



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFECTO SUBLETAL DEL AMONIO
SOBRE EL RITMO CIRCAMAREAL DE
LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN
CANGREJOS VIOLINISTAS ADULTOS
Uca princeps (Crustacea, Decapoda)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
EUGENIO MARTÍN AZPEITIA ESPINOSA**

TUTOR

Dr. Manuel Miranda Anaya

Cotutora Dra Ruth Cecilia Vanegas Pérez

2007





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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Efecto subletal del amonio sobre el ritmo circamareal de la actividad locomotora en cangrejos violinistas adultos, *Uca princeps*, (Crustacea, Decapoda)”

realizado por **Azpeitia Espinosa Eugenio Martín**, con número de cuenta **098195037** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Co-Tutora Propietario	Dra.	Ruth Cecilia Vanegas Pérez	
Propietario	Dr.	René de Jesús Cárdenas Vázquez	
Tutor(a) Propietario	Dr.	Manuel Miranda Anaya	
Suplente	Dr.	Baltazar Barrera Mera	
Suplente	M. en C.	Enrique Moreno Sáenz	

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 1o. de agosto del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Agradecimientos

A mi tutora Cecilia Vanegas por todo el apoyo que me brindó a lo largo de todo el proyecto, por su comprensión a lo largo de los momentos difíciles, por el cariño, compromiso, dedicación, paciencia y confianza que brinda en cada momento.

A mi tutor Manuel Miranda por el apoyo, por las facilidades brindadas para que la tesis saliera adelante, por su disposición a lo largo del trabajo, por sus observaciones y sus comentarios.

A los integrantes del jurado Enrique (en especial), René y Baltazar por su apoyo dentro y fuera de la investigación y por sus observaciones.

A mi mamá... gracias, mil gracias, me has enseñado y compartido tantas cosas, sin ti y tu continua incentivo me hubiese costado mucho más.

A la carnalita, a Juan y a mi papá (descansa en paz), a Locha, a Antonio, a María y a toda la familia que ha estado pendiente y apoyándome incondicionalmente a lo largo del proyecto y de mi vida.

A la gente que me apoyo de diversas formas en este proyecto Ma. Luisa Arias, Sis, Sebastián, Ceci R., Shere, Luz, Susana, Ara, Karla, Miguel B., Diana C., Manuel, León y Pilar.

A Agustín, Yeni, Dora y todo el personal del bioterio.

A la gente de la Unidad de Análisis Ambiental de la facultad.

A todos mis amigos dentro y fuera de la facultad por soportarme tanto tiempo y yo tan encajoso.

A Josefina R. mi maestra y amiga.

A mi gatito que tanto quise.

A mi papá



INDICE

Página

Resumen

1. Introducción	1
1.1. Los ritmos biológicos	1
1.1.1. Endogeneidad y libre curso	2
1.1.2. Compensación de la temperatura	2
1.1.3. Sincronización	3
1.2. Ritmos circamareales	4
1.2.1. Naturaleza geofísica de las mareas	4
1.2.2. Naturaleza de los ritmos circamareales	4
1.3. Organización del sistema circadiano en crustáceos	6
1.4. Zona intermareal	8
1.5. El amonio	10
1.5.1. Efecto tóxico del amonio en los crustáceos	11
1.5.2. Efecto neurotóxico del amonio	12
1.6. Biología de <i>Uca princeps</i>	14
2. Planteamiento del problema	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	17
4.1. Objetivo general	17
4.2. Objetivos particulares	17
5. Materiales y métodos	18
5.1. Obtención y mantenimiento de los animales	18
5.1.1. Prueba de toxicidad aguda. Determinación de la CL 50-24 h	18

5.1.2. Registros de actividad locomotora	19
5.1.2.1. Efecto del periodo de aclimatación sobre la actividad locomotora	19
5.1.2.2. Efecto subletal del amonio sobre la actividad locomotora	20
6. Resultados	26
6.1. Prueba de toxicidad aguda. Concentración letal media (CL ₅₀ -24h)	26
6.2. Registros de actividad locomotora	29
6.2.1. Efecto del tiempo de aclimatación en el ritmo circamareal y circadiano de la actividad locomotora de <i>Uca princeps</i>	28
6.2.2. Efecto de la exposición crónica al amonio sobre la actividad locomotora de <i>Uca princeps</i> .	30
6.2.2.1. Grupo testigo	30
6.2.2.2. Grupo expuesto a 3.5 mg N-AT/L (0.2 mg NH ₃ /L)	32
6.2.2.3. Grupo expuesto a 18mg N-AT/L (0.9mg NH ₃ /L)	34
6.2.2.4. Efecto del amonio en los niveles de actividad	36
6.2.2.5. Efecto del amonio sobre la sincronización a los ciclos artificiales de luz y mareas	37
6.2.2.6. Efecto del amonio sobre la relación de fase entre el ciclo de mareas y el inicio de actividad.	37
7. Discusión	39
8. Conclusiones	45
9. Consideraciones	46
10. Glosario	47
11. Referencias	48

Resumen

Los ritmos biológicos permiten a los organismos medir el tiempo para anticipar las distintas variables cíclicas de las condiciones ambientales, como lo son el día y la noche en el transcurso de una jornada o la bajamar y pleamar en las zonas intermareales. El cangrejo intermareal *Uca princeps* se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, donde la actividad humana ha ocasionado un incremento en las concentraciones ambientales del amonio en el hábitat de la especie, lo que involucra un probable impacto adverso tanto en las poblaciones del cangrejo violinista como en el equilibrio de estos ecosistemas costeros. En el presente estudio, se evaluó el efecto subletal del amonio sobre las características del ritmo circamareal de la actividad locomotora de *Uca princeps*. A partir de la determinación de la concentración letal media del amonio en bioensayos de exposición de 24h a (CL₅₀-24hrs) y de las concentraciones de amonio detectadas en el medio natural, se eligieron las concentraciones subletales utilizadas en los ensayos experimentales. Los cangrejos empleados fueron capturados en el Estero de Urias, Mazatlán, México y mantenidos tanto en el laboratorio como en los registros de actividad en agua de mar artificial a 25±1 °C, 35±1 ups, 8.2±0.05 pH y 5.2±0.2 mg OD/L. El estudio se realizó en tres fases. En la primera fase, se determinó la CL₅₀-24hrs del amonio en *Uca princeps*. En la segunda etapa, se registró la actividad locomotora de los cangrejos bajo condiciones constantes (fotoperiodo OO; oscuridad constante y sin mareas) y con distintos tiempos de aclimatación (0, 15 y 30 días), en organismos sin exposición al amonio. En la tercera fase, se evaluó el efecto subletal de la exposición al amonio (0, 3.5 y 18 mg N-AT/L) sobre la actividad de los organismos registrados bajo un fotoperiodo LO de 12:12 y un patrón de mareas similar al de su medio natural.

El bioensayo de la toxicidad aguda al amonio, demostró que *Uca princeps* es más sensible que otras especies de cangrejos de regiones templadas y subtropicales (CL₅₀-24 h = 186.017mg N-AT/L). A la vez, se corroboró la endogeneidad de la ritmicidad de la actividad locomotora de *Uca princeps*, la cual se mantuvo hasta los 15 días de mantenimiento bajo condiciones de laboratorio. La exposición subletal al amonio, modificó las características de la ritmicidad de la actividad en los cangrejos. El grupo testigo presentó un ritmo circamareal de actividad locomotora, con el inicio de actividad y la mayor actividad durante la marea baja sin respuesta al fotoperiodo. Los grupos expuestos a concentraciones subletales de amonio cambiaron su inicio de actividad a la marea alta y presentaron un incremento en la intensidad y duración de la actividad. Estas respuestas pueden obedecer a un efecto neurotóxico del amonio, a una conducta de escape o a una combinación de ambas. Además, en los grupos expuestos al compuesto nitrogenado se observó una coordinación relativa entre los dos sincronizadores (fotoperiodo y mareas) lo cual puede ser un comportamiento normal, un cambio en la sensibilidad a los sincronizadores o a un efecto similar al splitting.

La presente investigación permite concluir que en *U. princeps* su ritmo circamareal es verdadero y que el amonio tiene un efecto tanto cuantitativo como cualitativo en la relación de fase y en la intensidad y duración de la actividad, alteraciones que sugieren un efecto neurotóxico del amonio o una conducta de escape. La sensibilidad de la especie al amonio la ubica como un buen candidato como bio-indicador al efecto adverso a este compuesto nitrogenado.

1. Introducción

1.1. Los ritmos biológicos

La cronobiología ha tratado de encontrar las vías por las cuales los organismos miden el tiempo y cuáles son las implicaciones de esta cronometría. Todos los seres vivos se ven afectados por los cambios ambientales, ya sean cambios diarios, estacionales o momentáneos; muchos de estos cambios son cíclicos, por lo cual el poder medirlos e inclusive anticiparlos, confiere a los organismos ventajas adaptativas. Esta capacidad permite anticipar cualquier condición adversa o favorable del ambiente y modificar las características necesarias para enfrentarlas o aprovecharlas. Por ejemplo, en un nicho, los distintos factores ambientales presentan variaciones temporales, como el alimento (disponibilidad, cantidad, tipo, calidad, etc.) o el clima, que cambian a lo largo de un día o del año, por lo que la capacidad de los organismos de medir el tiempo desempeña un papel adaptativo y ecológico importante, (Brady, 1979; DeCoursey, 2004b).

Los ritmos biológicos son la forma en que todos los organismos miden el tiempo, los cuales se observan tanto en procariontes como en eucariontes. Los ritmos biológicos se pueden clasificar de la siguiente forma con base en su frecuencia:

- a) Ultradianos. Son ritmos con un periodo menor a 20 horas; dentro de estos se encuentran los ritmos circamareales, el ritmo cardiaco, etc.
- b) Circadianos. Incluyen a aquellos ritmos con un periodo entre las 20 y 30 h, como el ritmo diario de actividad, el de temperatura y el de sueño-vigilia, entre otros.
- c) Infradianos. Son ritmos con una duración mayor a 30 horas, como los ritmos circalunares y los circanuales, (Hirschie et al, 2004; DeCoursey, 2004a).

El valor del periodo del ritmo, generalmente se encuentra relacionado con distintos ciclos geofísicos, como el ciclo de la noche y el día, las mareas, estaciones del año, cambios en las fases lunares, etc. Los ritmos circadianos son los más estudiados hasta el momento y para poder considerarlos como tal, deben de cumplir con las siguientes características básicas indispensables (DeCoursey, 2004a).

- a) Endogeneidad; lo que significa que son generados genéticamente y aun cuando las condiciones en las que se encuentre un organismo fueran constantes, o estuvieran

aislados de señales temporales relevantes, el ritmo se presentaría de forma espontánea.

- b) Son capaces de compensar la temperatura. es decir, los cambios ambientales de temperatura afectan poco o nada al periodo del ritmo.
- c) Se pueden sincronizar a los ciclos ambientales, siendo el sincronizador por excelencia el ciclo luz-oscuridad.

1.1.1. Endogeneidad y Libre curso

Los organismos que presentan un ritmo biológico que cumpla con los requerimientos básicos de endogeneidad, deben mostrarlo aun en ausencia de ciclos ambientales. El ritmo es generado por un sistema oscilador, también mencionado como reloj biológico. El ritmo presenta un periodo cercano a la duración del ciclo ambiental al cual se sincroniza, ya sea el día, las mareas, las estaciones del año o cualquier otro. La connotación de esta oscilación espontánea se conoce como libre curso (o free running, en inglés). Este libre curso da un indicio importante de la endogeneidad del ritmo. El valor del periodo del ritmo biológico en libre curso, puede variar dependiendo de las condiciones experimentales en que se encuentre el organismo. El Dr. Jürgen Aschoff (1960) descubrió que el periodo de los ritmos circadianos varía en función de la intensidad de la luz; observó que al incrementar la intensidad lumínica a un organismo de actividad diurna, la duración de su periodo en libre curso disminuye, en tanto que se incrementa la duración del periodo en organismos nocturnos. Lo anterior se conoce como la regla de Aschoff (revisado en Brady, 1979; Hirschie et al, 2004). La duración del periodo del ritmo en libre curso, depende de las condiciones ambientales de las cuales proviene el organismo; ello significa que en un mismo individuo puede variar el periodo de su ritmo si proviene de una condición luz-oscuridad (LO) 12:12 o una LO 8:16, es decir, 12 horas de luz y 12 de oscuridad, u 8 de luz y 16 de oscuridad respectivamente (Hirschie et al, 2004).

1.1.2. Compensación de la temperatura.

Los ritmos circadianos compensan los cambios de temperatura, lo que implica que los cambios ambientales de temperatura afectan poco al periodo del ritmo. Inclusive se han encontrado ritmos con un Q_{10} de 1, lo cual involucra que al aumentar 10 grados la

temperatura del ambiente, la duración del periodo del ritmo a cada una de las dos temperaturas es similar, aspecto poco comprendido si se considera que todos los procesos enzimáticos y el metabolismo aumentan su velocidad al subir la temperatura (Hirschie et al, 2004). Cabe destacar que se desconoce si los ritmos biológicos no circadianos se apegan estrechamente a esta característica.

1.1.3. Sincronización.

Los agentes sincronizadores son aquellas señales ambientales capaces de igualar el periodo del ritmo biológico al del ciclo ambiental con una relación de fase estable entre ambos. El agente sincronizador por excelencia, no solamente para ritmos circadianos, sino para cualquier ritmo biológico, es el ciclo de luz y oscuridad, dado por la proporción de horas de luz (L) y de oscuridad (O) en un día, conocido como fotoperiodo. No obstante, se ha encontrado que los agentes sincronizadores son diversos, como lo puede ser la temperatura, la actividad social, las mareas y la alimentación, entre los más destacados. Para que se demuestre que una señal es un verdadero agente sincronizador, se deben cumplir dos aspectos: por un lado, el periodo del ritmo en libre curso debe igualar al del agente sincronizador con una relación de fase constante; por otra parte, al regresar al organismo a condiciones de libre curso, el ritmo debe continuar con sus fases en los momentos determinados por el sincronizador (aun en su ausencia). Si el segundo aspecto no se cumple, y el ritmo en libre curso presenta las fases en un momento distinto, se presenta un enmascaramiento y la señal no se considera como un verdadero sincronizador (Brady, 1979; Hirschie et al, 2004). Se han propuesto dos modelos sobre cómo funciona un sincronizador en los ritmos circadianos. El modelo continuo sugiere que la velocidad angular de los cambios en el mecanismo del reloj están determinados por la intensidad lumínica durante toda la fase luminosa del ciclo, mientras que el modelo discreto sugiere que los cambios que presenta el mecanismo de reloj están dados por la simple percepción de luz durante las transiciones entre la luz y la oscuridad, suficiente como para atrasar o adelantar el reloj para igualar la duración del ritmo biológico al ciclo ambiental (Brady, 1979; Hirschie et al, 2004).

Los ritmos biológicos en general presentan límites de sincronización, esto es, solo son capaces de sincronizar con algún agente hasta cierta duración del periodo (Hirschie et al, 2004).

La sensibilidad de un oscilador circadiano a un agente sincronizador no es siempre la misma. Es posible que un sincronizador, débil en intensidad tenga efecto sólo en algunas fases del ciclo y en otras no. Pese a que el sincronizador se presenta de forma cíclica, el ritmo circadiano del organismo pareciera en ocasiones sincronizarse y en otras ser indiferente a la presencia del sincronizador. A este fenómeno se le ha denominado coordinación relativa (More-Ede et al, 1982).

