



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE ALIMENTO SOBRE EL
RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ EN EL
CANGREJO DE RÍO *Pseudothelphusa americana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JAZMÍN CARRILLO MERCADO



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

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

**Carrillo
Mercado
Jazmín
51199573
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
99056980**

2. Datos del tutor

**Doctor
Manuel
Miranda
Anaya**

3. Datos del Sinodal 2

**M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz**

4. Datos del Sinodal 3

**Doctora
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal**

5. Datos del Sinodal 4

**Doctor
Baltazar
Barrera
Mera**

6. Datos del sinodal 5

**Bióloga
Vania Patricia
Carmona
Alcocer**

Datos del trabajo escrito: Efecto de la restricción de alimento sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz en el cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* 49p. 2009.

*“La vaca con su reloj biológico, el perro con el suyo,
el engranaje de la bomba de agua, los patos
buscando altura, la hilera ceremoniosa de las hormigas: cada
uno con su hora precisa:
la materia pesada y la materia liviana produciendo elementos de
distinta densidad,
la leña cortada y la semilla donde
ya no se ve: el magma de este universo en gestación que
en estos días se llama
sopa primordial: vida
sobre muerte para dar
en muerte sobre vida, y así rotando y
otra vez rotando hasta
la comprobación de que este paisaje, y aún el peso
de lo artificial,
tiene su reloj biológico trabajando desde el parto hasta ahora:
¿y quién es el que anda por aquí? ¿quién
despieza este paisaje inacabado con su reloj en marcha: los
amigos de los que no me he despedido?”*

Santiago Sylvester

AGRADECIMIENTOS

A mi familia empezando por la persona más importante para mí en la vida, mi mamá preciosa por ser mi mayor ejemplo de fortaleza y valor en la vida, por demostrarme cuanto me quieres... por seguir aquí conmigo. Mis hermanos, Flaca (Jacqueline) por ser la única cómplice que inicio su vida al mismo tiempo que la mía, gracias por todas las travesuras que hicimos juntas y por compartir mis sueños. Flaco (José) por demostrar tu amor a esta familia y sacrificar tanto para que sigamos juntos.

Pekita (Dulce) por ser como una segunda hermana para mí y regalarme momentos con un poco de locura, Campeón (Daniel) por ser la persona más honesta y justa que conozco, Campis (Carlos) por tener esa chispa de humor que siempre nos hace olvidarnos un poco de los problemas. Tía Guya por creer en mí cuando más lo necesite y darme una oportunidad, Tío Marcos por adoptarnos.

Mary por preocuparte por mí desde que tenía 4 años, por cuidarme y quererme. Montse por hacer que mi niña interior salga cada vez que te veo y Dianita por ese "Jazz, te quiero mucho" que dices tan sinceramente.

Ernesto por ser la inspiración y motivación para cerrar esta etapa en mi vida, por cada uno de tus consejos que me están ayudando a ser una mejor bióloga, mujer y persona. Gracias por estar a mi lado siempre que lo necesito y seguir compartiéndote conmigo y por que cada día me recuerdas que bajo este cielo hay alguien que me quiere y en estos momentos ese alguien eres tú... Te amo.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por toda la paciencia que me tuvo para terminar esta tesis, por ser un gran asesor y siempre estar al pendiente de lo que necesitaba y me hacía falta, por darme los consejos necesarios para ayudarme a crecer como persona y así formar una mejor bióloga, pero sobre todo por nunca dejar de confiar en mí.

A Adrián por haberme apoyado durante estos años, ayudaste a encontrar mi capacidad de asombro ante las cosas maravillosas de la vida, la cual creía perdida, por devolverme la sonrisa y creer en mí desde el primer momento.

A Paulo y Diega por ser los cronopios más divertidos que he conocido en la vida y contagiarme de toda esa felicidad cada vez que están a mi alrededor. Por prestarme sus oídos y hombros cada vez que lo necesito, solo por ser **YO**. No tienen idea de cuanto los quiero.

A Marco y Lizz por la amistad que me han brindado durante casi 10 años, de los cuales tengo recuerdos muy gratos. Por preocuparse de mí en cada torneo y consentirme después. Los adoro y saben que siempre están conmigo.

Al profesor Macario de Félix Estupiñán por enseñarme a ser una guerrera dentro y fuera del área de combate y ayudarme a entender mejor la filosofía del TKD, para aplicarlos en mi vida. A los amigos que forme dentro del TKD Héctor, Lili, Paty, Juan, Yolo, Perla, Richy, Raúl, Pam y Rodrigo por mostrar su apoyo como grupo en todo momento y ayudarme a no dejarme vencer tan fácilmente.

Club lechuza!!! Clau, Paty y Erik por tantas y tantas horas de café que incluyen momentos divertidos, por todas las buenas pláticas y los planes a futuro. Por ustedes amigos sssssssshhhhhhhhh.

A mis sinodales Al Dr. Baltazar Barrera Mera, Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal, M. en C. Enrique Moreno Sáenz y a la Biól. Vania Patricia Carmona Alcocer, por el tiempo dedicado a las sugerencias y comentarios para mejorar este trabajo.

Y por último pero no menos importante a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una magnífica formación académica, por que aquí conocí y desarrollé mi pasión por la biología. A cada uno de los profesores que dejaron huella en mi corazón. **"Por mi raza hablará el espíritu"**.

Algunas cosas del pasado desaparecieron pero otras abren una brecha al futuro y son las que quiero rescatar.

Mario Benedetti

Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el conocimiento, el sentido, de la maravillosa estructura de la existencia. Con el humilde intento de comprender aunque más no sea una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza.

Albert Einstein

Andábamos sin buscarnos, pero sabiendo que andábamos para encontrarnos.

Julio Cortázar

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Los ritmos Biológicos.....	2
1.2 Características de los Ritmos Circadianos.....	5
1.2.1 Libre Curso.....	5
1.2.2 Efectos de la Luz Constante a Diferentes Intensidades.....	6
1.2.3 Post-Efectos.....	6
1.2.4 Compensación de los cambios de temperatura.....	7
1.2.5 Sincronización.....	8
1.2.6 Límites de Sincronización.....	10
1.2.7 Curva de respuesta de Fase.....	11
1.3 Enmascaramiento.....	12
1.4 Organización del Sistema Circadiano.....	12
1.4.1 Múltiples Osciladores.....	15
1.5 El Oscilador Sincronizado por Alimento.....	17
2. Antecedentes	19
2.1 El Sistema Circadiano en los Crustáceos Decápodos.....	19
2.2 Biología de Crustáceos y de la Especie (<i>P. americana</i>)	22
3. Planteamiento del Problema.....	25
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	26
5.1 General.....	26

5.2 Particulares.....	26
6 Material y Método.....	27
6.1 Obtención y Mantenimiento de los Animales.....	27
6.2 Registro de la Actividad Locomotriz.....	27
6.3 Diseño Experimental.....	29
6.3.1 Sincronización Fótica y No Fótica.....	29
7. Resultados.....	31
7.1 Primer Protocolo	31
7.1.2 Condiciones de LO.....	31
7.1.3 Condiciones de OO con Restricción de Alimento.....	33
7.2 Segundo Protocolo	36
7.2.1 Condiciones de LO.....	36
7.2.2 Condiciones de OO con Restricción de Alimento.....	36
8. Discusión.....	42
9. Conclusiones	46
10. Bibliografía	47

RESUMEN

Los organismos necesitan tener suficiente energía para poder sobrevivir y realizar funciones tales como la reproducción, la actividad locomotriz, migración, etc., por lo cual requieren estrategias de alimentación eficientes. Algunas especies de animales tienen solo ciertos momentos y disponen de poco tiempo durante el día para poder conseguir su alimento, las cuales también pueden variar conforme pasan las estaciones del año. En este sentido los marcapasos circadianos pueden permitirles por medio de las señales ambientales crear patrones temporales de conducta adecuados para facilitar la obtención de comida.

En el presente trabajo se tiene como objetivo analizar los efectos de la restricción de alimento en organismos con baja demanda energética como lo es el cangrejo de río *Pseudothelphusa americana*, tomando como respuesta el ritmo de actividad locomotriz. Para cumplir con tal objetivo se plantearon dos protocolos con diferentes condiciones de iluminación, en el primero se colocó a los cangrejos en condiciones de luz-oscuridad (LO), oscuridad constante (OO), OO con restricción de alimento (RA) de 30 min. por día y OO. En el segundo protocolo se consideró un objeto placebo y condiciones LO en la RA para observar diferencias, así como dos estímulos de alimentación a diferentes horarios con duración de 1 hora. Los resultados obtenidos indican que en condiciones de LO en el primer protocolo muestra que la presencia de alimento puede cambiar la fase de inicio de actividad e inclusive sincronizar el ritmo de algunos animales observados. Con respecto a se discute la capacidad de sincronización en organismos expuestos a la restricción de alimento. En el primer grupo se obtuvo una mayor respuesta de sincronización, en el grupo 2 también se obtuvo una respuesta al alimento en el primer pulso a pesar de contar con el fotoperiodo. Se determinó que esta especie responde al pulso de alimento mostrando una actividad anticipatoria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los Ritmos Biológicos

A lo largo de su evolución, los seres vivos han interactuado con el ambiente, lo que les ha impuesto condiciones que obligan adaptar su fisiología para poder tener una mayor probabilidad de supervivencia. Una característica crucial del mismo ambiente son las series de cambios que suceden en diferentes intervalos de tiempo y que están relacionados con eventos geofísicos, lo que ha dado lugar a respuestas biológicas basadas en la duración de estos cambios conocidas como ritmos biológicos y que se definen como variaciones cíclicas que ocurren en diferentes parámetros del funcionamiento de los organismos (Aguilar-Roblero, 1993).

Una clasificación de los ritmos es con base en su frecuencia en un día, los que ocurren alrededor de 24 horas y se les conoce como ritmos circadianos (del latín *circa*: cerca y *diano*: día), los ritmos ultradianos, son aquellos que suceden varias veces en un día, y los ritmos infradianos cuyo periodo es mayor de 30 horas o requieren de varios días para completar un ciclo (Pittendrigh, 1981).

De los primeros experimentos reportados sobre las características de los ritmos biológicos, particularmente aquellos que suceden una vez al día, destaca el de DeMarian en 1729, quién demostró que la ciclicidad en los movimientos del follaje de una planta, la mimosa púdica, se mantenía a pesar de alejarla del ciclo de luz-oscuridad.

Este fenómeno lo llevó a preguntarse si los ritmos se originan sólo como una respuesta a una señal cíclica ambiental, es decir si son exógenos o si los genera el propio organismo, es decir, que son endógenos y el ambiente solo es un modulador del ritmo. Posteriormente a los experimentos de DeMairan, una gran variedad de trabajos se han venido desarrollando para conocer y entender mejor las características básicas de los ritmos biológicos.

Los fenómenos recurrentes tienen ciertas características generales tales como el *periodo* el cual se puede definir como el lapso de tiempo en el que ocurre la repetición del ritmo, la magnitud de la variación de dicho fenómeno se denomina *amplitud* y se estima del valor máximo, o cresta, al valor mínimo, o valle, del ciclo. El uso del término *fase* se refiere al momento en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio, como la cresta o el valle. Al evento característico seleccionado para estimar la fase le llamamos *marcador de fase* (Gruart, et al; 2002).

Dentro de la oscilación, la región de actividad se define como *alfa* y los niveles de reposo durante el ritmo los definimos como *rho*, ello depende del tipo de señal cíclica con la que se cuente (fig 1).

