



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DEL RITMO  
CIRCADIANO DE ACTIVIDAD  
LOCOMOTRIZ Y SU RESPUESTA A  
DISTINTOS TIPOS DE FOTOPERIODOS  
EN LA TORTUGA JUVENIL**

***Trachemys scripta elegans***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**KRISTEL LORENA GOPAR  
CANALES**



**TUTOR**

**Director Dr. Manuel Miranda Anaya**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Agradecimientos

## Agradecimientos

Especialmente, a mi tutor Dr. Manuel Miranda Anaya por su valioso apoyo, por su gran paciencia, por brindarme todo el conocimiento teórico y práctico que soporta este proyecto. Por compartir conmigo muchos logros y apoyarme en proyectos futuros.

A mis padres por el apoyo consistente y su confianza en mí, por la motivación que me dieron durante el desarrollo de mi tesis, y no sólo eso, sino por forjar mi vida con principios fuertes, por ser también mis amigos y mis consejeros.

A mi hermano, que a pesar de que nos vemos poco no dejó de brindarme su amistad, por escucharme siempre, por vivir conmigo mis alegrías y mis tristezas, porque eres la energía paralela de mi ser. Te adoro y te admiro muchísimo. ¡Gracias!.

Al profesor Enrique Moreno Sáenz que no sólo me guió académicamente sino también con su amistad me apoyó y me entusiasmó durante todo el proyecto.

Al Dr. Baltazar Barrera por abrirme las puertas a su laboratorio para realizar todos mis experimentos en su laboratorio, y por compartirme su conocimiento y su opinión certera.

A todos los profesores del Taller de Ritmos Biológicos. A Pili y León, que compartimos muchos ratos gratos como amigos y como compañeros, por sus enseñanzas.

A mis maestros de la carrera que influyeron tanto en mi formación profesional y en el modo en que percibo la Biología y la ciencia: Aquiles Bernal, Raúl Contreras y Baldo.

A Marcos, eres una persona admirable en todo sentido, por todas tus enseñanzas. Y a la familia Flores, con quienes compartí una gran etapa de mi vida, y a quienes considero amigos eternos. ¡Los quiero! Compartí con ustedes toda mi carrera, compartimos una relación hermosa durante esos años tan valiosos, por acompañarme siempre, por enseñarme infinidad de valores, por vivir conmigo millones de momentos, mi infinito agradecimiento siempre.

A mis amigos que les tocó compartir conmigo una serie de momentos de todo tipo. A Adriana por apoyarme tanto, por su confianza, por compartir momentos importantes de mi vida académica y deportiva, por ser mi amiga, por tu honestidad, por tu amistad. A mi carnalita Brenda, que desde siempre ha estado conmigo, que aunque ya no estudiamos

juntas compartimos, y seguro, seguiremos compartiendo muchas vivencias, por tu sencillez, por este lazo tan fuerte que hemos construido juntas, por apoyarme sinceramente.

A mis amigas Mariana y Yaz por todo, por escucharme, por darme su confianza, por regañarme cuando fue preciso, por encaminarme, por acompañarme.

A mis amigos del Taller de Ritmos. Eugenio, que me motivó a entrar al taller y me enseñó, me aconsejó y por ser mi amigo. A Cinth, que compartimos largas horas fuera y dentro del laboratorio, por compartir conmigo su valiosa amistad. A Marichuy por todas las vivencias dentro y fuera del laboratorio, en Atlanta y San Diego, por convivir conmigo siempre alegre, por todo lo que he aprendido contigo.

A quienes, por falta de tiempo, no he recordado; pero ustedes saben quienes son, y que estuvieron conmigo todos estos años de la carrera, por compartir conmigo sucesos inolvidables, por su sencillez y honestidad que se reflejan en mi vida y en mi percepción de las cosas.

A mis abuelas Celia y Adelaida, que siempre fueron y serán la fuerza de mi vida, que las conocí y las viví con toda mi alegría.

## INDICE

<b>1 Introducción .....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>¿Qué es el tiempo y cómo podemos medirlo sin necesidad de un instrumento?.....</i>	<i>2</i>
1.2. Diversidad de Ritmos Biológicos.....	6
1.3. Características generales de un ritmo biológico.....	7
1.4. Características generales de los ritmos circadianos.....	10
1.4.1. a) <i>Libre curso u oscilación espontánea.....</i>	<i>11</i>
1.4.2. b) <i>Compensación de Temperatura .....</i>	<i>14</i>
1.4.3. c) <i>Sincronización en ritmos circadianos.....</i>	<i>15</i>
1.4.3.1. <i>Diferencia de ángulo de fase.....</i>	<i>18</i>
1.4.3.2. <i>Límites de Sincronización.....</i>	<i>20</i>
1.4.3.3. <i>Sincronización discreta .....</i>	<i>21</i>
<i>(fotoperíodos esqueleto y curvas de respuesta de fases)</i>	
1.4.3.4. <i>Curva de Respuesta de Fase.....</i>	<i>22</i>
1.4.3.5. <i>Sincronización Continua.....</i>	<i>23</i>
1.4.3.6. <i>Enmascaramiento .....</i>	<i>26</i>
1.5. Organización del sistema circadiano en reptiles.....	28
1.5.1. <i>Fotorreceptores retinales y extraretinales.....</i>	<i>28</i>
1.5.2. La Pineal como órgano fotorreceptor y como marcapasos.....	30
1.6. Biología general de la tortuga <i>Trachemys scripta elegans</i> .....	31
1.6.1. Descripción morfológica.....	31
1.6.2. Registro fósil.....	31
1.6.3. Hábitat.....	32
1.6.4. Conducta.....	32
1.6.5. Reproducción.....	33
1.6.6. Distribución.....	34
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo general .....	35
2.2. Objetivos particulares.....	35

<b>3.</b>	<b>Justificación.....</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Materiales y método.....</b>	<b>37</b>
4.1.	Obtención y mantenimiento de animales.....	37
5.	Sistema de registro de actividad locomotriz.....	37
6.	Protocolo de condiciones de registro.....	38
6.1.	Análisis de Datos.....	41
<b>7.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>42</b>
7.1.	Sincronización continua (paramétrica) a ciclos LO12:12 .....	42
7.2.	Sincronización discreta (no paramétrica).....	44
7.3.	Efecto de la luz constante sobre el ritmo de actividad locomotriz .....	48
7.4.	Respuesta a fotoperiodo de días cortos LO 6:18 .....	49
7.5.	Respuesta a fotoperiodo de días largos LO 18:6 .....	52
<b>8.</b>	<b>Análisis Integral de Resultados.....</b>	<b>54</b>
8.1.	Variaciones de periodo en libre curso después de cada condición de fotoperíodo.....	54
8.2.	Variación en la relación alfa/rho en cada condición de fotoperíodo .....	55
8.3.	Variaciones en la relación de fase entre los distintos fotoperíodos.....	57
<b>9.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>65</b>

## RESUMEN

El estudio de los ritmos biológicos como un reflejo de la biología conductual de cualquier especie que habita el planeta Tierra es fundamental para conocer y entender la interacción espacial y temporal que existe entre los seres vivos. Con el objetivo de generar mayor conocimiento de los ritmos circadianos en vertebrados no mamíferos y proponer un nuevo modelo de estudio para los ritmos circadianos en reptiles se realizó el presente estudio, titulado “Caracterización del ritmo circadiano de la actividad locomotriz y su respuesta a distintos tipos de fotoperiodos en la tortuga juvenil *Trachemys scripta elegans* (Testudines: Emydidae)”. Gracias a que la mayoría del conocimiento que se ha generado en este campo con reptiles, es resultado de la experimentación con lagartijas, nos atrevimos a probar el protocolo de investigación para mamíferos desarrollado por Jürgen Aschoff en una especie de reptil semiacuática y de agua dulce como lo es *T. scripta*. Los resultados indicaron que la tortuga juvenil de esta especie se adaptó y respondió como se esperó a todas las condiciones de luz a las que fue sometida. El protocolo se desarrolló en 13 individuos juveniles como se indica a continuación: 1) sincronización paramétrica, 2) sincronización no paramétrica, 3) libre curso, 4) luz constante, 5) sincronización a días cortos y 6) sincronización a días largos. Para poder analizar cada una de las condiciones mencionadas de manera crítica, entre cada condición lumínica se aplicó un periodo de oscuridad constante, evitando así, que la condición previa afectase la siguiente.

A pesar de que existen otros ritmos circadianos, el ritmo de actividad locomotriz no necesita de tecnología avanzada, técnicas sofisticadas o material poco accesible para ser descrito. Además los individuos juveniles de *T. scripta* son de fácil cuidado.

De acuerdo al protocolo antes mencionado, la especie tiene una gran capacidad de sincronización a las condiciones establecidas, el ritmo de actividad locomotriz se mostró claramente y se describió exitosamente. En particular, la especie mostró una sincronización completa y que anticipa la llegada de la luz, lo que indicó que es una especie diurna capaz de sincronizar mediante mecanismos continuos y discretos.

Finalmente, *T. scripta* es un buen modelo para describir los ritmos circadianos en tortugas, y el presente estudio ofrece un campo amplio para investigaciones a futuro de la especie.

## **1. Introducción: El estudio de los ritmos biológicos a través de la historia**

**1.1. ¿Qué es el tiempo y cómo podemos medirlo sin necesidad de un instrumento?** Diversos científicos del pasado y del presente trataron de dar una definición más o menos acertada de lo que llamamos *tiempo*, sin embargo, hasta la fecha nadie ha podido concretar un concepto irrefutable. Isaac Newton y Albert Einstein, dos de los más grandes estudiosos de la física, pese a sus intentos no desarrollaron una definición que los convenciera totalmente. Jespersen y Fitz-Randolph llamaron al tiempo un “enigma paradójico” ya que para ellos, el tiempo ocurre siempre pero no ocupa ningún espacio. Puede ser medido pero no ser visto, ni es tangible. A pesar de que el tiempo es un fenómeno que nunca deja de ocurrir nadie lo ha definido satisfactoriamente. Puede gastarse, ahorrarse, desperdiciarse pero nunca puede destruirse ni cambiarse (Revisado en DeCoursey, 2004).

Históricamente el hombre ha expresado su interés por estudiar la interacción que existe entre los seres vivos y los ciclos ambientales, para entender las bases biológicas que les permite medir temporalmente su entorno. Desde sus orígenes, el ser humano se ha percatado de la importancia de conocer los ciclos de la vida y su relación con los ciclos ambientales. Aunque no existen documentos que los indiquen, algunas civilizaciones dejaron indicios de distintos métodos para estimar el tiempo mediante la observación de las estrellas y del sol, y así saber cuando preparar las cosechas. Tal es el caso de las formaciones rocosas que hoy conocemos como Stonehenge en Inglaterra y que sirvieron para detectar ciertos elementos de carácter rítmico en su entorno como son los solsticios de verano. A pesar de que los griegos documentaron observaciones

interesantes de los ritmos del canto de aves o del movimiento de las hojas de las plantas, nunca antes se había considerado que estas respuestas a ciclos ambientales eran más que solo una reacción directa a los ciclos externos. Del siglo IV a.C. existen escritos de Alejandro Magno que se refieren al movimiento diario de hojas y pétalos, Andróstenes, otro griego naturalista, reportó los ritmos diarios de apertura y cierre de las hojas pero asumió que este comportamiento era una respuesta directa a los estímulos ambientales (DeCoursey, 2004).

A pesar de su fascinación por determinar el tiempo exterior, el ser humano aún no podía entender cómo los animales podían calcularlo sin la ayuda de algún instrumento o artificio. Todos los organismos podemos medir el *tiempo* gracias a que poseemos un sistema capaz de precisar el momento de realizar cualquier actividad o proceso, a esta condición o estado se le conoce como cronometría biológica, o en inglés *timing* biológico. Los conceptos de *tiempo*, *timing*, *reloj biológico* y *ritmo biológico* son fundamentales para el estudio de los procesos de ritmicidad biológica en los seres vivos, la disciplina científica que se conoce hoy como Cronobiología (*Cronos* = tiempo, *bios* = vida y *logos* = estudio) comprende el estudio de relojes internos en los organismos que identifican y permiten anticipar eventos o ciclos ambientales con un ritmo y dan lugar a la expresión de una serie de estrategias para poder enfrentar y responder a cambios en su ambiente (Chauvnick, 1960).

Los primeros indicios de la Cronobiología comenzaron en el siglo XVIII con el astrónomo francés Jean Jacques d'Ortus DeMairan, quien mostró un gran interés en los movimientos de las hojas de plantas sensibles a la luz, en particular del género *Mimosa*. DeMairan realizó experimentos en condiciones de oscuridad y observó que el ritmo de

las hojas continuó por varios días a pesar de que no había estímulos ambientales. En el siguiente siglo, el botánico suizo Alphonse de Candolle, demostró que los movimientos de las hojas de *Mimosa* persistieron en oscuridad constante, y no sólo eso, sino que en esas condiciones el ritmo iniciaba antes cada día. Gracias a este experimento se conoció por primera vez el fenómeno de oscilación en *libre curso* (en inglés conocido como *free running*) de los ritmos biológicos (DeMairan, 1729). En 1926 Maynard S. Johnson demostró el libre curso del ritmo de actividad de ratones del género *Peromyscus* y notó que el periodo persiste por varios meses aún cuando los ratones se mantienen en oscuridad. Desafortunadamente sus observaciones tuvieron poca influencia en la época en que fueron hechas (DeCoursey, 2004). Uno de los pioneros de la biología circadiana fue el fisiólogo alemán Erwin Bünning quien comenzó sus estudios en ritmos biológicos en 1928 y al poco tiempo propuso la hipótesis de que los ritmos circadianos tienen un valor adaptativo en los organismos. Publicó la primera evidencia del uso de un reloj biológico para medir el fotoperíodo ambiental; demostró que las plantas y los insectos expresan sus ritmos circadianos a pesar de que sus progenitores se mantienen en condiciones constantes, y concluyó que los ritmos circadianos son una característica que se encuentra en los genes y se puede heredar (Moore-Ede *et al*, 1982). Hacia 1940 surgió otra idea controversial en el campo de la cronobiología; cuando el científico alemán Gustav Kramer estudiaba la migración de las aves, ya que demostró que estos animales requerían de un compás solar para volar hacia el norte en primavera y reflexionó que las aves para poder guiarse en un punto de referencia que está en continuo movimiento deben poseer un reloj biológico (Kramer, 1952). El término de Reloj Biológico reemplazó entonces la vaga noción que se tenía por *ritmo biológico* y se

sugirió la presencia de una estructura o sistema en los organismos fisiológicamente capaz de precisar momentos del día.

En 1960, el estudio de los ritmos tuvo un giro importante, los científicos alemanes Colin S. Pittendrigh y Jürgen Aschoff se convirtieron en los fundadores de la cronobiología moderna, ya que desarrollaron los principios que son clave para el estudio de los relojes biológicos. Ambos investigadores aportaron una gran cantidad de información que hoy en día es la base del entendimiento de la biología de los ritmos que tienen un periodo cercano a un día, también conocidos como ritmos circadianos. En particular, los trabajos de Pittendrigh despertaron; en diferentes laboratorios del mundo, gran interés por estudiar la cronometría biológica por trabajo sobre la eclosión de los huevos de *Drosophila*, (revisado en DeCoursey, 2004).

Algunos investigadores como Woody Hastings de la Northwestern University y su colaboradora Beatrice Sweeney del Scripps Institution of Oceanography se dedicaron a estudiar los ritmos de bioluminiscencia de *Gonyaulax*, un alga unicelular; cuyo ritmo persistía de manera espectacular en condiciones constantes, gracias a esto los científicos notaron que los organismos unicelulares también tienen la capacidad de la ritmicidad circadiana. Gran parte de la investigación que se realizó en los siguientes años del siglo XX, dio lugar a la formación de una comunidad internacional de cronobiólogos que hoy en día constituye la base moderna del estudio de los relojes biológicos.

La Cronobiología tiene el objetivo de entender los mecanismos de ritmicidad biológicos en los ámbitos genético, molecular y celular, por los cuales los organismos expresan la gran variedad de ritmos e interpretar qué papel tiene en el ecosistema de las especies vivientes. El avance conceptual que generó que la ciencia moderna se

interesara por los ritmos biológicos, fue el reconocimiento de que son el resultado de un reloj o sistema biológico cuya función es medir el tiempo (Moore-Ede *et al*, 1982). Concretamente, un reloj biológico tiene tres funciones principales: la primera es iniciar cualquier proceso fisiológico en el momento apropiado del ciclo ambiental, la segunda es medir adecuadamente el transcurso del día y la tercera es estimar la duración del día o la noche (Revisado en Hirsch *et al*, 2004).

## **1.2. Diversidad de Ritmos Biológicos**

Los ritmos pueden ser clasificados de acuerdo a: 1) su frecuencia; 2) el sistema biológico en el cual está siendo observado; 3) el tipo de proceso que genera el ritmo y 4) la función que lleva a cabo ese ritmo (Aschoff, 1981).

De acuerdo a la frecuencia con la que ocurren en un día, los ritmos biológicos se pueden dividir en tres tipos principales: ultradianos, circadianos e infradianos. Los ritmos ultradianos tienen periodos menores a 20 horas, por ejemplo el ritmo de la frecuencia cardíaca y pulmonar. Los ritmos infradianos son aquellos que tienen una frecuencia mayor a la diaria, es decir con un período superior a las 28 horas, estos ritmos están menos documentados, un ejemplo son los ritmos circalunares como el ciclo menstrual de la mujer y los ritmos circanuales como los ciclos de migración e hibernación (DeCoursey, 2004). Por último los ritmos circadianos son aquellos que tienen una frecuencia próxima a la diaria, es decir, entre 20 y 28 horas. La palabra *circadiano*, introducida por Halberg en 1959, proviene del término *circa* (cerca) y *diem* (día) y se refiere a la ligera desviación que tienen estos ritmos respecto a las 24 horas que dura un

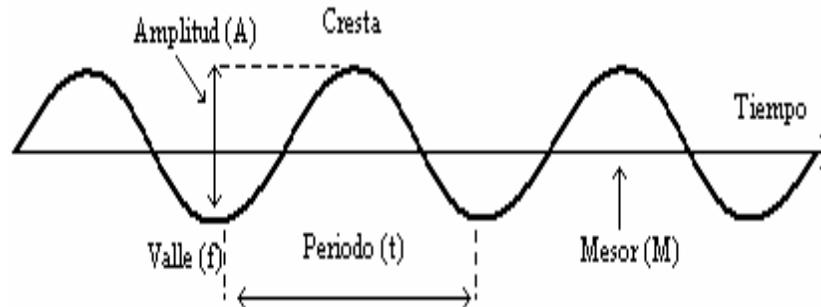
día geofísico, el prefijo *circa* se utilizó al principio para caracterizar únicamente a los ritmos circadianos pero después se adoptó a los otros ritmos endógenos; como los circamareales, circalunares y circanuales (Aschoff, 1965). El prefijo se usa solamente para aquellos ritmos que se encuentran sincronizados a ciclos ambientales y que muestran su propia frecuencia bajo condiciones especiales.