1.2. Ritmos circamareales

1.2.1. Naturaleza geofísica de las mareas

Los ritmos circamareales son ritmos con un periodo cada 12.4h, donde cada ciclo parece estar determinado por la gravedad lunar que atrae el agua de los océanos al girar alrededor de la tierra. Si la luna se encuentra en el ecuador, lo cual ocurre 2 veces al mes, el tamaño de las mareas no varia, por lo cual realmente en ese momento no hay una marea alta o baja real, pero, si la luna se encuentra en otro lugar las mareas varían entre si. Además la gravedad solar causa un efecto extra, pues cuando la luna, tierra y sol se encuentran en una misma línea (lo cual sucede dos veces al mes, luna llena y luna nueva), la intensidad de las mareas es aún mayor, y cuando la luna, tierra y sol forman un ángulo de 90° las mareas disminuyen en intensidad (Stillman y Barnwell, 2004).

1.2.2. Naturaleza de los ritmos circamareales

Los crustáceos han invadido exitosamente todo tipo de hábitats, desde marinos, estuarinos, dulceacuícolas y terrestres. Particularmente en los ambientes intermareales, los organismos experimentan amplias fluctuaciones de las variables ambientales relacionadas con los cambios de marea. Los crustáceos que habitan estas zonas han desarrollado la capacidad de expresar ritmos circamareales. Cabe mencionar que los crustáceos no son los únicos organismos capaces de expresar ritmos circamareales y que los crustáceos son capaces de generar distintos tipos de ritmos biológicos (circadianos,

circanuales, ultradianos), los cuales se observan en distintas respuestas biológicas como el cambio de coloración (ritmo circadiano), el ritmo de reproducción (ritmo circanual) o el de actividad (ritmo ultradiano o circadiano; (DeCoursey, 2004c).

Se han propuesto dos teorías para explicar cómo se generan los ritmos circamareales:

a) Teoría del reloj-circalunar, formulada en 1986 por John D. Palmer, explica que los ritmos circamareales son controlados por dos relojes lunares, cada uno con un periodo de 24.8 h, los cuales están acoplados con un desfase de 180°; al encontrarse cada reloj en antifase, se produce la apariencia de un ritmo bimodal con un pico cada 12.4 h. Son tres las evidencias que soportan esta hipótesis:

- 1) En el laboratorio cada pico de actividad se ve afectado de forma distinta por la luz.
- 2) Un pico de actividad puede desaparecer y puede o no reaparecer
- 3) Un pico de actividad se puede fragmentar mientras que el otro continúa normal, dando con todo esto la idea de que cada pico asociado con una marea funciona de forma independiente (Palmer 1997; Williams, 1998).

b) Teoría del reloj circamareal/circadiano, propuesta por Ernest Naylor en 1958, quien se basó en sus estudios sobre el cangrejo *Carcinus maenas*. En esta teoría se explica la presencia de los ritmos circamareales debido a la interacción entre un ritmo circamareal verdadero, el cual produce un ritmo de 12.4 h, y un ritmo circadiano controlado por el ciclo luz-oscuridad, el cual determina la intensidad de cada pico dependiendo de la relación de fase que forme con el ciclo de luz-oscuridad (Naylor 1958; Palmer, 1997; Williams 1998). Naylor comenzó sus estudios con este cangrejo hace varias décadas, primero observando el ritmo locomotor, el cual presentaba un ritmo circamareal con mayor actividad por las noches, ya fuera este en condiciones sin mareas, en un ambiente simplemente con humedad o con el organismo inmerso continuamente (Naylor, 1958); posteriormente observó el ritmo locomotor en condiciones sin mareas y notó que, bajo luz constante, el cangrejo presentaba un ritmo bimodal con un pico mayor en la noche, con un retraso diario de 50 minutos. Al estudiar al cangrejo en condiciones de luz-oscuridad, el ritmo de éste se sincronizó con el fotoperiodo, mientras que al mantener al cangrejo varias semanas bajo condiciones sin mareas se presentó el ritmo circamareal

endógeno (Naylor, 1960). Naylor también analizó el efecto de la temperatura en el ritmo de actividad locomotora de *Carcinus*, y observó que bajo un intervalo de temperatura entre los 10 y los 25° el ritmo se veía poco afectado, pero que con temperaturas bajas, menores a los 10°, se provocan cambios en la estructura del ritmo, observados como retrasos de fase (Naylor, 1963).

El debate sobre cual es la propuesta más adecuada para explicar como se controlan los ritmos circamareales, debido a los distintos resultados obtenidos, ha sido abordado por diversos autores. Williams (1998) observó la falta de ritmicidad circadiana en dos invertebrados intermareales, no obstante, concluye que ninguna de las dos teorías es capaz de explicar todos los ritmos circamareales estudiados, punto en el cual concuerda con Aldrich (1997).

En el género *Uca*, diversos autores han abordado el estudio de su ritmicidad. Bennet (1957) observó el ritmo de la actividad locomotora circamareal de *U. pugnax*. Palmer (1989) reportó la ritmicidad circalunar de *U. minuca*. Por otro lado, Thurman (1998) y Thurman *et al.* (2001) estudiaron el ritmo locomotor de *U. subcylindrica* en condiciones de luz artificial y oscuridad constante. En un estudio de relevancia fue realizado por Stillman y Barnwell (2004) en *U. princeps* donde se registró la actividad locomotora circamareal en individuos de distintas poblaciones, los resultados señalan que las características del ritmo son distintas entre los individuos de cada población, y que estas diferencias están dadas por el patrón y el comportamiento de las mareas de cada localidad.

1.3. Organización del sistema circadiano en crustáceos

Los primeros estudios realizados enfocados a ubicar los marcapasos que controlan la ritmicidad circádica y circamareal en los crustáceos, señalan a los pedúnculos oculares como los responsables del control del ritmo de la actividad locomotora, y se ha propuesto que el sistema circadiano esta conformado por un marcapasos, ubicado en el pedúnculo óptico u ocular. El pedúnculo óptico contiene una gran porción del protocerebro, donde se encuentra al órgano "X", encargado de sintetizar y enviar a la glándula sinusal

neurohormonas, muchas de las cuales influyen en varios ritmos, como la hormona hiperglicémica, involucrada en el ritmo circádico del nivel de glucosa, o la 5-hidroxitriptamina (serotonina), involucrada en el ritmo de la posición de los pigmentos proximales de la retina y también en el ritmo locomotor, o la hormona concentradora de pigmentos rojos, que afecta el ritmo de los cromatóforos del tegumento, entre muchas otras (Aréchiga et al; 1992). El órgano "X" es el principal cuerpo neurosecretor en los lóbulos ópticos y las neuronas de este órgano proyectan sus terminales a la glándula sinusal, donde libera las neurohormonas tales como la hiperglicemante, la hormona dispersora de los pigmentos distales etc., encargadas de funciones fisiológicas con ritmicidad circadiana en los crustáceos (Tombes, 1970; Aschoff; 1984; Aréchiga *et al.*, 1992). Kalmus (1938) (revisado en Page y Larimer, 1972) observó que al cortar los pedúnculos oculares al acocil *Procambarus clarkii*, este aparentemente sufría de una pérdida de la ritmicidad circadiana (Aschoff; 1984). La idea del pedúnculo óptico como oscilador se sostiene en el hecho de haber encontrado ritmicidad circadiana en el pedúnculo óptico aislado; además se le ha encontrado ritmicidad *in vitro* en su capacidad de respuesta a la luz y a la neurosecreción (Aréchiga *et al.*, 1992). No obstante, Page y Larimer (1972; 1976), establecen que los pedúnculos ópticos no son el único marcapasos y que inclusive, estos no son necesarios para la sincronización de los crustáceos. En sus experimentos llevados a cabo en el acocil, observaron que al extraer los pedúnculos oculares a los crustáceos, mantienen la capacidad de sincronización del ritmo con el fotoperiodo, por lo cual se propuso una estructura extraretinal encargada de la sincronización. El ganglio supraesofágico ha sido también propuesto como marcapasos en los crustáceos y es la estructura que se sugiere como posible sincronizador extraretinal. Este, está conectado con los pedúnculos ópticos a través de los nervios ópticos. Uno de los ritmos circadianos mejor comprendidos en los decápodos es el de la sensibilidad visual, donde participan distintos elementos neurohumorales. El ganglio supraesofágico parece estar encargado de controlar el ritmo de movimiento de los pigmentos distales, el cual es el único que no es capaz de generar sus propias señales circadianas, a diferencia de los otros dos pigmentos de los pedúnculos ópticos (Aréchiga et al; 1992). Sin embargo, se cree que el ganglio lleva a cabo tareas para la sincronización entre ambas retinas. En los crustáceos otras estructuras se han encontrado como posibles

sitios que originan ritmicidad circadiana, como las neuronas del 6° ganglio abdominal (Aréchiga et al; 1992).

1.4. Zona intermareal

El tipo de ritmo que genera un organismo y las características del ritmo están estrechamente ligadas al tipo de ambiente que habita y las condiciones que en este se presentan. Un tipo especial de ambiente, es la zona intermareal donde los organismos que la habitan, presentan actividades asociadas a las mareas y a las condiciones de variabilidad ambiental que ocasionan. La zona costera es un amplio espacio de interacciones del mar, la tierra, aguas epicontinentales y la atmósfera, donde la transición de estas cuatro fases incide profundamente en las condiciones y en las dinámicas ambientales. Las aguas costeras se definen como aquellas que son directamente afectadas por la influencia de mareas, como lo son los estuarios, las lagunas y los pantanos entre otras (Yanes-Arancibia, 1986).

El medio lagunar-estuarino es un ecotono costero, conectado con el mar de manera permanente o intermitente. Estos ecosistemas son cuerpos de agua someros, semi-cerrados de volúmenes variables, dependiendo de las condiciones locales climáticas e hidrológicas. Se caracterizan por presentar temperaturas y salinidades variables debido a la entrada y salida de agua, que se presenta de forma efímera al subir o bajar la marea, fondos predominantemente fangosos, alta turbidez y características topográficas irregulares. Las lagunas costeras generalmente se diferencian de los estuarios sobre bases geomorfológicas; No obstante de manera general, las lagunas costeras y los estuarios son sistemas dinámicos, variables, extremadamente abiertos que reciben un alto nivel de aporte de energía física (Yanes -Arancibia, 1981).

Los factores que determinan este tipo de hábitats son:

- a) La duración de la inmersión en agua y exposición al aire.
- b) Factores secundarios debidos a la marea alta y baja, como el tiempo disponible para obtener alimento, los cambios de temperatura del agua y del aire entre mareas, la humedad y el tiempo que un organismo puede pasar agua oxigenada por la superficie de su cuerpo (Newell, 1979).

En estas zonas, las mareas desempeñan un papel muy importante en las distintas poblaciones de organismos que habitan estos ambientes. Así, los organismos que viven en las zonas de intermareas, quedan expuestos al aire y sumergidos en el agua de mar de forma periódica. Los organismos que viven en los límites superiores de la costa se encuentran la mayor parte del tiempo en condiciones terrestres, mientras que aquellos que están en la zona baja de la costa se encuentran la mayor parte del tiempo sumergidos. Aún cuando ambos presentan una exposición e inmersión diaria acorde al patrón de mareas, cada uno está sujeto a condiciones ambientales distintas, de elevada heterogeneidad, dinámica que determina una gran cantidad de nichos y de especies. Si bien los organismos son capaces de evitar la competencia por los recursos de espacio con otros organismos y alimento (compartimentalización de recursos), se encuentran en un ambiente poco estable e impredecible (Newell, 1979); aunado a ello, los patrones de mareas son poco predecibles al encontrarse relacionados a muchas variables como lo son, el ciclo lunar, el sol e inclusive el viento (DeCoursey; 2004b). De tal manera la biota que habita la zona de intermareas presenta numerosas adaptaciones, tanto fisiológicas como morfológicas, donde el ritmo circamareal, que han desarrollado varios organismos desempeña un papel fundamental, permitiéndoles explotar y adecuarse a este medio ambiente.

Los organismos de la especie *Uca princeps* habitan este medio, y se encuentran expuestos a estos cambios ambientales, como las fluctuaciones en la temperatura y la salinidad. Una condición de especial interés para este estudio es el aumento en las concentraciones de amonio debidas al patrón de mareas; al bajar la marea, dentro de las galerías de este cangrejo se da un descenso en las concentraciones de oxígeno y aumentos de temperatura, de salinidad y de la concentración de amonio. En otras especies de crustáceos, se ha observado que estas condiciones, ocasionan una reducción en la excreción nitrogenada, especialmente en la excreción del amonio, resultando en un incremento de amonio en la hemolinfa (Durand, et al, 2000) y la acumulación de aminoácidos libres en hemolinfa, las branquias y el hepatopáncreas (Chen, 2000). Al volver la marea alta los compuestos nitrogenados “son lavados” por el recambio de agua.

1.5. El amonio

El amonio es un compuesto químico formado por átomos de hidrógeno y de nitrógeno, el cual se puede encontrar ionizado (NH_4^+) o no ionizado (NH_3) este último también llamado amoniaco. El amoniaco es un gas y es 100 veces más tóxico que el amonio ionizado. En ambientes acuáticos, la proporción de cada uno está en relación al pH, a la temperatura y a la salinidad del medio, a mayor pH y temperatura y menor salinidad la proporción del amoniaco aumenta (Harris *et al*, 2001).

El efecto tóxico del amonio en los organismos está determinado fundamentalmente por la concentración, el tiempo de exposición y la proporción amonio-amoniaco. No obstante el efecto tóxico puede verse modificado por las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, pH, sustrato, humedad, frecuencia de la exposición) así como por variables bióticas como son el estadio de desarrollo del organismo, la especie y la tolerancia de los individuos al compuesto nitrogenado (Whitfield, 1974; Bower, 1978; Weihrauch *et al*, 2004).

El amonio proviene de forma natural de la excreción nitrogenada de los organismos acuáticos amoniotélicos y de las bacterias como *Rhizobium* que llevan a cabo la fijación del nitrógeno. No obstante, actualmente el amonio en el ambiente acuático es considerado un contaminante de importancia. El incremento en las concentraciones de amonio en los ambientes naturales se debe a muchas causas, fundamentalmente de origen antrópico debido a los aportes de descargas industriales, aguas urbanas residuales, actividades agrícolas y aportes de la acuicultura, aunado a los aportes de actividades pecuarias y de procesamiento de alimentos (Harris *et al*, 2001; Grimaldo, 2002; Camargo y Alonso, 2006).

De manera general la acción tóxica del amoniaco en organismos acuáticos, incluyendo los crustáceos, aún en concentraciones subletales obedece a varias causas entre las cuales destacan:

- a) Daño al epitelio branquial ocasionando asfixia.

- b) Estimulación de la glucólisis y supresión del ciclo de Krebs ocasionado acidosis progresiva y la reducción de la capacidad de la sangre de transportar oxígeno.
- c) Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa ocasionando la inhibición de la producción de ATP y la reducción del ATP a nivel cerebral.
- d) Disrupción de los vasos sanguíneos y la alteración de la osmoregulación relacionado con la disrupción de los mecanismos de regulación iónica y osmótica y el deterioro de los órganos hepáticos y renales.
- e) Supresión del sistema inmune incrementando la susceptibilidad a enfermedades.

La alteración en estas respuestas fisiológicas resultan en la reducción de la actividad de alimentación, disminución de la fecundidad y la sobrevivencia, reduciendo así las poblaciones de los organismos acuáticos. Sobre la base de estudios agudos y crónicos del efecto tóxico del amoníaco en organismos acuáticos sensibles, los niveles máximos permitidos de este compuesto se han estimado en 0.05-0.35 mg N-NH₃/L para exposiciones cortas y 0.01-0.02 mg N-NH₃/L para exposiciones crónicas (revisión en Camargo y Alonso, 2006).