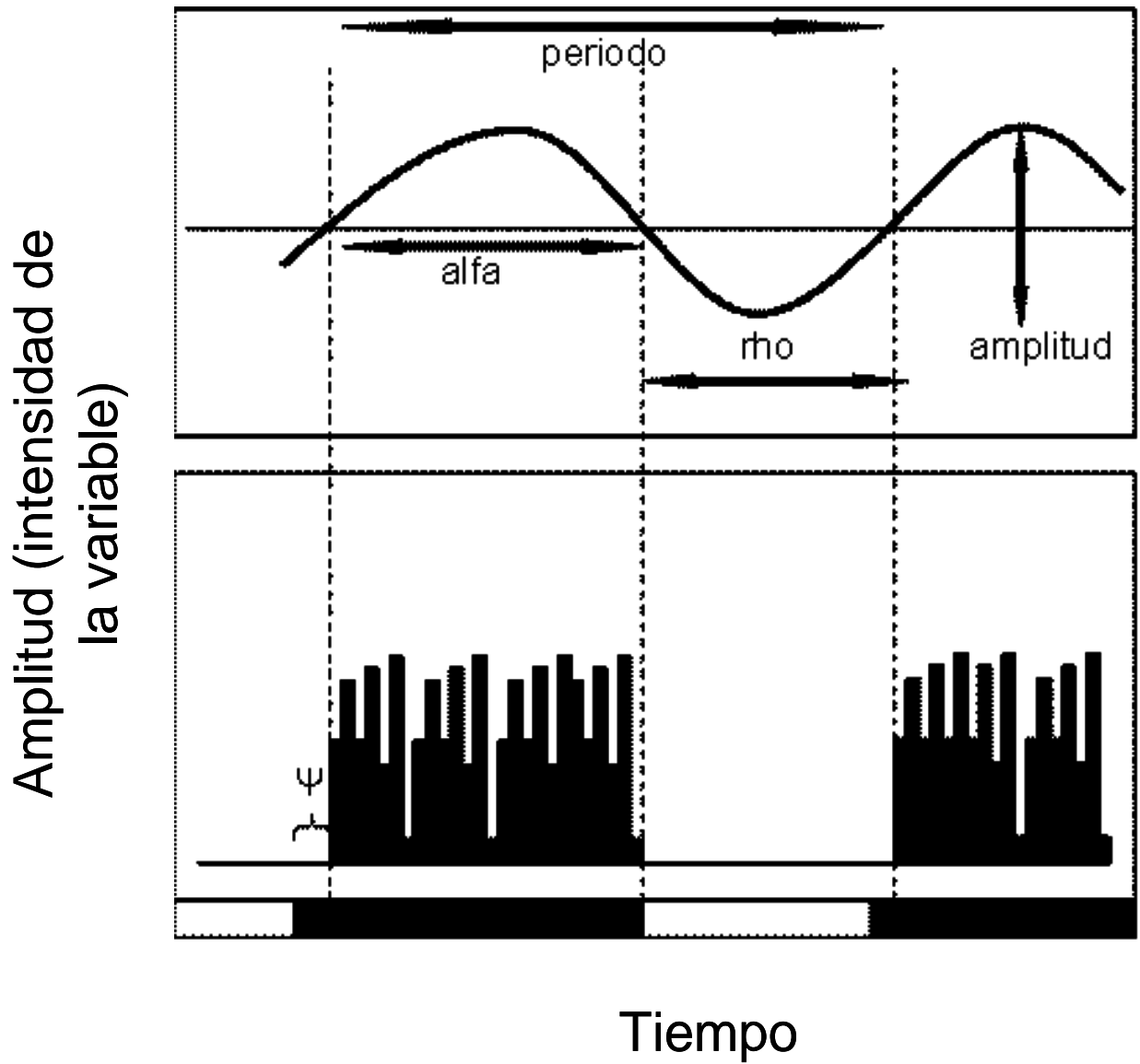


Fig.1. Los parámetros típicos evaluados en un ritmo circadiano. (Tomado de Samario, 2008).

Los ritmos biológicos de naturaleza endógena son generados en estructuras del individuo conocidas como reloj biológico; el cual es un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades fisiológicas y conductuales, implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna (Aguilar-Roblero, 1993). Este sistema permite una interacción adecuada entre el organismo y su ambiente.

1.2 Características de los Ritmos Circadianos

1.2.1 Libre Curso

Cuando se mantiene a un organismo aislado de cualquier tipo de señal ambiental temporal, puede observarse que la ritmicidad de la variable observada se sigue presentando con una ligera desviación en el periodo del ritmo en comparación al que se genera en condiciones naturales; a este fenómeno se le conoce como oscilación espontánea en libre curso (*free running*, en inglés). El periodo endógeno es denominado con la letra griega tau (τ) y varía entre los individuos y especies. Entonces τ es una aproximación a los ciclos ambientales relevantes, y su variación indica que el ritmo observado surge independientemente de ciclos externos (Moore-Ede et.al, 1982). Así podríamos determinar un periodo característico para cada especie, lo que sugiere que es determinado por la información genética. Se pueden hacer ciertas generalizaciones, en las que especies diurnas, (τ) es mayor a 24 horas y en especies nocturnas (τ) es menor de 24 horas, en libre curso en condiciones de oscuridad constante (Aschoff, 1960).

1.2.2 Efectos de la luz constante a distintas intensidades

Entre los factores ambientales que pueden afectar el valor de τ , se encuentra la iluminación ambiental. Estos efectos de la iluminación se reflejan en las reglas circadianas de Aschoff propuestas en 1960. De acuerdo con la primera de éstas, en la mayoría de las especies diurnas se logra observar un acortamiento de τ con mayor intensidad de luz, mientras que para las especies nocturnas, τ se alarga. La segunda regla indica que si bien τ se acorta al aumentar la intensidad de la luz en animales diurnos, el cambio es directamente proporcional a la intensidad en los animales nocturnos. La tercera regla señala que la proporción actividad/reposo ($\alpha-\rho$) aumenta con el incremento en la intensidad de la luz en animales diurnos, pero disminuye en los nocturnos. La exposición a la luz brillante constante en algunas especies, puede crear la desorganización de la ritmicidad, lo que puede tener como consecuencia un patrón arrítmico de conducta. Esta señal o falta de ritmicidad se han interpretado como el desacoplamiento entre múltiples osciladores (Aschoff, 1960).

1.2.3 Post-Efectos

El periodo de un ritmo circadiano en libre curso esta fuertemente influido por las propiedades del fotoperiodo al que estuvo expuesto previamente, es decir que es historia-dependiente (Pittendrigh y Daan, 1976b), a éste fenómeno de alteración se le conoce como post-efecto.

1.2.4 Compensación de los cambios de temperatura.

Esta propiedad de los relojes biológicos, se refiere a que el valor de τ de un organismo es muy similar cuando se mide a diferentes temperaturas ambientales. La mayoría de los procesos biológicos dependen de la temperatura en la que se llevan a cabo las reacciones enzimáticas, una forma de determinar el grado de dependencia es utilizar el Q_{10} , que 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). Es decir que τ se mantiene relativamente constante a pesar de que se presenten variaciones en la temperatura que pueden llegar a afectar la cinética de procesos enzimáticos cada vez que se aumenta 10° C ($Q_{10}=2-3$). Lo anterior sugiere que existen mecanismos a este nivel, que compensan los cambios 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. Éste proceso es esencial, ya que si pequeños cambios en la temperatura los afectara perderían su periodicidad. En la mayoría de las especies, la velocidad del periodo de los ritmos circadianos antes y después de un incremento de 10° C está en el intervalo de 0.85 a 1.3 ($Q_{10}\sim 1$), como resultado de la compensación de temperatura. Esto permite a los organismos que puedan realizar de una manera más eficiente la medición del tiempo no importando si ocurren fluctuaciones en la temperatura del ambiente (Pittendrigh, 1981).

1.2.5 Sincronización

En condiciones naturales el ambiente geofísico presentan diversas variaciones cíclicas, por lo que la ritmicidad biológica no manifiesta su libre curso, si no que presenta una estrecha relación temporal con estos, la cual se manifiesta en forma más notable en el periodo de la ritmicidad biológica y en su relación de fase con los ciclos ambientales. A este fenómeno le llamamos sincronización y su importancia radica en que permite el ajuste del periodo del tiempo biológico con el geofísico (Aguilar, 1993).

La sincronización de acuerdo con Aschoff, consiste en que los relojes biológicos ajustan su periodo de oscilación τ al periodo del ritmo ambiental T , de tal forma que el periodo del ritmo endógeno sincronizado $\tau^* = T$, además se establece una relación ó ángulo de fase (ψ o, z) constante entre la fase del ritmo endógeno (φ_0) y la fase del ritmo ambiental (φ_z), la cual depende de la intensidad del estímulo sincronizador y la relación entre τ y T ; de tal forma que para una intensidad determinada del sincronizador, el principal determinante es la relación entre τ y T , cuando $\tau < T$ el ritmo endógeno precede al ambiental (ψ es positiva), mientras que cuando $\tau > T$ el ritmo endógeno sigue al ambiental (ψ es negativa). Por otra parte, cuando la relación τ/T es constante, la disminución en la intensidad del sincronizador incrementa el valor de ψ . La intensidad del estímulo sincronizador y la relación $\tau-T$, determinan la potencia del sincronizador. La sincronización y el tiempo que requiere para que se realice dependerá de la fuerza de la señal así como de la sensibilidad del organismo a la misma (Pittendrigh, 1981).

A cualquier tipo de señal ambiental capaz de sincronizar un ritmo y que se presenta de manera cíclica se le da el nombre de *zeitgeber* (del alemán “dador de tiempo”). Los sincronizadores más comunes son la luz y la temperatura, aunque también se encuentran los sonidos, la disponibilidad de comida, señales sociales, etc.

Las variaciones en distintos parámetros del ambiente se presentan cíclicamente día con día; por lo tanto, el periodo del ritmo biológico está ajustado al del ambiente y el periodo endógeno no se observa a menos que se aíse del ambiente cíclico. Cuando el periodo endógeno y su relación de fase del oscilador se ajustan estrechamente al del estímulo externo, se le conoce como sincronización (en inglés, *entrainment*). Sin este proceso, los individuos no podrían ajustar sus funciones a los cambios cíclicos que se presenten en el ambiente. La sincronización le da una relevancia adaptativa a los ritmos biológicos, ya que permiten maximizar la supervivencia del individuo, colocándolo en el tiempo adecuado para realizar diferentes funciones fisiológicas y conductuales.

Se ha demostrado por diversos autores, que existe una variedad de fenómenos ambientales que pueden funcionar como *zeitgebers* de los ritmos endógenos. De todas ellas, se considera que las variaciones en la iluminación del ciclo día-noche son las que poseen mayor estabilidad en su periodo y fase, por lo que son los más predecibles actuando a su vez el principal sincronizador (Moore-Ede, et al, 1982).

Existen dos teorías para explicar la sincronización: Una implica el modelo continuo ó paramétrico, el cual se enfoca en la importancia de los cambios graduales de la iluminación en el ambiente. La segunda propone un modelo discreto ó no paramétrico, éste se enfoca en los efectos de transición en el ambiente como el amanecer y el crepúsculo (Pittendrigh y Daan, 1976).

