos realizados no incluyeron esta interacción. Cabe señalar que se han desarrollado registros de otras especies de animales, tanto arañas como peces encontrados en la misma caverna que muestran patrones de locomoción claramente circadianos. El suponer que la luz es el agente principal de sincronización para esta especie desprecia la posibilidad de que estos organismos sean más sensibles a factores no fóticos. Anteriormente se han indicado que existen ventajas sensoriales no fotosensibles en organismos cavernícolas, que pudieran representar una adaptación que les favorece la ocupación de dicho hábitat. La especie en este estudio, no presenta una completa insensibilidad retinal a la luz, de hecho, la visión parece ser indispensable para que el animal localice a su presa. En observaciones preliminares, se detectó que los animales son reactivos a la luz, sin embargo, no parecen tener preferencias fóticas en un ambiente con iluminación, sombra. Ya que el ritmo circadiano indica actividad diurna, es posible que la rana pudiera salir a alimentarse dentro de la caverna, con la poca luz que difunde desde la entrada, y de noche es posible que busque ocupar otros nichos o repose en grietas de la cueva.

El presente trabajo deja un precedente importante. La sensibilidad de la respuesta circadiana en un organismo cavernícola puede ser lábil y por lo tanto, la falta de ritmicidad observada en otras especies, es posible que se deba las condiciones de laboratorio a las que son expuestas. Finalmente, el estudio de las relaciones temporales entre organismos cavernícolas nos dará una mejor idea de las interacciones en el espacio y en el tiempo que existen en ambientes aparentemente constantes.

De igual forma, estudios sobre la organización circadiana en especies, troglobias y troglófilas, permitirá entender la organización temporal en los organismos de una comunidad tan específica como la existente en cavernas, lo que a su vez enriquecerá la comprensión de la biología de estas especies "in vivo", además de ser un antecedente importante para el desarrollo de los programas de conservación.

10. REFERENCIAS

- Aguilar R. 1993. Curso Latinoamericano de cronobiología. *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM). México.
- Andersen y Green, 2000. Symphony of Rhythms in the *Xenopus laevis* Retina. *Microscopy Research and technique*, 50: 360-372
- Aschoff J. 1960. Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1960 25: 11-28
- Baird S.F. 1859, Reptiles of the Boundary, in United States and Mexican Boundary Survey under the Order of Lieut. Col. W. H. Emory, Major First Cavalry, and United States Commissioner. 2, Rept., Pt. 2. Department of the Interior, Washington, 35 pp
- Barr, T.C. 1968. Cave Ecology and the Evolution of Troglodites. *Evolutionary Biology* 2: 35-102.
- Cruz Jr, Francisco. Stephen J. Burns, Ivo Karmann, Warren D. Sharp, Mathias Vuille y José A. Ferrari. 2006. A Stalagmite Record of Changes in Atmospheric Circulation and Soil Processes in the Brazilian Subtropics During the Late. *Quaternary Science Review*, 25: 2749-2761.
- Christiansen, K. A. 1982. Zoogeography of Cave Collembolan East of the Great Plains, *Bulletin of the National Speleological Society*. 44: 32-41.
- De Coursey P. 2004. Overview of Biological Timing from Unicells to Humans. *Chronobiology, Biological timekeeping*. Sinauer. Jay C. Dunlap, Jennifer J. Loros. Sunderland Mass. USA. 402 pp.
- De La O-Martínez, A., M. A. Verde, R. L. Valadez, J. A. Viccon-Pale y B. Fuentes-Pardo 2004. About the Existence of Circadian Activity in Cave Crayfish. *Biological Rhythm Research* 35(3): 195-204.
- Espinasa, Luis y Richard Borowsky. Eyed Cave Fish in a Karst Window. *Journal of Cave and Karst Studies* 62(3): 180-183. 2000
- Espino Del Castillo, A. Castaño, Dávila, Morales-Malacara, Miranda y Paredes. 2009 (en publicación), Seasonal Distribution and Circadian Activity in the Troglophile Long-footed Robber Frog, *Eleutherodactylus longipes* (Anura: Brachycephalidae) at Los Riscos Cave, Querétaro, México: Field and Laboratory Studies. *Journal of Cave and Karst Studies*, 71(1): 24-31.