1.5.1. Efecto tóxico del amonio en los crustáceos

En crustáceos, además de los efectos previamente mencionados, numerosos estudios han abordado el efecto de la exposición subletal al amonio. En diversas especies y estadios, se ha reportado de manera particular alteraciones en los procesos de muda y reducción del crecimiento (Young-Lai *et al*, 1991; Marazza *et al*, 1996; Cavalli *et al*, 2000; Mangas-Ramírez y Sarma, 2002; Sarma *et al*, 2003; Chen y Liu, 2004) cambios en los patrones de excreción de compuestos nitrogenados (Chen y Cheng, 1994; Chen y Cheng, 2004), alteración de los procesos iónicos y osmóticos afectando la osmorregulación (Shaw, 1960; Armstrong, 1978; Spaargaren, 1990; Young lai, 1991; Harris, 2001) y el consumo de oxígeno (Chen y Lin, 1992; Chen y Lin, 1995; Racotta y Hernandez-Herrera, 2000).

En juveniles de *Litopenaeus setiferus* concentraciones subletales de amonio ocasionan retrasos de fase en su ritmo de actividad locomotora y una menor intensidad de actividad en su ritmo locomotor, además de un incremento en su metabolismo energético (Grimaldo, 2002). Estas alteraciones conductuales se asocian con el efecto neurotóxico

del amonio de manera similar al documentado en peces, en los cuales las alteraciones conductuales se asocian con fallas en la neurotransmisión e interferencia en la función normal del sistema nervioso central (Russo, 1985; Jobling, 1994).

Si bien la acción adversa del amonio en crustáceos ha sido analizada sobre numerosos parámetros fisiológicos (comportamiento, metabolismo energético, osmorregulación, crecimiento, reproducción, supervivencia, etc.) no existen estudios a la fecha que tomen en cuenta la toxicidad del amonio en el ritmo circamareal de crustáceos.

1.5.2. Efecto neurotóxico del amonio

La acción neurotóxica del amonio se incrementa en condiciones de temperatura elevada, pH básico, exposiciones crónicas o sub-crónicas o concentraciones letales (Racotta y Hernández-Herrera, 2000, Harris *et al*, 2001). La hipoxia, la alcalosis y la hipertermia aumentan la toxicidad del amonio, mientras que la hipotermia y la acidosis disminuyen su efecto tóxico en el sistema nervioso (Cooper y Plum, 1987). Cuando el amonio se encuentra ionizado, este tiene el mismo radio iónico que el ión K^+ y debido al comportamiento parecido que mantienen estos iones afectan el potencial de membrana, despolarizándola (Armstrong *et al*, 1978), como se ha observado en el axón gigante de *Loligo pealei* (Binstock y Lecar, 1969 citado por Weihrauch, 2004) y en el potencial de membrana en neuronas de mamíferos (Cooper y Plum, 1987). Según Cooper y Plum (1987), el efecto del amonio en los animales donde se ha estudiado es similar. Generalmente al poco tiempo de la administración de dosis letales de sales de amonio, los animales comienzan a hiperventilar y experimentan convulsiones. En ratas, las dosis de amonio a 5mmol/Kg., pueden ocasionar insensibilidad, hiperventilación y ligera somnolencia; dosis de 7.8 mmol/kg ocasionan una rápida insensibilidad y convulsiones posteriores (Cooper y Plum, 1987). Daños mayores en el sistema nervioso central de los mamíferos son ocasionados por elevadas concentraciones de amonio generalmente ocasionando encefalopatías metabólicas (Cooper y Plum, 1987). Incluso, se ha encontrado relación entre elevadas concentraciones de amonio y el Alzheimer, debido a la acumulación toxica de la glutamina en los astrositos, lo cual genera un mal funcionamiento celular o la muerte celular (Butterworth, 2002). También en células de la

microglia y de la astrogliia, el amonio afecta la endocitosis, la citocinesis e incrementa la actividad de hidrolasas lisosomales (Atanassov *et al.*, 1994; Atanassov *et al* 1995).

Los mecanismos propuestos por Cooper y Plum (1987) por los cuales el amonio actúa como neurotóxico involucran:

- a) El efecto en la fisiología de los vasos y del flujo sanguíneo como se documenta en monos donde el amonio tiene un efecto vasodilatador en los vasos cerebrales.
- b) El efecto en las propiedades electrofisiológicas en el sistema nervioso. Las cantidades anormales de amonio en sangre y cerebro reducen las respuestas eléctricas electroencefalográficas y la agudeza mental y ocasionan estados prolongados de letargo. Al parecer estas anormalidades se deben a los efectos del ión amonio en la membrana celular de las neuronas y en la eficiencia de la transmisión sináptica.
- c) La interferencia con la función de los neurotransmisores. En ratas se ha observado que dosis letales de amonio reducen los niveles de glutamato e incrementan los de alanina, cambios encontrados en pocos compartimentos neurales incluyendo los astrocitos.
- d) Los cambios morfológicos de los astrocitos y las neuronas. Se reportan daños morfológicos en astrocitos cultivados.
- e) La interferencia con rutas bioquímicas. El amonio ocasiona un incremento en la producción de carbamil-fosfato mitocondrial en el hígado, el cual induce un incremento en la síntesis de nucleótidos pirimídicos. A su vez, el amonio interfiere con el metabolismo de carbohidratos y de grasas en varios tejidos.
- f) La interferencia con el metabolismo energético. Se ha propuesto que la encefalopatía hepática se debe a que el exceso de amonio interfiere con el metabolismo energético del cerebro.

Tomando en cuenta el efecto neurotóxico del amonio es posible suponer que este compuesto nitrogenado puede afectar la ritmicidad biológica de los organismos, incluidos los cangrejos acuáticos como *Uca*. Particularmente el cangrejo *Uca princeps*, se presenta como un candidato ideal para conocer el efecto del amonio en el ritmo de actividad de

organismos intermareales que viven en ambientes en los cuales las concentraciones de amonio se han visto incrementadas debido a las actividades antrópicas.

1.6. Biología de *Uca princeps*

El estudio más importante y mejor planteado de este género lo llevó a cabo Crane (1975), complementado por un estudio taxonómico posterior basado en 236 caracteres discretos, comparados posteriormente con un estudio molecular por Rosenberg (2001). El género *Uca* cuenta con 88 especies que se distribuyen en los trópicos y sub-trópicos, en su mayoría en la zona de intermareas y en lugares generalmente cálidos. Mantienen actividad reproductiva durante todo el año en los trópicos y únicamente en época de lluvias en lugares sub-tropicales. Son animales que viven en sustratos fangosos donde pueden formar hoyos, denominado galerías, donde habitan. El género se distingue por presentar un claro dimorfismo sexual; el macho tiene un quelícero largo y otro muy corto mientras que la hembra tiene ambos iguales. El quelícero grande de los machos es empleado en la búsqueda de pareja y para combate, mientras que el pequeño lo utilizan para comer (Crane, 1975). Debido a que existe poco registro fósil del género, se ha propuesto que aparecieron en el área circuntropical (Crane, 1975).

Se ha observado que estos cangrejos se meten a sus galerías durante la marea alta y salen para alimentarse durante la marea baja, siendo en general de hábitos detritívoros. Son tolerantes a los cambios de salinidad y en su mayoría son animales diurnos. En ocasiones se mueven en grupos y han sido considerados modelos biológicos idóneos para estudios conductuales, ya que ciertas posturas tienen significado en su contexto social (Crane, 1975; Rosenber, 2001). El género *Uca* ha sustentado una gran variedad de estudios de selección sexual, aislamiento reproductivo, combate, forrajeo, asimetría, regeneración, morfometrías, ritmicidad, cambio de color, osmorregulación, tolerancia a la temperatura, entre muchos otros (Rosenberg, 2001).

Entre los estudios de ritmos circamareales, los de mayor relevancia son los desarrollados por John D. Palmer en el género *Uca* (1997), quien elaboró experimentos y estudios para conocer las características y zonas de control del ritmo circamareal. Palmer comparó

ritmos circamareales de actividad locomotora entre varios cangrejos del género y de otros géneros, contribuyendo enormemente a los estudios cronobiológicos de esta ritmicidad, entre lo que destaca su teorías del reloj circalunar, para explicar el control de la ritmicidad circamareal (Palmer; 1997). Por otra parte Stillman y Barnwell (2004) estudiaron la actividad locomotora circamareal en cuatro poblaciones de *Uca princeps* localizadas en lugares con distintas características mareales (La Paz, San Blas y Mazatlán, México y Mata de Limón, Costa Rica). La estructura de la actividad locomotora de cangrejos de cada población mostró que el ritmo locomotor está en relación con la estructura particular del ritmo de mareas de cada lugar. Las poblaciones estudiadas presentaron una tendencia a la bimodalidad en su ritmicidad, con un pico de actividad a mediodía. En la población proveniente de Mata de Limón, Costa Rica, el ritmo circamareal dominó sobre el circadiano claramente, mientras que en las poblaciones provenientes del pacifico mexicano su ritmicidad era fuertemente modulada por un ritmo circadiano en un patrón semilunar, lo cual sugiere que existe una coordinación relativa en la ritmicidad circamareal de *U. princeps*, y dependiendo de la interacción de los sincronizadores, en este caso el fotoperiodo y las mareas, se presenta de distinta forma el ritmo; además, significa que estas poblaciones de *Uca princeps* expresan tanto un reloj circadiano como un circamareal. En el cangrejo *Uca subcylindrica*, el cual vive en lagunas de zonas semiáridas, el ritmo de actividad locomotora en condiciones constantes y luz natural dio como resultado la presencia de un ritmo unimodal en luz constante (LL) y bimodal en oscuridad constante (OO) y fotoperiodo (LO) presentando en todos los casos netamente un ritmo circadiano (Thurman, 1998). Posteriormente se estudió el ritmo bajo distintos periodos de luz artificial (12:12 y 14:10) y se vio que el ritmo se sincroniza. Luego de varios días de este régimen se les puso bajo condiciones LL y presentaron una gran gama de comportamientos, unimodales la mayoría y algunos bimodales, con periodos menores y mayores a 24 h. Al pasarlos de LO a OO varios animales presentaron arritmia (Thurman y Broghammer, 2001).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, las emisiones de compuestos nitrogenados por las actividades humanas se han incrementado considerablemente, lo cual tiene un impacto adverso en el equilibrio de los ecosistemas. Particularmente el incremento del amonio en los sistemas acuáticos ocasiona numerosas alteraciones fisiológicas en los organismos comprometiendo la estabilidad de las poblaciones. No obstante es amplio el desconocimiento del efecto del amonio sobre la ritmicidad biológica de crustáceos que habitan zonas lagunares-estuarinas. *Uca* es un género de cangrejos violinistas, ampliamente empleados para el estudio de la ritmicidad circadiana y circamareal. Además *Uca princeps* es una especie intermareal que se distribuye ampliamente en ambientes lagunares-estuarinos, donde la actividad humana ha ocasionado el incremento en las concentraciones de compuestos nitrogenados en el medio, incluido el amonio.

A la fecha se desconocen los efectos adversos del amonio sobre la fisiología circadiana-circamareal de las especies que habitan estos ambientes, debido a lo cual el cangrejo violinista *Uca princeps* es un candidato ideal para llevar a cabo estudios con este enfoque. El presente trabajo complementa la información sobre las características del ritmo mareal de la actividad locomotora de adultos de la especie *Uca princeps*, de una población que se encuentra en Isla Soto en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa, con base en el trabajo publicado por Stillman y Barnwell (2004), donde se señala la presencia de un ritmo bimodal con mayor actividad diurna y en marea baja.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto subletal del amonio sobre las características del ritmo circamareal de la actividad locomotora de *Uca princeps*.

Objetivos particulares

1. Confirmar la endogeneidad de la ritmicidad circamareal de la actividad locomotora en *U. princeps*.
2. Definir las condiciones de laboratorio para obtener un registro claro y conspicuo, del ritmo circamareal de la actividad locomotora de *U. princeps*.
3. Analizar las características del ritmo circamareal en sincronización.
4. Determinar la sensibilidad de la especie al amonio a través de la obtención de la concentración letal media (CL₅₀- 24 h).
4. Determinar si la exposición crónica subletal a distintas concentraciones de amonio, ocasiona cambios cuantitativa y cualitativamente en la capacidad de sincronización, la intensidad de la actividad y las relaciones de fase con las condiciones del medio (fotoperiodo y mareas).

4. HIPÓTESIS

En crustáceos decápodos, el amonio ejerce acción neurotóxica interfiriendo con numerosos procesos fisiológicos. Si el ritmo circamareal es regulado por el sistema neuroendocrino en estos organismos, al exponer de forma crónica a cangrejos de *Uca princeps* a concentraciones subletales de amonio, se alterará la expresión y las características generales del ritmo locomotor. Dicho efecto se verá reflejado en las relaciones de fase que guarda el ritmo manifiesto con las variables ambientales, además

de deteriorar la intensidad de la actividad locomotora, como sucede en el camarón blanco *Litopenaeus setiferus* (Grimaldo, 2002).

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Obtención y mantenimiento de los animales.

Todos los animales utilizados en este estudio se capturaron en la Isla Soto, ubicada en el Estero de Urías, Mazatlán, Sinaloa. Las capturas se llevaron a cabo siempre al bajar la marea y se capturaron únicamente machos de entre 3 y 3.5cm de ancho total de caparazón. Los organismos capturados se transportaron en contenedores al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, Mazatlán) y fueron enviados el mismo día a las instalaciones de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

De acuerdo a cada proceso experimental, se establecieron las condiciones adecuadas de mantenimiento y manejo de los organismos bajo estudio.

5.1.1. PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA. Determinación de la CL 50-24 h

De manera inicial se determinó la toxicidad aguda del amonio en los adultos machos de *Uca princeps* a través de la determinación de la concentración letal media del amonio (CL_{50-24 h}). Esta prueba se realizó con la finalidad de calcular las concentraciones subletales que se habrían de emplear en la pruebas de registro de la actividad locomotora, y de corroborar si las concentraciones a emplear eran similares a las que se reportan en su medio natural.

Los organismos capturados fueron colocados en acuarios de mantenimiento de 250 L de capacidad, equipados con filtro biológico, con sustrato similar a su hábitat y sin estímulo de mareas. Durante la aclimatación de 10 días, se mantuvieron constantes la temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), la salinidad (35 ± 1 ups), el pH (8.05 ± 0.05) y el oxígeno disuelto (> 5.2 mg O₂/L) del agua; el fotoperiodo se fijó en 12:12 luz:oscuridad (700:1900h). Durante el periodo de mantenimiento los cangrejos fueron alimentados con hojuelas de *Artemia, ad limitum*, a razón de 0.5g por día.

La prueba de toxicidad aguda se efectuaron en la Unidad de Análisis Ambiental (UNAAMB) de la Facultad de Ciencias, UNAM. El bioensayo de toxicidad aguda,

estático, de 24h, se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en el curso regional de entrenamiento sobre ensayos biológicos y pruebas de toxicidad (INDERENA, PAC, PNUMI, FAO, COI. 1989) para peces e invertebrados marinos. Después del periodo de aclimatación, los organismos de cada concentración experimental se colocaron en acuarios de 18 L donde permanecieron 24 h sin alimentación antes de la exposición al amonio. En cada acuario (original y réplica) se colocaron 8 organismos (N=16 por concentración) salvo en la concentración más elevada donde se colocaron 9 (N=18). Las concentraciones experimentales de amonio se dosificaron a partir de una solución madre de 100g/L de cloruro de amonio.