En la sincronización paramétrica se propone que la velocidad angular del oscilador es afectada continuamente, generando así adelantos y atrasos de su velocidad angular para ajustarlos al ambiente; en el modelo de sincronización no paramétrica sólo se afecta la fase del oscilador en las transiciones de inicio y fin del estímulo.

1.2..6 Límites de sincronización

Dentro del fenómeno de sincronización se establecen ciertos límites de periodo T , fuera de este rango el ritmo presenta libre curso. Estos ciclos T están determinados principalmente por el periodo en libre curso y la curva de respuesta de fase. Entre más compleja es la organización anatómico-funcional del organismo el rango de sincronización se irá haciendo más pequeño y a medida de que este rango se amplía disminuye el cambio de ψ inducidos por cambios en el T .

También pueden presentarse casos a los que Aschoff denominó “sincronización parcial” en los que se estudian simultáneamente de más de un sistema efector ante un estímulo sincronizador, algunos ritmos se sincronizan y otros presentan libre curso (Aguilar, 1993).

1.2.7 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 o tiempo circadiano 12* (TC12). Así pues, el TC12 marca el inicio de la noche subjetiva y esta se extiende hasta TC 24; mientras que el día subjetivo se extiende desde TC 0 hasta TC 12 (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)

1.3. Enmascaramiento

Se puede dar el caso de que ciertas condiciones experimentales ó señales ambientales puedan llegar a obscurecer el mecanismo real del sincronizador actuando sobre los sistemas efectores del ritmo manifiesto sin llegar a afectar el reloj circadiano; a este fenómeno se le conoce como enmascaramiento (Moore-Ede, *et al*; 1982) y puede diferenciarse de la sincronización al observar si la fase del ritmo en libre curso, corresponde a la que se predice por la fase del oscilador previa a la presencia del estímulo que provocó el enmascaramiento (Dunlap *et al*, 2004).

1.4 Organización del sistema circadiano

La mayor información acerca de la organización circadiana en los animales viene de algunos organismos modelo. Los sistemas circadianos de los animales multicelulares consisten de uno o más marcapasos (osciladores maestros con capacidad para imponer su fase y periodo a otros osciladores) para la generación de ritmos diarios, señales de entrada del medio para transmitir la información sensorial necesaria para la sincronización y mensajes de señales de salida para regular diariamente la fisiología y conducta rítmica.

La búsqueda de los marcapasos se ha enfocado en el sistema nervioso central, pero también se ha observado que existen varios tejidos que son de señal de salida en el sistema nervioso que tienen un ritmo circadiano robusto (figura 2).

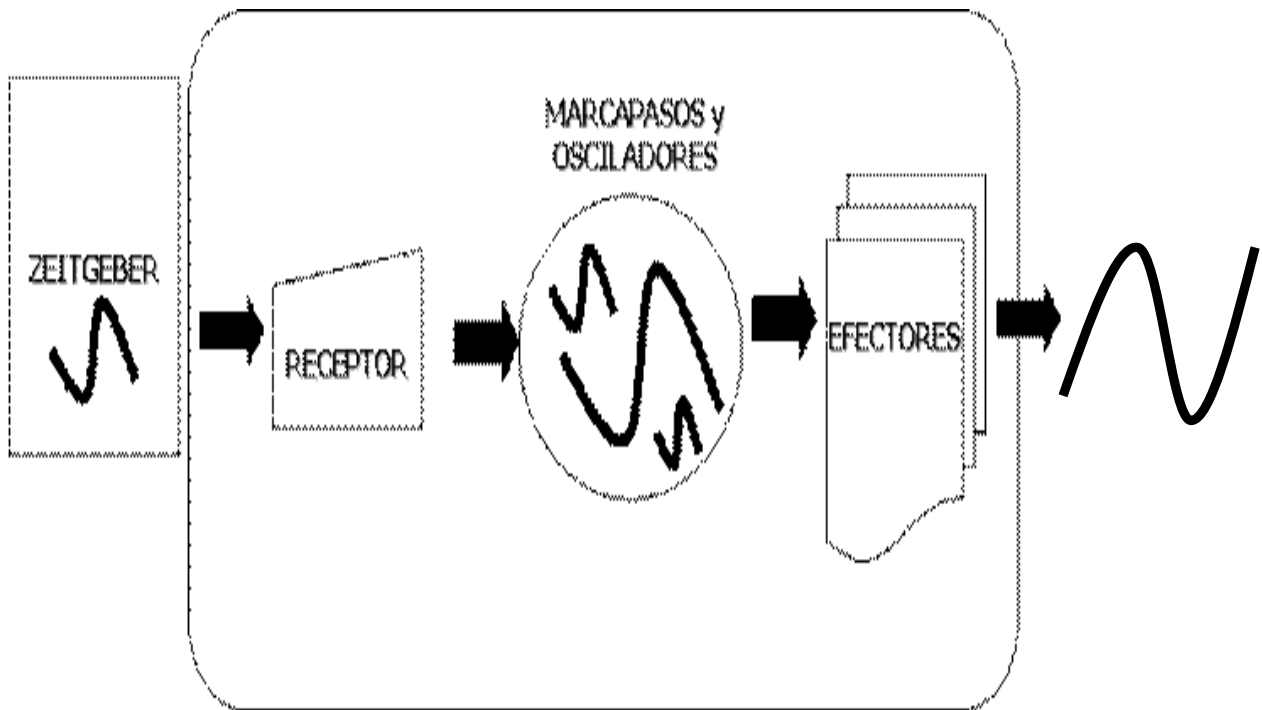


Figura 2. Representación básica de los elementos que integran un sistema circadiano. Los ciclos ambientales son Zeitgebers que sincronizan al reloj circadiano para que su salida tenga el mismo periodo.

La organización del sistema circadiano en invertebrados ha sido enfocada en el sistema nervioso central de dos especies de moluscos gasterópodos y en varias especies de artrópodos. En los moluscos marinos *Bulla gouldiana* y *Aplysia californica* se observó en cultivos de ojo aislado que el ritmo de potenciales de acción se mantenía en libre curso bajo condiciones constantes de laboratorio. Las neuronas basales de la retina del ojo sirven de marcapasos y los fotorreceptores para la sincronización, (DeCoursey, 2004).

Los sistemas circadianos de artrópodos mejor conocidos son el del escorpión y el de la cacerola de mar *Limulus*. En insectos, el marcapaso primario se ha encontrado en el lóbulo óptico para grillos, cucarachas, en los escarabajos y el lóbulo cerebral para moscas y mariposas nocturnas. La retina y fotorreceptores extrarretinianos proporcionan una señal de entrada para la sincronización a las condiciones ambientales locales. El reloj del escorpión está oculto en el protocerebro y cinco conjuntos de ojos laterales sirven en la detección de iluminación para la sincronización circadiana (DeCoursey, 2004).

En los animales vertebrados no mamíferos el principal marcapasos frecuentemente es la glándula pineal, la retina y el núcleo supraquiasmático (NSQ). La glándula pineal es fotorreceptora y junto con la retina participan en la sincronización por luz. Otros fotorreceptores periféricos pueden presentarse en este grupo, y la sincronización no fótica es importante en algunas especies.

1.4.1 Múltiples osciladores

A lo largo del tiempo se han podido identificar en distintos niveles elementos que cumplen con las características de un reloj biológico, esto nos lleva a pensar en si en un organismo existe un solo reloj que lleva todos los ritmos ó si cada ritmo tiene un oscilador.

En distintas especies de vertebrados e invertebrados se han localizado una serie de genes cuyo producto regula el periodo de la ritmicidad biológica. A nivel de sistemas se ha identificado estructuras como el ganglio cerebral en la polilla, la glándula pineal en las aves o el NSQ en los mamíferos. Cada una de estas estructuras ha sido capaz de imponer periodo y fase de la ritmicidad biológica en cada una de las señales de salida estudiadas. Este tipo de reloj consistiría en un oscilador autosostenido que impondría fase y periodo a la salida de sistemas efectores. El oscilador sería el responsable del ajuste de fase del organismo ante señales cíclicas del ambiente (Johnson et al, 2004)

Por otra parte se ha observado en la fisiología animal, que para la regulación de los sistemas organizados, se requiere de asas de retroalimentación negativa, las cuales pueden considerarse osciladores potenciales, donde el periodo dependería de las características cinéticas del sistema. La relevancia funcional de estos dos tipos de osciladores (físicamente discretos y los que surgen de sistemas de retroalimentación negativa), se ha demostrado por medio de diversos estudios. La perturbación en el funcionamiento de los sistemas fisiológicos no es capaz de alterar la organización temporal del individuo, salvo en las estructuras consideradas como

marcapasos y la lesión en éstas últimas no es capaz de conducir a la formación de individuos arrítmicos (Moore-Ede et al, 1982).

Por todas estas observaciones se sugiere un modelo de estructura multioscilar jerárquica del sistema circadiano. Esta jerarquización pudiera depender del hecho de que mientras la oscilación de las asas de retroalimentación negativa ocurre en sistemas orientados a mantener constante la salida de estos, la oscilación en los marcapasos parece ser en sí misma la salida regulada del sistema. En el primer caso las oscilaciones son atenuadas y fácilmente perturbables en su periodo y fase, mientras que en el segundo las oscilaciones son autosostenidas y las perturbaciones del periodo y fase son compensadas por componentes aparentemente homeostáticos (Aguilar, 1993).

Existen tres tipos de características que hacen válida la teoría de más de un oscilador en un individuo. Uno, el sistema circadiano está compuesto por dos ó más osciladores capaces de generar un ritmo circadiano auto sostenido. Dos, estos osciladores potencialmente independientes están sincronizados entre si estando o no el organismo en un ambiente periódico. Tres, cada oscilador está normalmente sincronizado a ciertos ciclos ambientales específicos, así que debe haber transductores que conviertan la señal ambiental en señales biológicas que puedan sincronizar a cada oscilador (Moore-Ede, *et al*; 1982).

1.5 El oscilador sincronizado por alimento

Todos los organismos necesitan energía para sobrevivir y reproducirse, las presiones de selección natural han mantenido las estrategias más eficientes para estas funciones. Para algunos omnívoros y carnívoros sus fuentes de alimento están disponibles sólo durante un cierto momento durante el día y esta disponibilidad puede cambiar durante las estaciones. Para los herbívoros la fuente de alimento es relativamente constante, pero puede ser que sólo cierto momento en el día esté libre de depredadores. Por estas razones la disponibilidad de alimento y el tiempo de ingesta del mismo son factores muy importantes para la sobrevivencia de los organismos. Los animales pueden usar un reloj circadiano para generar patrones temporales óptimos de conducta, incluyendo los de alimentación (Stephan, 2001).

Las observaciones y experimentos relacionados con la sincronización por alimento establecieron que las abejas tienen una memoria para el tiempo de comida basado en un reloj circadiano endógeno (Bünning, 1973). En 1922 Ritcher observó que en mamíferos, particularmente en ratas, que eran alimentadas diariamente en un horario restringido, incrementaban su actividad locomotriz varias horas antes del tiempo de comida, es decir, que las ratas “anticipaban” el tiempo de disponibilidad de alimento (Johnson, et al, 2004).

La primera evidencia indirecta de que la actividad anticipatoria (AA) puede ser controlada por otro reloj circadiano, se muestra en el trabajo de

Meyer-Lohmann en 1955. Los ratones estudiados en oscuridad constante y comiendo una vez al día se volvían activos antes de la llegada del alimento, pero simultáneamente mostraban un ritmo de actividad en libre curso, con un periodo más corto de 24 horas. Esto implicaba que dos osciladores estaban involucrados, pero tuvieron que pasar varias décadas y la realización de varios experimentos para que esta idea fuera aceptada.