- Galan, Carlos y Francisco F. Herrera. 1998. Fauna Cavernícola: Ambiente, Especiación y Evolución. *Bol. Soc. Venezolana Espeleol.* 32: 13-43.
- Gruart, Agnes, José María Delgado, Carolina Escobar y Raúl Aguilar Roblero. 2002. Los Relojes que Gobiernan la Vida. *La Ciencia para Todos*. Fondo de Cultura Económica. México. 197 pp.
- Halberg F, 1960. Temporal Coordination of Physiological Function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25: 289-310
- Hedges, S. B., 1989. Evolution and Biogeography of West Indian Frogs of the Genus *Eleutherodactylus*: Slow Evolving Loci and the Mayor Groups. *Sandhill Crane Press Inc.* Gamsville. Florida. 305-319.
- Hoenen, S., 2005. Circadian Patterns in the Activity of the Brazilian Cave Cricket *Strinatia brevipennis* (Ensifera Phalangopsidae). *European Journal of Entomology.* 102(4): 663-668.
- Hoenen, S., Schimmel M. y Marques M. D. 2001. Rescuing Rhythms from Noise: A New Method of Analysis. *Biological Rhythm Research.* 32(2): 271-284.
- Hoffmann, A., Morales-Malacara, J. y Palacios-Vargas, J. 1989. *Manual de Bioespeleología*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.
- IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2009.2. En línea en: <www.iucnredlist.org>.
- Lazcano Sahagún, Carlos. 1986. *Las Cavernas de la Sierra Gorda*. Tomo I. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 180 pp.
- Lazcano Sahagún, Carlos. 1986. *Las Cavernas de la Sierra Gorda*. Tomo II. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 205 pp.
- Lynch, J. 1970. A Taxonomic Revision of the Leptodactylid Frog Genus *Syrhophus* Cope. *University of Kansas, Natural History Museum.* 20(1): 1-45.
- Lynch, J. y Duellman, W. 1997. Frogs of the Genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in Western Ecuador: Systematics, Ecology and Biogeography. *University of Kansas, Natural History Museum*. Publicación Especial No. 23. Kansas.
- Morales- Malacara, J. y Vázquez, I. 1986. *Bioespeleología de Algunas Cuevas del Estado de Querétaro*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. 139 pp.

- Oda, G. A., Caldas I. L., Piqueira J.R.C., Waterhouse J. M., y Marques M. D. 2000. Coupled Biological Oscillators in Cave Insects. *Journal of Theoretical Biology*. 206(4): 515-524.
- Page T 2000. Circadian systems of invertebrates. En Handbook of behavioral neurobiology, Vol 12. Circadian Clocks. Takahashi, Turek and Moore Eds. Kluwe Academic, Plenum Press, New York, 770pp.
- Pittendrigh C, 1960. Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 25: 159-184
- Reddell, J. R. 1981. A Review of the Cavernicole Fauna of Mexico, Guatemala and Belize. *Bulletin of the Texas Memorial Museum*. 27: 327 pp.
- Santos-Barrera, G. y Canseco-Márquez, L. 2004. *Eleutherodactylus longipes*, *Global Amphibian Assessment*. IUCN Conservation International and Nature Serve.
- Taylor, E. 1939. New Species of Mexican Anura. Science Bulletin, The University of Kansas. 26 (11): 385-401.
- Trajanó E., Menna-Barreto L. 2000. Locomotor Activity Rhythms in Cave Catfishes, Genus *Taunayia*, from Eastern Brazil (Teleostei: Siluriformes: Heptapterinae). *Biological Rhythm Research* 31(4): 469-480.
- Trajanó E., Duarte L., Menna-Barreto L. 2005. Locomotor Activity Rhythms in Cave Fishes from Chapada Diamantina, Northeastern Brazil (Teleostei: Siluriformes). *Biological Rhythm Research* 35(3): 195-204.
- Underwood H, 2000. *Circadian organization in non mammalian vertebrates*. En *Handbook of behavioral neurobiology, Vol 12. Circadian Clocks*. Takahashi, Turek and Moore Eds. Kluwe Academic, Plenum Press, New York, 770pp
- Vega, A. 1993. Análisis estadístico en Cronobiología. *Psiquis*. 2:139-149.