Para la prueba, se consideraron cinco concentraciones experimentales, reales: 42.5, 103.4, 197.3, 254.1 y 351.9 mg de nitrógeno de amonio total (N-AT/L), correspondientes a 2.1, 5.1, 9.8, 12.6 y 17.4 mg N-NH₃/L respectivamente de acuerdo a la temperatura, pH y salinidad de los acuarios experimentales. Un grupo sin adición de amonio se consideró como testigo (1.25 mg N-AT/L; 0.06 mg NH₃/L). Las pruebas se efectuaron por duplicado. Durante las pruebas los organismos no fueron alimentados y a lo largo del periodo experimental las condiciones de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto se mantuvieron similares a los del periodo de aclimatación. Las concentraciones reales de amonio se determinaron por el método de Azul de Indofenol (Rodier, 1981) adaptado para microplaca (Zúñiga, 2001 com. per.).

En el transcurso del bioensayo, la muerte de los organismos se estableció por la falta de respuesta al estímulo suave de una varilla de vidrio. A partir de los resultados de la mortalidad de los cangrejos, se calculó la CL₅₀-24h mediante el programa de cómputo de análisis Probit (EPA, versión 1.5) que consiste en una regresión lineal para datos de probabilidad.

5.1.2. REGISTROS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA.

5.1.2.1. Efecto del periodo de aclimatación sobre la actividad locomotora.

De manera inicial se seleccionaron tres grupos experimentales sobre los cuales se llevó a cabo un registro de actividad los cuales fueron monitoreados con el fin de conocer la persistencia del ritmo circamareal después de distintos periodos de aclimatación bajo

condiciones de laboratorio. Se usaron cangrejos aclimatados durante 0, 15 y 30 días. Todos ellos fueron mantenidos en registro durante 15 días en condiciones constantes de oscuridad, sin amonio y sin mareas.

Durante estas pruebas la temperatura, la salinidad, el pH y el oxígeno disuelto se mantuvieron regulados en niveles de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 35 ± 1 ups, el pH 8.05 ± 0.05 pH y niveles mayores de $5.2 \text{ mg O}_2/\text{L}$. Los cangrejos se alimentaron cada tres días con hojuelas de *Artemia* (0.1g/individuo). Cada 3 días se efectuó el recambio del 50% del volumen de agua del sistema para regular las concentraciones experimentales de amonio, las cuales se cuantificaron diariamente por el método de Azul de Indofenol (Rodier, 1981) adaptado para microplaca (Zúñiga, 2001).

El registro de la actividad locomotora de *U. princeps* se obtuvo mediante el uso de fotointerruptores de luz infrarroja, conectados a los costados de la cara larga de las peceras individuales; al ser interrumpida cada haz de luz infrarroja por el movimiento de un cangrejo, cada sensor registró medio movimiento y medio más al desbloquearlo. El número de datos (frecuencia de movimiento) se agrupó en periodos de 10 minutos, los cuales se almacenaron en una computadora mediante el uso de una tarjeta de adquisición de datos (NAFRI, SA de CV, México). Los datos capturados fueron posteriormente agrupados en Excell (Microsoft Office 2003) y analizados por medio del programa DISPAC (Arturo Vega y Raúl Aguilar Roblero, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) en forma de actograma de doble gráfica.

5.1.2.2. Efecto subletal del amonio sobre la actividad locomotora.

La evaluación del efecto subletal, crónico, del amonio sobre el registro de la actividad locomotora en adultos de *Uca princeps* se llevó a cabo en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM. A su llegada a las instalaciones los organismos fueron colocados inmediatamente en los sistemas de registro. Sustentado en los resultados previos, no hubo periodo de aclimatación a fin de preservar el ritmo de los cangrejos lo más similar posible al que presentan de manera natural en su ambiente, el cual se modificó luego de un periodo de 15 días de aclimatación.

El registro de la actividad locomotora se efectuó en tres grupos con 8 cangrejos cada uno, con una duración mínima de 15 días de registro equivalentes a un ciclo semi-lunar. El primer grupo, testigo, no fue expuesto al amonio; los otros dos grupos fueron expuestos a 3.5 y 18 mg N-AT/L (correspondientes a 0.2 y 0.9mg N-NH₃/L respectivamente) a partir del cuarto día. Estas concentraciones correspondieron al 2 y 10% del valor de la CL50-24 h obtenidos previamente y a valores registrados en el medio natural (Vanegas com. per).

Para llevar a cabo los registros de la actividad locomotora, se diseñó un sistema capaz de simular las mareas presentes en su medio. Para la simulación de mareas, se empleó una bomba sumergible (Dolphin P-2000 professional), con capacidad de bombeo de 700L/min colocada en un contenedor inferior de agua con un volumen de 75L. La bomba enviaba el agua a un contenedor superior, aproximadamente a una altura de 1.20 m, con una capacidad de 40L, el cual se conectó a un sistema de distribución para los ocho acuarios de registro (fig. 1), los cuales a su vez vertían su flujo al contenedor inferior. Cada acuario mantuvo un nivel mínimo y máximo de agua a través de rebosaderos (fig. 2).

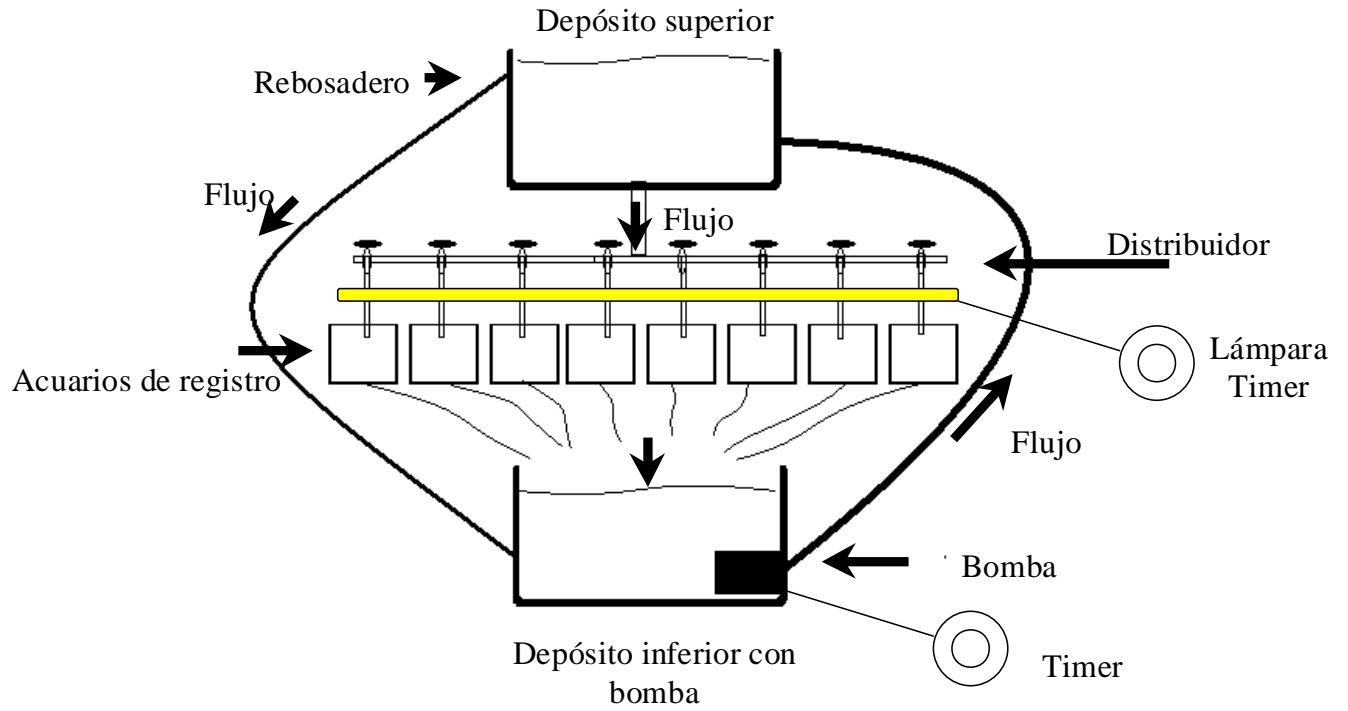


Figura 1. Esquema del sistema experimental de circulación y distribución de agua en los acuarios para el registro de la actividad locomotora de *Uca princeps*.

La actividad de la bomba se reguló mediante el uso de un interruptor programable (timer), el cual la activaba cuando se pronosticaba marea alta, y la desactivaba cuando se esperaba marea baja. El tiempo en el que se programaron las mareas fue hecho con base en el pronóstico de las mareas publicado por el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) para la localidad de colecta. Durante las pruebas, de 15 a 20 días de duración, el fotoperiodo se mantuvo en LO 12:12 ~200 lux, encendido de la luz a las 07:00 y el apagado a las 19:00 h.

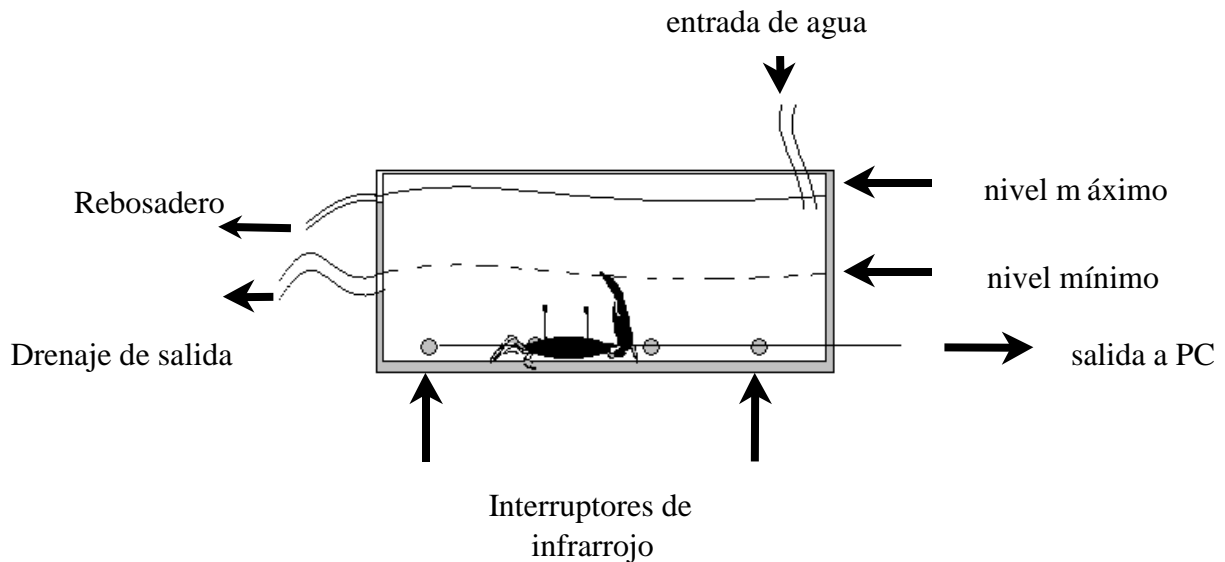


Figura 2. Esquema de las características generales de los acuarios para el registro de la actividad locomotora. Se señalan los niveles máximo y mínimo de agua al interior del sistema, correspondientes a los niveles mantenidos durante la marea alta y baja, respectivamente.

El registro de la actividad locomotora y su análisis, la alimentación, la regulación de las variables ambientales y el control de las concentraciones experimentales de amonio se llevó a cabo de manera similar que en las pruebas realizadas para conocer el efecto del periodo de aclimatación. Los resultados de los registros obtenidos fueron analizados de forma similar, aunque en esta ocasión, los datos fueron analizados mediante el programa DISPAC y se cuantificaron también los parámetros de la actividad tales como amplitud, duración, estructura rítmica y fase con los sincronizadores. Dichos parámetros fueron comparados entre grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) y t-Student (Zar, 1999).

La figura 3 sintetiza la información de los grupos experimentales usados en el presente trabajo. Cada uno de los grupos estaba formado por 8 individuos al inicio del experimento.

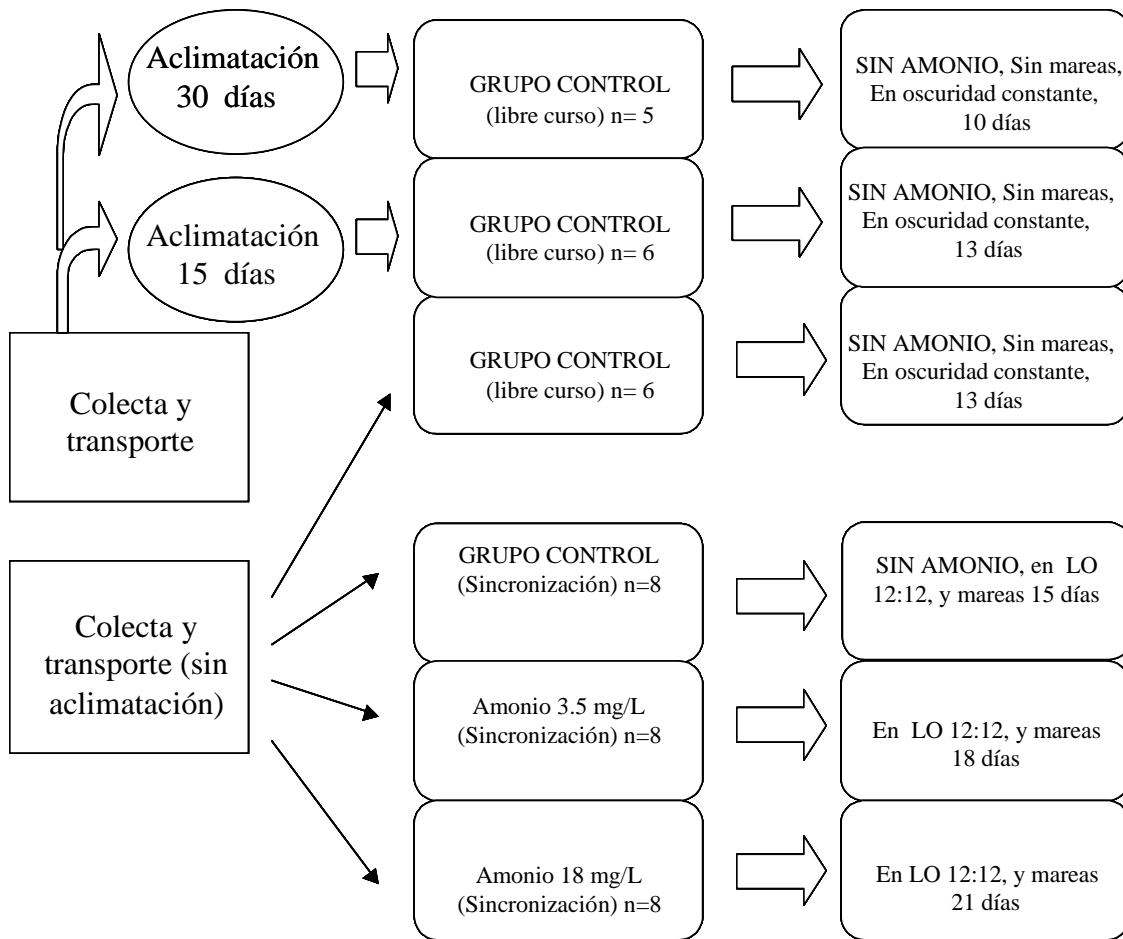


Fig. 3. Diagrama del diseño experimental usado para evaluar el efecto del amonio sobre la actividad locomotora de *Uca princeps*.

6. RESULTADOS

6.1. Prueba de toxicidad aguda. Concentración letal media (CL50-24h).

La concentración letal media del amonio (CL50-24h) para los adultos de *Uca princeps* se calculó en 186.017mg N-AT/L correspondiente a 176.8 mg N-NH₄⁺/L y 9.2 mg N-NH₃/L respectivamente. En la tabla 1 se presentan los valores estimados a partir del análisis probit, de las concentraciones que ocasionaron del 1 al 99% de la mortalidad en los organismos, con sus respectivos intervalos de confianza (IC), comportamiento que se visualiza en la Fig. 4. Cabe señalar que el modelo probit aplicado fue significativo ($p < 0.05$).