Diversas investigaciones de los efectos de restricción diaria de alimento en los procesos fisiológicos, revelaron que la temperatura y los niveles de corticosterona aumentan anticipando el acceso de comida (Krieger, 1974) y que la comida compite aparentemente con la luz como zeitgeber para estas funciones.

En un estudio donde los ratones tuvieron lesión en el núcleo supraquiasmático (NSQ), no se eliminó el aumento anticipatorio de la temperatura y la corticosterona. Lo que indica que la sincronización por alimento es regulada por otro oscilador distinto al NSQ, en la actualidad aún se desarrollan experimentos para poder localizar el oscilador de sincronización por alimento (FEO, por sus siglas en inglés *Food-Entrainable Oscillator*). Para el estudio de las propiedades del FEO se usan roedores principalmente con lesiones en el NSQ pero con la capacidad de sincronización con ciclos rápidos de comida.

2. ANTECEDENTES

2.1 El sistema circadiano en los crustáceos decápodos

Los crustáceos son uno de los grupos animales más grandes en número de especies e individuos, así como uno de los más diversos en comportamiento, están muy bien adaptados a los diferentes hábitats que van desde aguas tropicales a árticas, estuarios, océanos, agua dulce y hábitats terrestres.

A pesar de que dentro del grupo de los invertebrados más estudiados están los crustáceos estos cuentan con poca información acerca de los relojes biológicos, debido a factores como: una talla pequeña, hábitats relativamente inaccesibles y la complejidad extrema del ciclo ambiental, lo que resulta en ritmos biológicos poco claros, además de la fragilidad que presentan muchos crustáceos bajo condiciones de laboratorio. Sin embargo, existen algunas revisiones que incluyen ciertos aspectos de la ritmicidad en crustáceos en donde se ha confirmado la tesis de que los marcapasos biológicos operan funciones rítmicas en estos organismos (DeCoursey, 1983).

En crustáceos ha sido difícil identificar una estructura que funcione como reloj aislado (*in vitro*), sin embargo, estos han sido estudiados a través de medios indirectos, usando salidas rítmicas para estudiar las propiedades del reloj. Entre los ciclos biológicos más estudiados están los reproductivos, de sensibilidad visual y de actividad locomotriz (Fanjul-Moles *et al*, 1992, Miranda-Anaya *et al*, 2003a,b).

DeCoursey (1983), menciona que los ritmos mejor estudiados en crustáceos son los de reproducción y en decápodos en particular los de actividad locomotriz. Entre los principales estudios de ritmicidad en la actividad locomotriz en decápodos de agua dulce, están principalmente los de acociles (Miranda-Anaya, 1994; Fanjul-Moles, 1998); así como estudios recientes en el cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* (Miranda-Anaya et al, 2003a; 2003b, 2004, Carmona-Alcocer et al, 2005).

Se han realizado estudios en crustáceos sobre ritmos biológicos, los primeros reportes fueron por cambio de color del integumento de organismos como acociles y cangrejos del género *Uca*, haciendo énfasis en la desaparición del ritmo por eliminación de los pedúnculos oculares, determinando a estos como centros rítmicos que llevan a cabo esta función mediante la liberación de hormonas (Brown, 1983).

De los ritmos más estudiados en crustáceos de agua dulce, están los de la migración de pigmentos retinales en cangrejos, donde se observó que el pigmento retinal se expande en el día y contrae por las noches. Se ha propuesto que existe un mecanismo hormonal que regula los pigmentos ya que no se ha demostrado la existencia de fibras nerviosas eferentes hacia ellos (Brown, 1983; Aréchiga, et. al, 1992).

Otros ritmos investigados son las tasas metabólicas de algunos cangrejos, como la aceleración del corazón en fase nocturna, cambio de pH en músculo e hígado, consumo de O₂, etcétera, postulándose con estos estudios la existencia de un ritmo general en el metabolismo y reforzando la hipótesis de la existencia de ciclos diarios, mensuales y lunares en la tasa metabólica, algunos ciclos de origen exógeno que constituyen el sistema del marcapasos para las ritmicidades endógenas persistentes (Brown, 1983).

Dentro de la gran diversidad de estudios, pueden existir algunas contradicciones, pero todos los autores están de acuerdo en que se presenta una pérdida de ritmicidad después de la ablación de los pedúnculos (para *Cambarus*, *Uca* y *Trichodactylus*). Lo anterior sugiere que el mecanismo hormonal del pedúnculo es al menos un mediador, si no un reloj autónomo involucrado en el control de la actividad locomotriz rítmica.

Diversos estudios apuntan a que el sistema circadiano de los crustáceos es multioscilario (Page, 2001). Se ha identificado que diversos elementos cumplen con la función de reloj biológico. Los sistemas postulados como osciladores en crustáceos son: el pedúnculo ocular, y el protocerebro en el ganglio supraesofágico (Page y Larimer, 1975; Fanjul-Moles, 1998; Fuentes-Pardo et. al, 1996).

2.2 Biología de crustáceos y de la especie (*Pseudothelphusa americana*)

Los crustáceos son artrópodos, su característica principal es que tienen el tegumento muy consistente, en ciertas especies logra una dureza acentuada, esto debido a que la cubierta de quitina está formada por sales calcáreas y forman una costra. Su anatomía externa se caracteriza por que su cabeza consiste de cinco somitas: anténulas (o primeras antenas), antenas (o segundas antenas), las mandíbulas que aparecen cubriendo la boca, detrás de las mandíbulas están dos pares de apéndices alimentarios accesorios: maxilulas o primeras maxilas y el maxilar o segundas maxilas (Ruppert y Barnes, 1996).

El orden decápoda se caracteriza porque en estos individuos los tres primeros pares de apéndices torácicos se han transformado en maxilípedos (apéndices modificados para la alimentación), los cinco pares restantes son patas y de ellos viene el nombre. Este orden incluye crustáceos como camarones, langostas y cangrejos, en los cuales el caparazón cubre las regiones cefálica y torácica, formando el cefalotórax el cual se extiende lateralmente para formar las cámaras branquiales, además el primer par de patas se transforma en quelípedos (apéndices para defensa o alimentación).

Los decápodos son predominantemente marinos (89%), pero también han logrado invadir ambientes dulceacuícolas (10%) y terrestres (1%). Los adultos en su mayoría son organismos bentónicos que viven sobre el sustrato, protegidos por las rocas o la vegetación, pero también pueden vivir enterrados en el sedimento (infauna).

El orden Decápoda se divide en dos subórdenes: Dendrobranchiata y Pleocyemata; en este último se encuentran los camarones, langostas, acociles y cangrejos anomuros y verdaderos. Los cangrejos braquiuros (o cangrejos verdaderos), tienen el primer par de pereiópodos quelado más desarrollado que los restantes, el abdomen es reducido y simétrico y totalmente flexionado sobre la superficie ventral del tórax (Álvarez y Villalobos, 1996).

Los cangrejos de agua dulce del continente americano pertenecen a dos familias: Pseudothelphusidae y Trichodactylidae. Para distinguir las dos familias se toma en cuenta la forma del caparazón; en los pseudotelfúsidos es más ancho con dientes anterolaterales muy reducidos o ausentes, mientras que en los tricodactílicos es de redondeado a hexagonal con espinas anterolaterales bien formadas (Álvarez y Villalobos, 1997). Los cangrejos de agua dulce representan un componente importante en los ecosistemas dulceacuícolas ya que son eficientes procesadores de materia orgánica, depredadores de pequeños invertebrados y peces, son a su vez, alimento de una gran variedad de vertebrados y huéspedes intermediarios de parásitos del hombre.

Los cangrejos de la familia Pseudothelphusidae se distribuyen en el continente americano siguiendo un patrón estrictamente neotropical. La distribución de la familia va desde el norte de Sonora, continuando hacia el sur por la vertiente del Pacífico hasta el eje neovolcánico, a partir del cual se dirige hacia la costa del Golfo de México. El resto de la porción sur central de México está ocupada por estos organismos, con la excepción de la Península de Yucatán.

Estos cangrejos se distribuyen en Centroamérica y el norte de Sudamérica desde las Guayanas hasta Perú, incluyendo una vasta porción de la cuenca del Amazonas (Álvarez y Villalobos, 1997).

La familia Pseudothelphusidae generalmente se encuentra debajo de las rocas, en las orillas de los ríos y lagos debido a que tienen la capacidad de realizar respiración aérea, siempre y cuando exista suficiente humedad en el ambiente. Se ha descrito una membrana epitelial a través de la cual se da el intercambio de gases llamada “pseudopulmón”. Esta adaptación le ha permitido a estos cangrejos ocupar tierras húmedas a cientos de metros de un cuerpo de agua. La morfología externa es uniforme en todas las especies de la familia, con excepción de las formas cavernícolas que carecen de pigmentación y ojos, y presentan una elongación de los apéndices ambulatorios (Álvarez y Villalobos, 1997). Estas especies presentan un desarrollo directo, es decir, no hay etapa larvaria, de los huevecillos emergen pequeños cangrejos que permanecen en el abdomen de la hembra durante algún tiempo hasta alcanzar tallas de más de 1.6 mm de ancho de caparazón. Este tipo de desarrollo es una respuesta a la necesidad de permanecer cerca del lugar de origen, ya que si se alejan de éste, disminuyen sus posibilidades de encontrar un lugar apropiado para establecerse, las áreas de distribución de cada especie pueden ser muy reducidas, una sección de un río, una cascada, una porción de la orilla de un lago, una cañada, etc. Necesariamente, una dispersión reducida o ausente conduce a la diferenciación de las poblaciones y consecuentemente a la especiación (Álvarez y Villalobos, 1997)

3. Planteamiento del problema

Se han realizado muchos trabajos con la sincronización como tema principal, su importancia radica en que ésta permite al organismo ajustar sus diferentes funciones a las variaciones cíclicas del ambiente.

En el caso del cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* se toma como principal sincronizador a los periodos de luz – oscuridad ya que se tienen registros de que es una especie crepuscular, que en condiciones de laboratorio presenta un ritmo circadiano bimodal donde los picos de actividad se encuentran relacionados con el encendido y apagado de las luces (Ramírez-Lomelí, 2002). En esta especie, los componentes de actividad se mantienen en condiciones de oscuridad constante y se llegan a tener varios ciclos en libre curso (Miranda-Anaya et. al, 2003a, Carmona-Alcocer et al, 2005).

En este estudio se toman en cuenta no sólo la sincronización fótica, también se considera la sincronización por medio del alimento, ya que la disponibilidad de éste es indispensable para la sobrevivencia de los animales.

También se analiza la importancia de la comida como sincronizador en competencia con la luz, un zeitgeber que es ampliamente eficiente en la sincronización de los ritmos circadianos en *Pseudothelphusa*, una especie que no tiene altas demandas energéticas, pues es un invertebrado y por lo tanto ectotermo.

4. Hipótesis

En distintos estudios se ha observado que el ciclo de luz-oscuridad funciona como un agente sincronizador fuerte, pero también se ha propuesto como sincronizador al alimento obteniendo una respuesta de actividad anticipatoria (AA). Si el alimento funciona como sincronizador en el cangrejo de río *Pseudothelphusa americana*, entonces los animales presentarán una respuesta de anticipación al alimento, sincronizando su ritmo de actividad locomotriz a la presencia de éste. Si además ésta anticipación se presenta en ciclos de luz y oscuridad, indicará que el alimento es un sincronizador tan fuerte como el ciclo de luz.

