



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ EN EL
AJOLOTE MEXICANO JUVENIL *Ambystoma mexicanum*:
SINCRONIZACIÓN Y LIBRE CURSO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARCELA BERENICE ROBLES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
2011



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
Robles
Martínez
Marcela berenice
57009403
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304076231

2. Datos del tutor
Doctor
Manuel
Miranda
Anaya

3. Datos del sinodal 1
M en C
Enrique
Moreno
Sáenz

4. Datos del sinodal 2
Doctora
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Ignacio Andrés
Morales
Salas

6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Maria Estela
Pérez
Cruz

7. Datos del trabajo escrito
Ritmo circadiano de actividad locomotriz en ajolote juvenil *Ambystoma
mexicanum*. Sincronización y libre curso
48 p. 2011

Agradecimientos

Les agradezco a mis padres Ma. Teresa y Alberto Felipe, que me apoyaron los 4 años de la carrera, por estar ahí en todo momento y sobre todo en los momentos de debilidad.

A mi mama por ayudarme a terminar mi carrera, por que gracias a ella estoy donde estoy, por sus buenos consejos y sabios regaños; a mi papa por apoyarme económicamente y echarme porras cuando las necesitaba.

Dr. Manuel Miranda Anaya el cual me brindo su apoyo en la tesis, fue un tutor muy bueno; además de un excelente profesor. Pero lo mejor es un excelente amigo.

Les agradezco a todos los del taller de Ritmos Biológicos, con los que pase momentos inolvidables, Alejandra por saberme escuchar, a Vania por sabernos guiar como maestra y como amiga, a Ivette y carlitos por ser buenos compañeros de clase y excelentes amigos, a Javier por apoyarme cuando lo necesite y saberme escuchar en todo momento.

A mi Hermana Adriana que muchas veces me ayudo a buscar y encontrar trabajos perdidos o información que requería y que se llevo varios regaños, gracias a Christian Villegas por creer en mi cuando pensaba que ya nada importaba y darme palabras de aliento y consuelo, sobre todo para terminar mi tesis fuiste un gran apoyo emocional. A el abeja por la motivación que me dio de "Salvemos a xochimilco". Mi prima Venessa por siempre estar cuando la necesitaba y subirme el ánimo cuando creía que todo había acabado.

A mis amigos de toda la carrera que siempre me apoyaron y creyeron en mí, con los que pase momentos inolvidables en fiestas, clases, practicas de campo, etc. Amanda gracias por creer siempre en mi, Marco por tus ocurrencias y motivaciones diarias, Tona por ser una persona que sabe entregar toda su amistad y su confianza, y a Monica, Andrea, Olga, Paola, Bere, Gaby, Estefanía, por dejarme formar parte de sus vidas y de muchas aventuras juntas.

A Pato por estar conmigo en mi fiesta de graduación y hacerme saber que para el mundo soy una persona pero para el yo soy el mundo, por apoyarme y acompañarme a todas mis fotos de graduación.

Agradezco inmensamente a Oscar Rojas Monjaras, por que gracias a el pude llevar a cabo un sueño y ese sueño es este proyecto, porque el creyó en mi y me apoyo en la elaboración de mi sistema de agua, sin el cual no hubiera sido posible este trabajo; además de ser parte de mi vida, ayudarme y apoyarme en los momentos que lo necesite.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Ritmos biológicos, importancia y clasificación.....	2
1.2 Propiedades generales de los ritmos circadianos.....	5
1.2.1 Oscilación espontánea en libre curso.....	5
1.2.2 El sistema circadiano.....	6
1.2.3 Sincronización.....	8
1.2.3.1 Sincronización continua y discreta.....	9
1.2.4 Fotoperiodo esqueleto.....	10
1.2.5 Compensación de la temperatura.....	10
1.2.6 Enmascaramiento.....	11
1.2.7 Organización General del sistema circadiano en vertebrados no mamíferos.....	11
1.2.8 La glándula pineal como reloj circadiano.....	12
1.2.9 La retina como oscilador circadiano.....	13
1.2.10 El núcleo supraquiasmático.....	13
1.3 Ontogenia de los ritmos circadianos.....	14
1.4 Ritmo circadiano de actividad locomotriz.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Estudios de ritmos circadianos en anfibios.....	16
2.2 Biología general del ajolote <i>Ambystoma mexicanum</i>	17
2.2.1 Estado actual de la especie.....	17
2.3 Taxonomía.....	19
2.4 Distribución geográfica e importancia económica del <i>Ajolote mexicano</i> en la localidad.....	19
2.5 Ciclo de vida.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos específicos.....	23
6. MATERIALES y MÉTODOS.....	24
6.1 Obtención y mantenimiento de los animales.....	24
6.2 Sistema de registro de actividad locomotriz.....	24
6.3 Sistema de flujo continuo de distribución de agua.....	26
6.4 Diseño experimental.....	27
6.5 Análisis de datos.....	27
7. RESULTADOS.....	28
8. DISCUSIÓN.....	37
9. CONCLUSIONES.....	40
10. REFERENCIAS.....	41