Tabla 1. Valores obtenidos a partir del modelo Probit X, de la concentración letal del amonio (CL-24h; mg N-AT/L) para *Uca princeps* obtenidos a partir del análisis probit. Se incluyen los valores de los límites de confianza inferior (ICi) y superior (ICs) de cada concentración letal.

CL, %	mg N-AT/L	ICi	ICs
1	41.908	13.479	68.358
5	64.847	28.059	94.209
10	81.841	41.305	112.252
15	95.762	53.457	126.738
50	186.017	145.457	231.388
85	361.339	280.563	595.954
90	422.802	317.845	768.658
95	533.604	379.840	1128.192
99	825.671	524.856	2342.351

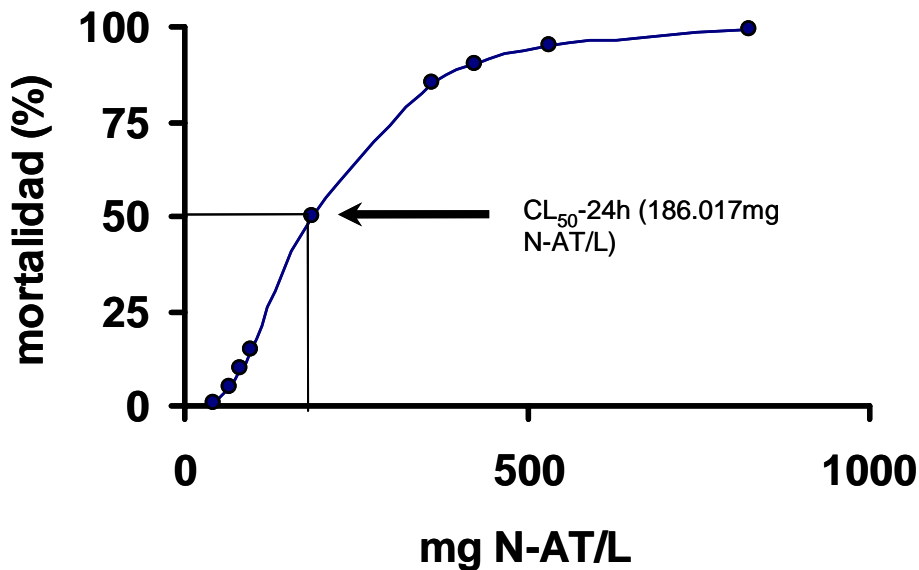


Fig. 4. Comportamiento de la toxicidad aguda del amonio en *Uca princeps*.

El cambio en el comportamiento de los organismos a partir del inicio de la exposición al amonio, permitió caracterizar el curso de la intoxicación en *Uca princeps*, desde la etapa temprana de intoxicación hasta su muerte:

Comportamientos:

Se llevaron a cabo observaciones de comportamiento con una duración aproximada de una hora dos veces por día, de las cuales se presenta el siguiente resumen de la secuencia de los comportamientos observados a lo largo del experimento:

1. Reducción de la actividad locomotora de los cangrejos; postura defensiva con extensión de las extremidades.
2. Tetanización de las extremidades; movimientos espontáneos de las extremidades.
3. Brincos con las extremidades tetanizadas.
4. Pérdida completa del equilibrio; los cangrejos caen sobre su caparazón; movimientos esporádicos tetánicos de las extremidades.
5. Muerte de los organismos.

6.2. Registros de actividad locomotora

6.2.1. Efecto del tiempo de aclimatación en el ritmo circamareal y circadiano de la actividad locomotora de *Uca princeps*.

Del primer grupo de cangrejos (n=5) colocados desde el primer día (sin periodo de aclimatación) en condiciones de registro, 2 mostraron ritmicidad circamareal y 1 circadiana. Del grupo de animales aclimatados durante 15 días (n=6), 1 mostró ritmicidad circamareal y 2 ritmicidad circadiana. Finalmente del grupo de animales aclimatados durante 30 días (n=6), solamente 1 presentó ritmo circadiano estadísticamente significativo. Cabe mencionar que en todas estas pruebas preliminares se presentaron artefactos en el registro por lo cual aún cuando algunos de los organismos pudieron presentar ritmicidad, ésta se vio modificada o alterada por los artefactos, lo que dificultó obtener más y mejores registros.

Los actogramas de dos distintos cangrejos, registrados a distintos tiempos de aclimatación (izquierdo 15 días, derecho 30 días) se presentan en la figura 5. Durante los días de registro, el organismo con 30 días de aclimatación la actividad se presenta con un ritmo circadiano, con un periodo de 24.79 h. En el registro del organismo con 30 días se observa un ritmo locomotor con ritmicidad tanto circadiana como circamareal, con un valor respectivo de 24.37 y 16.15hrs. Los periodogramas correspondientes se muestran en la parte inferior de cada actograma.

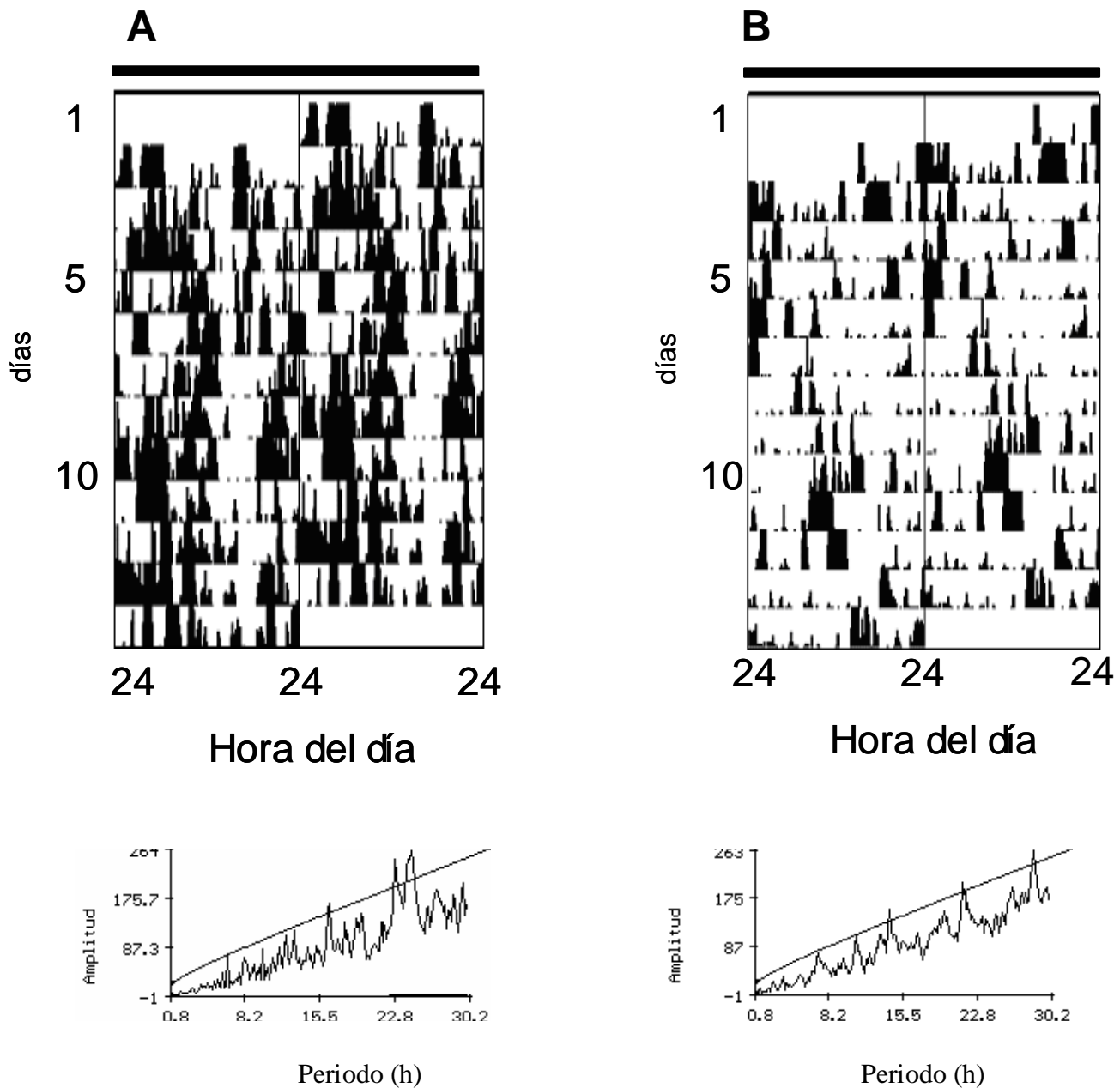


Fig. 5. Actogramas de organismos con diferentes tiempos de aclimatación. El actograma “A” representa a un organismo con 15 días de aclimatación y el “B” a uno luego de 30 días. Los periodogramas correspondientes se incluyen en la parte inferior. La línea diagonal en cada periodograma indica el nivel de significancia por χ^2 ($p < 0.05$).

6.2.2. Efecto de la exposición crónica al amonio sobre la actividad locomotora de *Uca princeps*.

Los resultados obtenidos en los experimentos previos (6.2.1.) denotan que a medida que se incrementa el tiempo de aclimatación se reduce la expresión del ritmo locomotor tanto circadiano como circamareal. De tal manera, los registros experimentales subsecuentes se efectuaron en organismos sin periodo de aclimatación a fin de mantener la expresión de la ritmicidad locomotora en condiciones lo más similares a las del medio natural. Cabe destacar que los registros de exposición crónica se efectuaron durante un mínimo de 15 días considerando condiciones simultáneas de ciclos de luz:oscuridad y patrón de mareas artificiales, similares a los del medio natural.

6.2.2.1. Grupo testigo

Los cangrejos del grupo testigo (N=8); sin adición del amonio, mostraron una actividad principalmente bimodal, sincronizada al patrón de mareas programado en el sistema de registro. La actividad se presentó predominantemente en la marea baja, y el inicio de la actividad no siguió al inicio del fotoperiodo. El análisis de los datos de la actividad mediante el periodograma de X^2 denotó un periodo promedio de 24.7 ± 0.14 h, el cual es más cercano al periodo de la marea artificial (T= 24.8 h) que al del ciclo de luz oscuridad (24:00 h). La relación de fase con respecto al inicio de la marea diurna tuvo un valor de -6.70 y de -6.04 h con la marea nocturna.

En la figura 6 se señalan dos ejemplos de registros de actividad locomotora de organismos de este grupo testigo. El lado superior de cada actograma muestra el ciclo de luz oscuridad con barras claras y oscuras respectivamente, mientras que las sombras en el lado derecho dentro de cada actograma, indican la marea alta. El lado izquierdo de cada actograma muestra solamente los datos de actividad. Debajo de cada actograma se presentan los respectivos periodogramas.

En estos registros, se observa que la actividad se concentra en los momentos de bajamar, El primer grupo de actividad, que deriva de la región nocturna del fotoperiodo, es más largo en duración que aquel que deriva de la parte luminosa. En general, en los cangrejos del grupo testigo, la actividad se detiene o comienza a disminuir al inicio de la marea alta.

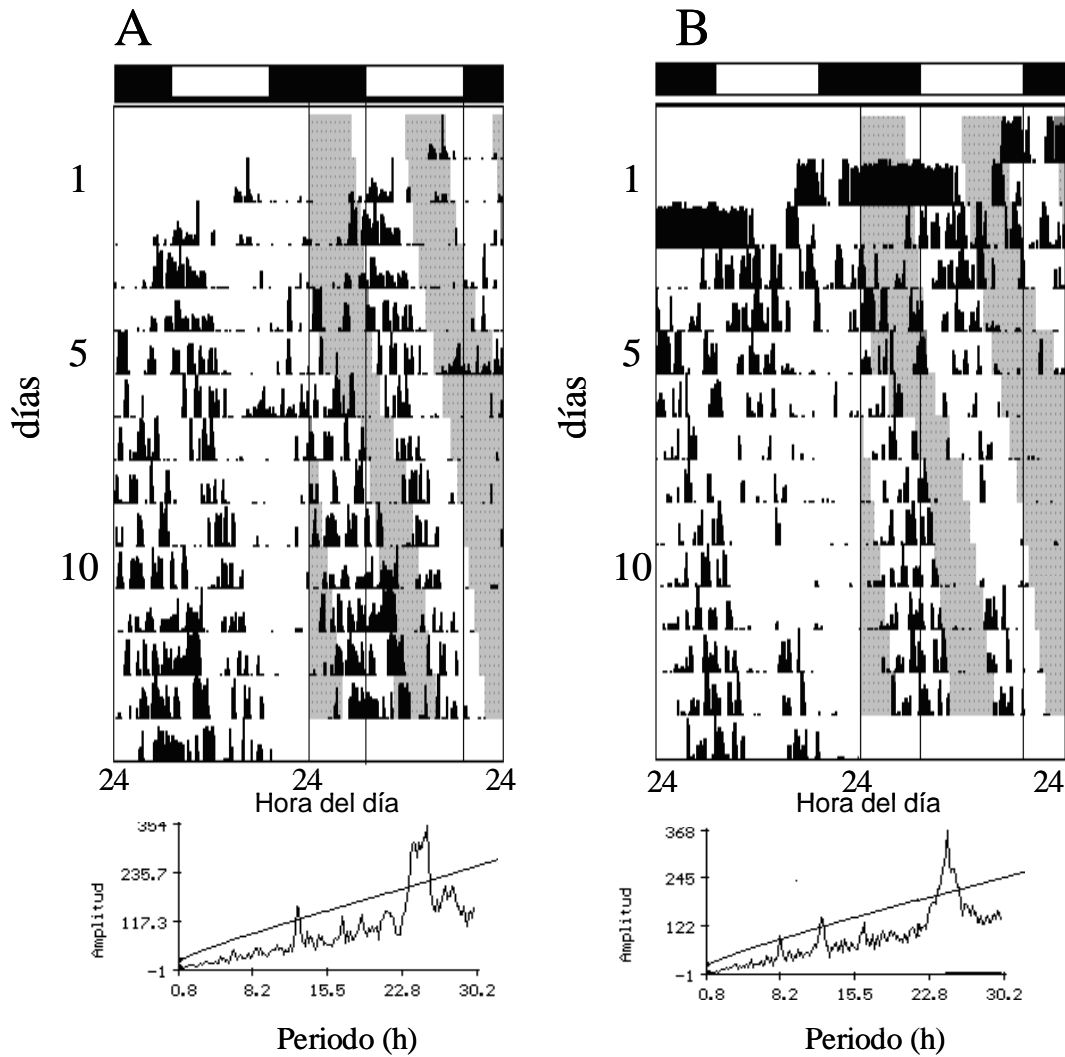


Fig. 6. Actogramas de dos ejemplares de *Uca princeps* en condiciones de marea artificial y fotoperiodo 12:12 (grupo testigo). Debajo de cada actograma se presenta el periodograma correspondiente. La línea diagonal en cada periodograma indica el nivel de significancia por X2 ($p < 0.05$). En el actograma B, aparece un artefacto del sistema de registro durante los dos primeros días.