5. Objetivos

5.1 General

Analizar la eficiencia que tiene el alimento como zeitgeber en un cangrejo de río y si existe actividad anticipatoria a la presencia de alimento.

5.2 Particulares

- 1.- Observar si el alimento sincroniza el ritmo circadiano en libre curso y si se presenta una actividad de anticipación (AA) al mismo.
- 2.- Conocer si existe una diferencia entre el efecto del ciclo de luz-oscuridad y el ciclo de alimento.
- 3.- Observar si el placebo produce una respuesta de sincronización y actividad de anticipación.
- 4.- Si se requiere un periodo largo de ayuno para reforzar el efecto del alimento como agente sincronizador.

6. Materiales y Método

6.1 Obtención y mantenimiento de los animales.

Los animales fueron obtenidos de estanques naturales en Mixquiahuala, Estado de Hidalgo, se trasladaron al acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, para ser aclimatados durante dos semanas con fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y alimentados con cubos pequeños de salchicha de pavo y verdura. Durante la aclimatación, los cangrejos fueron mantenidos en acuarios de vidrio, parcialmente llenos de agua y recambiada totalmente dos veces a la semana. El alimento (cubos pequeños de salchicha de pavo y verdura precocida) fue proporcionado diario a distintas horas para no crear sincronización a esta actividad.

6.2 Registro de la actividad locomotriz

El registro de la actividad locomotriz se llevó a cabo dentro de las cámaras de ambiente controlado del taller de Biología de Animales II de la Facultad de Ciencias UNAM. En total se utilizaron 24 cangrejos sin distinción de sexo, peso y sin distinción entre estado juvenil o adulto.

Cada cangrejo fue colocado en acuarios individuales de 30x10x11 cm equipados con fotosensores infrarrojos conectados a un sistema de registro (PC). Los datos obtenidos, fueron acumulados en bloques (bin) de 10 minutos. Los sensores registraron el movimiento uno a la vez (figura 3).

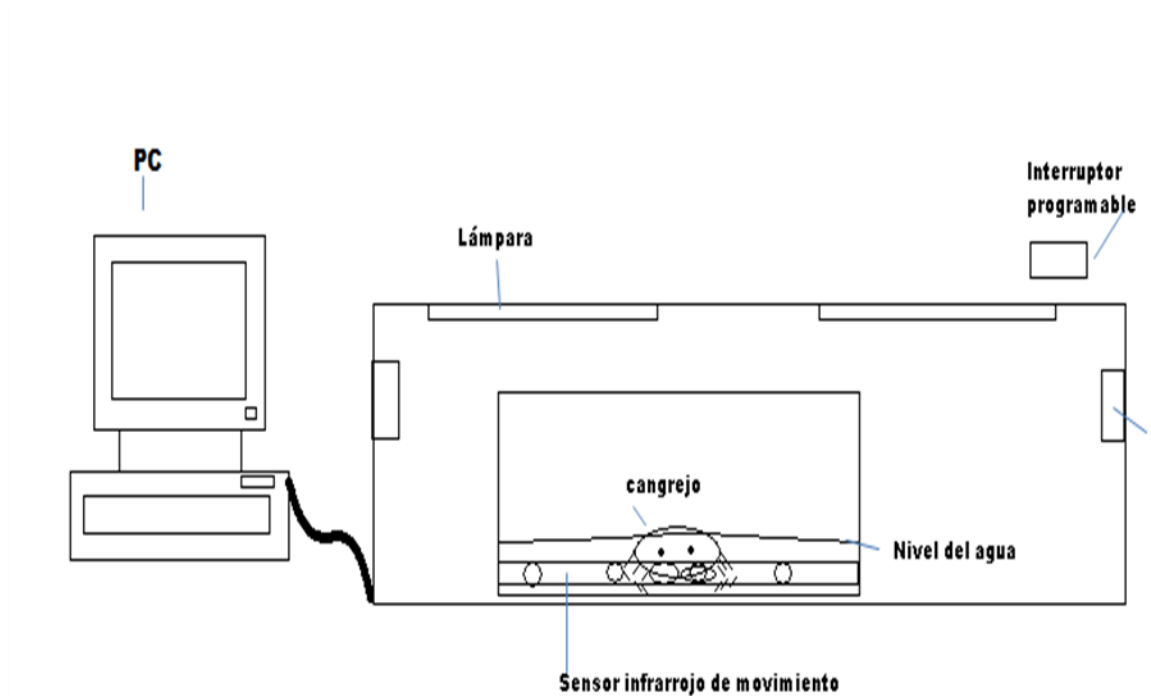


Figura 3. Sistema de registro de actividad locomotriz mediante sensores infrarrojos acoplados al acuario que contenía el espécimen.

Se colocaron ocho acuarios en un gabinete de madera, acondicionados con lámparas (Phillips, 150 lux) que proporcionaron las condiciones de luz. El fotoperiodo fue controlado por medio de un interruptor programable. El fotoperiodo comprendió un ciclo de 12 horas de luz con 12 horas de oscuridad (LO 12:12).

6.3 Diseño Experimental

6.3.1 Sincronización Fótica y No Fótica

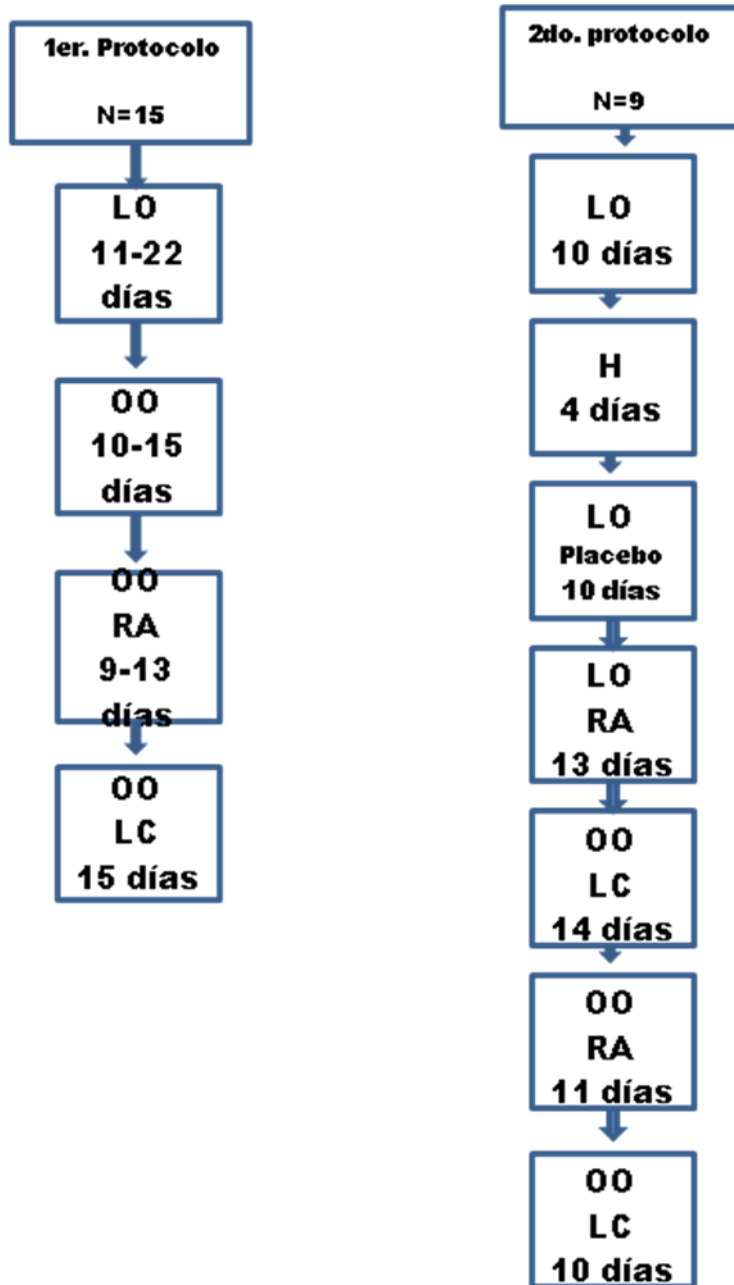
Los animales fueron divididos en dos grupos para seguir distintos protocolos de sincronización de la siguiente manera: G1 (15 cangrejos) y G2 (9 cangrejos). La restricción de alimento esta definida para este trabajo como el tiempo limitado y un momento determinado en el día en la que se les proporcionó alimento a los cangrejos. El objeto placebo considerado para el segundo protocolo consistió en un círculo de plástico colocado durante 4 días por 60 minutos de 10:00 a 11:00 am.

Primer protocolo: La sincronización Fótica consistió de 10 a 22 días en un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad (LO 12:12) con alimento cada 5 días, de 10 a 15 días en oscuridad constante con alimento cada 5 días, de 9 a 13 días en oscuridad constante (OO) con restricción de alimento (RA) de 40 minutos en promedio alrededor de las 10:00 am y para finalizar 15 días en OO en libre curso (LC).

Segundo protocolo: La sincronización fótica consistió de 10 días en un fotoperiodo de LO 12:12 con alimento diario, 4 días en hambruna en LO 12:12, 10 días en LO 12:12 presentando diario un estímulo con el objeto placebo (plástico en forma circular), 13 días en LO 12:12 RA de 60 minutos de 10:00 a 11:00 am, 14 días en OO y LC, 11 días con RA de 60 minutos de 13:00 a 14:00 pm y para finalizar 10 días en OO y LC.

En la figura 4 se presenta el método de trabajo seguido para cada uno de los grupos experimentales, y las condiciones a las que fueron sometidos para

obtener un registro continuo de sus movimientos.



LO: Luz- oscuridad (12:12)

OO: Oscuridad constante

RA: Restricción de alimento

LC: Libre Curso

H: Hambruna

Figura 4. Diseño experimental usado en el presente trabajo.

7. RESULTADOS

7.1 Primer protocolo

7.1.1 Condiciones de LO

Los cangrejos de éste grupo mostraron un ritmo circadiano de actividad locomotriz bimodal con picos de actividad relacionados con el encendido y el apagado de las luces. En la tabla 1 se muestran los valores de periodo en esta condición y se observa que tres organismos presentaron periodos de 24.5, 22.4 y 26.5 h respectivamente. El resto de los cangrejos presentaron ritmos con periodos de 23.9 lo que indica una sincronización al fotoperiodo. Al poner el alimento por 50 minutos tres horas después del encendido de las luces, sólo hay un animal que no se sincronizó con el ciclo LO, estabiliza el periodo del ritmo a 23.9 h, mientras que cuatro cangrejos presentan actividad arrítmica.

	PERIODO	
1er. protocolo		
Individuo	LO	OOR
c11	23.5	arritmico
c51	24.5	23.9
c61	23.9	22.5
c71	23.9	23.9
c81	22.4	25
c12	23.9	24.91
c22	23.9	arritmico
c32	26.5	arritmico
c42	23.9	24.2
c52	23.9	24.06
c62		23.45
c72		arritmico

Tabla 1. Se presentan los valores de periodo en horas, obtenido mediante el periodograma de X^2 , de cada uno de los individuos usados en diferentes condiciones experimentales. LO= Luz/oscuridad 12:12, LORA= ciclos de luz/oscuridad con restricción de alimento.