### **1.3. Características generales de un ritmo biológico**

No es lo mismo hablar de un ritmo biológico que de un reloj biológico. Un ritmo biológico se refiere a la actividad biológica observada en condiciones constantes; con un periodo cercano al ciclo ambiental que lo sincroniza en condiciones naturales, por ejemplo, un ritmo biológico de tipo circadiano posee un periodo similar a 24 horas. Un reloj biológico, en cambio, se refiere a la estructura u oscilador que indica el momento en el cual se debe iniciar uno o varios procesos de la misma índole, puede indicar por ejemplo el momento en el cual se debe secretar una enzima específica o una hormona (DeCoursey, 2004; Hirsch *et al*, 2004). Existen distintas características en una oscilación que nos permiten estudiar un ritmo biológico de manera cualitativa y cuantitativa. Una de ellas es el *periodo* de tiempo en el que ocurre. Otra manera de definirlo es por su *frecuencia*, o bien, el número de veces que ocurre el fenómeno en un intervalo de tiempo arbitrario. Cuando el periodo es igual tiempo en que ocurre, la frecuencia del ritmo que se está estudiando es igual a uno. Otra característica de los ritmos es su *amplitud*, la cual define la magnitud de la variación que posee el fenómeno en cuestión, la amplitud se estima generalmente del valor máximo (cresta), al valor mínimo (valle) del ciclo. Una

propiedad importante para describir a los ritmos es el *mesor*, o bien, el promedio de todos los valores observados de un ciclo en estudio (Fig 1).

Para definir la *fase* de un ritmo nos referimos al momento en que ocurre una característica importante dentro del ciclo en estudio, puede ser la cresta o el valle. Al punto característico que fue seleccionado para estimar la fase se le llama *marcador de fase*. Así pues, se puede distinguir entre animales nocturnos y diurnos por la fase en la que el sujeto está despierto y/o activo (Gruart *et al*, 2002).



**Fig.1. Parámetros que caracterizan un ritmo biológico, (tomado de Gruart *et al*, 2002).**

Cuando se quiere comparar la fase de dos ritmos distintos, por ejemplo dos biológicos o uno biológico y otro ambiental, la diferencia entre ellos, cuantificada en unidades de tiempo o grados, se le llama *relación* o *ángulo de fase* ( $\phi$ ). Para medir esta propiedad es necesario normalizar las 24 horas del día a los 360° de un ciclo y si se obtiene una medida con signo negativo nos indica que un evento ocurrió después de la fase de referencia.

Según las condiciones en que se encuentre un organismo, su ritmo biológico, puede presentar cambios en la fase en que ocurre un punto característico o marcador de

fase. Si el cambio consiste en que el marcador de fase se presenta después de lo esperado, se le conoce como *retraso de fase*, y cuando el marcador de fase ocurre antes de lo esperado, al cambio se le conoce como *adelanto de fase*.

A veces pueden ocurrir cambios en la hora en que se presenta un marcador de fase, como una respuesta transitoria a una perturbación ambiental o fisiológica, sin embargo, para considerarlo un cambio de fase es necesario que éste se mantenga de manera estable, lo cual solamente ocurre cuando el reloj subyacente al ritmo se afecta intrínsecamente, ajustándose a la nueva hora.

La secuencia de valores que caracteriza un ciclo de un fenómeno periódico, determina la forma de la función que observamos en la gráfica que representa el ritmo. Sin importar qué ritmo estemos midiendo, lo que se trata de identificar es la función, en una forma que describa procesos periódicos como la función *coseno*. Sin embargo, la mayoría de los casos puede presentar varias subidas y bajadas, por lo que se debe identificar algún patrón que se repita en ciclos sucesivos para usarlo como referencia. Por ejemplo, se habla de ritmos *monofásicos* cuando se puede identificar claramente un solo pico de actividad máxima, o *bifásicos*, cuando se observan dos picos, uno con los valores máximos y otro de intensidad cercana al anterior, o claramente de mayor intensidad que el resto de los valores observados (Gruart *et al*, 2002).

#### 1.4. Características generales de los ritmos circadianos

Hasta la fecha los únicos relojes biológicos que se han podido identificar son los responsables de los ritmos circadianos. Aún no es claro si los relojes responsables de otros ritmos son entidades anatómicas o moleculares, o bien, si son entidades que resultan de procesos funcionales distribuidos en varias estructuras o entidades moleculares en el organismo.

Así, los ritmos circadianos se definen por tres características observables fundamentales:

a) **Son endógenos**, es decir, persisten en condiciones de luz, oscuridad y/o temperatura constantes con un periodo en *libre curso* u *oscilación espontánea* (en inglés *free running*) similar a 24 horas. Para demostrar esta persistencia el ritmo debe ser observado por varios ciclos.

b) **Compensan los cambios de temperatura**. Se refiere a que la longitud del periodo circadiano en *libre curso* de un organismo es muy similar cuando se mide en diferentes temperaturas ambientales.

c) Los ritmos endógenos de aproximadamente 24 horas **pueden ser sincronizados** por distintas señales ambientales, como lo son los ciclos de luz-oscuridad, ciclos de temperatura, u otro estímulo cuyo periodo es igual o cercano a 24 horas (Pittendrigh, 1960).

Es importante entender que el reloj que está llevando a cabo la generación de un ritmo siempre está funcionando, pero si al someter a un organismo a ciertas condiciones observamos que el ritmo “desaparece” o tiene un comportamiento errático no quiere decir

que el reloj ha dejado de funcionar sino que los cambios rítmicos que observamos (las manecillas del reloj) perdieron coordinación o sincronización con el reloj en sí mismo (Moore-Ede *et al*, 1982).

#### **1.4.1. Libre curso u oscilación espontánea**

Debido a que la Tierra siempre ha girado sobre su eje aproximadamente cada 24 horas, aún antes de que apareciera la vida; las plantas y los animales se encuentran expuestos diariamente a patrones de luz y temperatura (sincronizadores) que tienen el mismo periodo. No es sorpresa entonces, descubrir que el comportamiento y el metabolismo de la mayoría de los organismos sigan un horario de 24 horas.

La explicación obvia para aquellos ritmos de 24 horas es que los organismos responden constantemente a los ciclos ambientales que los rodean. La manera que estos afectan un ritmo puede ser comprobada evitando su presencia, es decir, manteniendo constante las condiciones de luz, alimento, temperatura y ruido, etc. Cuando esto pasa el ritmo no desaparece sino que se mantiene con un periodo ligeramente diferente al que ocurría en presencia del sincronizador. En estas circunstancias el ritmo se denomina en *libre curso* o en *oscilación espontánea* y su valor de periodo se denomina  $\tau$  (tau) el cual es muy cercano, pero no igual, a 24 horas, este nos indica que los ritmos circadianos están gobernados por relojes autónomos dentro de los organismos y que no son producto causal de estímulos externos.

El valor del periodo en libre curso varía dependiendo de la especie que se trate, mientras que el periodo individual de cualquier organismo normalmente se encuentra dentro del promedio de su especie y depende del estado fisiológico en el que se encuentre

(Aschoff, 1984). Un ritmo en libre curso no siempre posee el mismo periodo que el fenómeno ambiental que lo puede sincronizar, gracias a esto existe una gama de variación en  $\tau$  entre distintos individuos de una especie, por lo que después de varios ciclos, los sujetos pueden perder sincronización entre sí, aunque para cada individuo el periodo en oscilación libre sea muy preciso. La mayoría de los individuos y de las especies tienen periodos en libre curso alrededor de 23 a 25 horas. Dependiendo de los hábitos que posean será la precisión con la que mantengan el mismo valor durante varios ciclos. Las especies que son diurnas tienden a ser mucho menos precisas que las nocturnas (Aschoff, 1984).

La luz afecta tanto el periodo como la amplitud de los ritmos circadianos. Jürgen Aschoff en 1960, analizó una gran cantidad de estudios en especies nocturnas y diurnas y demostró que el período en libre curso en luz constante está en función de la intensidad lumínica. Aschoff observó que al aumentar la intensidad de la luz el período de los ritmos en libre curso de las especies diurnas se acorta, mientras que en las especies nocturnas se alarga, la magnitud de la actividad es mayor en especies diurnas y en las nocturnas es menor. En diversas especies nocturnas de mamíferos el periodo circadiano es más largo en luz constante que en oscuridad constante y en animales diurnos el periodo en libre curso se acorta o se mantiene igual en luz constante en comparación con la oscuridad constante; esta correlación se le conoce hoy en día como la *regla de Aschoff* (Daan y Pittendrigh, 1976).

El periodo en libre curso no sólo depende de la intensidad lumínica a la cual se encuentran expuestos los organismos, sino también es dependiente de la historia previa, es decir, se ve afectado por la condición lumínica a la cual fue expuesto anteriormente.

Este efecto puede ser claramente observado cuando la intensidad luminosa tiene un cambio de nivel muy marcado.

Los cambios largos y lentos en el periodo del marcapasos son llamados post-efectos. Sólo pueden observarse cuando la intensidad de iluminación cambia de nivel y cuando los animales se registran en oscuridad constante tras haber sido expuestos a algún fotoperiodo en particular (Daan y Pittendrigh, 1976). A pesar de que los periodos en libre curso pueden ser extremadamente precisos día a día, no quiere decir que sean invariables, uno de los factores que afecta de manera directa el periodo de un ritmo circadiano es la historia previa (condición de iluminación) a la cual fue sometido el organismo (Dunlap *et al*, 2004). La exposición a la luz u oscuridad continua puede alterar los patrones conductuales circadianos de manera dramática. Los animales nocturnos pueden mostrar un efecto de partición llamado “*splitting*,” en su actividad locomotriz circadiana, alimentación, patrón de ingesta de agua, etc; cuando se mantienen en luz brillante constante. Esto significa, en términos sencillos que el animal se vuelve activo en dos momentos del día en vez de uno (Daan y Pittendrigh, 1976).

Es importante recalcar el significado que tiene el poseer una oscilación autosostenida, ya que es lo que permite a los organismos anticipar diferentes cambios periódicos en el ambiente, interpretarlos y actuar de acuerdo a sus necesidades como especie.

Uno de los ritmos más estudiados y que está controlado por relojes circadianos es el de actividad locomotriz. Si un organismo nocturno se somete a condiciones de oscuridad constante es probable que manifieste el intervalo de actividad durante la *noche subjetiva* y el intervalo de reposo durante el *día subjetivo* (Gruart *et al*, 2002). Es común

observar que a intensidades de luz muy altas la actividad locomotriz se vuelve arrítmica. Es diferente decir que un ritmo desaparece a que ocurra una desincronización entre la multiplicidad de osciladores cuando se presentan estas condiciones; cuando el ritmo parece desaparecer es porque el oscilador circadiano que lo controla se detuvo (Aschoff, 1984).

#### **1.4.2. Compensación de Temperatura**

La uniformidad o estabilidad que los relojes circadianos poseen día a día se debe a los mecanismos de compensación a la temperatura que tienen. Este proceso es esencial ya que si pequeños cambios en la temperatura los afectara, perderían su periodicidad. La velocidad de los procesos bioquímicos se duplican dos o tres veces por cada 10 °C que aumente la temperatura ( $Q_{10} = 2-3$ ).  $Q_{10}$  es un índice de la dependencia de un proceso a la temperatura, y se calcula como la razón de la proporción de un proceso a una temperatura alta dividida entre la proporción a una temperatura 10° C más baja (Sweeney y Hastings, 1960). Si el reloj circadiano dependiera de cualquier proceso metabólico y si la temperatura ambiental cambiara, el organismo estimaría de manera incorrecta el tiempo y por lo tanto, dejaría de tener un significado adaptativo (Moore-Ede *et al*, 1982).

Cuando se dice que el periodo en libre curso posee una compensación a la temperatura significa que si la temperatura ambiental varía un poco, el periodo del ritmo se mantiene. Si esto no ocurriese, el reloj no serviría como un marcapasos. Cuando la compensación a la temperatura ocurre, el periodo se mantiene, pero la fase

del reloj puede modificarse por transiciones en la temperatura. Sin esta compensación, el reloj del organismo podría alterarse si fuera sincronizado a un día cálido seguido por un día frío así la fase del ciclo de temperatura sería la misma y por lo tanto el periodo del reloj sería muy corto en el primer día (cálido) y muy lento en el segundo (frío). La fase del marcapasos circadiano sería diferente de un día a otro debido a la diferencia en la temperatura y además el ángulo de fase no se conservaría (Sweeney y Hastings, 1960).

Los primeros estudios de compensación de  $\tau$  respecto a la temperatura ambiental fueron demostrados en el ritmo de eclosión de *Drosophila*. Sin embargo, la mayoría de los organismos hasta ahora estudiados también muestran una dependencia muy leve de  $\tau$  de la temperatura, con valores de  $Q_{10}$  muy cercanos a 1 (Aschoff, 1984).

### **1.4.3. Sincronización de los ritmos circadianos**

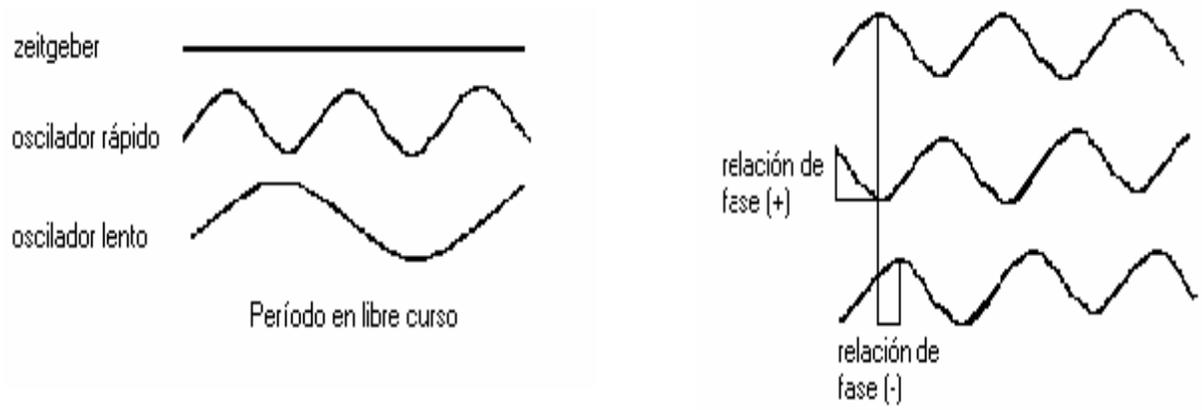
La estabilidad en la duración del periodo de un ritmo circadiano está directamente relacionada con la luminosidad y la temperatura durante el día y la noche. Tales señales ambientales permiten que cada día, mes o año, se ajuste el periodo y la fase de los ritmos biológicos, a este fenómeno se le llama *sincronización* (Gruart *et al*, 2002). El efecto neto de un sincronizador es un cambio en el periodo ( $\tau$ ) del oscilador circadiano (o marcapasos) o bien la diferencia del periodo externo  $T - \tau$  (Pittendrigh, 1981).

La sincronización da lugar al ajuste de la frecuencia y la fase de los ritmos biológicos con los ciclos que son consecuencia de la rotación de la Tierra. Es solo gracias a este proceso, que la conducta y la fisiología generada por los sistemas circadianos endógenos pueden ocurrir de manera apropiada en el tiempo. La

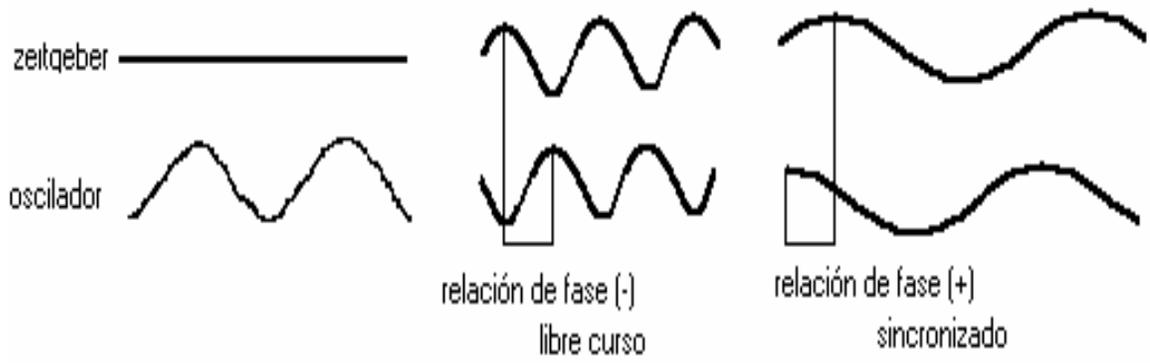
sincronización requiere de la sensibilidad de osciladores endógenos tanto a ciertas señales ambientales como la insensibilidad a otras. La sensibilidad a la luz ha sido, y continúa siendo, la señal primaria para probar y entender la fisiología de los sistemas circadianos (Aschoff, 1981). Los estímulos ambientales capaces de sincronizar o ajustar diariamente el ritmo de un individuo a los cambios del ciclo ambiental o externo se les conoce como *sincronizadores* o *zeitgebers* (**T**), que significa en alemán “dador de tiempo” (Halberg, 1977). Como ya se ha mencionado, los ritmos circadianos poseen un valor de período similar a 24 horas ( $\tau$ ) y se pueden sincronizar a los ritmos ambientales que posean un periodo semejante a 24 horas, como son los ciclos de luz y de temperatura, tales ajustes se logran alargando o acortando su valor de periodo para igualarlo al del ciclo ambiental, de manera que  $t = T$  (Pittendrigh, 1981; Aschoff, 1981; Brady, 1969), gracias a esto pueden ser observados en el laboratorio sin necesidad de técnicas muy sofisticadas, por lo mismo son los ritmos que más se han estudiado. Cuando la sincronización ocurre, el sistema adopta una relación de fase ( $\phi$ ) específica con el *zeitgeber* (Aschoff, 1981).

Durante la sincronización la diferencia en el ángulo de fase ( $\psi$ ) entre el ritmo y el *zeitgeber* depende de: 1) las propiedades del *zeitgeber* y 2) de la capacidad de responder del sistema circadiano a las señales de sincronización del *zeitgeber*. Por ello la mayor determinante para  $\psi$  es la diferencia entre el periodo  $\tau$  en libre curso del ritmo y el periodo  $T$  del *zeitgeber* (Ashoff, 1960).