6.2.2.2. Grupo expuesto a 3.5 mg N-AT/L (0.2mg N-NH₃/L).

La exposición crónica a la menor concentración subletal de amonio, (3.5 mg N-AT/L) (correspondiente a 0.2mg N-NH₃/L y 3.3mg NH₄⁺/L) modificó las características del ritmo locomotor de *U. princeps*, respecto a los organismos del grupo testigo. Los resultados obtenidos denotan que los cangrejos presentan una tendencia a aumentar la intensidad de la actividad; más importante aun, la fase de inicio de actividad se presenta durante la pleamar diurna con un valor de relación de fase de 0.80 y de 2.37 h con respecto a la marea alta nocturna, a diferencia del grupo testigo que presentó valores de -6.70 ± 0.61 y -6.04 ± 0.31 h, respectivamente. En la figura 7 se presentan dos actogramas y periodogramas de la actividad locomotora de dos cangrejos expuestos crónicamente a 3.5 mg N-AT/L. Los niveles de actividad de los organismos de este grupo experimental, fueron en promedio de 6.15 ± 1.58 horas de α por cada 16.59 ± 2.90 h de ρ ; sin embargo las diferencias no fueron significativas respecto al grupo testigo ($p > 0.05$). Cabe destacar que un comportamiento muy importante en este grupo experimental, fue la reducción de actividad cuando existe una coincidencia entre la marea alta y el inicio del periodo de oscuridad; así, en la figura 7 se observa que a partir del décimo día del actograma se reducen los niveles de actividad, los cuales reaparecen nuevamente el día 14. A la vez, se destaca que la actividad es básicamente diurna, fundamentalmente durante la pleamar. La comparación de los periodogramas de la actividad con el del patrón de mareas, denota que los organismos, a pesar de la interacción de los sincronizadores, siguen sincronizando de forma preferente al patrón de mareas.

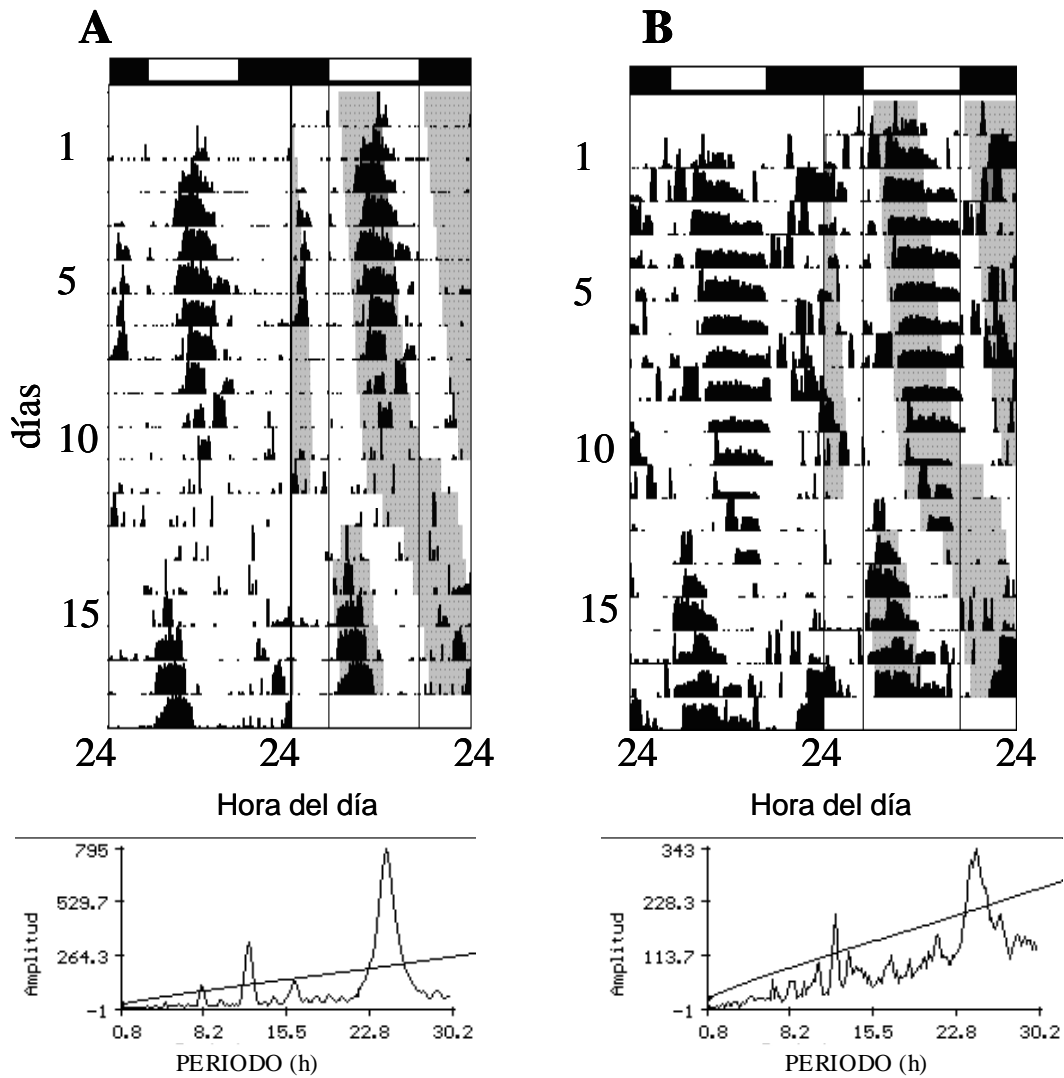


Fig. 7. Actogramas de dos ejemplares de *Uca princeps* expuestos a 3.5 mg N-NH₄⁺/L, en condiciones simultáneas de marea artificial y fotoperiodo 12:12. Debajo cada actograma se presenta el periodograma correspondiente. La línea diagonal en cada periodograma indica el nivel de significancia por X² (p<0.05). En ambos actogramas se puede apreciar que la actividad disminuye a partir del día 10 y parece retomar su nivel original entre el día 14 y 15 de exposición.

6.2.2.3. Grupo expuesto a 18 mg N-AT/L (0.9mg N-NH₃⁺/L)

En la figura 8 se presentan los actogramas y periodogramas correspondientes a dos organismos expuestos a 18 mg N-AT/L. Al igual que en los organismos expuestos a la concentración baja de amonio, la exposición a la concentración alta de amonio (18 mg N-AT/L) modificó las características del ritmo locomotor de *Uca princeps* pero con un mayor aumento en la intensidad de la actividad; la actividad de los cangrejos se mantiene durante toda la marea alta y en ocasiones se prolonga por un corto periodo en la marea baja, los valores promedio de α y ρ fueron de 6.58 ± 1.6 h y de 8.84 ± 4.8 h respectivamente. El efecto de la interacción de los sincronizadores se vuelve a presentar, y aunque la actividad se presenta en su mayoría en las horas de luz, esta no se encuentra tan restringida a estas horas como en el experimento anterior sino que también se presenta actividad nocturna. Asimismo, la actividad sigue sincronizada al ciclo de mareas. La relación de fase mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con el grupo testigo, mas no con el primer grupo experimental, con un valor de ψ de -0.65 h con respecto al inicio de la marea diurna y de -0.77 h con respecto a la nocturna, a diferencia de las 6.7 y 6.04 h del grupo testigo. El mismo comportamiento del anterior grupo experimental, es decir, la reducción de actividad cuando existe una coincidencia entre la marea alta y el inicio del periodo de oscuridad se vuelve a presentar, en la figura 8 se observa que a partir del día 12 en el actograma A se reducen los niveles de actividad, aunque en esta ocasión la actividad no se restituye, en el actograma B parece ocurrir lo mismo, pero los artefactos no permiten asegurarlo. A la vez, destaca que la actividad es más intensa en las horas de luz, fundamentalmente durante la pleamar.

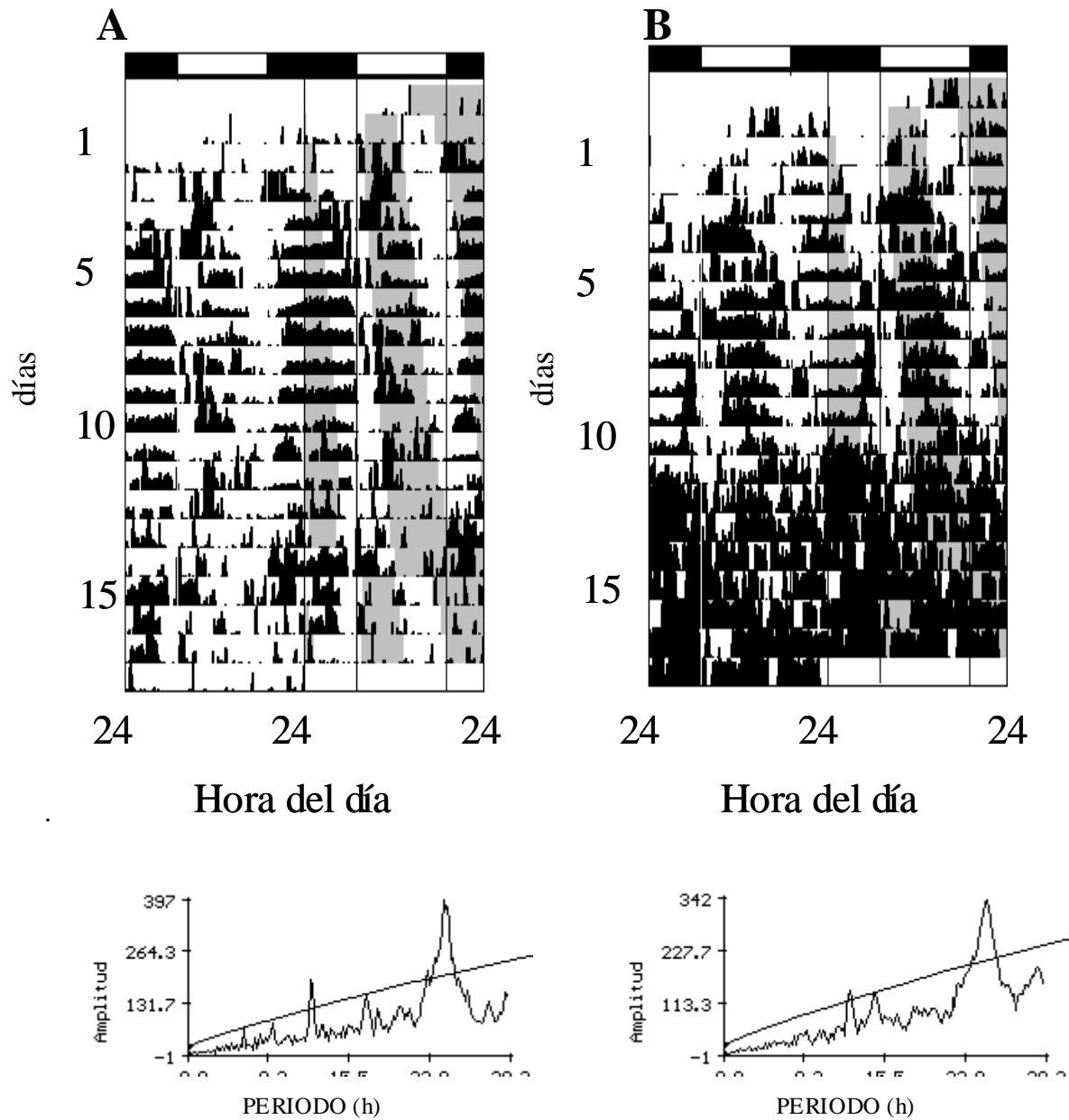


Fig8. Actogramas de dos ejemplares de *Uca princeps* expuestos a 18 mg N-AT/L, en condiciones simultáneas de marea artificial y fotoperiodo 12:12. Debajo de cada actograma se presenta el periodograma correspondiente. La línea diagonal en cada periodograma indica el nivel de significancia por X^2 ($p < 0.05$). Se observa una coordinación relativa, más evidente en el actograma A, donde desaparece la actividad luego del décimo segundo día.

6.2.2.4. Efecto del amonio en los niveles de actividad

Las variaciones de la actividad de *Uca princeps* expuestos al amonio cuantificadas mediante el análisis diario de alfa (α) y rho (ρ), se visualiza en la figura 9. En el grupo testigo, la duración de cada grupo de actividad del ritmo bimodal muestra un valor promedio de 4.61h, el cual aumenta a 6.15 ± 0.59 h y 6.58 ± 0.65 h en los cangrejos expuestos a 3.8 y 18 mg N-AT/L, respectivamente. Si bien los niveles promedio de la actividad entre los distintos grupos no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$), existe una tendencia de incremento conforme aumenta la concentración de amonio en el agua.

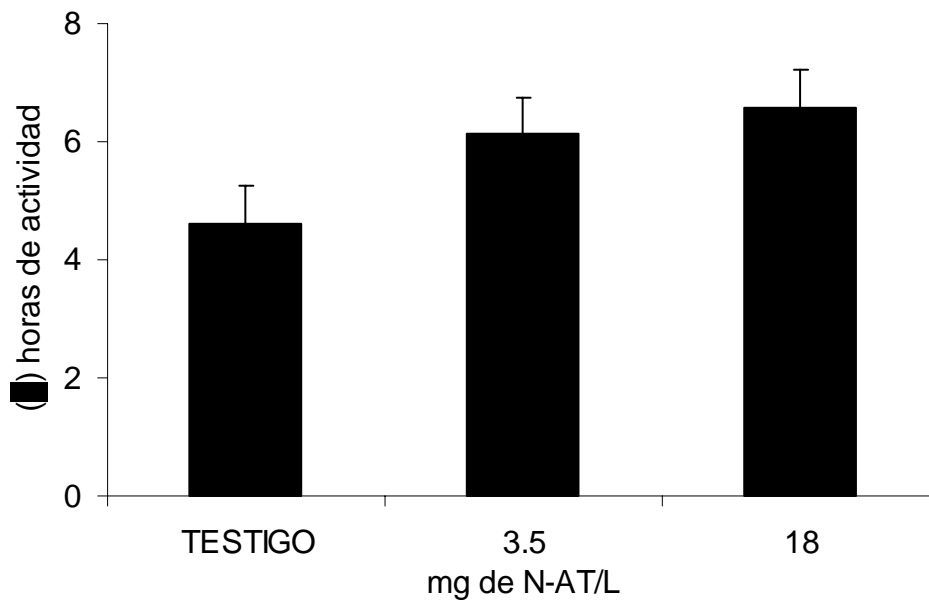


Fig. 9. Actividad cuantificada mediante el análisis diario de alfa, en *Uca princeps* expuestos al amonio (mg N-AT/L). Se grafican valores promedio y de desviación estándar de la duración de la fase de actividad (α).

6.2.2.5. Efecto del amonio sobre la sincronización a los ciclos artificiales de luz y mareas.

En ninguno de los grupos estudiados, se presentó falta de sincronización a los ciclos artificiales de mareas ni preferencia de sincronización a los ciclos de luz y oscuridad; sin embargo, en los grupos expuestos al amonio, el fotoperiodo marcó una coordinación relativa de la actividad entre ambos sincronizadores, lo que produjo un descenso de la actividad cuando hubo coincidencia de la pleamar diurna con el inicio de la fase oscura del fotoperiodo. Es importante notar que en ningún caso el ritmo se ajustó al valor del fotoperiodo, aun cuando este se encontraba presente.

6.2.2.6. Efecto del amonio sobre la relación de fase entre el ciclo de mareas y el inicio de actividad

Una respuesta clara de los cangrejos al ser expuestos a las distintas concentraciones de amonio, fue el desplazamiento de la fase de inicio de actividad en relación al patrón de mareas ($p < 0.05$), comportamiento que se observa en la figura 10 donde se señalan valores promedio de la hora de inicio de actividad con respecto al inicio de la marea alta, tanto para la pleamar nocturna como la diurna. Como se mencionó anteriormente, el grupo testigo muestra un inicio de actividad en la bajamar, mientras que los dos grupos expuestos al amonio la presentan típicamente alrededor del inicio de la pleamar. Los valores numéricos en la figura denotan los grupos entre los cuales se observaron las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) mediante el análisis de t-Student.