7.1.2 Condiciones de OO con Restricción de alimento

La figura 5 muestra dos actogramas dobles¹ en donde se observa la sincronización al pulso de alimento (izquierda) y donde el alimento no tuvo efecto sobre el periodo del ritmo (derecha). Las condiciones de iluminación iniciales (LO) correspondiente a los primeros 20 días, se muestran con las barras blancas y negras en la parte superior de cada actograma. Las subsecuentes condiciones de iluminación se indican al lado izquierdo de cada actograma (LO, OO) y si hay presencia de alimento a la misma hora (RA). El actograma de la izquierda muestra que al presentar el alimento del día 39 al 65 la actividad anticipa la presencia del alimento aproximadamente dos horas antes. Al suspender el pulso de alimento, el ritmo desaparece. La figura de la derecha muestra claramente el ritmo en libre curso y no tiene respuesta los ciclos LO ni a la presencia de alimento.

¹ Técnica que a partir de una captura de datos, efectuada durante un periodo P a intervalos constantes, se agrupan los datos en subintervalos y se escalan para construir una gráfica de n barras, donde n es un número de intervalos definidos en P. Además, para observar mejor la ritmicidad se repite al lado izquierdo la misma gráfica, pero recorrida un periodo, sobre la escala de las ordenadas; de esta forma se observa que si la ritmicidad corresponde al periodo P seleccionado, se obtendrá una gráfica de desfase, o bien si la ritmicidad es mayor a la del periodo propuesto, la gráfica presentará una pendiente negativa, mientras que si es menor presentará una pendiente positiva. De esta forma es posible apreciar el periodo y fase del fenómeno en estudio (Vega, 1993).

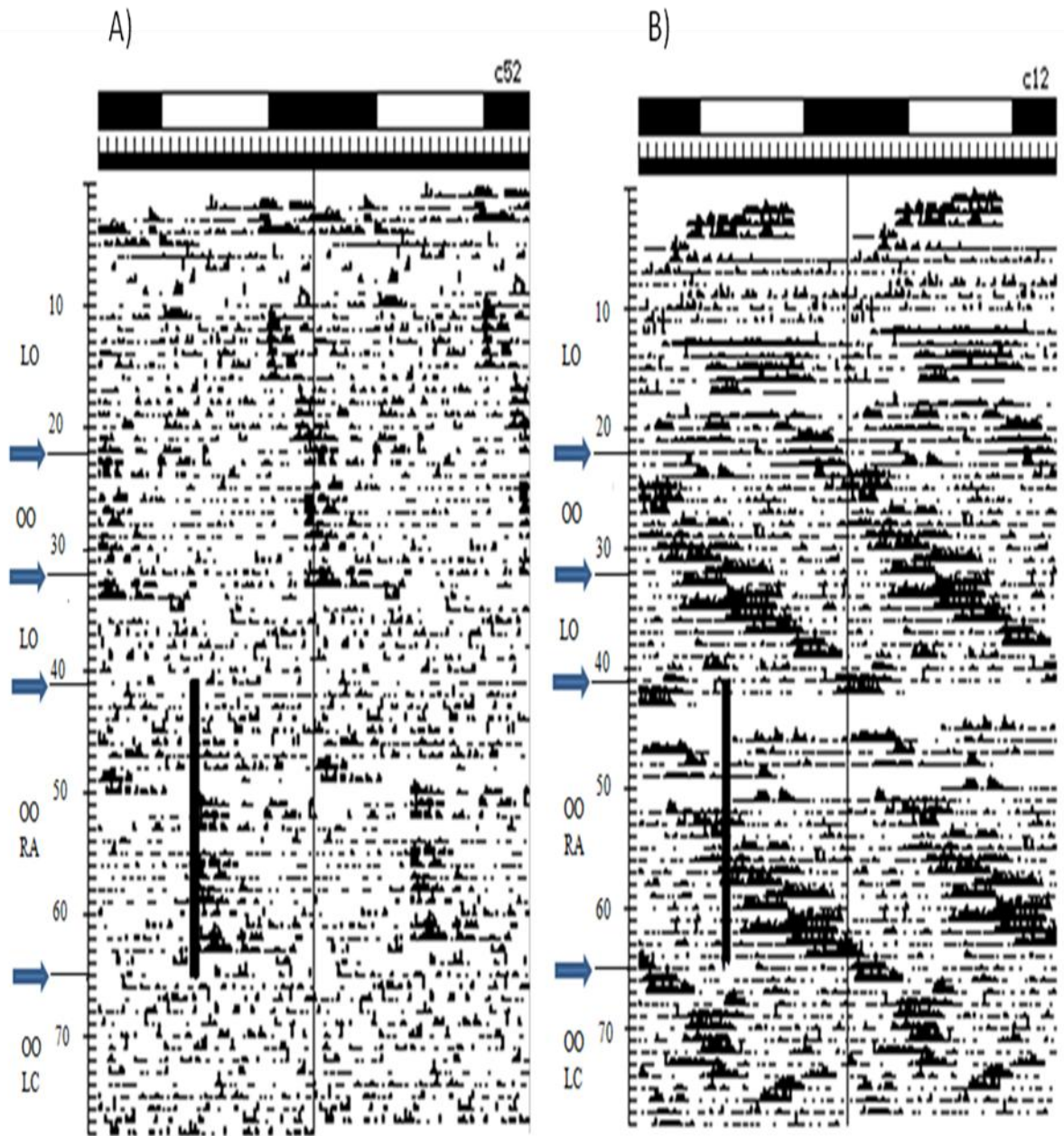


Fig.5 A) Actograma del ritmo de actividad locomotriz durante el protocolo 1. el organismo de la izquierda anticipa y sincroniza a la presencia del alimento durante DD, B) se observa como es que este organismo al principio del protocolo solo sincroniza al fotoperiodo de LO 12:12 solo por los primeros días, después de esto sigue un libre curso muy marcado sin responder al estímulo del alimento para poder sincronizarlo. La línea oscura representa la presencia del alimento. La flecha azul indica el cambio de condición.

En la figura 6, se muestra a los organismos que sincronizaron al ciclo LO, en un histograma de frecuencias, de las fases de inicio de actividad en ciclos LO (gráfica superior) y de la fase al presentar el alimento durante el fotoperiodo. Se puede observar que en LO, las fases se distribuyen alrededor de la transición del fotoperiodo, pero al presentar el alimento (señalado con una flecha en el histograma inferior), las fases se redistribuyen alrededor del pulso del alimento.

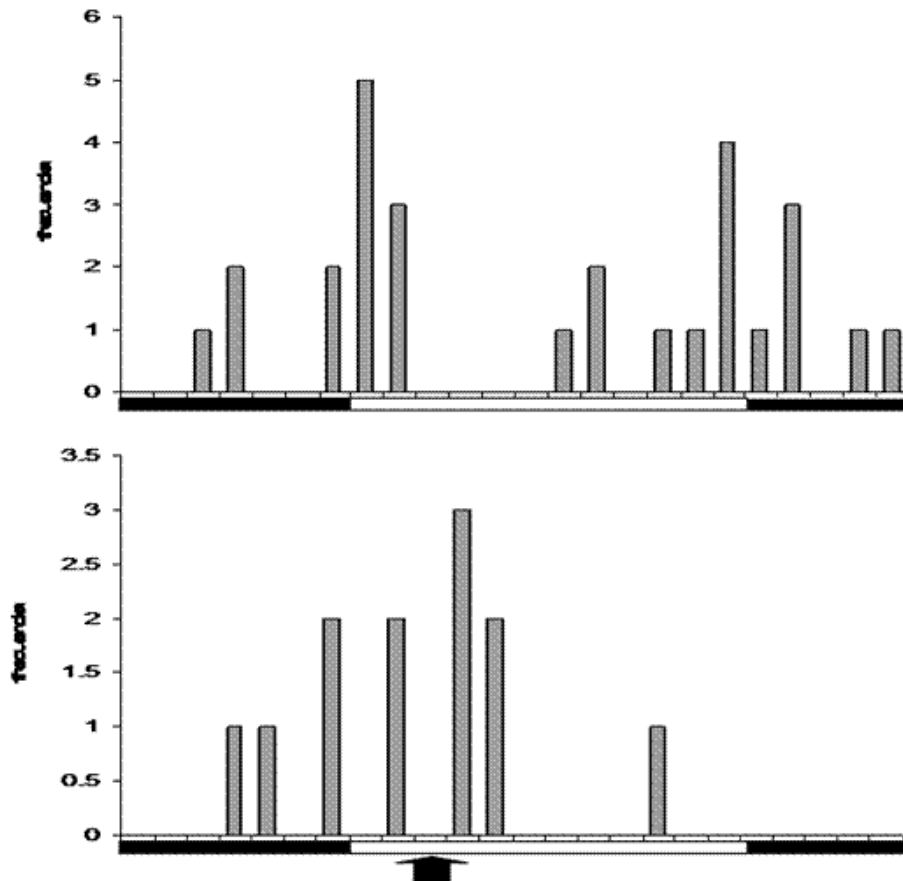


Fig.6 Se muestra un histograma doble. En el histograma superior se puede observar el comportamiento de los individuos durante la fase de LO en el primer protocolo. En el histograma inferior se presenta con una flecha negra el momento en el que es presentado el estímulo del alimento.

7.2 Segundo protocolo

7.2.1 Condiciones de LO

La tabla 2 indica el valor del periodo del ritmo de actividad locomotriz observado en el segundo protocolo. En ella se observa que 7 de 9 cangrejos no presentan sincronización al fotoperiodo en los días revisados en el protocolo, en el que además se presentó un objeto como placebo, el cual no enmascara el efecto del alimento como sincronizador. La segunda columna muestra que sólo tres cangrejos no responden a la presencia de alimento y los demás modifican el valor del periodo a uno más cercano a las 24 horas, en condiciones de oscuridad constante. A la segunda exposición pero a diferente horario, cinco cangrejos de ocho no sincronizaron al pulso de alimento.

	PERIODO		
2do protocolo			
Individuo	LOplacebo	LORA	OORA
c23	28	24.06	29.5
c33	23.89	27.7	
c43	22.59	23.89	25.42
c53	23.1	23.89	27.06
c63	27.57	23.78	23.89
c73	27.57	23.97	22.08
c83	23.89	24.63	24.79
cA3	28.37	22.18	23.81
cB3	23.92	23.97	23.81

Tabla 2. Se presentan los valores de periodo en horas, obtenido mediante el periodograma de X^2 , de cada uno de los individuos usados en diferentes condiciones experimentales. LO= Luz/oscuridad 12:12 con estímulo de un objeto placebo, LORA= ciclos de luz/oscuridad 12:12 con restricción de alimento y OO= oscuridad constante con restricción de alimento.