Cuando un ritmo lento y uno rápido están sincronizados con el mismo *zeitgeber*, el rápido se adelanta a la fase del *zeitgeber* ( $\psi$  positivo) y el lento se retrasa ( $\psi$  negativo) (Fig.2A). Cuando un ritmo de frecuencia media se sincroniza con un *zeitgeber* de mayor frecuencia hay un  $\psi$  negativo y con uno de menor frecuencia un  $\psi$  positivo (Fig.2B).



**Fig. 2A. Sincronización de dos oscilaciones, una lenta y una rápida, por el mismo *zeitgeber*.**



**Fig. 2B. La sincronización de una oscilación por *zeitgebers* de alta o baja frecuencia.**

*(copiado de Aschoff, 1981).*

### 1.4.3.1. Diferencia de ángulo de fase

La relación de fase entre un ritmo circadiano y un *zeitgeber* puede ser descrita seleccionando ángulos de fase de manera arbitraria para ambos. La relación para el ritmo se connota con el signo  $\phi$  mientras que para el *zeitgeber* se usa el signo  $\Phi$ . En un ritmo de actividad  $\phi$  es el momento de inicio o final de actividad, o el punto medio entre estos. La diferencia de ángulo de fase ( $\psi = \Phi - \phi$ ) describe la diferencia en tiempo entre las referencias de fase del *zeitgeber* y el ritmo. Cuando  $\psi$  es positivo significa que  $\phi$  guía a  $\Phi$  y si es negativo entonces  $\phi$  retrasa a  $\Phi$ .

En estado estable, la diferencia del ángulo de fase depende de: 1) las propiedades del *zeitgeber* y 2) de la capacidad de respuesta del sistema circadiano al *zeitgeber*. Estos factores en conjunto reflejan la “fuerza” del sincronizador (Aschoff, 1960). La relación entre  $\psi$  y  $T$  y el rango de sincronización reflejan la sensibilidad del sistema circadiano al *zeitgeber* (Daan y Aschoff, 2001).

Los *zeitgebers* no son exclusivamente la luz y la temperatura, se han propuesto otros fenómenos geofísicos como sincronizadores; como el magnetismo terrestre, las radiaciones cósmicas y los campos electromagnéticos débiles; así como otros fenómenos que dependen de otros organismos y que también pueden sincronizar un ritmo, entre los más estudiados están la disponibilidad del alimento y las interacciones sociales entre individuos.

La demostración experimental de la sincronización requiere en primer lugar, que el ritmo biológico en estudio sea observado tanto en presencia como en ausencia del *zeitgeber*. En presencia de este, el periodo debe ser idéntico al mismo, en su ausencia debe ser diferente.

El segundo criterio de la sincronización es que la oscilación circadiana en presencia del sincronizador mantiene una sola relación de fase con éste. Y por último, para la sincronización es necesario que las variables ambientales tengan efectos directos en la manifestación de los sistemas circadianos, lo cual a su vez puede mimetizar el proceso de sincronización. Estos efectos se conocen como enmascaramiento *o masking*. La sincronización se distingue del enmascaramiento primero porque la fase de un ritmo endógeno sincronizado usualmente se caracteriza por una anticipación al *zeitgeber*. En segundo, la re-sincronización después de un episodio de libre curso o después de un cambio de fase del *zeitgeber*, se caracteriza por un periodo de ciclos transitorios antes de volver a alcanzar un estado estable de sincronización. Y tercero, el libre curso en condiciones constantes después de la sincronización empezaría a un momento del día determinado por el *zeitgeber* previo. En cualquier protocolo de sincronización es recomendable que la fase de la oscilación circadiana endógena se compruebe en condiciones constantes después de haberse expuesto en cualquier *zeitgeber* (Aschoff, 1981).

Sin la sincronización, el organismo no podría ajustar sus funciones ante los cambios que ocurren en el ambiente, lo cual indica una plasticidad en los programas temporales de los organismos, y confiere una gran relevancia adaptativa a los ritmos biológicos (Aschoff, 1960).

### 1.4.3.2. Límites de Sincronización

Un *zeitgeber* con un periodo  $T$  sincroniza un ritmo circadiano de manera que su longitud de ciclo en un estado estable sea igual a  $T$ . Aunque esto no significa que la sincronización puede ser alcanzada en todos los valores de  $T$ . Por ejemplo, un organismo puede sincronizar a diferentes longitudes de periodo pero puede no hacerlo en otras. Esto significa que existe un rango de sincronización o bien un rango limitado de valores de  $T$  alrededor del periodo circadiano  $\tau$  en donde la sincronización es posible. Dentro de este rango, existe una variación en la posición de fase relativa al *zeitgeber*.

Cuando el periodo del *zeitgeber* está fuera del rango de sincronización no debería presentarse ninguna influencia visible en el ritmo circadiano en estudio. Los efectos más notorios son con aquellos cuyo  $T$  es cercano a  $\tau/2$  en los cuales hay una sincronización completa, pero no con longitud de periodo igual a  $2T$ . A pesar de que no ocurra la sincronización un *zeitgeber* puede ejercer una influencia periódica. Esto conlleva a oscilaciones lentas o pulsos, en donde el *zeitgeber* acelera el ritmo biológico cuando coincide con una fase particular de éste y lo frena cuando coincide con otra. La interferencia oscilatoria del *zeitgeber* y del ritmo es llamada *coordinación relativa* (Aschoff, 1981).

Como se ha mencionado las oscilaciones autosostenidas pueden ser sincronizadas a periodos que se desvían de su propio periodo “natural” con ciertos límites. Estas frecuencias limitantes forman lo que se conoce como *rango de sincronización* (Klotter, 1960). El tamaño de este rango aumenta con la fuerza del *zeitgeber* y también depende del “grado de persistencia” (Klotter, 1960) de autosustentabilidad del sistema circadiano. De una amplia variedad de rangos de

sincronización obtenidos por Aschoff y Phol en 1978 en vertebrados, se concluyó que los rangos de sincronización son: 1) relativamente pequeños en vertebrados (no más de 10 horas), más largos en insectos (alrededor de 20 hrs.) y alcanzan valores extremos en plantas y organismos unicelulares; y 2) mientras más largo sea el rango de sincronización, más pequeño es el cambio en  $\psi$  por 1 h de cambio en el periodo del *zeitgeber* (Aschoff, 1984). Los rangos secundarios de sincronización o bien más pequeños ocurren cerca de valores de T que están cerca de múltiplos y submúltiplos de  $\tau$ , a esto se le conoce como *sincronización por demultiplicación*. No se puede medir con precisión el rango de sincronización; ya que ocurre cerca de los límites del rango, en donde la sincronización se vuelve inestable y resultando en fluctuaciones periódicas de  $\tau$  o la llamada *sincronización relativa* (Wever, 1972).

#### **1.4.3.3. Sincronización discreta (fotoperíodos esqueleto y curva de respuesta de fase)**

La forma en que se lleva a cabo la sincronización a ciclos de luz consiste en dos protocolos generales y que se utilizan para describir qué partes de un ciclo luz-oscuridad (LO) son los que proveen de señales que sincronizan un ritmo. Por ejemplo el apagado de la luz puede ser la fase principal que determine el patrón representado por el ritmo, o pudiera ser el encendido. Considerando esto se puede predecir que solo señales discretas afectan el ritmo vía lo que se conoce como *sincronización no paramétrica* o discreta. Para llevar a cabo una sincronización discreta se dan pulsos de luz de corta duración en el inicio del día subjetivo y noche subjetiva del organismo, de esta manera podemos observar si su reloj biológico es capaz de sincronizarse y anticipar la llegada de la luz.

La teoría fue desarrollada para generar predicciones en ciclos artificiales de LO compuestos por dos periodos cortos de luz por ciclo. Estos pulsos deben estar separados por un intervalo de oscuridad, por ejemplo LO 12:12 (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Los fotoperiodos esqueleto son de interés debido a que pueden dar puntos clave del modo de sincronización en largos fotoperiodos de diferente duración (Pittendrigh y Minus, 1964). Además, se pueden estudiar los ritmos biológicos desde el punto de vista de la sincronización real y sin enmascaramiento (Strubbe *et al*, 1986).

La sincronización estable por fotoperíodo esqueleto se basa esencialmente en el criterio de que  $\Delta\phi_1 + \Delta\phi_2 = \tau - T$ , en donde  $\Delta\phi_1$  y  $\Delta\phi_2$  son los cambios de fase sucesivos causados por los dos pulsos que definen el esqueleto.

En este tipo de sincronización también se utilizan las curvas de respuesta de fases, que incluye una zona de atrasos (noche subjetiva temprana) y una de avances (noche subjetiva tardía) y una sin cambios o zona muerta durante el día subjetivo (Aschoff, 1984).

#### **1.4.3.4. Curva de Respuesta de Fase**

Si se observa un ritmo en libre curso durante un tiempo suficiente se podría predecir cuándo ocurrirá el marcador de fase. Para ello se necesita conocer previamente el periodo del ritmo, así como la fase en la que se presentó el marcador de fase en el ciclo anterior. El momento en el que inicia la actividad de un ritmo circadiano en libre curso se le conoce como *hora circadiana 12* (CT12). Así pues, la CT12 marca el inicio de la noche subjetiva y esta se extiende hasta CT24; mientras que el día subjetivo se extiende desde CT0 hasta CT12 (Gruart *et al*, 2002). Cuando a un sujeto que presenta

un ritmo en libre curso se le aplica un estímulo sincronizador adecuado, el ritmo del sujeto puede responder de tres maneras: a) que el ritmo en libre curso no se altere, y por lo tanto que el marcador de fase ocurra a la hora prevista, b) que ocurra un retraso de fase y que el marcador de fase se presente después de lo previsto o c) que se presente un adelanto de fase y el marcador de fase se presente antes de lo previsto. El tipo de respuesta y la magnitud con que se presente dependerá de la fase en la que haya ocurrido el estímulo, los datos obtenidos pueden ser estudiados en lo que se conoce como *curva de respuesta de fase* (CRF) la cual muestra, en el eje de las ordenadas, las respuestas o cambios de fase provocados por la aplicación del estímulo en diferentes momentos de un ciclo circadiano, cuyos valores se representan en el eje de las abscisas (Pittendrigh, 1960). La aplicación de estímulos de un sincronizador sobre los ritmos en libre curso permite inferir las propiedades de los relojes circadianos subyacentes a dichos ritmos, mientras que evita el efecto de la luz sobre el periodo del reloj. Con esta técnica Pittendrigh caracterizó las tres zonas de la CRF (descritas anteriormente por Ashoff en 1984) y observó que estas eran similares en todas las especies que estudió, hasta la fecha todas las especies estudiadas tienen curvas de respuesta de fase con características similares lo cual apoya la idea de que los ritmos circadianos se originaron con la vida (Gruart *et al*, 2002).

#### **1.4.3.5. Sincronización Continua**

Cuando se habla de *sincronización continua* o *paramétrica* se refiere a una acción o efecto continuo del zeitgeber en la velocidad angular del oscilador circadiano, por lo que se pueden utilizar fotoperiodos completos de luz- oscuridad. Los efectos de la

sincronización paramétrica se reflejan claramente en la dependencia del periodo en libre curso con la intensidad de la iluminación continua. Como fue observado por M.S Johnson en 1939,  $\tau$  se alarga en roedores nocturnos cuando están en luz constante y se acorta cuando están en oscuridad constante. De hecho, en aves diurnas  $\tau$  decrece en luz constante. Los patrones que se fueron descubriendo en cuanto al  $\tau$  respecto a la intensidad luminosa fueron suficientes para generalizarse en muchas especies diurnas y nocturnas. Sin embargo algunos grupos taxonómicos, como mamíferos diurnos y artrópodos parecen no seguir esta regla (Aschoff, 1979). No obstante, en la mayoría de las especies, se estableció un efecto paramétrico de la luz en la velocidad del sistema circadiano. En la mayoría, la luz constante de alta intensidad conduce a la desaparición de ritmicidad, de manera que se ha sugerido que la dependencia de  $\tau$  con la intensidad luminosa es el efecto neto de la aceleración y desaceleración de la velocidad angular del marcapasos (Daan y Pittendrigh, 1976).

Una descripción más detallada para el entendimiento de la sincronización fue descrita por C.S. Pittendrigh, quien en esencia, siguió un protocolo en dos pasos. Primero, la sensibilidad del sistema circadiano puede ser comprobada mediante la administración de pulsos breves de luz a diferentes fases durante la oscuridad constante y se miden los cambios de fase que ocurran. Después se aplica una serie de pulsos idénticos que en conjunto constituyen un zeitgeber, esto pone a prueba la hipótesis de que cada pulso produce un cambio de fase de acuerdo a la fase circadiana. Si esta hipótesis es correcta debería ser posible predecir el momento en que el marcapasos cambia de fase en cualquier protocolo de luz (Pittendrigh, 1981).

Los efectos paramétricos de la luz en los sistemas circadianos son claramente reflejados en la dependencia con la intensidad de la iluminación continua de los periodos en libre curso. Aunque no se concibe una generalización para todos los animales diurnos y nocturnos, se ha observado que en la mayoría de las especies existe un efecto paramétrico de la luz en la velocidad del sistema circadiano. En muchas especies, altas intensidades de luz constante conllevan a la desaparición del ritmo en cuestión. Existen ciertas evidencias de que la magnitud del efecto de la iluminación, está asociada con la curva de respuesta de fase que se genera con pulsos breves de luz. Los animales nocturnos con una sección de retraso relativamente larga en su curva de respuesta de fase, muestran un gran aumento de  $\tau$  con el aumento de la intensidad luminosa y las especies con una sección de retraso pequeña muestran poco efecto paramétrico (Daan y Pittendrigh, 1976).

Los efectos paramétricos en el sistema circadiano parecen generar una CRF más indicada para predecir la sincronización por fotoperiodos completos. La cual describe la respuesta de fase a transiciones individuales de oscuridad a luz y de luz a oscuridad, sugiriendo que la transición tiene efectos de espejo. Los pasos hacia la luz generan en su mayoría retrasos de fase y hacia la oscuridad adelantos de fase.

Para un mejor entendimiento de la sincronización en la naturaleza, debemos suponer que el apagado y encendido inmediato de la luz aplicada en la mayoría de los experimentos es una pobre imitación de las señales naturales del atardecer y el amanecer. Las transiciones son mucho más lentas, particularmente en las áreas polares de la Tierra. Las consecuencias de transiciones naturales que ocurren entre el paso de luz a oscuridad y viceversa no han recibido la suficiente atención en los estudios de sincronización. Sin

embargo, el significado de la duración de la transición para el proceso de sincronización ha sido claramente demostrado (Aschoff y Weaver, 1967; Weaver, 1972; Boulos *et al*, 1994).

#### **1.4.3.6. Enmascaramiento**

Los *zeitgebers* no solamente sincronizan a los ritmos circadianos controlando la fase y periodo del marcapasos, también enmascaran el ritmo en general (Aschoff, 1999). El fenómeno de enmascaramiento es aquel en el cual un *zeitgeber*, interfiere directamente con la expresión de un ritmo y no con su marcapaso (revisado en Dunlap *et al*, 2004).

Uno de los criterios para demostrar la sincronización real de un ritmo se observa en el libre curso que se manifiesta en la post-sincronización del mismo. Ante un ciclo ambiental determinado uno esperaría que el libre curso del ritmo inicie en la fase determinada por el *zeitgeber*, sin embargo, existe la posibilidad de que el estímulo ambiental tenga una fuerte influencia exógena en el ritmo en medición y en realidad no haya un efecto neto en el mecanismo del reloj. Por lo tanto el marcapasos continuará en un libre curso durante una sincronización aparente o bien enmascarada por los efectos del ciclo ambiental. Bajo estas circunstancias no existe una relación entre la fase aparente del ritmo durante la sincronización y la fase a la cual el libre curso subsecuente empieza (Aschoff, 1960).

El enmascaramiento, en primer lugar, oscurece el comportamiento del marcapasos, pero eventualmente tiene influencia en la fase del mismo a través de una vía indirecta (Aschoff, 1979). Y en segundo lugar, es un fenómeno en el cual un factor

externo interfiere no solo con la expresión de un ritmo o con la observación del comportamiento del marcapasos, sino que, afecta directamente la expresión del ritmo. Podemos decir entonces que todo lo que interfiera con la entrada y salida del ritmo afecta o puede enmascarar el estado verdadero del oscilador. Esto puede originar una serie de mediciones incorrectas acerca de un ritmo (DeCoursey, 2004).

Un ejemplo claro es cuando se mide el ritmo de actividad locomotriz de un animal homeotermo en condiciones de luz-oscuridad y el ambiente en el que se encuentra fluctúa mucho en temperatura, aunque el animal es capaz de regular su temperatura de manera endógena su actividad locomotriz puede aumentar si la temperatura baja precipitadamente o viceversa, si la temperatura aumenta el animal buscará estar lo más quieto posible. Una vez que la temperatura ambiental se restablece en el promedio el ritmo de actividad locomotriz tendrá la fase del fotoperiodo con la que inicialmente estaba sincronizado. Al analizar los datos debemos tomar en cuenta que habrá zonas de actividad e inactividad generadas por cambios de temperatura y no de luz, en realidad esos lapsos son resultado de una necesidad fisiológica. (More-Ede *et al*, 1982).

El efecto del enmascaramiento puede manifestarse de dos maneras. En primera instancia, la luz provoca el aumento espontáneo de la actividad locomotriz en la mayoría de los organismos diurnos (enmascaramiento positivo) mientras que la suprime en la mayoría de las especies nocturnas (enmascaramiento negativo). La diferencia entre la sincronización de un ritmo y el fenómeno de enmascaramiento es que en la primera suele presentarse una anticipación al *zeitgeber*; en segundo, puede restablecerse después de un periodo en libre curso o de un cambio de fase del *zeitgeber* y en tercero, el libre curso en

condiciones constantes después de la sincronización comienza en un momento del día que está determinado únicamente por el *zeitgeber* previo (Daan y Aschoff, 2001).

### **1.5. Organización del sistema circadiano en reptiles**

El sistema fisiológico responsable de medir el tiempo y sincronizar los procesos internos de un organismo con los eventos diarios en el ambiente se conoce como *marcapasos circadiano* (Pittendrigh, 1981). El o los marcapasos circadianos involucrados en la regulación de los ritmos en el organismo, reciben información fótica del ambiente, a través de los fotorreceptores circadianos, mientras que una gran cantidad de elementos no osciladores pueden responder a la influencia del marcapasos como elementos pasivos efectores (Moore- Ede *et al*, 1982). En general, en los vertebrados no mamíferos se han reconocido diversos tejidos que exhiben ritmicidad circadiana de manera autónoma. Entre los más estudiados se encuentran la glándula pineal, el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y la retina, que contiene múltiples fotorreceptores circadianos. Entre los fotorreceptores extrarretinales destacan la glándula pineal, el ojo parietal y fotorreceptores extrapineales localizados dentro del cerebro, llamados también fotorreceptores de cerebro profundo (Underwood y Menaker, 1976).