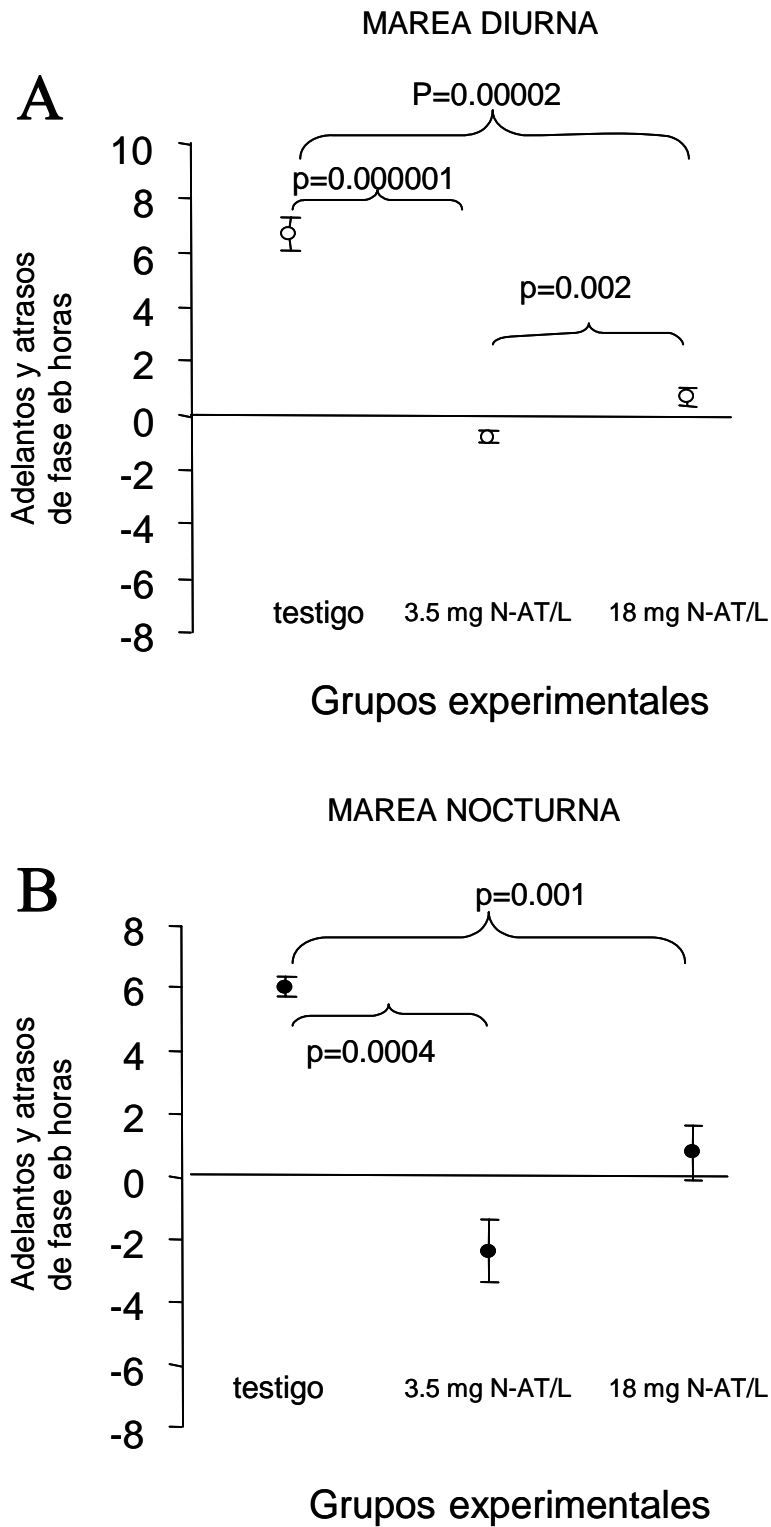


Fig.10. Las graficas muestran el valor de ψ en la relación de fase con respecto a la marea diurna (A) y la nocturna (B). Las llaves en ambas figuras muestran el valor asignado a p , mediante el análisis de t-Student, las diferencias, en todos los casos que se muestran las diferencias fueron significativas.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad aguda del amonio en adultos de *Uca princeps* expuestos por 24 h, tomando en consideración el aumento y disminución de las concentraciones de amonio en el medio natural, particularmente en sus “madrigueras”, proceso que tiene un periodo de al menos 24 h por el recambio natural del agua producida por las mareas, cuando la luna se encuentra en cuarto menguante o creciente.

Los valores de la CL50-24 h obtenidos en el presente estudio, de 186.02 mg N-AT/L (correspondientes a 176.12 mg N-NH₄⁺/L y 9.89 mg N-NH₃/L) fueron menores a los reportados por Rebelo *et al.* (1999) en el cangrejo estuarino *Chasmagnathus granulata*, de Brasil, con valores de CL50-96 h de 249 y 196 mg NH₄⁺/L, evaluados en salinidades de 20 y 40 ups, respectivamente. Los resultados obtenidos sugieren que, aun cuando ambas especies son similares en cuanto al hábitat, *U. princeps* es más sensible al efecto tóxico del amonio. Es entonces de interés realizar estudios de toxicidad similares en otras especies de crustáceos que comparten hábitats similares, valorando a la vez la variabilidad de parámetros ambientales propias del sistema como la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto así como la interacción de otros compuestos nitrogenados relacionados, como el nitrito y el nitrato.

Las concentraciones subletales de amonio utilizadas para evaluar el efecto del compuesto en las características del ritmo de actividad de cangrejos machos *Uca princeps* se eligieron a partir de los resultados de la CL50-24 h, considerando los valores correspondientes al 2 y 10% del valor de la CL50. Las concentraciones establecidas, de 3.5 y 18 mg N-AT/L (correspondientes a 0.17 y 0.90 mg N-NH₃/L, respectivamente) son niveles que se reportan en el medio natural de *Uca princeps* (Vanegas, com. per.). No obstante, son concentraciones superiores a las establecidas como niveles de seguridad para organismos acuáticos en exposiciones prolongadas, de 0.01-0.02 mg N-NH₃/L y que podrían asociarse con niveles biológicos adversos de este compuesto nitrogenado (Camargo y Alonso, 2006).

En la caracterización del ritmo de la actividad locomotora de *Uca princeps*, el ritmo se logró obtener y mantener por lo menos durante medio ciclo lunar, en organismos tanto en condiciones constantes (oscuridad y sin estímulo de mareas) como con fotoperiodo luz:oscuridad (12:12) y mareas artificiales. De tal manera se pudo corroborar la endogenicidad del ritmo al presentarse en organismos mantenidos en condiciones de oscuridad constante y sin mareas. A la vez, en *Uca princeps* se observó con claridad la anticipación de la fase del inicio de actividad en relación a las mareas, rasgo distintivo en los ritmos biológicos (Pittendrigh, 1982), lo que le confiere un peso importante al presente estudio.

El hecho de que bajo condiciones de laboratorio *U. princeps* sincronice con el ritmo circamareal ante un esquema de dos zeitgebers con distinto periodo, simulando la interacción de estos en la naturaleza, permite afirmar que la especie es un excelente modelo para el estudio de los ritmos circamareales, aún en condiciones de laboratorio. Pese a la distancia geográfica del sitio de colecta, se obtuvieron comportamientos similares a los descritos en estudios con organismos evaluados en condiciones muy similares a las de su hábitat (Palmer, 1997; Stillman y Barnwell, 2004).

Al igual que lo reportado en los cangrejos *Carcinus maenas* y especies del género *Uca* (Naylor 1958; 1960; Palmer 1997; Dunlap; 2004), el ritmo circamareal endógeno de *U. princeps* se amortigua a medida que se incrementa el periodo de aclimatación, lo que impidió desarrollar más experimentos en condiciones de libre curso. No obstante, las condiciones de sincronización a ciclos de luz:oscuridad (12:12) y estímulo de mareas permitieron una observación conductual más detallada.

Es conocido que la relación de fase que existe entre un oscilador biológico y el zeitgeber con el cual se sincroniza, depende en buena medida de la velocidad que presenta el propio oscilador, es decir, que el valor del periodo endógeno es un determinante importante para la relación de fase que establecerá con el sincronizador (Aschoff y Daan, 2000). La característica del periodo puede ser afectada en los ritmos biológicos por modificaciones desde genéticas hasta fisiológicas que intervengan en mecanismos

metabólicos (Moore-Ede, 1982). En el presente trabajo, destaca el hecho de que los animales del grupo testigo, no expuestos al amonio, presentaron una relación de fase con el zeitgeber de las mareas, significativamente diferente a la observada en los organismos expuestos durante 18 y 21 días a niveles subletales del amonio. El que la relación de fase con el zeitgeber sea distinta entre animales expuestos a diferentes concentraciones de amonio, sugiere el efecto indirecto de la toxicidad de este compuesto nitrogenado a distintos niveles fisiológicos y metabólicos.

En *Uca princeps*, el efecto del amonio sobre la capacidad de sincronización entre el ritmo locomotor y las señales de luz y mareas ocasionó adelantos en la relación de fase entre los sincronizadores y el inicio de la actividad. El adelanto de la fase de inicio de actividad en los experimentos con adición de amonio contrasta con lo observado por Grimaldo (2002) que observó disminución de la intensidad de la actividad y retrasos de fase conforme se incrementó la concentración de amonio en *Litopenaeus setiferus*. Esta respuesta, en *Uca princeps* puede obedecer al efecto neurotóxico del amonio aunado a una conducta de escape, cuya intensidad fue mayor a medida que se incrementó la concentración de amonio (movimientos de escape e intentos de subir por las paredes de los acuarios o por las mangueras de aireación y de flujo del agua de los acuarios). El efecto neurotóxico que ocasiona la alteración conductual que regula el ritmo, se presenta de manera similar a como se ha descrito en ratas, donde cambios de fase obedecen a los cambios de sensibilidad al sincronizador (en este caso la luz) a lo largo del día (Dunlap, 2004). No obstante, existen más explicaciones para esto, puede deberse a que el amonio tenga un efecto similar al que ocasionan intensidades elevadas de luz en algunos roedores, desacoplando a dos osciladores internos (splitting), sin embargo es importante mencionar que esto sólo se ha observado bajo condiciones constantes, por lo que el desacoplamiento es únicamente entre los osciladores internos (Aschoff, 1984; DeCoursey, 2004d). Si nos basamos en esta explicación y en la teoría de Naylor sobre el control y la generación de los ritmos circamareales, es posible plantear que el efecto tóxico o neurotóxico del amonio, esta afectando más a un oscilador que a otro, pues la actividad diurna se mantiene en su mayor parte, pero la relación de fase con respecto a las mareas cambia, por lo cual el amonio tendría un efecto mayor sobre el oscilador que se

sincroniza con el patrón de mareas. Un ejemplo claro de desacoplamiento entre osciladores por agentes químicos neurotóxicos, es el presentado por Honma (1986; 1987) quien observó en ratas, que el tratamiento con metanfetaminas ocasiona la aparición de un ritmo extra, proveniente de otro oscilador distinto al del núcleo supraquiasmático; este ritmo se encontraba desacoplado del fotoperiodo, pues se presentaba en libre curso aun cuando ocurría en condiciones de luz oscuridad. Sin embargo, esta explicación sería difícil de comprobar o aplicar para comprender el efecto del amonio en *U. princeps*, pues en las ratas el desacople es total, es decir no existe una relación de fase entre el fotoperiodo y el ritmo, mientras que en *U. princeps* esta relación sí se presenta si bien aún no se comprende bien el control de la ritmicidad en crustáceos o el control de la ritmicidad circamareal; sin embargo, estos son de los pocos trabajos de ritmicidad y farmacología donde se observa un desacoplamiento. Aún así, se puede afirmar que el cambio en la relación de fase da como resultado la pérdida de sincronización entre el ritmo y el sincronizador, lo que ocasiona desajustes en procesos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, conductuales y poblacionales, incluyendo actividad en momentos inadecuados o fatiga en horarios en que normalmente se presenta actividad (Brady, 1979; Dunlap, 2004), lo cual produce que los organismos que presentan el desajuste se encuentren en condiciones desfavorables con los que se encuentran mejor sincronizados. El efecto se incrementa con organismos circamareales con en un medio cambiante y poco predecible.

La interpretación de estos cambios en los patrones conductuales de *Uca princeps* en su medio natural son de una gran complejidad debido a numerosos aspectos que deben ser considerados (Crane, 1975; Newell, 1979; Yanes-Arancibia, 1981; Decoursey, 2004b), por lo cual es difícil saber si los organismos de esta especie en su hábitat, al estar expuestos crónicamente a altas concentraciones de amonio presentan los mismos cambios conductuales que se observaron de forma experimental. En su medio, las concentraciones de amonio son variables debido a que conforme sube y baja la marea las concentraciones de amonio igualmente aumentan y/o disminuyen. Más aun, si bien las concentraciones del amonio se puede elevar más dentro de sus galerías durante la marea alta, las fluctuaciones de las condiciones ambientales, como la temperatura y la salinidad pueden

ocasionar cambios en la proporción amonio-amoniaco, y en consecuencia en el efecto tóxico del amonio; no obstante, durante la marea alta, los productos nitrogenados son “lavados”, “liberándose” los organismos del amonio principalmente en esta etapa. Con ello, se dificulta valorar si en su medio natural *Uca princeps* experimenta alteraciones conductuales por efecto del amonio similares a las obtenidas bajo las condiciones de laboratorio evaluadas. Sin embargo y a pesar de su complejidad es relevante el efectuar observaciones directas en el campo, máxime considerando el incremento en las concentraciones de amonio en los ambientes costeros debido a las actividades antrópicas. Un comportamiento relevante observado en el presente estudio, que no ha sido descrito anteriormente en la literatura de ritmos circamareales, fue la detección de una coordinación relativa registrada durante el cruce de fases de los sincronizadores, cuando la marea alta que se encontraba en la fase de luz, pasaba a la fase de oscuridad, cambiando la relación de fase de la marea con el fotoperiodo pasando del día a la noche subjetiva, ocasionando una disminución en el nivel de actividad de los cangrejos, la actividad volvía a aparecer cuando la marea alta entraba nuevamente en la parte de luz (día subjetivo) del fotoperiodo, lo cual sugiere la coordinación relativa entre los sincronizadores. Este fenómeno solo se observó en los organismos expuestos al amonio, aclarando que este entrecruzamiento de sincronizadores y pérdida pronosticada de las mareas no se presentó durante el registro de los organismos testigo.

La coordinación relativa se refiere a que la sensibilidad de un oscilador circadiano a un agente sincronizador no es siempre la misma; es posible que un sincronizador débil en intensidad tenga efecto sólo en unas fases del ciclo y en otros no (More-ede, 1982, Aschoff, 1984) y tiene un valor biológico importante cuando un organismo se encuentra bajo la presión de dos o más sincronizadores, que desempeñan un papel importante sobre una misma conducta. En el caso de *Uca princeps*, el sincronizador de mayor importancia, parecieran ser las mareas; no obstante, se observó que cuando la marea alta pasa a la fase oscura, la actividad de los organismos pierde intensidad. Este fenómeno se presentó en momentos en que en su medio natural la marea era nula o casi nula, debido al momento del ciclo lunar en el cual se encontraba, lo cual se relacionaría con el periodo del ciclo lunar en que los cangrejos en condiciones naturales no podrían salir de sus galerías a

desempeñar su actividad normal por estar las 24 horas sumergidos. Esto sugiere que los organismos mantienen el comportamiento que tendrían en su medio natural, el cual se presentó a lo largo de los registros testigo y con adición de amonio.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se corroboró la endogenicidad del ritmo locomotor del cangrejo *Uca princeps*, debido a su persistencia en condiciones constantes (oscuridad y sin estímulo de mareas). La ritmicidad se amortigua al incrementarse el periodo de aclimatación de los organismos.