7.2.2 Condiciones de OO con Restricción de alimento

La figura 7 muestra dos actogramas dobles en donde se observa la sincronización al pulso de alimento (actograma a la izquierda) y donde el alimento no tuvo efecto sobre el periodo del ritmo (actograma a la derecha). Las condiciones de iluminación iniciales (LO) correspondiente a los primeros 13 días, se muestra con las barras blancas y negras en la parte superior de cada actograma. En este actograma se observan los días en los que se presentó el objeto placebo del día 14 al 24 durante 1 hora de 10:00 a 11:00 am, este no provocó ninguna alteración en el ritmo de actividad locomotriz. Las subsecuentes condiciones de iluminación se indican al lado izquierdo de cada actograma (LO, OO) y si hay presencia de alimento a la misma hora (RA). El actograma de la izquierda muestra que al presentar el alimento del día 24 al 38 y del 51 al 62 por 1 hora de 10:00 a 11:00 am la actividad anticipa la presencia del alimento aproximadamente dos horas antes. Al suspender el pulso de alimento, el ritmo parece seguir con la misma fase aunque se presenta de una manera menos marcada. Al presentar el segundo pulso de alimento del día 51 al 62 de 13:00 a 14:00 pm se nota un acortamiento del periodo sin sincronizar a éste. En el actograma de la derecha se observa como el cangrejo se sincroniza con el fotoperiodo pero sin tener respuesta al objeto placebo. Cuando se presenta tanto el primer como el segundo pulso de alimento no sincroniza a la presencia de estos, sigue mostrando una respuesta más fuerte al fotoperiodo. En cuanto se presentan las condiciones de OO se muestra ligeramente el libre curso del ritmo de actividad

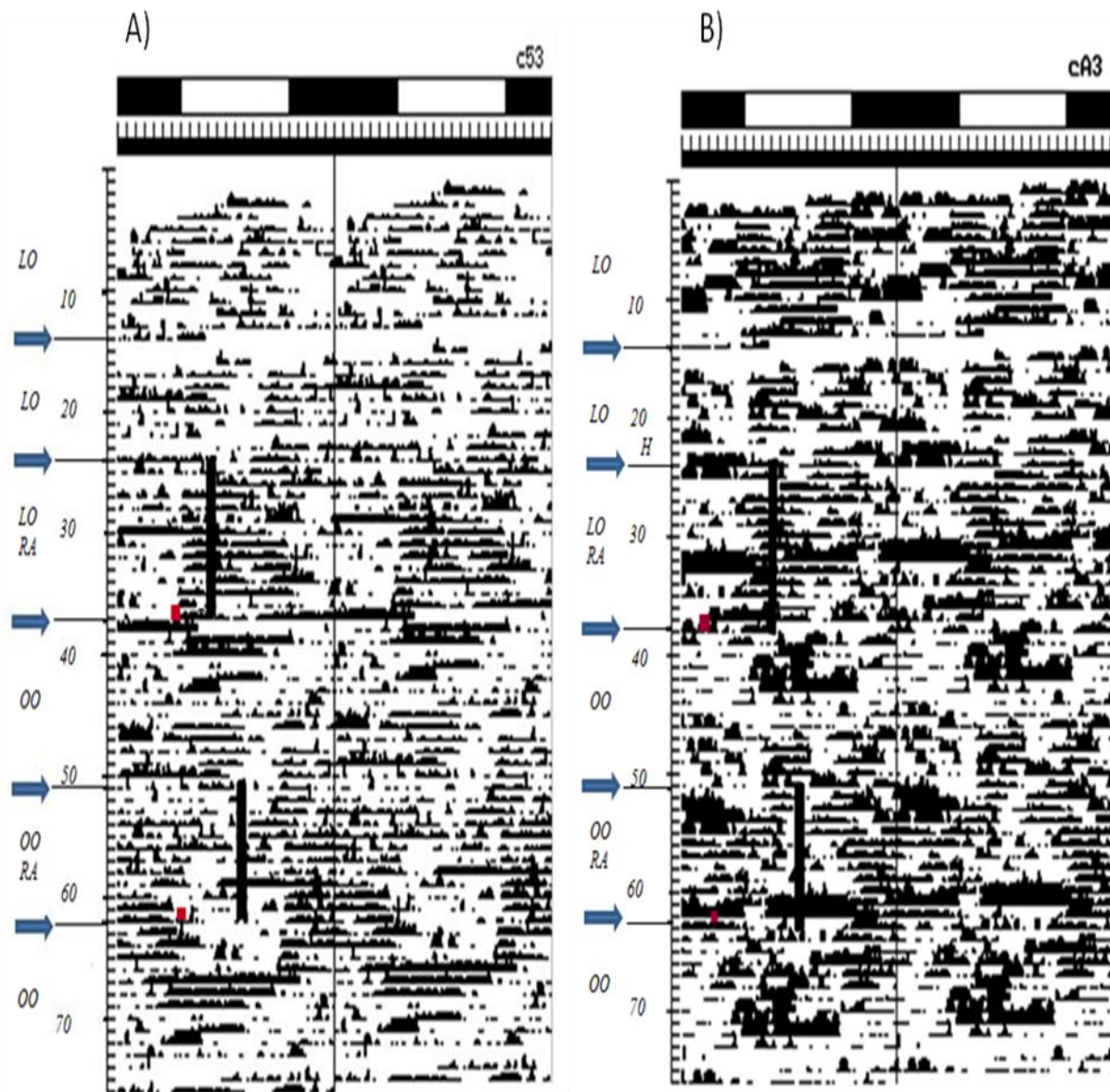


Fig.7A) Muestra el Actograma del ritmo de actividad locomotriz durante el protocolo 2 completo. Con este individuo se logra observar el efecto de la sincronización por alimento durante el primer estímulo, se puede ver un cambio de fase después del OO hacia el segundo estímulo de alimento. En B) se presenta la sincronización típica al efecto del fotoperiodo LO 12:12 sin mostrar ningún cambio de fase ante la presencia del estímulo de alimentación. La línea oscura representa la presencia del alimento. La flecha azul indica el cambio de condición.

El cuadrado de color rojo indica la suspensión del pulso de alimento.

En la figura 8 se muestra en un histograma de frecuencias a los organismos que sincronizaron al ciclo LO, fases de inicio de actividad en ciclos LO (gráfica A), fase al presentar el objeto placebo en condiciones de LO (gráfica B) y de las fases al presentar el pulso de alimento en condiciones de OO (gráfica C). Se puede observar que en LO, las fases se distribuyen alrededor de la transición del fotoperiodo, pero al presentar el objeto placebo (señalado con una flecha blanca en el histograma) b) el inicio de las fases sufren un ligero cambio. Al presentar el alimento de 13:00 a 14:00 h el inicio de las fases se distribuyen alrededor del pulso.

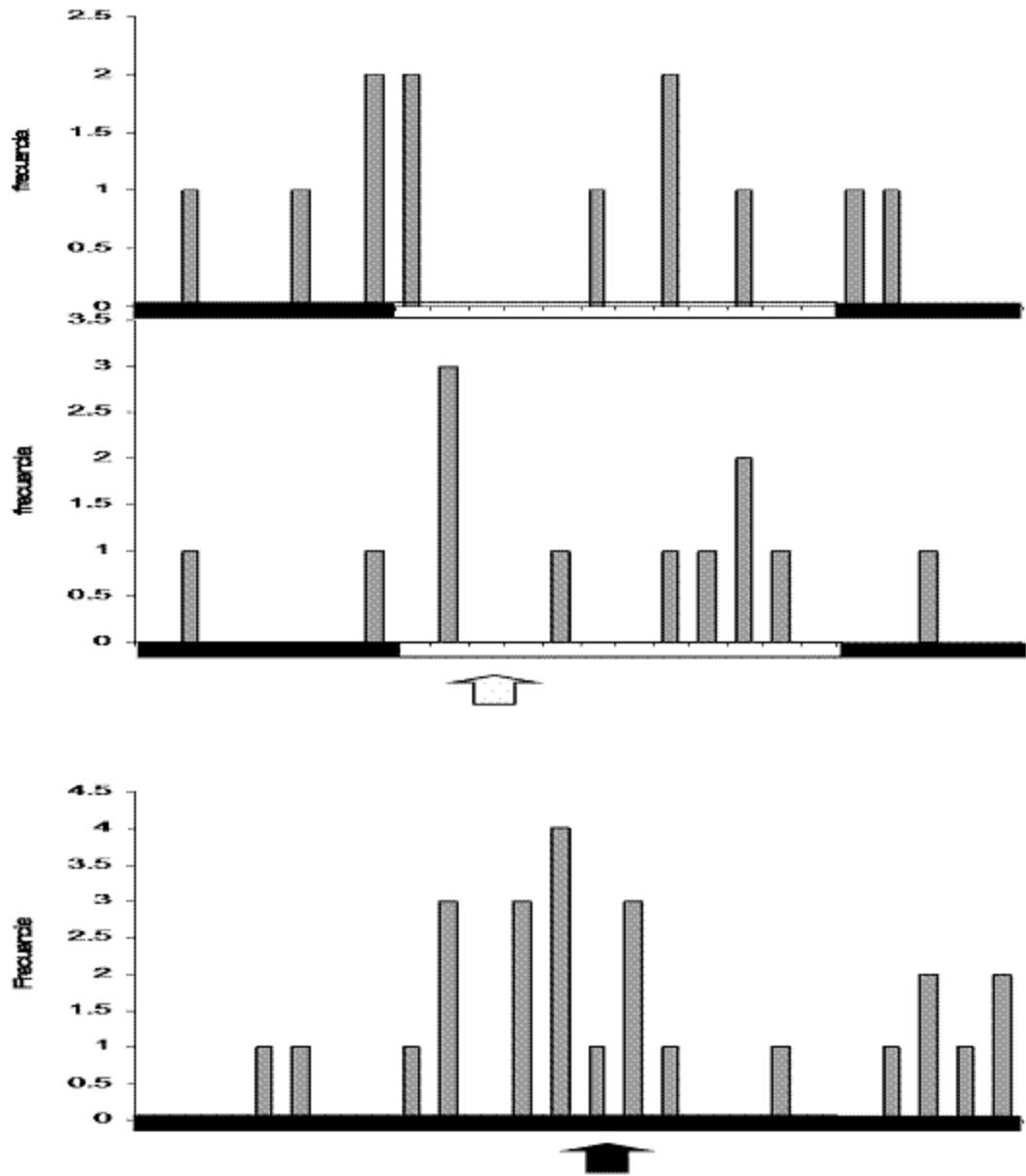


Fig.6 Histograma triple en el segundo protocolo a) Condiciones de LO 12:12, b) condición de LO 12:12 con presencia de placebo y c) condición de OO con presencia del estímulo de alimento.

8. Discusión

Los organismos vivos requieren tomar suficiente energía del medio para poder sobrevivir y reproducirse, por lo que las presiones de selección natural han formado eficientes estrategias para la alimentación. Para algunos omnívoros y carnívoros, las fuentes de alimentación están disponibles en ventanas temporales en el día y estas varían conforme cambian las estaciones del año. Por lo cual, con las señales ambientales y los cambios geofísicos, los animales pueden hacer uso de los relojes circadianos endógenos para generar óptimos patrones temporales de conducta incluyendo la alimentación (Stephan, 2001).

Para este trabajo se siguió un primer protocolo en ciclo de luz-oscuridad donde se pudo observar a organismos con diferentes valores de periodo, debe hacerse notar que para los protocolos no hubo distinción en características tales como la edad, el peso ni el sexo de los animales utilizados. Durante el primer protocolo se mantuvieron 12 cangrejos de los cuales 9 lograron sincronizar el ciclo de luz con un promedio de periodo de 23.9h. En cuanto al segundo protocolo se presentan datos en los cuales 7 de 9 cangrejos no presentaron una sincronización al fotoperiodo. Esta diferencia entre los dos protocolos en función del fotoperiodo, puede estar dada debido a que, los cangrejos del segundo protocolo, estuvieron expuestos a un periodo de hambruna. Posteriormente fueron expuestos a la presencia de un objeto placebo que no fue lo suficientemente fuerte para sincronizarlos pero si para alterar un poco la fase de su ritmo de actividad locomotriz, (como se muestra en la fig.6B), lo cual podría explicar que a pesar de que éste grupo estuvo más días expuesto al ciclo de luz-

oscuridad, una mayor cantidad de cangrejos no mostraron una respuesta de sincronización.