#### **1.5.1. Fotorreceptores retinales y extrarretinales**

Al menos 24 especies de vertebrados no mamíferos, incluyendo peces, anfibios, reptiles y aves, muestran sincronización a ciclos de 24 horas de luz oscuridad cuando se les extraen los fotorreceptores retinales (Takabata, 1992, Underwood y Groos, 1982, Underwood y Menaker, 1976). Los fotorreceptores extrarretinales responsables de la

sincronización en animales ciegos son altamente sensibles a la luz; ya que ésta puede ocurrir incluso en ciclos de luz oscuridad equivalentes a la luz que genera la luna o aún a menor intensidad. Se ha comprobado que estos fotorreceptores se localizan en el cerebro debido a que si se bloquea la incidencia de luz hacia la cabeza de diferentes organismos como gorriones, ranas y lagartijas no ocurre la sincronización (Taylor y Ferguson, 1970; Underwood, 1976). Recientes estudios inmunohistoquímicos en peces, reptiles y aves han corroborado que los receptores responsables de la sincronización y la capacidad de respuesta al fotoperiodo se encuentran localizados en el cerebro (Silver *et al*, 1998).

En reptiles, como en la iguana *Anolis carolinensis* se ha encontrado reacción a anticuerpos de opsina cerca del ventrículo lateral. El papel de los ojos dentro del sistema circadiano se percibe como un sistema que recibe información de la luz y la manda a los osciladores circadianos localizados en cualquier otro lado aunque por sí solos los contienen un oscilador. Los cuales gobiernan numerosos ritmos de la fisiología retinal (Foster *et al*, 1994).

### **1.5.2. La Pineal como órgano fotorreceptor y como marcapasos**

El órgano pineal no es sólo un fotorreceptor, sino que también puede actuar como un marcapasos circadiano. Virtualmente todos los vertebrados poseen un órgano pineal. En la mayoría de los vertebrados, este órgano se localiza en la superficie dorsal del cerebro. En vertebrados como peces, anfibios y reptiles usualmente encontramos un segundo componente llamado órgano parapineal (Hamasaki y Eder, 1977). Este segundo componente no se encuentra en muchas especies de reptiles como víboras y tortugas y aún no se ha estudiado su papel dentro del sistema circadiano en estos grupos de reptiles (Underwood, 1990).

Las pineales de todos los vertebrados sintetizan una variedad de compuestos. En particular, las llamadas indolaminas han sido extensamente estudiadas, y particularmente melatonina (N-acetil-5-metoxytryptamina). Los estudios inmunohistoquímicos y autoradiográficos muestran que las células fotosensibles de la pineal son los sitios de la síntesis de las indolaminas.

La glándula pineal en distintos vertebrados no mamíferos es un oscilador circadiano que controla la síntesis de melatonina (Tosini *et al* 2003).

## **1.6. Biología general de la tortuga *Trachemys scripta elegans***

### **1.6.1. Descripción morfológica**

*T. scripta* es una tortuga de agua dulce de talla mediana a larga. Se caracteriza por una mancha que se localiza entre la parte posterior de los ojos y el cuello y en ambos lados de la cabeza, dependiendo de la variedad esta puede ser roja (*T. s. elegans*), anaranjada (*T. s. troostii*) o amarilla (*T. s. scripta*). En los individuos más viejos, la mancha llega a reducirse. Las extremidades son robustas y con membranas interdigitales. Puede alcanzar un tamaño máximo entre 20 y 60 cm en función de la subespecie (*T. s. elegans* alcanza tamaños de 27 cm o más). Los machos presentan una mayor longitud de las uñas de las extremidades anteriores que las hembras. La coloración juvenil del caparazón es verdosa con manchas y dibujos amarillos (también cabeza, cuello y extremidades) y el plastrón (parte ventral del caparazón) es amarillo con dibujos verdes rodeados de un verde más intenso. Con la edad, la coloración dorsal se oscurece y la ventral se aclara (Gibbons y Lovich, 1990).

### **1.6.2. Registro fósil**

A pesar de que el género *Trachemys* está representado en los depósitos del Mioceno y Plioceno (Weaver and Robertson, 1967; Jackson, 1988), el fósil más reciente de *T. scripta* data del Plioceno (Rogers, 1976) en la región de Texas. Los registros en México provienen de Sonora y Yucatán (Álvarez, 1976; Van Devender *et al.*, 1985).

### 1.6.3. Hábitat

*Trachemys scripta* ocupa la mayoría de los hábitats de agua dulce y prefiere aguas quietas de fondo suave con gran abundancia de plantas acuáticas y sitios extensos para asolearse (Ernst and Barbour, 1972). Puede habitar lagunas, canales, ríos de curso lento, bahías y humedales (Gibbons *et al.*, 1979).

### 1.6.4. Conducta

La especie es principalmente diurna. Durante la noche permanecen dormidas descansando en la orilla de lagos y charcas o bien flotando en la superficie. Su actividad se suprime a los 30°C pero aumenta significativamente a 20°C. La actividad aumenta cuando las tortugas son expuestas a 12 horas de luz ultravioleta seguidas por 12 horas de oscuridad (Cloudsley-Thompson, 1982). La parte más notable del ciclo de actividad diaria es el proceso de asolearse, este hábito se encuentra muy bien desarrollado aún en tortugas juveniles (Janzen *et al.*, 1992). La duración de la exposición al sol depende del tamaño corporal; las tortugas con carapachos menores a 10 cm se exponen más tiempo por día que aquellas con carapachos más grandes (Janzen *et al.*, 1992). La función principal de la exposición solar es termorregulatoria (Boyer, 1965; Moll and Legler, 1971). La glándula pineal es muy sensible a la luz y esto pudiera estar determinando cuánto tiempo *T.scripta* puede asolearse sin riesgo a sobrecalentarse. (Meissl and Ueck, 1980). Como otros animales poiquiloterms, la conducta de la tortuga de orejas rojas está controlada por la temperatura ambiental. *T. scripta* presenta preferencias térmicas en un intervalo de 25 a 30°C como la temperatura a la cual su capacidad locomotriz es máxima. La tolerancia al calor va de 41 a 41.7°C, aunque el valor térmico crítico es de 42.2 a 42.3°C (Hutchinson *et al.*, 1966).

### 1.6.5 Reproducción

El tiempo y tamaño en el que alcanzan la madurez sexual varía mucho entre y dentro de las poblaciones de la especie. En machos, la madurez es evidente por la elongación de las uñas de las patas delanteras, un aumento en la longitud preanal de la cola y una reducción notoria en el rango de crecimiento (Gibbons and Greene, 1990; Gibbons and Lovich, 1990). La maduración de las hembras es reconocible en la longitud del plastron que a los tres años es alrededor de 18.5 cm. Aunque no ha sido profundamente estudiado, la fotoperiodicidad pudiera tener un papel controlador en los ciclos sexuales del macho. El cortejo por parte de los machos es altamente estereotipado y ritualizado. Al parecer este se presenta en la primavera y hay casos en los que tres o cuatro machos cortejan a una hembra simultáneamente. Los machos usualmente no pelean entre sí aunque es evidente que los machos más grandes tienen mayor ventaja que los pequeños (Cagle, 1950). Una vez que copulan, los nidos son excavados por la hembra con sus patas traseras. Los huevos son colocados en intervalos de aproximadamente 40 segundos. Su cascarón es relativamente delgado y su capa más superficial se compone de unidades múltiples de cristales de aragonita (Acuña-Mesén, 1989). Los nidos proveen de un ambiente térmico estable para el desarrollo óptimo del embrión (Cagle, 1950). En condiciones de laboratorio la concentración de gas atmosférico afecta el periodo de incubación (Etchberger *et al.*, 1991).

### **1.6.6. Distribución**

Se distribuye desde el lago Michigan, por el este y el centro de EUA, y ocupa gran parte de América Central, Colombia y Venezuela. La distribución de la subespecie *T. s. elegans* se extiende por la cuenca del Mississipi: desde Illinois, oeste de Kansas, Oklahoma, Florida y Virginia hasta el Golfo de México al sur (Hutchinson, 1992).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Describir las características básicas del ritmo circadiano de actividad locomotriz de tortugas juveniles de *Trachemys scripta elegans* en diferentes condiciones de iluminación artificial.

### **2.2. Objetivos particulares**

1. Conocer las características principales alfa ( $\alpha$ ), rho ( $\rho$ ) y tau ( $\tau$ ) del ritmo circadiano de actividad locomotriz en tortugas juveniles de *T. scripta elegans*, en condiciones constantes de oscuridad.
2. Describir las características del ritmo antes mencionadas, de la respuesta del ritmo de actividad locomotriz, que causan distintas condiciones de iluminación artificial, tales como sincronización paramétrica y no paramétrica, y luz constante.
3. Describir las relaciones de fase que existen entre el ritmo de actividad con respecto a diferentes longitudes de fotoperiodos, correspondientes a días cortos y días largos.
4. Evaluar las posibles diferencias en el periodo en libre curso después de cada condición de iluminación con el fin de describir los postefectos correspondientes.
5. Evaluar el valor de la especie para futuros estudios sobre ritmos circadianos en reptiles quelonios.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de ritmicidad circadiana en reptiles revelan la existencia de una fisiología y una conducta particular dependiendo de las condiciones y/o señales exógenas a las que se encuentren expuestas. Los datos obtenidos de estos estudios pueden servir como una prueba indirecta de la presencia y estado del reloj biológico de tipo circadiano que poseen estos animales.

*Trachemys scripta* es una tortuga de agua dulce que se explota comercialmente desde hace varias décadas principalmente con fines de ornato. A pesar de esto existe muy poca información acerca de su biología y fisiología básica, no existen estudios acerca de los ritmos biológicos en la especie.

El estudio de la organización fisiológica de los ritmos circadianos en reptiles, ha sido desarrollado principalmente en lacertilios e iguánidos (revisado en Tosini *et al*; 2003). Al momento, no existe información acerca de las características conductuales circadianas en especies de tortugas que pudieran servir de referencia para estudios de fisiología circadiana en estas especies. La tortuga *T. scripta*, es una especie que por su amplia distribución, es de interés para el conocimiento de las adaptaciones circadianas a las distintas latitudes que habita. Aunado a la facilidad de la disponibilidad de organismos juveniles y el bajo costo para su mantenimiento, es una especie que puede considerarse con el potencial para enriquecer los estudios sobre ritmos biológicos en tortugas.

## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.1. Obtención y mantenimiento de animales**

13 tortugas juveniles de *Trachemys scripta elegans* de 2.5 gramos en promedio fueron obtenidas del Mercado de Peces San Lázaro (Magdalena Mixuca). Los animales fueron mantenidos en acuarios convencionales y alimentados con dieta comercial (Tortuguetas “minibits”) hasta su uso en el registro de actividad, donde recibieron el mismo tipo de dieta cada tres o cuatro días, sin utilizar horarios repetidos para evitar cualquier tipo de sincronización. Durante los registros, el agua de los acuarios fue cambiada totalmente cada semana aproximadamente y sin repetición de horario.

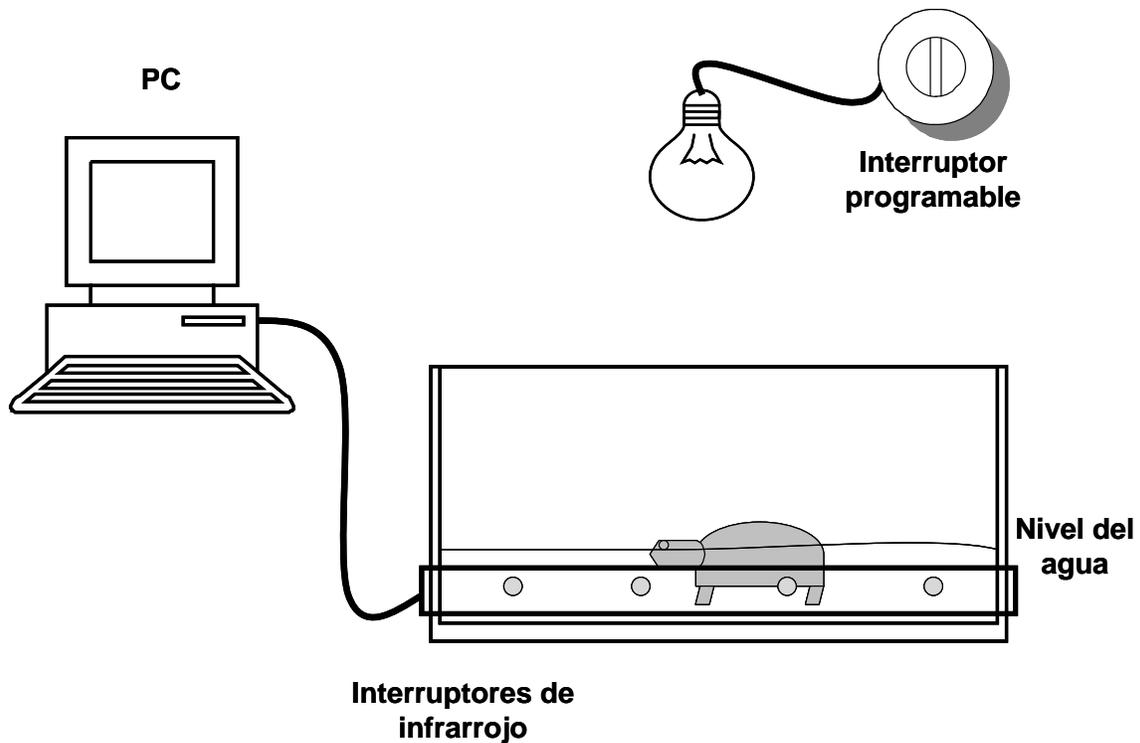
### **5. Sistema de registro de actividad locomotriz**

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Fisiología, coordinado por el Dr. Baltazar Barrera Mera en la Facultad de Medicina de la UNAM. El registro de la actividad fue obtenido mediante el uso de interruptores infrarrojos, acondicionados en acuarios de vidrio de 31 x 11.5 x 11 cm. Cada acuario contenía distribuidos cuatro interruptores infrarrojos a lo largo del mismo, los interruptores se conectaron a una tarjeta de adquisición de datos (Nafri S.A. de C.V.) la cual, mediante el programa de RALM15, permitía la sumatoria de actividad cada diez minutos y la colectaba en el disco duro de una PC durante los días que durara el experimento. Los datos capturados del registro de actividad locomotriz fueron posteriormente agrupados en el programa *Excell* y analizados

por medio del programa DISPAC (IFC, UNAM) en forma de actograma de doble gráfica (Figura 3).

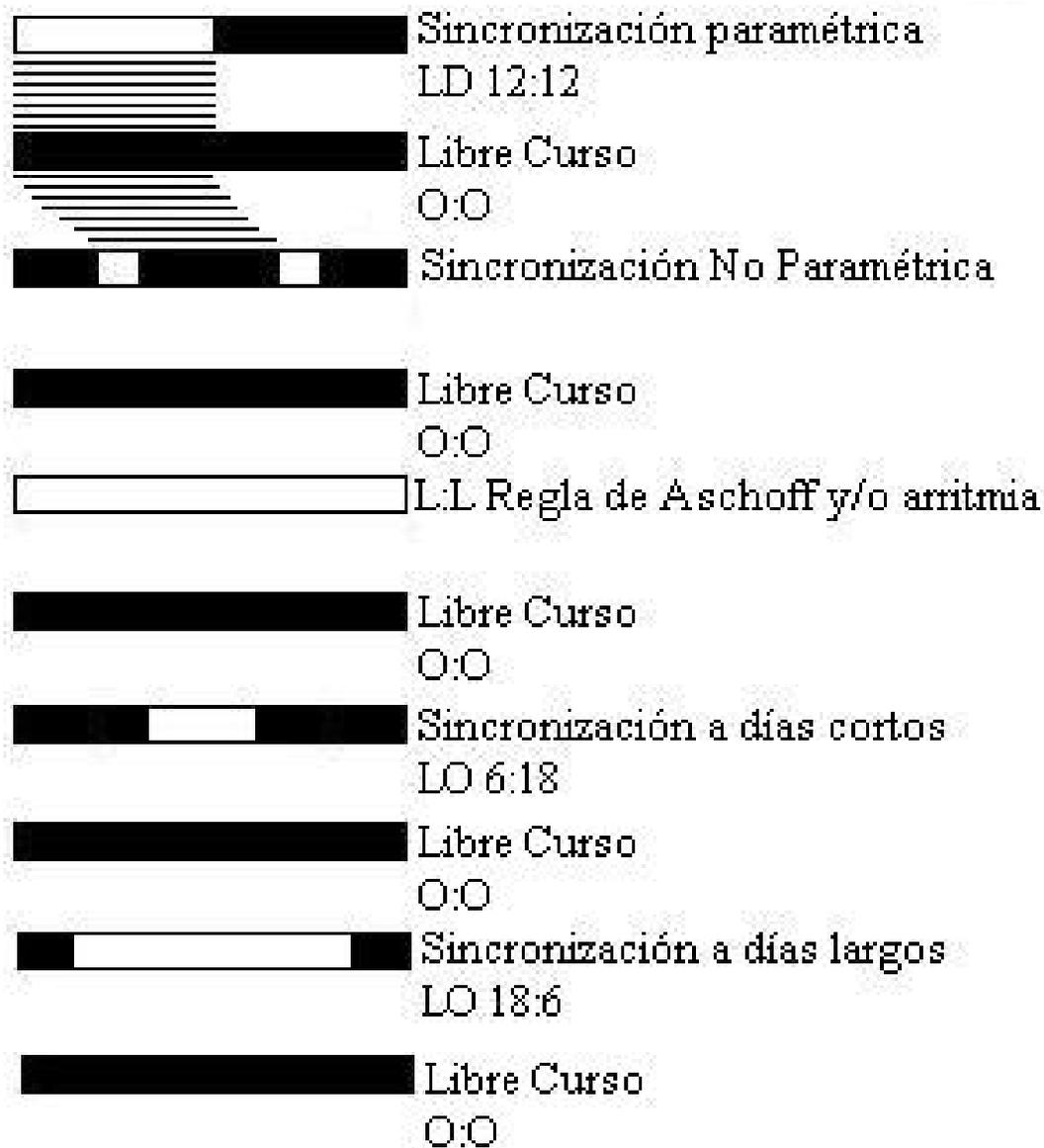
## **6. PROTOCOLO DE CONDICIONES DE REGISTRO**

Todas las tortugas fueron sometidas a un protocolo de sincronización como se muestra en la figura 4. En primer lugar, los animales fueron expuestos a ciclos de luz-oscuridad que denominamos LO 12:12, con encendido a las 6:00 a.m. y apagado a las 18:00 p.m. durante al menos 10 días. La luz del fotoperiodo fue provista mediante el uso de lámparas de luz fría (Philips) a una distancia de aproximadamente 50 cm. de cada acuario (Figura 3). La intensidad de la luz en la base del acuario fue variable en función a la posición del acuario, con un rango de iluminación de 100 a 200 luxes. Después los animales fueron mantenidos en condiciones constantes de oscuridad durante al menos 15 días, para ser expuestos después a un fotoperiodo esqueleto de LO 11:1, 11:1 con encendido de luz de las 6:00 a las 7:00 a.m. y de las 17:00 a las 18:00 p.m. El mantenimiento de los acuarios y animales se llevó a cabo en las horas en que se presentaba iluminación. Después de la condición de fotoperiodo esqueleto, se mantuvo nuevamente a los animales en condiciones constantes de oscuridad, por al menos 10 días más. Una vez concluido este periodo de registro, los animales fueron expuestos a luz constante y con el mismo sistema de iluminación mencionado anteriormente, después de esta condición los animales fueron expuestos a oscuridad constante; posteriormente a fotoperiodo esqueleto de días cortos y por último a fotoperiodo esqueleto de días largos, cada uno con un periodo de oscuridad constante después de cada condición luminosa. Esta descripción se puede apreciar gráficamente en la figura 4.