Los registros de la actividad locomotora con sincronizadores artificiales (luz y mareas) demuestran que el principal sincronizador del ritmo locomotor de *U. princeps* son las mareas, lo cual se apoya a la vez por el hecho de que la mayoría de los individuos evaluados presentaron ritmicidad circamareal en condiciones constantes.

El análisis de las características del ritmo de actividad locomotora denotó que niveles subletales de amonio tiene un efecto, tanto cualitativo como cuantitativo, en la relación de fase del ritmo y en la intensidad de la actividad del ritmo de *U. princeps*.

Los cambios en las características del ritmo locomotor de los cangrejos expuestos a niveles subletales de amonio sugieren principalmente un efecto neurotóxico del compuesto nitrogenado, probablemente aunado a un comportamiento de escape.

Este trabajo constituye el primer reporte de la toxicidad aguda del amonio en *Uca princeps*. La CL50-24 h obtenida (186.02 mg N-AT/L) denota que los adultos de la especie son más sensibles al amonio de lo esperado, basado en lo reportado para organismos similares (cangrejos estuarinos).

9. CONSIDERACIONES.

En el presente estudio se generan numerosas interrogantes por lo cual se considera relevante continuar con esta investigación desde el punto de vista toxicológico y cronobiológico. Las preguntas que se consideran relevantes resolver incluyen entre otras: ¿Cuál es el efecto del amonio en los cangrejos dentro de las galerías donde las concentraciones de amonio? ¿Qué tan similares podrían ser los efectos respecto a lo encontrado en la presente investigación? ¿Cuál es el efecto del amonio con adiciones puntuales, esporádicas, sobre el ritmo de la actividad locomotora? ¿Cómo se regula el ritmo de la actividad locomotora circamareal? ¿Es un ritmo biológico verdadero, o es posible que sea algo similar a un enmascaramiento, al cual ciertos organismos tienen afinidad? ¿Qué representa la aparente coordinación relativa que se presenta en este estudio en *Uca princeps* expuestos al amonio? ¿Esta coordinación relativa se presenta también en organismos no expuestos a amonio, si se les presenta las condiciones o señales adecuadas?, ¿Qué significado o implicaciones adaptativas representa esta coordinación relativa? ¿En un sistema tan complejo como un ambiente lagunar-estuarino, como se podría cuantificar el aporte de compuestos nitrogenados por las actividades antropogénicas?

10. GLOSARIO

Alfa (α). Porción de actividad en un ciclo completo de un ritmo.

Amplitud. Intervalo desde el punto de mayor a la menor actividad en un ritmo cualquiera.

Fase. Cualquier momento ó punto en el ciclo de un ritmo, como el inicio de actividad o el punto máximo de actividad.

Frecuencia. El inverso del periodo. Número de veces que se repite el periodo entre unidad de tiempo.

Libre curso. Manifestación del ritmo con periodo endógeno bajo condiciones constantes.

Límite de sincronización. Puntos hasta los cuales un oscilador es capaz de sincronizar, es decir, si sincroniza a un fotoperiodo desde 20 hasta 28 h de duración, las 20 y 28 h serán sus límites de sincronización.

Marcapasos. Región anatómica, localizable y funcional capaz tanto de sostener su propia oscilación, como de sincronizar otros osciladores.

Periodo. Duración de un ciclo del ritmo, desde el momento en que se presenta una fase hasta la reaparición de la misma fase.

Relación de fase (ψ). Diferencia en una fase identificable de un oscilador y otra fase identificable de otro o un momento de un ciclo ambiental.

Rho (ρ). Porción de reposo de un ritmo de actividad.

Tau (τ). Duración de un periodo de un oscilador biológico.

Tiempo circadiano (CT). Valor relativo que se le da a una hora en un ritmo en libre curso; se obtiene dividiendo su duración en libre curso entre 24 horas. El resultado es el valor de una hora circadiana.

Oscilador. Componentes biológicos mínimos necesarios para producir y mantener un ritmo biológico.

10. REFERENCIAS

- Adrich J.C. 1997. Crab clocks sent for recalibration. *Chronobiol. Internat.* 14(4): 435-437.
- Aréchiga H., F. Fernandez-Quiróz, F. Fernandez de Miguel y L. Rodríguez-Sosa. 1992. The circadian sistem of crustacean. *Chronobiol. Internat.* 9: 1-19.
- Armstrong D.A., D. Chippendale., A.W. Knight y J.E. Colt. 1978. Interaction of ionized and unionized ammonia on short-term survival and growth of prawn larvae, *Macrobranchium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 154: 15-31.
- Asschoff J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 11-28.
- Aschoff J. 1984. *Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biologica rhythms.* Plenum press. Londres y Nueva York. 563p.
- Atanassov C.L., C.D. Muller, S. Sarhan, B. Knodgen, G. Rebel y N. Seiler. 1994. Effect of ammonia on endocytosis, cytokine production and lisosomal enzyme activity of a microglial cell line. *Res Immunol.* 145: 277-288.
- Atanassov C.L., C.D. Muller, S. Dumont, G. Rebel, P. Poindron y N. Seiler. 1995. Effect of ammonia on endocytosis and cytokine production by immortalized human microglia and astroglia cells. *Neyrochem. Int.* 27: 15975-15983.
- Batzing. 2002. *Microbiology, an introduction.* Ed Brock Cole. U.S.A. 271-273 y 701-704.
- Bennet, M. F., J. Shriner, y R. A. Brown. 1957. Persistent tidal cycles of spontaneous motor activity in the fiddler crab, *Uca pugnax*. *Biol. Bull.* 112 :267-75.
- Bower C.E. 1978. Ionization of ammonia in seawater: Effects of temperature, pH, and salinity. *J. Fish. Res. Board. Can.* 35: 1012-1016.
- Brady J. 1979. *Biological Clocks.* University of London. The Camelot Press. Southampton, Inglaterra. 61pp.
- Butterworth R.F. 2002. Pathophysiology of hepatic encephalopatya: a new look at ammonia. *Metab. Brain. Dis.* 17: 221-227
- Camargo J.A. y A. Alonso. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environ. Int.* 32: 831-849.
- Cavalli R., E.V. Berghe, P. Lavens, N.T.T. Thuy, M. Wille y P. Sorgeloos. 2000. Ammonia toxicity as driterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Machrobranchium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 125: 333-343.
- Chen J. y S. Lai. 1992. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus japonicus* adolecents exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 102(1): 129-133.
- Chen J. y C. Lin. 1992. Oxigen consuption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles expose to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 102(2): 287-291.
- Chen J., S. Cheng y C. Chen 1994. Changes of haemocyanin, protein and free aminoacid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 109(2): 339-347.
- Chen J. y C. Lin 1995. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* esposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136: 243-255.

- Chen J. 2000. Study on the free aminoacid levels in the hemolymph, gills, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. *Aquat. Toxicol.* 50(1-2): 27-37.
- Chen J. y C Liu. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish. Shellfish Immunol.* 16(3): 321-334.
- Cheng S.Y., C.W. Lee y S. Cheng. 2004. Increased production and excretion of urea in the Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) exposed to combined environments of increased ammonia and nitrite. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47(3): 352-362.
- Contreras A.F. 1997. Efecto de amoníaco/nitrito y temperatura sobre las respuestas fisiológicas de *Ctenopharygodon idella*. Tesis de maestría en ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 45pp.
- Cooper A.J.L. y F. Plum. 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Reviews.* 67(2): 440-519.
- Crane J. 1975. Fiddler crabs of the world. Ocypodidae: Genus *Uca*. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, E.U.A. 736 pp.
- Croll G.A. 2000. An evaluation of lekking behavior in the fiddler crab *Uca spp.* *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 254: 109-121.
- Decoursey P. J. 2004a. Overview of biological timing from unicell to humans. pp.3-26. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- Decoursey P. J. 2004b. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. pp.27-66. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- Decoursey P. J. 2004c. Functional organization of circadian systems in multicellular animals. pp.145-180. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- Decoursey P. J. 2004d. Cell physiology of circadian pacemakers systems in metazoan animals. pp.181-212. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- Durand F., N. Devillers, F.H. Lallier y M Regnault. 2000. Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal crab *Maia squinado* (L.). *comp.. Biochem. Physiol. A.* 127: 259-271.
- Emerson K., R.C. Russo, R.E. Lund y R.V. Thrston. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculation: Effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32:2379-2383.
- Grimaldo S. A., 2002. Actividad locomotora y metabolismo energético en juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea:Decapoda) por efecto del amonio. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias. UNAM, México. 32p.
- Harris R.R., S. Coley y R. McCabe. 2001. Ammonia uptake and its effects on ion regulation in the freshwater crayfish *Pacifastacu leniuscuus*. *J. Comp. Physiol. B.* 171: 681-693.
- Hirschie J. C., J. Elliot, R. Foster, K. Honma y R. Kronauer. 2004. Fundamental properties of circadian rhythms. Pp. 67-106. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- Honma, K., S. Honma y T. Hiroshige. 1986. Disorganization of the rat activity rhythm by chronic treatment with methamphetamine. *Physiol Behav.* 38: 687—695.

- Honma K., S. Honma y T. Hiroshinge. 1987 Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol. Behav.* 40: 767-774.
- INDERENA, PAC, PNUMA, FAO, COI. 1989. Test of the acute lethal toxicity of pollutants to marine fish and invertebrates. Republica de Colombia
- Jobling M. 1994. Fish bioenergetics. Chapman and Hall. London. G.B. 309p.p.
- Mangas-Ramirez E., S.S.S. Sarma y S. Nandini. 2002. Combined effects of algal (*Chlorella vulgaris*) densitu an ammonia concentration on the population dynamics of *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa* (Cladocera). *Ecotoxic. and Enviromen. Saf.* 51: 216-222.
- Marazza D., P.H. Bornens y Y. Le Gal. 1995. Effect of ammonia on survival and adenylate energy charge in the shrimp *Palaemonetes varians*. *Ecotox. Environ.* 34: 103-108
- Molina A.H.R., 1998. Alteraciones fisiológicas en post-larvas de *Penaeus vannamei* (Crustacea:Decapoda) por efecto del amonio. Tesis de Maestria en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 55p
- Moore-Ede M., F.M. Sulzman y C.A. Fuller. 1982. The clocks that time us. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Naylor E., 1958. Tidal and diurnal rhythms of locomotry activity in *Carcinus maenas* (L.). *J. Exp. Biol.* 602-610.
- Naylor E., 1960. Locomotor rhythms in *Carcinus maenas* (L.) from non-tidal conditions. *J. Exp. Biol.* 481-488.
- Naylor E., 1963. Temperature relationships of the locomotor rhythm of *Carcinus*. *J. Exp. Biol.* 40: 669-679.
- Newell R.C. 1979. Biology of Intertidal Animals. Marine Ecology Surveys. Faversham, Kent.
- Page T.L. y J.L. Lamier. 1972. Eintreinment of the circadian locomotor activity rhythm in crayfish. *J. comp. physiol.* 78: 107-120.
- Page T.L. y J.L. Lamier. 1976. Extraretinal photoreception in entrainment of crustaceans circadian rhythms. *Photochem. and photobiol.* 23: 245-251.
- Palmer J.D. 1989. Comparative studies of tidal rhythms. VII. The circalunidian locomotor rhythm of the brackish-water fiddker crab, *Uca minax*. *Mar. Behav. Physiol.* 14: 129-143.
- Palmer J.D. 1997. Dueling hypoteses: circatidial versus circalunidian battle basics. *Chronobiol. Internat.* 14(4): 337-346.
- Palmer J.D. 1997. Dueling hypoteses: circatidial versus circalunidian battle basics. Second engagement. *Chronobiol. Internat.* 14(4): 431-433.
- Racotta I. y R. Hernández Herrera. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 125: 437-443.
- Rebelo M.F., E.A. Santos y J.M. Monserrat. 1999. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulata* (Crustacea:Decapoda) Dana, 1851: accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 122(4): 429-435.
- Rios T.H.E., Efecto en la osmorregulacion de juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Crustacea:Decapoda). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 59p.
- Russo R. C. 1985. Ammonia, nitrite and nitrate. In: Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications. Rand G.M. and S.R., Petrocelli (eds) Hemisphere Publishing Corporation. USA.

- Rodier J. 1981. Análisis de las Aguas, Aguas Naturales, Aguas Residuales, Agua de Mar. Ediciones Omega. Barcelona, España. 1059 pp.
- Rosenberg M.S. 2001. The systematics and taxonomy of fiddler crabs a phylogeny of the genus *Uca*. J. Crust. Biol. 21(3): 839-869.
- Sandeman D.C., R.E. Sandeman y H.G. Covet. 1990. Extraretinal photoreceptors in the brain of crayfish (*Cherax destructor*) J Neurobiol 21(4) 619-629.
- Sarma S.S.S., E. Mangas-Ramirez y S. Nandini. 2003. Effect of ammonia toxicity on the competition among three species of cladocerans (Crustacea:Cladocera). Ecotos. Environ. 55: 227-235.
- Schulz H.D. 2000. Marine geochemistry. Ed Springer. U.S.A. 212-214.
- Shaw J. 1960. The absorption of sodium ions by the crayfish *Astacus pallipes*. Lereboullet III. The effect of other cation in the external solution. J. Exp. Biol.. 37: 548-556.
- Spaargaren D.H. 1990. The effect of environmental ammonia concentrations on the ion exchange of shore crabs, *Carcinus maenas* (L.). Comp. Biochem. Physiol. C. 97(1): 87-91.
- Stillman J.H y F.H. Barnwell. 2004. Relationship of daily and circatidial activity rhythms of the fiddler crab, *Uca princeps*, to the harmonic structure of semidiurnal and mixed tides. Mar. Biol. 144: 473-482.
- Thurman C.L. y Broghammer A.M., 2001. Locomotor activity of the fiddler crab, *Uca subcylindrica* (Stimpson), under artificial illumination. Biological. Rhythm. Research. 32(1): 85-99.
- Thurman C.L. 1998. Locomotor activity of the fiddler crab, *Uca subcylindrica*. Biological Rhythm. Research. 29(2): 179-196.
- Tombes A.S. 1970. An introduction to invertebrate endocrinology. Academic Press. Londres y Nueva York. 217p.
- Weihnrauch D., S. Morris y D.W. Towle. 2004. Ammonia excretion in aquatic and terrestrial crabs. J. Exp. Biol.. 207: 4491-1504.
- Whitfield M. 1974. The hydrolysis of ammonium ions in sea water a theoretical study. J. Mar. Biol.. Ass. U.K. 54: 565-580.
- Williams B.G. 1998. The lack of circadian timing in two intertidal invertebrates and its significance in the circatidial/circalunidian debate. Chronobiol. Internat. 15(3): 205-218.
- Wolfrath B. 1993. Observations on the behaviour of the european crab *Uca tangeri*. Mar. Eco. Prog. Ser. 100: 111-118.
- Yanes-Arancibia. A. 1986. Ecología de la zona costera, análisis de siete tópicos. Ed. AGT. México D.F. 189p.p.
- Young-Lai W.W., M. Charmantier-Daures y G. Charmantier. 1991. Effect of ammonia on survival and osmoregulation in different life stages of the lobster *Homarus americanus*. Mar. Biol. 110: 293-300.
- Zar. J. H. 1999. Biostatistical analysis. Prentice hall. New Jersey. USA. 663p.p.