En el primer caso de un ciclo artificial de LO a uno de OO se ha interpretado como la falta de ritmo como interrupción del acoplamiento entre osciladores endógenos y el sistema ambulatorio por los ciclos artificiales de luz o por la inhibición del oscilador responsable para el ritmo en OO (Thurman y Broghammer, 2001).

Al igual que el oscilador sincronizado por luz (LEO por sus siglas en inglés) el FEO controla la ritmicidad en varias conductas y procesos fisiológicos. La actividad anticipatoria hacia la disponibilidad de alimento en el caso de los animales forrajeros puede estar dada debido a que las fuentes de alimento se encuentran a una distancia considerable de la madriguera por lo cual la conducta anticipatoria provee suficiente tiempo de dirigirse hacia donde se encuentra el alimento (Sthephan, 2001).

La fase de Restricción de Alimento (RA) tuvo un promedio de 40 minutos en el primer grupo, en este se pudo observar que se tuvo una respuesta alta al estímulo de alimento se logró sincronizar a éste. En cambio en el segundo protocolo se tuvo que sólo 3 de ocho cangrejos no lograron sincronizarse con el alimento.

Se tuvieron ciertas diferencias en ambos protocolos las cuales pudieran relacionarse con la respuesta de los organismos. Se ha mencionado a la luz como el principal agente sincronizador de la actividad locomotriz, en donde las motoneuronas involucradas en el movimiento están bajo la influencia

modulatoria de agente neurohumorales que realzan o suprimen su actividad, particularmente de la hormona neurodepresora producida principalmente por el pedúnculo óptico (Aréchiga, *et al.*, 1992).

Se puede notar que a pesar de la presencia del estímulo fótico los cangrejos de este grupo logran sincronizarse con el alimento dándole una importancia a la presencia del FEO. En el primer protocolo la fase de RA fue en condiciones de OO por lo cual el factor del fotoperiodo no intervino y no se presentó competencia ante el estímulo del alimento. Otro de los factores que pueden estar teniendo influencia es el horario en el cual se presentó el estímulo, en el caso del primer grupo se presentó entre las 10 y 11 am.

Para el segundo se manejaron dos horarios de 10 a 11 am en condiciones de LO y de 13 a 14 pm en condiciones de OO. Para este grupo, el segundo estímulo de alimento no indujo sincronización, a pesar de no verse afectado por el factor luz, quizá sea menos sensible en este horario y tenga que ver con la propuesta de que el marcapasos circadiano está compuesto por dos osciladores mañana (M) y tarde (T) los cuales responden a diferentes cambios en la intensidad de la luz (Moore-Ede, *et al.*, 1982; Pittendrigh, 1981; Carmona-Alcocer *et al.* 2005).

El cangrejo de río *Pseudothelphusa americana* presenta un tipo de desarrollo abreviado o directo como respuesta a reducir la dispersión y permanecer cerca del lugar de origen, ya que mientras más se aleja tendrá menos oportunidades de encontrar un lugar para establecerse (Álvarez y Villalobos, 1997), por lo cual la respuesta anticipatoria puede proporcionarle una

ventaja ya que solo se desplaza el tiempo necesario hacia la fuente donde se encuentra disponible el alimento, evitando búsquedas infructuosas o donde el alimento no se encuentre disponible.

EL acoplamiento entre el FEO y LEO en ésta especie, puede tener una importancia adaptativa, tomando en cuenta que las fuentes de alimento pueden cambiar de repente, mientras que los cambios estacionales en el amanecer y atardecer son graduales. Esto permitiría a los animales restablecer la etapa de la fase FEO sin cambiar el sistema circadiano en su totalidad.

9 Conclusiones

1. Se determinó que esta especie responde sincronizando el ritmo de actividad locomotriz al pulso de alimento mostrando una actividad anticipatoria (AA). Lo cual es comprobado por medio de periodogramas de x^2 los cuales muestran valores cercanos a las 24 horas. Además de histogramas dobles que muestran la distribución de fases alrededor del pulso de alimento.
2. Se pudo observar que el efecto del alimento como zeitgeber es de relevancia para los organismos, ya que aún en presencia del fotoperiodo estos logran sincronizar su ritmo de actividad locomotriz a al estímulo del alimento obteniendo valores cercanos a las 24 horas como se muestra en la tabla 2.
3. El objeto placebo colocado durante el segundo protocolo no mostró ningún efecto sobre el inicio de fase del ritmo de actividad locomotriz en ninguno de los cangrejos estudiados, como se muestra en los actogramas de la figura 7, no afectó el valor de periodo y tampoco modificó la distribución de fase en el histograma presentado en la figura 8.

10. Bibliografía

- Aguilar-Robledo R. 1993. Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis*. 2 (6):121-132.
- Álvarez F. y J. L. Villalobos, 1997. Pseudothelphusidae y Trichodactylidae (cangrejos). En: González S.E., R. Dirso y R. C. Voght. Eds. Historia Natural de los Tuxtlas. Instituto de Biología UNAM-CONABIO. México.pp. 415-418.
- Álvarez F. y J. L. Villalobos. 1996. Especie nueva de cangrejo de agua dulce del Género *Pseudothelphusa* (Brachyura: Pseudothelphusidae) de Guerrero, México. *Anales del instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. Serie Zoología*. 67(2):297-302.
- Aréchiga H.; F. Fernández-Quiroz.; F. Fernández de Miguel y L. Rodríguez-Sosa. 1992. The Circadian System of Crustaceans. *Cronobiology International*. 9(6):1-16.
- Aschoff J. 1960 Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rythms. *Colds Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 25:11-28.
- Brown A. F., 1983. Physiological Rhythms. En: Waterman T.H. ed. *The Phisyology of Crustaces, Sense Organs, Integration, and Behavior*. E. U. Academic Press. 7(11):401-455.
- Bünning, E. 1973. *The Physiological Clock*. New York: Springer-Verlag
- Carmona-Alcocer V, Miranda-Anaya M y Barrera-Mera B. 2005. Shifting phase of circadian locomotor activity by light in the freshwater crab *Pseudothelphusa americana*. *Biol Rhythm Res*.36 (1-2)123-129

- DeCoursey J. P. 1983. Biological Timing. En: Bliss E.D, F. J. Vernberg y B. W. Vernberg ed. Behavior and Ecology. The Biology of Crustacea. E.U. Academic Press. 7:210-277.
- DeCoursey P, 2004. Overview of biological timing from unicells to humans. En Chronobiology, Biological timekeeping. Dunlap C , Loros J DeCoursey P . Eds. Sinauer MA. pp 3-27.
- Dunlap JC, 2004 Molecular biology of the circadian pacemaker systems. En Chronobiology, Biological timekeeping. Dunlap C , Loros J DeCoursey P . Eds. Sinauer MA. pp 213-255.
- Fanjul-Moles M. L. 1998. Ontogenic Study of a Circadian Rhythm in Crayfish: Clock Pacemaker and Entrainment. Comparative Biochemical and Physiology. 5:153-160.
- Fanjul-Moles ML, Miranda-Anaya M y Fuentes Pardo B. 1992 Effect of monochromatic light upon the ERG circadian rhythm during ontogeny in the crayfish (*Procambarus clarkii*). Comp. Biochem. Physiol, 102A(1) 99-106
- Fuentes-Pardo B, M. Lara- Aparicio, S. López de Medrano y J. Viccon-Pale; 1996; Motor Circadian Rhythm in Crayfish. An Experimental and Theoretical Study. Comparative Biochemistry & Physiology; 2:113-127pp.
- Gruart A.,J.M. Delgado, C Escobar y R. Aguilar Roblero; 2002; Los Relojes que Gobiernan la Vida;Col. La ciencia para todos; Vol. 188; SEP, Fondo de Cultura Económica y Consejo de Ciencia y Tecnología; México, D.F; 58-59 pp.
- Johnson CH, Elliot J, Foster R, Honma K, Kronauer R. Fundamental

properties of circadian rhythms, 2004. En Chronobiology, Biological timekeeping. Dunlap C , Loros J DeCoursey P . Eds. Sinauer MA. pp 66-107.

- Krieger, D. T. 1974. Food and water restriction shifts corticosterone, temperatura, activity and brain amine periodicity. *Endocrinology*, 95:1195-1201.
- Miranda-Anaya et al, 2004. Circadian locomotor activity in the freshwater decapods, an ecological approach. *Biol Rhythm Res.*35 (1-2) 67-78
- Miranda-Anaya M., B. Barrera-Mera y E. Ramírez-Lomelí; 2003a; Circadian Locomotor Activity in the Freshwater Crab *Pseudothelphusa americana* (De Saussure, 1857): Effect of Eyestalk Ablation; *Biological Rhythms Research*;34(2):167-176 pp.
- Miranda-Anaya M., E. Ramírez-Lomelí y V.P. Carmona-Alcocer; 2003b; Circadian Locomotor Activity Under Artificial Light in the Freshwater Crab *Pseudothelphusa americana*; *Biological Rhythms Research*; En Prensa.
- Moore-Ede C. M., M. F. Sulzman y C. A. Charles. 1982. A Physiological System Measuring Time. En: *The Clocks that time Us. Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University press. 1-29 pp.
- Page, T. L. y J. L. Larimer; 1975; Neural Control of Circadian Rhythmicity in the crayfish. I. The Locomotor Activity Rhythm; *Journal Comparative Physiology A*; 106:291-331pp.
- Page, T. L; 2001; Circadian Systems of Invertebrates; En: *Handbook of Behavioral Neurobiology Circadian Clocks*; Vol.12; J. S. Takahashi, F. W.

Tore, R. Y. Moore (eds.); Kluwer Academic, Plenum Publishers; New York; 79-103pp.

- Pittendrigh C.S. and S. Daan 1976. A Functional Analysis of Circadian pacemakers in Nocturnal Rodents: I. The Stability and Lability of Spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology* 106:223-252.
- Pittendrigh S.C. 1981 Circadian systems: general perspective. Cap 5. En: Jürgen Aschoff ed. *Handbook of Behavioral neurobiology. Biological Rhythms*. New York, Plenum Press. 4:55-77.
- Pittendrigh, C. S y S. Daan; 1976b; A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents IV: Entrainment: Pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291-331.
- Ramírez- Lomelí E. 2002. Caracterización del Sistema Circadiano que Regula el Ritmo de Actividad Locomotora del Cangrejo de Río *Pseudothelphusa americana*; Tesis de Maestría; Biología; Facultad de Ciencias; UNAM;62pp.
- Ruppert, E. E. y R. D. Barnes; 1996; Crustáceos Cap14; En *Zoología de los Invertebrados*; 6ta edición; Mc Graw Hill; México, D.F; 682-805pp.
- Stephan FK. 2001. Food-entrainable Oscillators in Mammals. En *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol 12. *Circadian Clocks*. Takahashi J, Turek F y Moore R Eds. Kluwer academic press, NY. 223-246
- Sweeney, B. M., and J. W. Hastings. 1960. Effects of Temperature Upon Diurnal Rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25: 87-104.
- Thurman C.L. y A. M. Broghammer. 2001. Locomotor Activity of the Fiddler

crab, *Uca Subcylindrica* (Stimpson), Under Artificial Illumination. Biological Rhythm Research. 32 (1): 85-99.

- Vega A, 1993. Análisis estadístico en cronobiología. Psisquis, vol. 2, núm. 6 p 139-150