RESUMEN:

El presente trabajo muestra la expresión del ritmo de actividad locomotriz en el ajolote juvenil Ambystoma mexicanum en condiciones de laboratorio. Para ello se usaron 8 animales de 3 a 5 meses de edad (grupo 1) y 8 animales de 7 a 9 meses (grupo 2). Los animales fueron obtenidos de reproductores mantenidos en el acuario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. La actividad locomotriz fue registrada de manera individual mediante acuarios con flujo tenue pero continuo de agua filtrada y aireada. Cada acuario contenía una batería de fotoceldas de luz infrarroja, las cuales al ser interrumpidas por el movimiento del animal, permitían monitorear la actividad. Los animales fueron expuestos a ciclos de luz y oscuridad, en fotoperiodo completo y a fotoperiodo esqueleto, con pulsos de 1 h al amanecer y al atardecer respectivamente. La actividad fue monitoreada automáticamente mediante un sistema de captura computarizado. Los resultados obtenidos muestran que los animales del grupo 1 presentan poca actividad y no hay una expresión clara del ritmo circadiano. Su respuesta a los fotoperiodos es pobre y los niveles de actividad aumentan conforme avanza la edad de los animales. Los animales del grupo 2, en cambio, muestran en mayor proporción ritmos de actividad siendo principalmente nocturna en fotoperiodos completos y se comienza a presentar respuesta sincronización ante ciclos de fotoperiodos esqueleto. Los resultados de este trabajo permiten concluir que el ritmo de actividad locomotriz parece manifestarse de manera clara a partir de los 5 meses de edad, momento en el cual parece haber maduración completa del sistema circadiano correspondiente.

1) INTRODUCCIÓN

1.1 RITMOS BIOLÓGICOS, IMPORTANCIA Y CLASIFICACIÓN.

Los ritmos biológicos son sucesos cíclicos o variaciones de las actividades fisiológicas y conductuales que presentan cierta periodicidad. Ocurren en todos los organismos desde bacterias hasta animales, por lo que son considerados una forma de adaptación al medio (Pittendrigh, 1960). Algunos de estos ritmos se expresan en tan solo fracciones de segundo mientras otros pueden repetirse en meses o incluso años (Gruart, *et al*, 2002). Los ritmos biológicos se clasifican por su semejanza o relación con el periodo de ciclos geofísicos:

- Circadianos (cercano a un día, 24 h).
- Circanuales (cercanos a 1 año, 365 días).
- Circamareales (cercano a la duración de las mareas, 12.4h).
- Circalunares (cercano a un ciclo lunar completo, 28 días).

También, los ritmos biológicos se han clasificado con base en su frecuencia:

- Ritmos Circadianos (cercano a 24 h)
- Ritmos ultradianos (periodo menor a 20 h)
- Ritmos infradianos (periodo mayor a 28 h)

Los ritmos circadianos, sirven como referencia para estudiar y entender los otros tipos de ritmos antes ya mencionados, y es por ello que han recibido mayor atención, por lo que se conocen mejor sus mecanismos (Aschoff, 1982).

Para que sean generados los ritmos biológicos, dependen de la existencia de un reloj que les confiera un carácter adaptativo. El reloj biológico es un sistema fisiológico capaz de generar un orden temporal circadiano en las actividades de un organismo. También es responsable de medir el tiempo y sincronizar el curso de los procesos internos del organismo con respecto a lo que sucede en su ambiente diariamente (Aguilar, 1993; Moore Ede, *et al*; 1982). El termino circadiano proveniente del Latín *circa* (cerca) y *diano ó diem* (día) y se ha utilizado para describir los ciclos endógenos que duran aproximadamente 24 horas que son generados por los organismos (Moore Ede, *et al*; 1982).

Para el estudio de los ritmos circadianos, es de gran importancia tomar en cuenta algunas características que los describen. Un ritmo requiere que exista una oscilación, que es un cambio cíclico medible, el cual generalmente muestra una forma de onda y un periodo que puede ser constante (fig. 1). La característica mas importante en la oscilación es el periodo (t) que es la duración de un ciclo completo, es decir el intervalo entre dos puntos que son idénticos respecto a un punto de referencia, otra referencia importante es la frecuencia, que es el número de veces que ocurre un ciclo en un intervalo de tiempo arbitrario. La fase (θ) es el valor inmediato de una función que es periódica. La amplitud es la magnitud del ciclo estimada del valor máximo conocido como cresta o acrofase, hasta el valor mínimo, conocido como valle o batifase; el valor promedio entre estos dos puntos se denomina mesor. El ángulo de fase (Ψ) es la diferencia en unidades de tiempo entre la fase de dos oscilaciones (Gruart, 2002).