**Fig. 3.** Cajas de registro de actividad locomotriz para tortugas. Se pueden observar las barras de luz infrarroja a los costados de la pecera y el nivel de agua al cual se llenaron las cajas.

La temperatura se mantuvo estable durante todo el protocolo ( $T = 23.5 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ). Todas las tortugas fueron alimentadas tres veces por semana con pellet “Tortugetas: minibits”; Petmmal de 3mm de diámetro.



**Fig. 4.** Protocolo de experimentación base para conocer las propiedades del ritmo de actividad locomotriz. Se observan todas las condiciones de LO, luz constante (LL) y oscuridad constante (OO) a las que fueron expuestos los sujetos experimentales.

## 6.1. ANALISIS DE DATOS

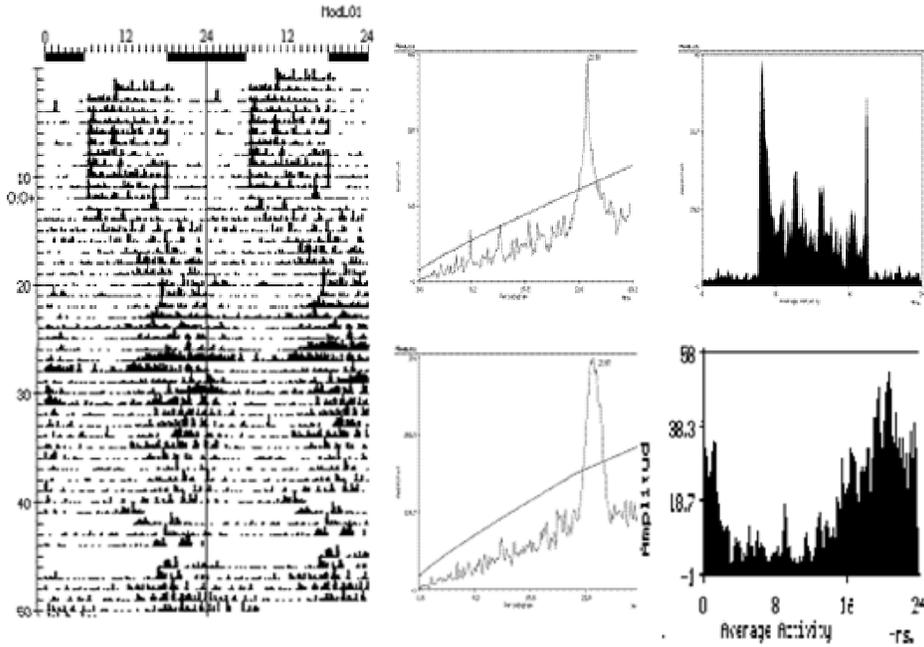
1. Para obtener la duración promedio del intervalo de actividad y de reposo ( $\alpha$ ,  $\rho$ ), se utilizó la curva promedio de la actividad ajustada al valor de  $\tau$  en el programa DISPAC (IFC, UNAM). El valor del periodo en libre curso fue obtenido mediante el periodograma de  $X^2$  incluido en el mismo paquete de análisis. Los datos fueron graficados en forma de actogramas de doble gráfica en formato de histograma. Finalmente, para determinar la relación de fase entre la señal ambiental y  $\tau$  se consideró únicamente los días fuera de transición a la sincronización y se restó la diferencia que hay entre el encendido de la luz y el valor inicial y final de  $\alpha$ .
2. Para analizar de manera grupal todos los valores obtenidos se utilizó una *T-student* con una significancia del 0.05%.

## 7. RESULTADOS

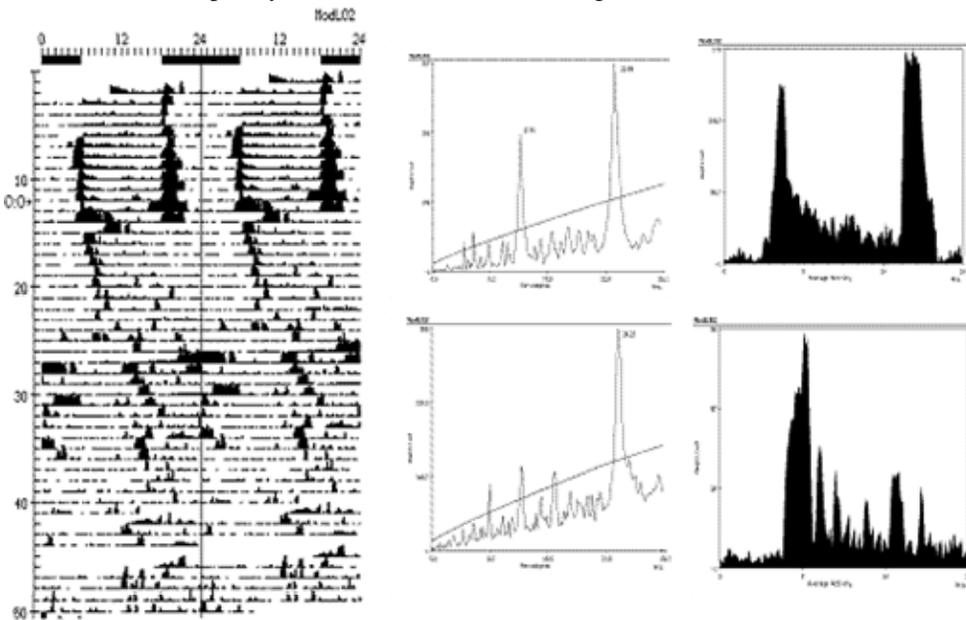
### 7.1. Sincronización continua (paramétrica) a ciclos LO12:12

La **figura 5** muestra que el ritmo de actividad se sincroniza con la fase diurna del ciclo LO, con inicio de actividad al encendido de la luz ( $\phi = 0$ ). La máxima actividad se alcanza en 1.02 h con un promedio de 30.13 eventos por cada 10 minutos, la transición en el ciclo de luz y oscuridad producen un cambio notable en los niveles de actividad como lo muestra la curva promedio correspondiente. El periodograma de este segmento indica que  $\tau = 23.9$  h. Cuando pasa a oscuridad constante a partir del día 13, se observa un ritmo en libre curso  $\tau = 23.67$  h, que parte de la fase del ciclo en LO (días 11 y 12). La curva promedio correspondiente, muestra mayor actividad al inicio de  $\alpha$  y varios grupos con menor amplitud se distribuyen a lo largo del ciclo circadiano.

La **figura 6**, corresponde a un actograma de un organismo distinto. En LO, hay un ritmo de actividad bimodal con inicio de actividad que anticipa el encendido de la luz ( $\phi = 0.4$  h) y el otro esta presente después del apagado de la luz. Durante la fase luminosa hay una depresión de los niveles de actividad, lo que indica un posible enmascaramiento negativo. La actividad máxima la alcanza en 1.94 h para el primer pico con un máximo de 150.21 eventos por cada 10 minutos. El segundo pico alcanza su actividad máxima a los 55 minutos después del apagado de la luz y con un promedio máximo de 177.47 eventos /10 min. Una vez en OO (del día 12 al 51,  $\tau = 24.23$  h) el pico de actividad de la mañana se mantiene con relación de fase correspondiente al ciclo LO, mientras que el pico de actividad de la tarde desaparece. Para el día 28, un segundo pico de actividad se hace manifiesto, y perdura hasta el día 35.



**Fig. 5** Actograma en doble grafica de un ritmo de actividad en LO y OO. Los periodogramas correspondientes a la sincronización y al libre curso, se muestran adjuntos. Se observa un ritmo diurno con sincronización completa y fase de actividad bien restringida a la fotofase.



**Fig. 6** Actograma en doble grafica de un ritmo de actividad en LO y OO. En este caso es clara la anticipación al inicio de la fotofase y el enmascaramiento negativo. Se observa también que el ritmo es diurno con sincronización completa y fase de actividad bien restringida al inicio de la fotofase.

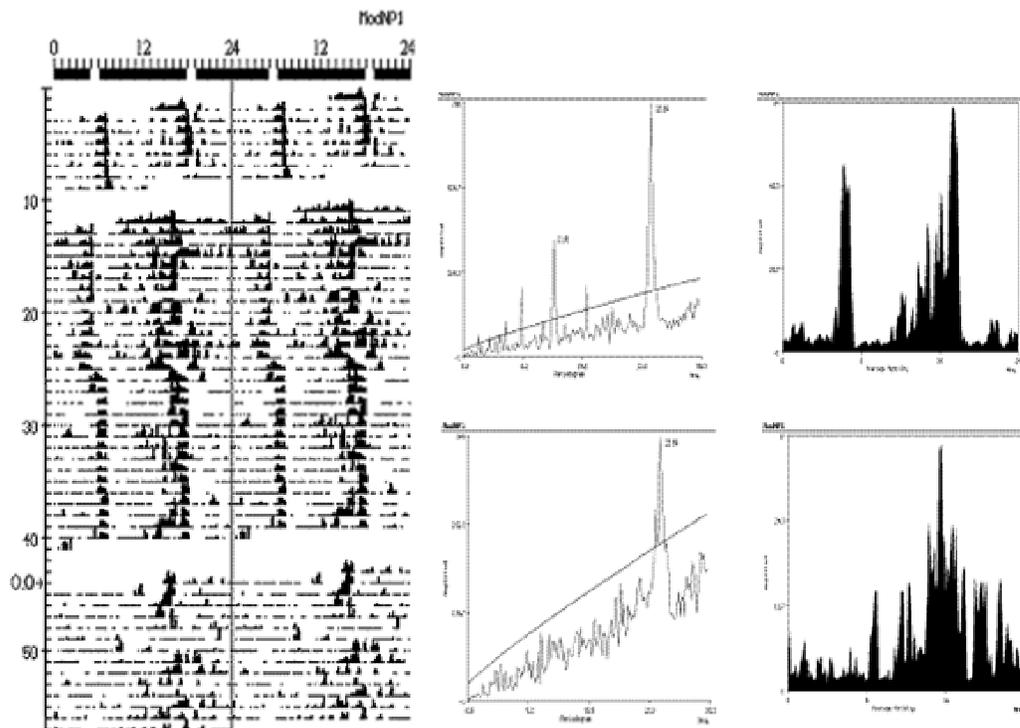
En todos los organismos expuestos a estas condiciones, se observó un ritmo diurno. Sin embargo, las respuestas a la luz no fueron iguales en todos los animales, ya que de 13 animales 5 presentaron su actividad como se muestra en la figura 5 mientras que 3 tortugas se comportaron como en el ejemplo de la la figura 6. En 13 animales  $\tau = 23.77 \pm 0.076$  h en LO, mientras que en libre curso  $\tau = 24.00 \pm 50.169$  h. La duración promedio de la actividad durante LO fue de  $\alpha = 15.137 \pm 0.653$  h; y en condiciones de OO  $\alpha = 17.175 \pm 1.99$  h.

## 7.2. Sincronización discreta (no paramétrica)

La **figura 7**, muestra el actograma de una tortuga en condiciones de fotoperíodo esqueleto LO 11:1, 11:1 del día 9 al día 12. Los días en blanco indican falta de datos por problemas en el sistema de registro. Del día 13 al 25, el horario en que se aplica el FE aparece adelantado por dos horas respecto a lo que se muestra al inicio debido a un error en el horario establecido en el *timer* o temporizador. Para el día 26 se restituye el horario del FE con el que se inició y se mantuvo hasta el final de esta condición experimental.

Se puede observar entre el día 1 al 9, que el ritmo se sincroniza con los pulsos de luz de mañana y de tarde. La respuesta a ambos pulsos (5-6 a.m. y 18-19 p.m.) es un aumento gradual de actividad que se prolonga 1 h después del apagado. Del día 26 al día 40 el pulso de mañana provoca aumento en los niveles de actividad durante la duración del pulso. El pulso de la tarde, en cambio, tiene un efecto diferente en el ritmo de actividad, ya que además de que ocurre una anticipación muy notoria al encendido de la luz, la actividad se suprime completamente cuando el pulso termina. La curva a la derecha, muestra el promedio de la actividad ajustada a un ciclo de 24 horas (días 30 al

40), donde se distinguen dos picos de actividad y su relación de fase con el encendido de cada uno de los pulsos de luz; la actividad aumenta alrededor del pulso de la tarde. La relación de fase obtenida respecto al pulso de la mañana es de  $\phi = 1.05$  h y el de tarde  $\phi = 5.9$  h, ambos anticipan el inicio del pulso. La máxima actividad se alcanza en 1.2 y 6.4 h y con un promedio de 48.6 y 62.8 eventos por cada 10 minutos respectivamente. El periodograma muestra periodos de 11.91 y 23.89 h. El valor de  $\alpha$  es de 13.32 h y  $\rho$  de 10.68 h. Al pasar a OO (días 44 al 56), el ritmo de actividad oscila libremente desde la fase correspondiente al pulso de la tarde ( $\tau = 23.89$ h). La curva promedio correspondiente, muestra un  $\alpha = 16.32$  h y  $\rho$  de 7.68 h. La máxima actividad promedio la alcanza en 7.3 h y con un promedio de 36.66 eventos por cada 10 minutos.



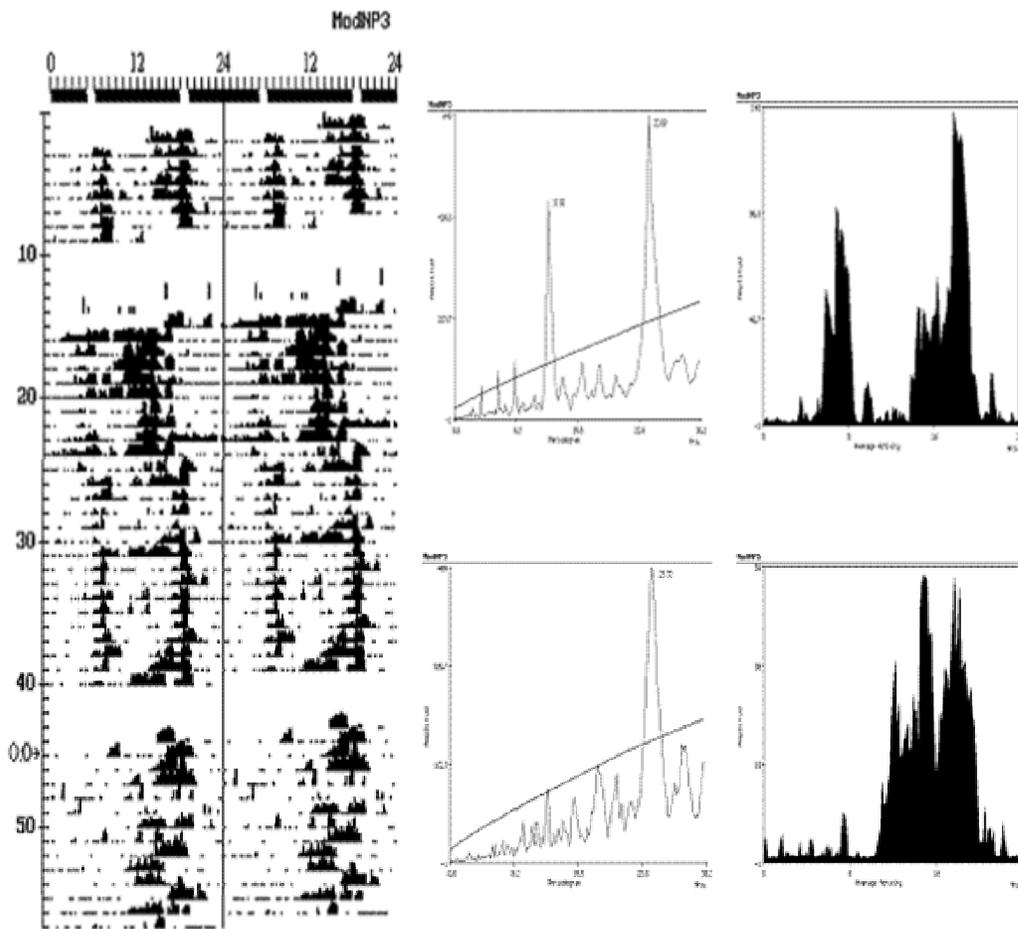
**Fig. 7** Actograma en doble grafica de un ritmo de actividad en fotoperíodo esqueleto (FE) y OO. Ambos pulsos de luz presentan un grupo de actividad asociado, sin embargo, es el de la tarde el que oscila libremente cuando se inician las condiciones de OO. Durante la aplicación del pulso, hay un incremento en la actividad, indicando un posible enmascaramiento positivo.

La **figura 8** muestra otro ejemplo en la misma condición experimental. Del día 1 al día 9, la actividad se presenta con mayor amplitud después del pulso de la mañana y con anticipación al encendido de la luz del pulso de la tarde ( $\phi = 3.36$  h). De los días 25 al 40, la luz suprimió la actividad en el pulso de la mañana pero ésta aumentó alrededor de las 2 horas consecutivas. Alrededor del pico de la tarde se observa mayor cantidad de la actividad. El periodograma muestra dos picos significativos de 11.91 h y 23.89 h respectivamente. La curva promedio de actividad, muestra  $\alpha$  total de 14.98 h mientras que el de  $\rho$  es de 9.02 h. Hay anticipación al pulso de la tarde ( $\phi = 3.36$  h). Para el pulso de la mañana, la actividad máxima se alcanza en 1.57 h con un máximo de 116.67 eventos / 10 min., mientras que para el pulso de la tarde la actividad máxima se alcanza en 4.16 h con un promedio máximo de 146.22 eventos / 10 min. Al iniciar OO (días 45 al 57), la fase de actividad oscila espontáneamente a partir del pulso de la tarde ( $t = 23.72$  h). La curva promedio de actividad, muestra una fase activa conspicua con  $\alpha = 14.43$  h y  $\rho = 9.57$ h. Una vez que el organismo inicia su actividad, la máxima amplitud la alcanza aproximadamente 4 h después, con un promedio máximo de 57.75 eventos/ 10 min.

Todos los organismos expuestos al protocolo de FE, mostraron sincronización. El libre curso en OO mostró relación de fase con el pulso de la tarde en 5 tortugas, mientras que en 2 mostraron el libre curso como un bloque de actividad continua. De acuerdo a los resultados, durante el pulso de luz, 8 animales mostraron enmascaramiento; tanto positivo (5 individuos) y negativo (3 individuos) en alguno de los dos pulsos. El pulso de luz que presentó la mayor actividad anticipatoria, corresponde a la fase de la que suele oscilar el ritmo en libre curso. El valor promedio del periodo en OO después de FE fue de  $\tau = 24.21 \pm 0.215$  h, mientras que el valor promedio de la relación alfa/rho fue de  $3.6 \pm$

1.024 h. Durante los pulsos de luz el valor promedio del periodo fue de  $\tau = 23.93 \pm 0.021$

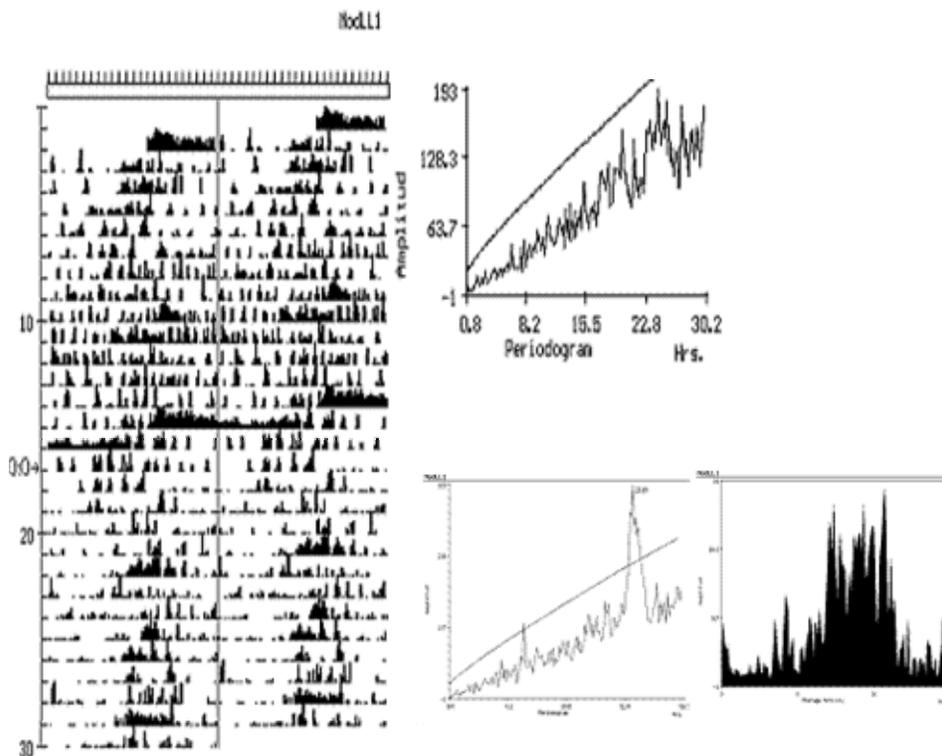
h.



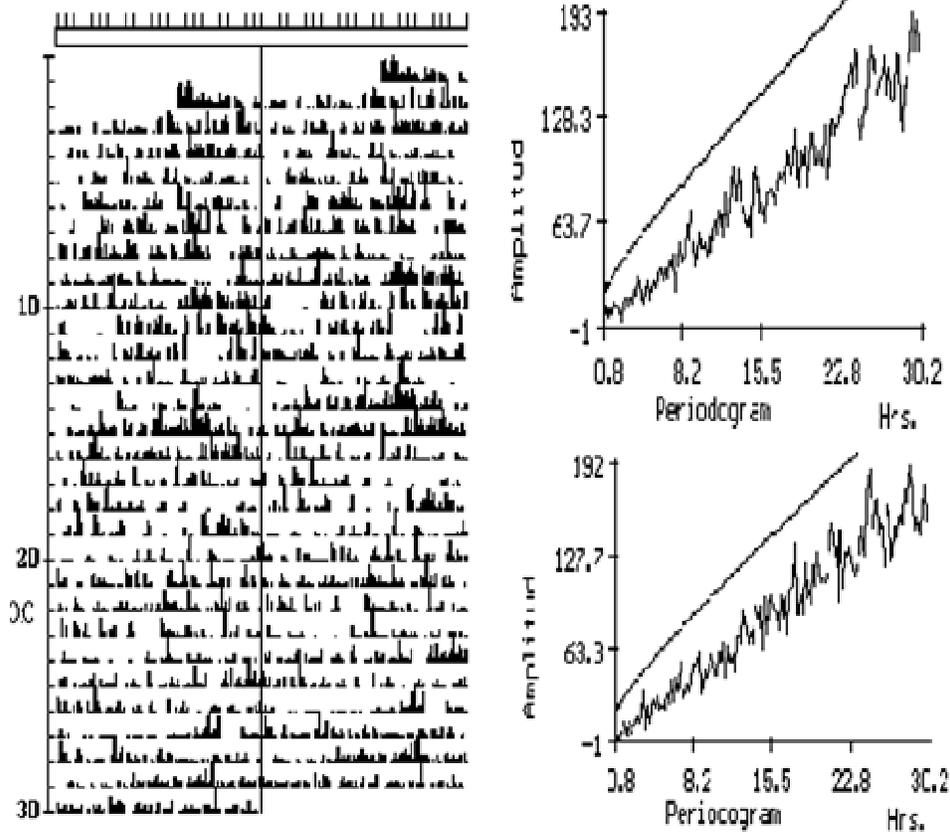
**Fig. 8** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en fotoperíodo esqueleto (FE) y OO. Ambos pulsos de luz presentan un grupo de actividad asociado. Al igual que en el caso anterior, el pulso de la tarde se asocia con la fase que mantiene el ritmo de actividad cuando se inician las condiciones de OO. Durante la aplicación del pulso de la mañana, hay disminución de la actividad, y en el de la tarde hay un incremento indicando un posible enmascaramiento negativo y positivo respectivamente.

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

La **figura 9** muestra la actividad locomotriz de una tortuga en LL (días 01 al 17). Durante los primeros cuatro días hay un ritmo con periodo corto, después se vuelve arrítmico, como se ve también en el periodograma adjunto. En OO (día 17), hay un ritmo circadiano nuevamente ( $\tau = 23.89$ ,  $\alpha = 15.31$ h y  $\rho = 8.69$  h). Su actividad máxima la alcanza después de 3.28 h con un promedio máximo de 30.82 Interrupciones / 10 min. La figura (10) presenta otro ejemplo, donde la arritmia se manifiesta desde el primer día y no se restituye aun después de someter al animal a oscuridad. De las 13 tortugas expuestas en esta condición, 7 mostraron arritmia en LL desde el primer día de registro, solo 6 animales restituyeron la ritmicidad al pasar a OO.



**Fig. 9** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LL y OO. La luz constante induce arritmia, que restituye en poco tiempo la oscuridad constante.

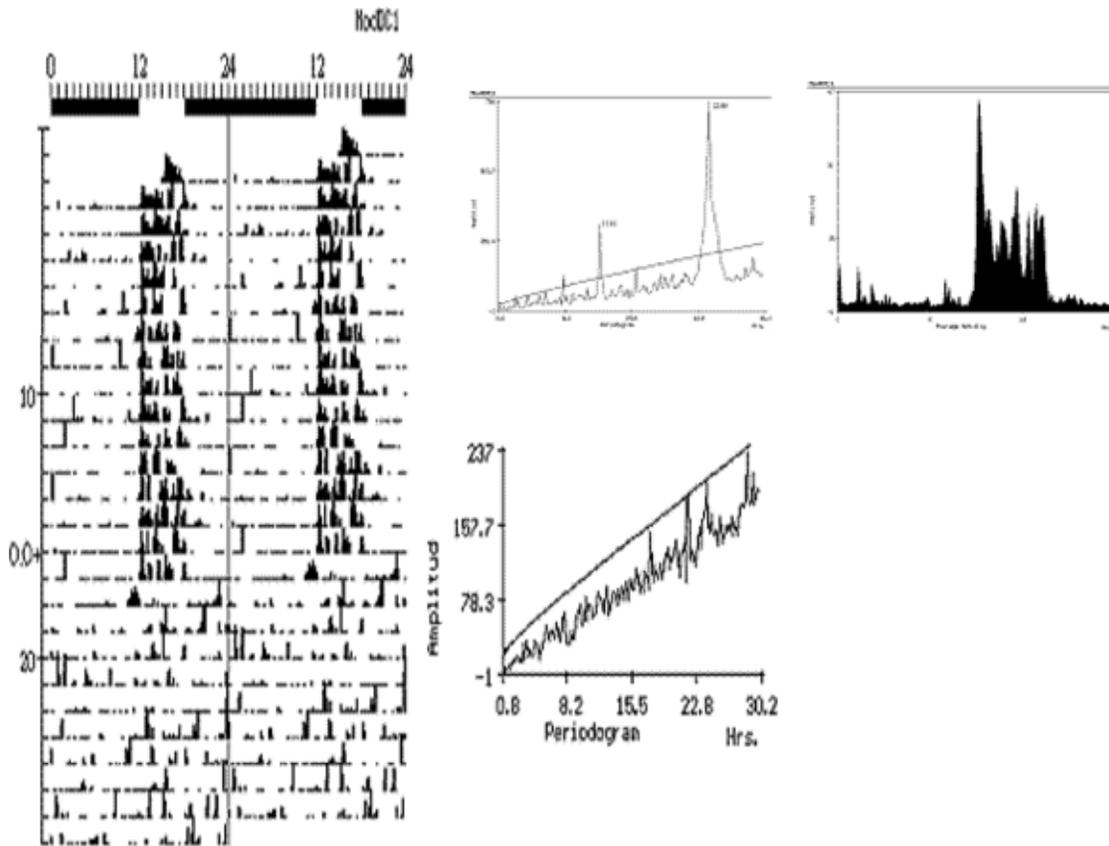


**Fig. 10** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LL y OO. Al igual que en el caso anterior, la luz constante induce arritmia, sin embargo, en este caso no se restituye en OO.

#### 7.4. Respuesta a fotoperíodos de días cortos LO 6:18

La **figura 11** muestra un actograma de un animal sincronizado a ciclos LO 6:18. La actividad está fuertemente determinada por la longitud de la fotofase. No hay anticipación al encendido de la luz ni enmascaramiento negativo (días 01 al 16). La actividad coincide con el encendido de la luz y es mayor una hora después del encendido, con un promedio máximo de 35.1 eventos por cada 10 minuto, luego se deprime notablemente durante la oscuridad. La curva promedio muestra un ritmo conspicuo y  $\alpha$

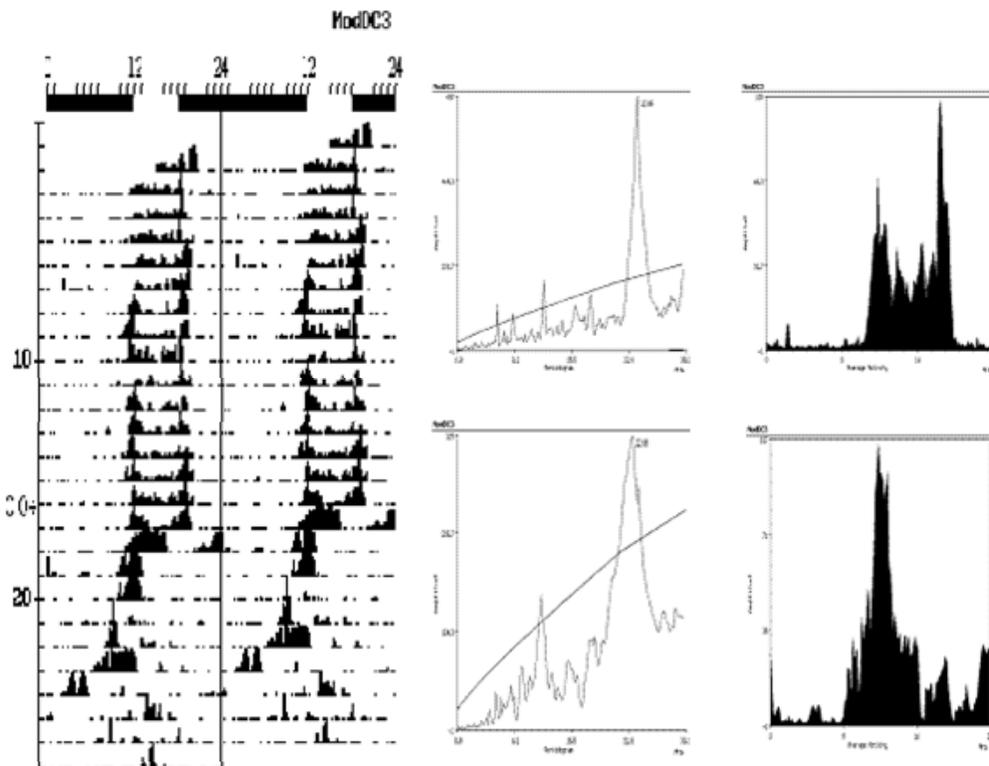
esta confinada a la fase luminosa ( $\alpha = 7.12$  h); el periodograma resalta dos picos significativos ( $\tau = 11.91$  y  $23.89$  h). Al iniciar OO (días 17 al 27), la actividad muestra un ritmo difuso, pero algunos grupos de actividad provienen de la fase correspondiente al encendido en LO. No se aprecia un valor significativo en el periodograma adjunto.



**Fig. 11** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LO 8:16. La luz confina la mayor parte de la actividad la cual no parece oscilar claramente durante la oscuridad constante (OO).

La **figura 12**, muestra un segundo ejemplo de actividad en LO 6:18. Aquí se anticipa la actividad al encendido de la luz a partir del día 8 ( $\phi = 0.25$  h). Se puede notar que el apagado de la luz provoca también un brote de actividad indicando un enmascaramiento positivo. Durante la fotofase, la actividad parece ser parcialmente

suprimida por lo que aparenta ser un ritmo bimodal. La curva promedio, muestra  $\alpha = 9.85$  h y  $\rho = 14.15$  h. La actividad aumenta cerca del encendido y el apagado de la luz con un promedio de 132.79 eventos por cada 10 minutos. El periodograma correspondiente a LO muestra  $\tau = 23.9$  h y varios picos armónicos. Cuando inicia OO, el ritmo presenta libre curso ( $\tau = 22.88$  h) y una relación de fase correspondiente a la del encendido de la luz. La curva de actividad promedio en OO muestra que  $\alpha$  tiene un valor aproximado de 9.02 h y de reposo de 14.98 h.

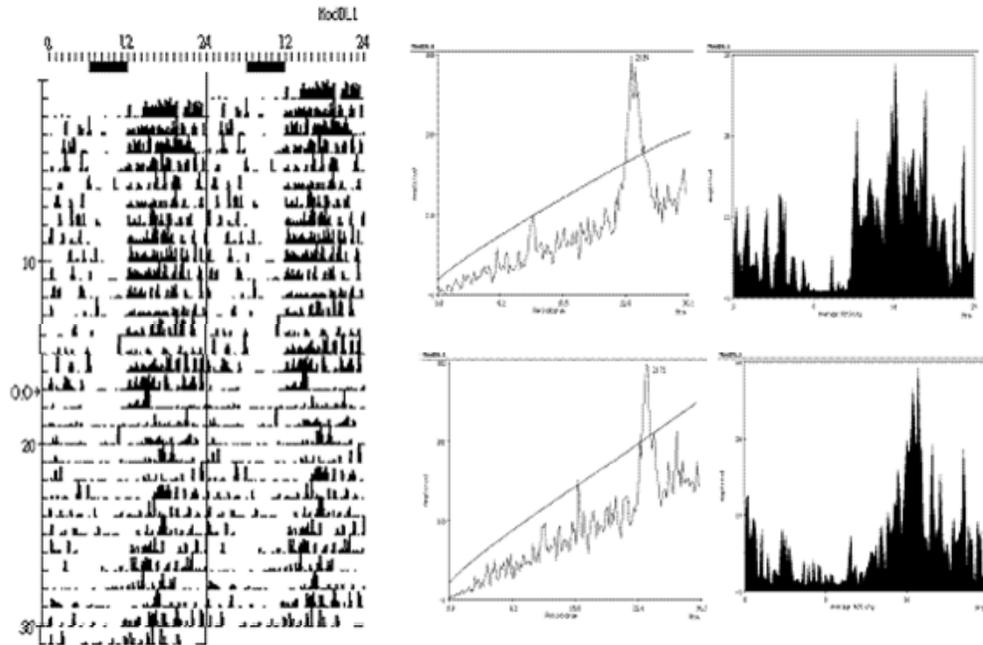


**Fig. 12** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LO 8:16. La luz suprime parcialmente la actividad durante la fase diurna. Hay clara anticipación al encendido, y la actividad continua aún después del apagado. El libre curso del ritmo, parte de la fase correspondiente al inicio de la fotofase.

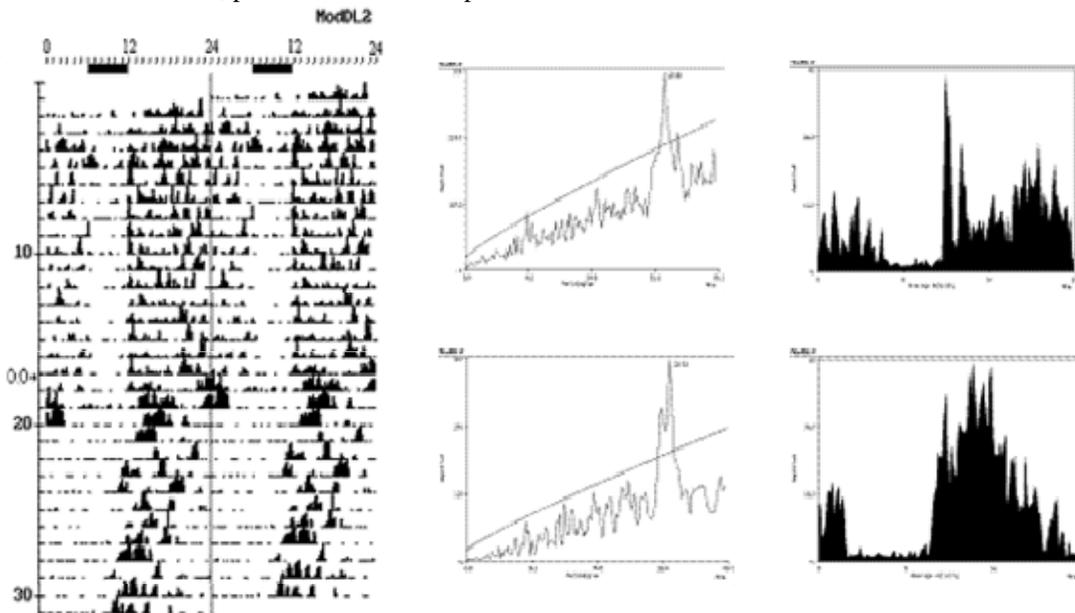
En esta condición, 3 tortugas anticiparon el encendido mientras que 7 restringieron la actividad a la fotofase y 3 tienen un aumento conspicuo antes del apagado de la luz. La sincronización fue completa ya que en la mayoría se observó un ritmo en libre curso con relación de fase correspondiente al encendido de la luz. El valor de  $\tau = 23.9 \pm 0.029$  h y en OO fue en promedio  $\tau = 23.79 \pm 0.336$  h. La duración de  $\alpha$  durante el fotoperiodo LO 6:18 fue de  $9.21 \pm 0.684$  h y en OO fue de  $13.26 \pm 1.494$  h.

### 7.5. Respuesta a fotoperiodo de días largos.

La **figura 13** muestra el actograma de una tortuga expuesta a ciclos LO 18: 6. (días 01 al 17). El ritmo de actividad sincroniza al fotoperiodo, la actividad inicia con el encendido de la luz y conforme transcurre la fotofase, disminuye en amplitud. La curva promedio de actividad, muestra una  $\alpha = 20.16$  h y  $\rho = 3.84$  h. La máxima actividad en la curva promedio la alcanza a las 4.53 h después del encendido de la luz, con un promedio máximo de 36.79 eventos/ 10 min. No se observa ningún efecto con el apagado de la luz. El ritmo de actividad se alarga en oscuridad constante (días 18 al 23) y después se acorta (días 24 al 30,  $\tau = 23.55$  h). La curva promedio correspondiente a OO, muestra la duración de  $\alpha$  de 18.91 h y  $\rho$  de = 5.09 h. entre los días 18 al 31, y con una amplitud máxima de 43.19 eventos /10 min. Un segundo ejemplo de sincronización a días largos, se muestra en la **figura 14**. La actividad inicia con la misma fase que la del *zeitgeber*, se extiende durante toda la fotofase (días 01 al 17) y disminuye notablemente durante las seis horas de oscuridad. Durante este periodo la actividad tiene mayor amplitud las primeras 12 horas de luz y las siguientes 6 horas disminuye, no se observa ningún efecto del apagado en el ritmo de actividad.



**Fig. 13** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LO 16:8. La luz confina la actividad durante la fase diurna. No se ve anticipación al encendido, y la actividad se debilita antes del apagado. El libre curso del ritmo, parte de la fase correspondiente al inicio de la fotofase.



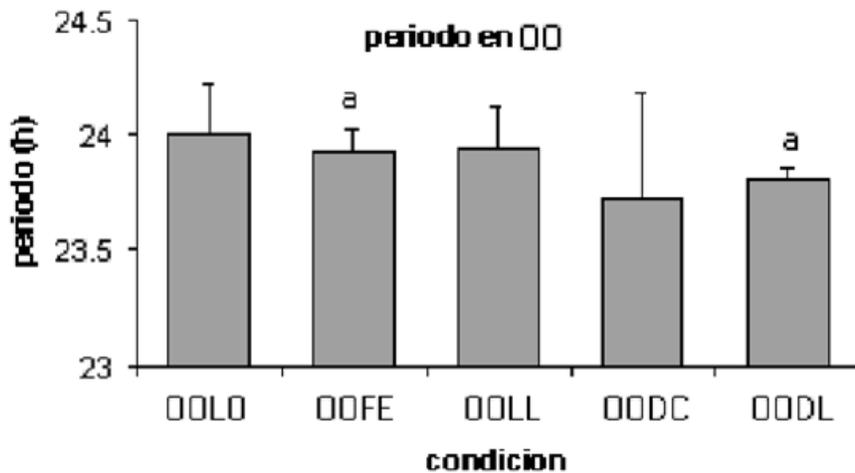
**Fig. 14** Actograma en doble gráfica de un ritmo de actividad en LO 16:8. La actividad es diurna y se extiende a lo largo de toda la fotofase. No se ve anticipación al encendido de la luz y el libre curso del ritmo muestra un periodo corto. Como en el caso anterior, parte de la fase correspondiente al inicio de la fotofase.

La curva de actividad promedio muestra que el pico de mayor amplitud ocurre con el encendido de la luz, posteriormente la actividad tiene una amplitud mas o menos constante. La duración de  $\alpha$  es de aproximadamente 19.8 h y la de  $\rho$  de 4.2 h. La actividad máxima se alcanza en 4.21 h después del encendido y esta tiene un máximo promedio de 38.11 eventos /10 min. Cuando el ritmo entra en libre curso (días 18 al 31) presenta periodo corto ( $t=23.55$  h) y la actividad es más robusta. A diferencia del fotoperiodo anterior la duración de  $\alpha$  es muy marcada y posee un valor de 13.36 h, la curva tiene una amplitud máxima promedio de 56.31 y la actividad máxima la alcanza en 4.62 h después del inicio de alfa. De los 13 animales expuestos a estas condiciones, solamente 3 organismos no sincronizaron con el fotoperiodo LO 18:6, 10 animales iniciaron su actividad con el encendido de la luz y ninguno presentó algún efecto en su ritmo relacionado con el apagado de la luz. En promedio la duración de  $\alpha$  en LO 6:18 fue de  $18.79 \pm 0.272$  h y el valor del periodo fue de  $\tau = 23.93 \pm 0.122$  h. Mientras que en OO el valor promedio del periodo fue de ( $\tau = 23.54 \pm 0.082$  h).

## **8. ANALISIS INTEGRAL DE RESULTADOS**

### **8.1. Variaciones de periodo en libre curso después de cada condición de fotoperiodo.**

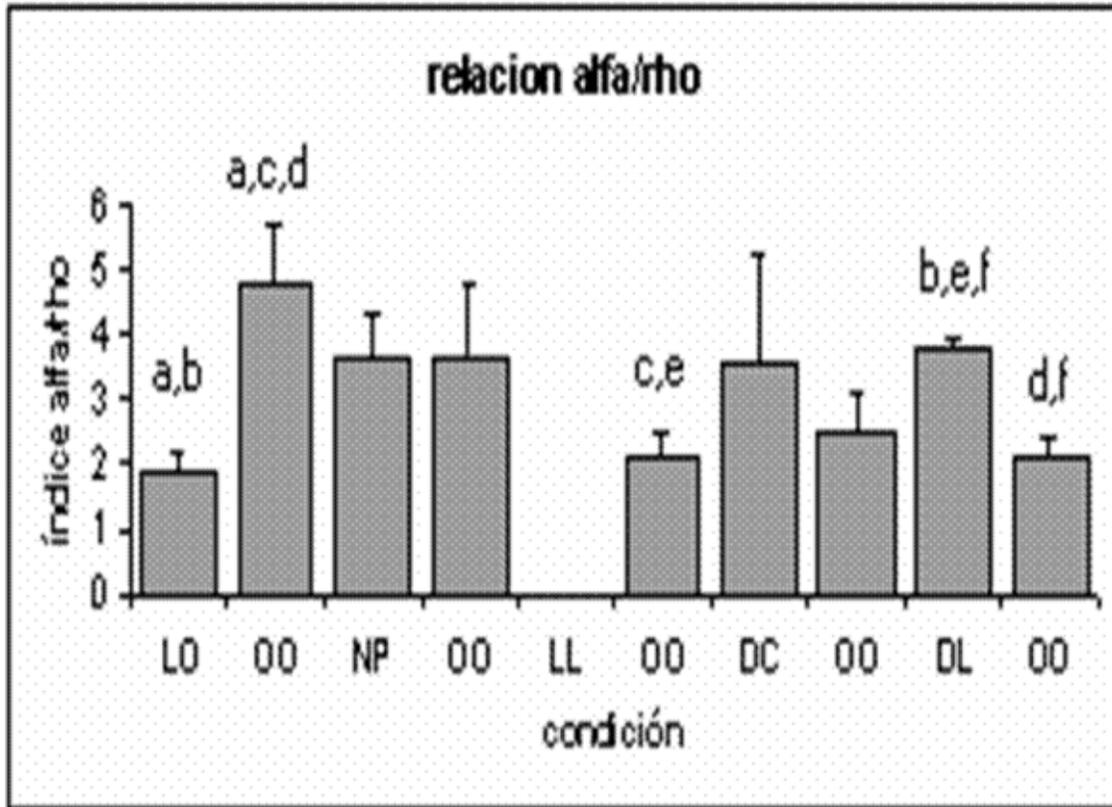
La **figura 15** presenta el promedio del periodo ( $\pm$  ES) obtenido en cada condición de oscuridad previa y posterior a cada fotoperiodo. Se observa que la variabilidad en el promedio del periodo es mayor después de LO (luz-oscuridad 12:12) que después de FE mientras que se observaron diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre el periodo en libre curso posterior el FE comparado con aquel posterior a DL. Podemos ver también que la variabilidad del periodo es mayor entre los animales después de estar en fotoperiodos de días cortos (DC).



**Figura 15** Promedio del periodo ( $\pm$ ES). Se observan diferencias significativas  $p < 0.05$ , entre las barras indicadas con la letra “a”.

## 8.2. Variación en la relación alfa/rho en cada condición

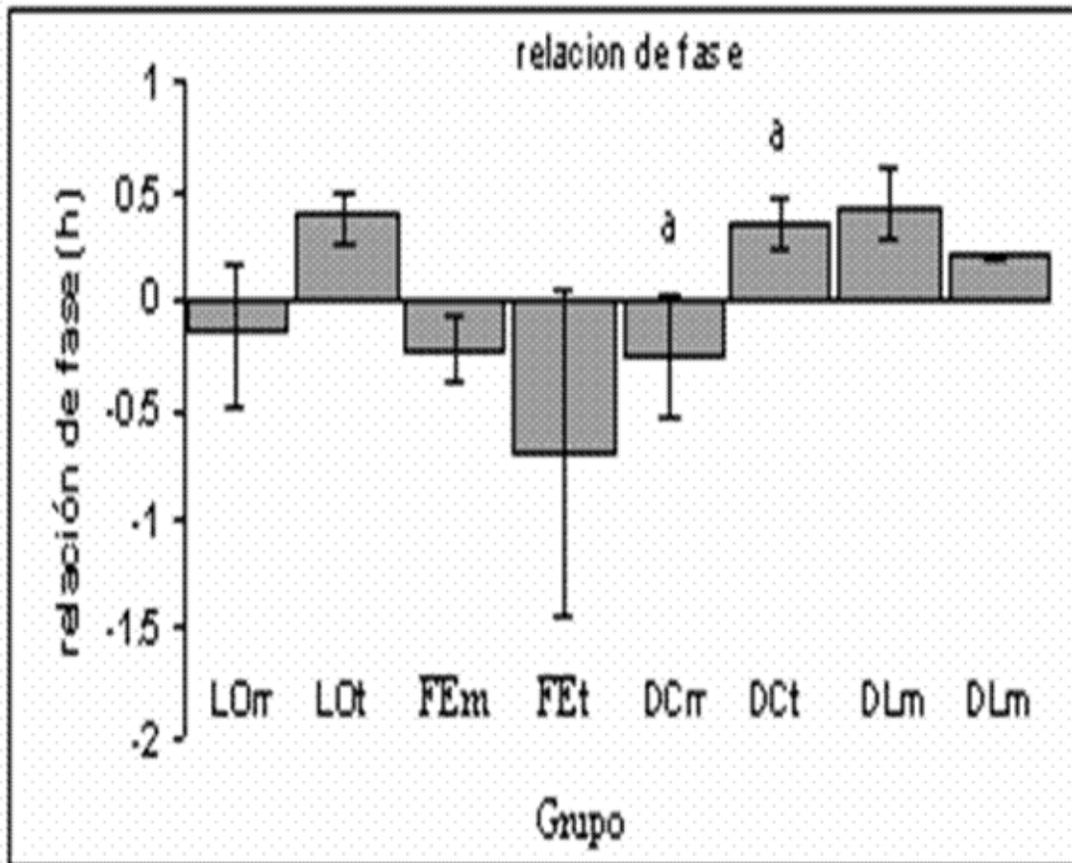
La **figura 16** muestra las variaciones en promedio ( $\pm$  ES) en la relación alfa/rho que se obtuvieron en cada condición. Se indica con letra (a,b,c,d,e y f) los grupos entre los cuales se encontraron diferencias significativas. Podemos ver que hay diferencias entre LO (luz-oscuridad 12:12) y OO posterior a esa condición (a) y con DL (b). La OO posterior a LO y a LL muestra diferencias también (c). No se pudo analizar la relación alfa/rho en LL debido a que no se encontró un parámetro con qué cuantificar la arritmia obtenida en esta condición. Entre la OO posterior a LO y a DL también hay diferencias (d), así como en la OO posterior a LL con DL (e) y DL con la OO siguiente (f).



**Figura 16** Promedio de la relación alfa/rho ( $\pm$  ES). Se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre a, c y d. Se observan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre b, e y f.

### 8.3. Variaciones en la relación de fase entre los distintos fotoperiodos

La **figura 17** muestra la variación en el promedio ( $\pm$  ES) que existe entre las distintas condiciones de luz. La mayor variabilidad entre los organismos se presenta en el pulso de la tarde del FE (FEt) y la mayoría anticiparon el encendido de la luz. La menor variabilidad se encuentra en el pulso de la mañana en días largos (DLm). Existen diferencias significativas entre los grupos marcados con la letra “a” correspondientes a los pulsos de mañana y tarde de DC.



**Figura 17.** Promedio de la relación de fase ( $\pm$  ES). Se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos identificados con la letra “a”.

## 9. DISCUSIÓN

La interacción entre los organismos y su ecosistema, y los mecanismos biológicos de las interacciones entre individuos dentro de sus comunidades, pueden describirse a diferentes niveles de organización biológica. Los organismos se pueden adaptar a su ambiente a través de modificaciones fisiológicas y conductuales, para ello, los estudios de ritmos circadianos nos proveen de diferentes herramientas para entender a los organismos dentro de un ambiente dinámico. Lo que un organismo debe hacer de acuerdo a su supervivencia y reproducción es encontrar alimento, encontrar una pareja, encontrar un hábitat con condiciones óptimas para sobrevivencia (temperatura, humedad, intensidad de luz, pH, oxigenación etc.), así como evadir depredadores y minimizar la competencia con otros organismos. Debido a la rotación de la Tierra, estos factores no se encuentran distribuidos de manera uniforme a través del ciclo día-noche, por lo que la estructura temporal del ambiente de un organismo es un componente igualmente importante de su nicho así como lo son los componentes espaciales, químicos, energéticos y sociales. Esta estructura temporal en el ambiente contribuye a la realización de actividades propias de los organismos en momentos específicos del día. Además, contribuye a la segregación temporal de actividades en especies enteras que contribuyen también a la diversidad de especies que habitan una comunidad. Por tanto, el estudio conductual de diversas especies de animales, ya sea terrestres, acuáticas, diurnas o nocturnas o todas sus variantes y que comparten un mismo nicho, proporciona información sobre la interacción espacial y temporal entre especies y entre comunidades.

Dicho lo anterior, los resultados de este estudio demostraron que la tortuga juvenil *Trachemys scripta* es una especie que es un buen modelo de estudio de ritmos circadianos en condiciones de cautiverio. A pesar de que existe una gran variedad de ritmos por estudiar, el ritmo de actividad locomotriz es una buena herramienta para empezar a describir la ritmicidad de este modelo biológico y no se necesitan de técnicas de laboratorio sofisticadas para estudiarlo. De acuerdo al protocolo de experimentación planteado *Trachemys scripta* se adaptó y respondió de la manera esperada a todas las condiciones lumínicas. Debido a que es una especie diurna y que se distribuye ampliamente se observó que la magnitud de alfa está muy relacionada con la longitud del sincronizador (luz).

*T. scripta* se explota comercialmente desde hace varias décadas con fines de ornato y de alimentación. A pesar de que es una especie de fácil acceso, no existen hasta el presente trabajo, antecedentes directos sobre esta especie como un modelo de estudio de los ritmos circadianos. Aunado a la ventaja de su reproducción es en cautiverio, las tortugas juveniles son fáciles de mantener en acuarios de poco insumo.

El estudio de los ritmos circadianos se originó con la observación de la conducta de los organismos. Como en los modelos biológicos, los modelos conductuales basados en principios circadianos proveen una herramienta que nos permite crear hipótesis acerca de las ventajas evolutivas, el origen y el rol ecológico de los ritmos. Los ritmos circadianos, por los cuales los organismos responden a la estructura temporal de su ambiente, deben ser estudiados como un tema principal dentro de su ecología. La pregunta que surge entre ecólogos y cronobiólogos es si estos mecanismos que regulan el orden temporal 1) recaen directamente en la relación estímulo-respuesta entre el animal y su ambiente, 2) recaen en

un reloj interno, o 3) representan la interacción entre el ambiente externo y el reloj interno (Horton *et al*, 1992).

El estudio de ritmos biológicos en reptiles ha sido enfocado especialmente en lacertilios, sin embargo, nunca se ha puesto mucho interés en el estudio de ritmos circadianos en reptiles acuáticos como las tortugas. Una de las estructuras que marcó un avance importante en el estudio de ritmos biológicos en reptiles fue la glándula pineal, presente en todos los vertebrados, su principal función es sintetizar y liberar al sistema circulatorio la hormona melatonina (Rivkees *et al*, 1989). La glándula pineal y la melatonina tienen un papel fundamental en el control de los ritmos circadianos de reptiles. A diferencia de las lagartijas y otros reptiles terrestres estudiados por el hombre, la glándula pineal en tortugas al parecer es rudimentaria y en algunos casos no funcional, (revisado en Dunlap *et al*; 2004). Un siguiente paso en el estudio de la conducta de *T. scripta*, es identificar qué papel tiene la glándula pineal en el control de la ritmicidad circadiana.

Gracias a los estudios de Menaker (1976) acerca de la evolución de los sistemas circadianos en vertebrados, se cree fielmente que los osciladores circadianos residen centralmente en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de los vertebrados y periféricamente en la glándula pineal y los ojos. Algunas investigaciones han demostrado que lesiones hipotalámicas producen arritmia en la actividad locomotriz de diversas especies de lagartijas (Janik *et al*, 1990; Minutini *et al.*, 1994). Los osciladores circadianos que se han sido mencionados fueron descritos en diferentes clases de vertebrados, pero como ya vimos dentro del grupo de los reptiles las lagartijas han sido las más estudiadas (Tosini *et al*, 2003).

*T. scripta* muestra con facilidad su capacidad de sincronización a los protocolos establecidos. Para un mejor conocimiento de su biología en el área de ritmos, nos basamos en el protocolo de investigación para mamíferos desarrollado por Aschoff (ver metodología) y encontramos que esta especie muestra ritmos muy claros y que ofrecen las herramientas suficientes para su descripción. La especie es diurna, por lo que se esperaba fácil sincronización paramétrica, sin embargo no sabíamos que esperar con la sincronización no paramétrica, y lo que observamos fue que la especie muestra una sincronización eficiente que anticipa a los pulsos de luz, por lo que se concluye que es una especie capaz de sincronizar mediante mecanismos continuos y discretos. Esta descripción ofrece un campo amplio para investigaciones posteriores de la especie.

Un rasgo importante en esta investigación corresponde a la presencia de enmascaramiento positivo y negativo, lo que sugiere que *T. scripta* es un modelo en reptiles para profundizar en el estudio de este fenómeno tan peculiar en el campo de la cronobiología. En la medida que sea necesario generar un protocolo para estudiar el enmascaramiento en sí, el entendimiento de los ritmos biológicos tendrá una nueva perspectiva y no sólo complementará su comprensión sino que enriquecerá el conocimiento de la biología de la conducta de los organismos.

El momento del día durante el cual un organismo está activo puede ser una faceta importante de su biología. Por ejemplo, el inicio y temporalidad de la actividad puede influenciar en el ambiente físico y en el individuo mismo, los competidores potenciales y depredadores que existen y los recursos disponibles. Para las tortugas de agua dulce, los patrones de actividad diaria durante la época de crecimiento (de mayo a septiembre)

pueden ser diurnos o nocturnos y hasta a veces crepusculares (revisado en Gourley, 1979; Graham y Hutchison, 1979).

Un principio básico en la ecología y la evolución es que los individuos que maximizan su consumo de energía mientras minimizan su exposición a la depredación u otros factores de estrés tienen mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse en un ambiente dado (Bennet, 1987; Horton y Rowsemitt, 1992). El grado al cual los factores internos y externos regulan el programa diario temporal podría estar determinado por el nivel de correlación (predictabilidad) en la ocurrencia de eventos ambientales de un ciclo a otro. Los efectos relacionados con sobrevivencia y reproducción y las conductas que coincidan con eventos que son altamente predecibles de ciclo a ciclo podrían estar más estrechamente controlados por un programa interno (reloj interno) que aquellos asociados con condiciones ambientales que tienen niveles menores de predictabilidad (Daan y Pittendrigh, 1976; Rapp, 1980).

La capacidad para anticipar un cambio en el ambiente está dada por un reloj circadiano. Un mecanismo de temporalidad basado en un oscilador permite la expresión de las conductas necesarias para medir el tiempo (Enright, 1970; Daan y Pittendrigh, 1976). La presencia de un oscilador también provee a los organismos la habilidad de reconocer el tiempo local. El reconocimiento del tiempo local resulta en el acoplamiento de actividades con el ciclo ambiental produciendo así una condición conocida como sincronización (Enright, 1965). La sincronización se caracteriza por una relación estable (ángulo de fase  $\psi$ ) entre eventos ambientales específicos (p. ej., crepúsculo) y conductas o comportamientos específicos (p. Ej., inactividad) (Kenagy, 1973; Mrosovsky, 1996). El significado funcional de que  $\tau$  no es necesariamente igual a 24 permite la plasticidad y

conservación de un ángulo de fase estable en cambios estacionales del fotoperíodos longitud del día (Daan y Pittendrigh, 1976). La observación de la desviación de estas predicciones en organismos bajo condiciones de laboratorio controladas indica que otros factores, ya sea dentro o fuera del organismo, están modificando la regulación de su conducta a través del sistema circadiano.

Dentro de todos los cambios externos a los cuales los organismos deben adaptarse se encuentra una clase especial de cambios que de manera predictiva ocurren en asociación con ciclos diarios y estacionales en el ambiente. En el curso de su evolución, la mayoría de las formas de vida han tomado ventaja de la predictabilidad de estos cambios desarrollando programas temporales que desencadenan respuestas adaptativas para anticipar su recurrencia en el tiempo. El estudio del ritmo de actividad en fotoperíodos largos y cortos, nos permite afirmar que la tortuga *T. scripta* presenta características estacionales diferenciales en su ritmo de actividad locomotriz, lo que la hace una especie de interés sobre respuestas estacionales reguladas por fotoperíodo.

El presente trabajo, es un estudio meramente descriptivo y que puede ser una base para el entendimiento de los ritmos que se generan en tortugas de agua dulce como *Trachemys scripta elegans*.

## 10. CONCLUSIONES

- La tortuga *T. scripta* se comporta como animal diurno y crepuscular, y su valor promedio del periodo en libre curso corresponde a lo esperado para un animal diurno.
- La presencia de luz, puede indistintamente, producir enmascaramiento positivo o negativo, sin afectar los mecanismos de sincronización.
- Los mecanismos de sincronización en esta especie son tanto paramétricos y no paramétricos.
- La actividad así como los post efectos de las condiciones en los ciclos de luz, permiten reconocer que el sistema circadiano de *T. scripta*, responde diferencialmente a los distintos protocolos de sincronización y de longitud de fotoperíodo.
- La tortuga juvenil *T. scripta*, puede ser considerada como un buen modelo para el estudio de los ritmos circadianos en quelonios.

## 11. Bibliografía

- Acuña-Mesén R. A. 1988. Ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Pseudemys scripta* (Testudines: Emydidae). Rev. Biol. Trop. (37): 193-200.
- Álvarez, S. T. 1976. Restos óseos de las excavaciones de Tlalilco, Edo. de México. Restos óseos rescatados del Cenote Sagrado de Chichén Itzá. Yucatán. Apuntes Arqueología, México 15: 1-39.
- Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. (25): 11-28.
- Aschoff, J. 1965. Circadian rhythms in Man. Science. Jun; (148) :1427-32.
- Aschoff, J. 1979. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. Z. Tierpsychol. Mar; 49(3): 225-249.
- Aschoff, J. 1981. Handbook of Behavioral Neurobiology and Biological Rhythms. Plenum, New York. 563p.
- Aschoff, J. 1984. Circadian Timing. Ann NY Acad. Sci. 423: 442-468.
- Aschoff, J. 1999. Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. Jpn. J. Physiol. Feb; 49(1): 11-28.
- Aschoff, J., y R. Wever. 1967. Circadian period and phase-angle difference in chaffinches *Fringilla coelebs*. Comp. Biochem. Physiol. Jun; 18(2): 397-404.
- Baylies, M. K., T. A. Bargiello, F. R. Jackson y M. W. Young. 1987. Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the Drosophila clock. Nature. Mar; 326(6111): 390-2.
- Bennett, D. H., J. W. Gibbons y J. C. Franson. 1987. Terrestrial activity in aquatic turtles. Ecology. 51: 738-40.
- Boulos, D. B., J. F. Duffy, R. E. Kronauer y C. A. Czeisler. 1994. Sensivity of the human circadian pacemaker to moderately bright light. J. Biol. Rhythms. (9): 315-331.

- Boyer, D. R. 1965. Ecology of the basking habit in turtles. *Ecology* (46): 99-118.
- Brady, J. 1969. How are insect circadian rhythms controlled?. *Nature*. Nov; 228(5271): 577-8.
- Bünning, E. 1973. *The physiological Clock*. Springer, New York.
- Cagle, F. R. 1950. The life history of the slider turtle, *Pseudemys scripta troostii* (Holbrook). *Ecol. Monogr.* (20): 31-54.
- Chandrashekar, M., R. Subbaraj, y K. Sripathi. 1981. Circadian rhythms in a few species of tropical bats. *Jul-Sep*; 25(3): 219-228.
- Chauvinick, A. (Ed.) 1960. *Biological Clocks*. Cold Spring Harb. Symp-Quart. Biol. Volume 25.
- Cloudsley-Thompson, J. L. 1982. Rhythmic activity in young red-eared terrapins (*Pseudemys scripta elegans*). *British J. Herpetol.* (6): 188-194.
- Cole, F. L. y B. L. Rogers. 1984. Biological rhythms: implications for critical care. *Crit. Care. Nurs.* Nov; 4(6): 30-5.
- Daan, J., y J. Aschoff. 2001. The entrainment of circadian rhythms. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology.*, Volume 12: *Circadian Clocks*, J. Takahashi, F. Threack, and R. Moore (Eds.), pp 7-44.
- Daan, S. y C.S. Pittendrigh. 1976. A functional análisis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. III. Heavy water and constant Light: Homeostasis or frequency? *J. Comp. Physiol.* (106): 267-290.
- Decoursey P. J. 2004. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. pp.27-66. En: *Chronobiology, biological timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. 406 pp.
- DeMairan, J.J. 1729. *Observation botanique. L' Historie de l' Academie Royale Scientifique*, pp 47-48.
- Dunlap, J. C., J. J. Loros y P. J. DeCoursey. 2004. *Chronobiology. Biological Timekeeping*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 406p.

- Enright, J. J. 1965. The search for rhythmicity in biological time-series. *J. Theor. Biol.* May; 8(3): 426-68.
- Ernst, C. H. y R.W. Barbour. 1972. *Turtles of the United States*. University of Kentucky Press, Lexington. 347 pp.
- Etchberger, C. R., J. B. Phillips, M. A. Ewert, C. E. Nelson y H. D. Paige. 1991. Effects of oxygen concentration and clutch on sex determination and physiology in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta*). *J. Exp. Zool.* (258): 394-403.
- Falcon, J., J. B. Marmillan, B. Ctanstrat y J. P. Collin. 1989. Regulation of melatonin secretion via photoreceptive pineal organ: an in vitro study in the pike. *J. Neurosci.* Jun; 9(6): 1943-1950.
- Foster, R. G., M. S. Grace, I. Provencio, W. J. DeGrip y García-Fernández, J. M. 1994. Identification of vertebrate deep brain photoreceptors. *Neurosci and Behav Reviews*, 18(4): 541-546.
- Frankel, H. M., A. Spitzer, J. Blane y E. P. Schoener. 1969. Respiratory response of turtles (*Pseudemys scripta*) to changes in arterial blood gas composition. *Comp. Biochem. Physiol.* Nov; 31(4): 535-46.
- Fukuhara, C. y G. Tosini. 2003. Peripheral circadian oscillators and their rhythmic regulation. *Front. Biosci.* May ; 8: 642-651.
- Gibbons, J. W. y J. E. Lovich. 1990. Sexual dimorphism in turtles with emphasis on the slider turtle (*Trachemys scripta*). *Herpetol. Monogr.* (4): 1-29.
- Gibbons, J. W. y J. L. Greene. 1990. Reproduction in the slider and other species of turtles. *In* Gibbons, J. W., ed. *Life history and ecology of the slider turtles*, 124-134. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Gibbons, J. W., G. H. Keaton, J. P. Shubauer, J. L. Greene, D. H. Benett, J. R. McAuliffe y R. R. Sharitz. 1979. Unusual population size structure in fresh water turtles on barrier islands. *Georgia J. Sci.* (37): 155-159.
- Gourley, E. V. 1979. Circadian activity rhythms of the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Animal Behavior.* Feb; 20(1): 13-20.

- Graham, T. E. Y V. H. Hutchinson. 1979. Effect of temperature and photoperiod acclimatization on thermal preferences of selected freshwater turtles. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A: 299-305.
- Gruart, A., J. M. Delgado, C. Escobar y R. Aguilar Roblero. 2002. Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de Cultura Económica. México. 197p.
- Halberg, F. 1977. International Society for Chronobiology. President's letter. *Chronobiology in 1977. Chronobiologia.* Jul-Sep; 4(3): 255-263.
- Hamasaki, D. I. y D. J. Eder. 1977. Adaptive radiation of the pineal system. *In* F. Crescitelli (Ed.), *Handbook of sensory physiology.* Pp 497-548. New York. Springer-Verlag.
- Hirsch 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.
- Horton, T. H. y C. N. Rowsemitt. 1992. Natural selection and variation in reproductive physiology. *In* T. E. Tomasi y T. H. Horton (Eds.); *Mammalian energetics. Interdisciplinary views of metabolism and reproduction* (pp. 160-185). Ithaca, N. Y. Cornell University Press.
- Hutchinson, V. H., A. Vinegar y R. J. Kosh. 1996. Critical thermal maxima in turtles. *Herpetologica* (22): 32-41.
- Hutchinson. A. M. 1992. A reproducing population of *Trachemys scripta elegans* in southern Pineallas County, Florida. *Herpetol. Rev.* (23): 74-75.
- Jackson, D. R. 1988. Reproductive strategies of sympatric fresh water emydid turtles in northern peninsular Florida. *Bull, Florida St. Mus. Biol. Sci.* (33): 113-158.
- Janik, D. S., G. E. Pickard y M. Menaker. 1990. Circadian locomotor rhythms in the desert iguana. II. Effects of electrolytic lesions to the hypothalamus. *J. Comp. Physiol. (A).* Apr; 166(6): 811-6.
- Janzen, F. J., G. L. Pankstis y E. D. Brodie III. 1992. Observations on basking behavior of hatchling turtles in the wild. *J. Herpetol.* (26): 217-219.

- Kenagy, G. J. 1973. Daily and seasonal patterns of activity and energetics in heteromyd rodent community. *Ecology*. (54): 1201-19.
- Kirsten, E. B. y E. P. Schoener. 1974. Action of anticholinergic and related agents on single vestibular neurons. *Neuropharmacology*. Dec; 12(2): 1167-77.
- Klotter, K. 1960. General properties of oscillating systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 185-187.
- Kramer, G. 1952. Experiments on bird orientation. *Ibis* (94): 265-285.
- Meisler, H., y M. Ueck. 1980. Extracellular photoperiodism of the pineal gland of the aquatic turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Physiol.* (140): 173-179.
- Menaker, M. 1976. Physiological and biochemical aspects of circadian rhythms. *Fet. Proc.* Oct; 35(12): 2325-26.
- Menaker, M. 1997. Rhythms, reproduction and photoreception. *Biol. Reprod.* Jun, 4(3): 295-308. Review.
- Menaker, M. y H. Underwood. 1976. Extraretinal photoreception in birds. *Photophysiology*. Apr; 23(4): 299-306.
- Minutini, L., A. Innocenti, C. Bertolucci y A. Foa. 1994. Electrolytic lesions to the optic chiasm affect circadian locomotor rhythms in lizards. *Neuroreport*. Jan; 5(4): 525-7.
- Moll, E. O. y J. M. Legler. 1971. The life history of a neotropical slider turtle *Pseudemys scripta* (Schoepff), in Panama. *Bull. Los Angeles Co. Mus. Natur. Hist.* (11): 1-102.
- Moore-Ede, M. F., M. Sulzman y C. A. Fuller. 1982. *The Clocks that Time Us*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447p.
- Mrosovsky, N. 1996. Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biol Rev Camb Philos Soc.* Aug; 71(3): 343-72.
- Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (25) : 159-184.

- Pittendrigh, C. S. 1981. Circadian System: Entrainment. *In* Aschoff, J (Ed.) Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. Pp 95-121. New York, Plenum Press.
- Pittendrigh, C. S. y D.H. Minus. 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *AMER. Nat.* (98): 261-294.
- Rapp, P. E. 1980. The origin and function of cellular oscillations. *Cell. Biol. Int. Rep.* Feb; 4(2): 227-9.
- Rivkees, S. A., V. M. Carsons, D. R. Weaver y S. M. Reppert. 1989. Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. *Endocrinology.* Jul; 12(1): 363-8.
- Rogers, K. L. 1976. Herpetofauna of the Beck Ranch local fauna (upper pliocene: Blancan) of Texas. *Publ. Mus. Michigan St. Univ. Paleontol. Ser.* (1): 163-200.
- Silver, R., P. Witkowsky, V. Alones, C. J. Barnstable and y M. N. Lehman. 1998. Coexpression of opsin- and VIP-like immunoreactivity in CSF-contracting neurons of the avian brain. *Cell and Tissue research*, 253, 189-198.
- Strubbe, J. H., N. J. Spiteri y A. J. Ahugh Prins. 1986. Effect of skeleton photoperiod and food availability on the circadian pattern of feeding and drinking in rats. *Physiol. Behav.* 36(4): 647-51.
- Sweeney, B. M., and J. W. Hastings. 1960. Effects of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (25) : 87-104.
- Tabata, M. 1992. Photoreceptor organs and circadian locomotion activity in fishes. *In* M. A. Ali (Ed.), *Rhythms in fishes*. Pp 223-234. New York. Plenum Press.
- Taylor. D. H. y D. E. Ferguson. 1970. Extraoptic celestial orientation in the southern cricket frog *Acris gryllus*. *Science.* 168(929): 390-392.
- Timbal, J., J. Colin y F. Marrolett. Circadian variations of systolic time intervals. 1986. *Acuat Space Environ Med.* Jul; 57(7): 642-6.
- Tosini, G. y C. Fukuhara. 2003. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J. Neuroendocrinol.* Apr; 15(4): 364-9.

- Underwood, H. 1990. The pineal and melatonin regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia*. Jan 15; 46(1): 120-128. Review.
- Underwood, H. y M. Menaker. 1976. Extraretinal photoreception in lizards. *Photophysiology*. Apr 23(4): 227-243.
- Underwood, H., y G. Groos. 1982. Vertebrate circadian rhythms: retinal and extraretinal photoreception. *Experientia*. Sep 15; 38(9): 1013-1021.
- VanDevender, T. R., A. M. Rea y M. L. Smith. 1985. The Sangamon interglacial vertebrate fauna from Rancho la Brisca, Sonora, México. *Trans. San Diego Soc. Natur. Hist.* 24: 23-55.
- Weaver, W. G., Jr. y J. S. Robertson. 1967. A reevaluation of fossil turtles of the *Chrysemys script* group. *Tulane Stud Geol.* (5): 53-66.
- Weaver, W.D. y B. Jr. Siegel. 1968. Photoperiodism as a factor in feeding rhythms of broiler chickens. *Poult Sci.* 47(4): 1148-54.
- Wever, R. 1972. Virtual synchronization toward the limits of the range of entrainment. *J Theor Biol.* Jul; 36(1): 119-132.