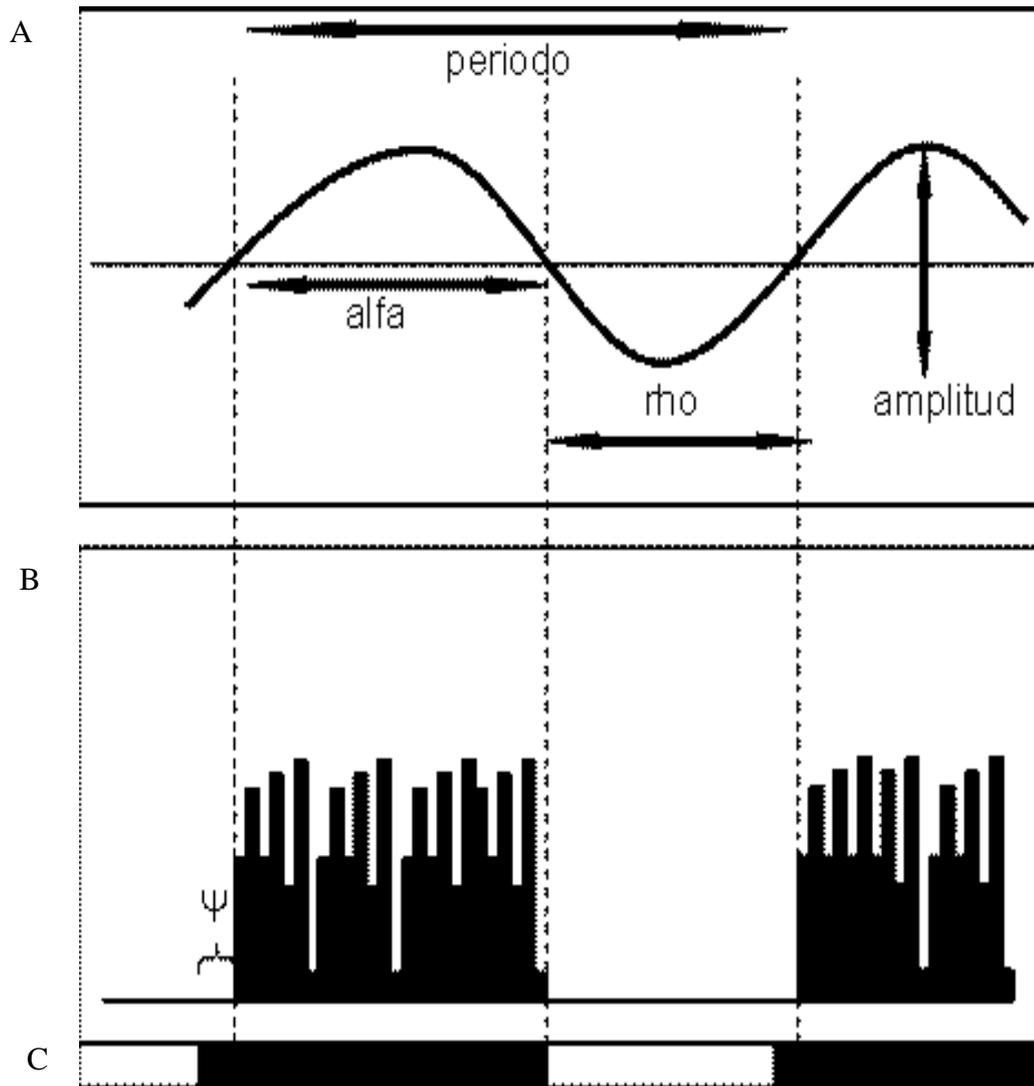


Figura 1. Componentes generales de una oscilación periódica en una oscilación sinusoidal (A) y su equivalente en una oscilación correspondiente a un ritmo de actividad locomotriz (B) en relación a un ciclo de luz y oscuridad(C).

1.2 PROPIEDADES GENERALES DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Los ritmos circadianos presentan diversas características que los distinguen de los demás ritmos biológicos. Las más distintivas son su origen endógeno es decir, su oscilación espontánea en libre curso, su capacidad de sincronizarse y de compensar los cambios de temperatura (Moore Ede, *et al*, 1982).

1.2.1 OSCILACIÓN ESPONTANEA EN LIBRE CURSO

El ritmo circadiano en libre curso es representado por la oscilación espontánea con un periodo cercano a las 24 hs. ello requiere de un origen endógeno de la ritmicidad biológica, la cual se basa en el hecho de persista el ritmo en las condiciones típicas de aislamiento de señales ambientales (como condiciones constantes de oscuridad, temperatura y disponibilidad de alimento).

La naturaleza endógena de los ritmos circadianos, ha sido demostrada con el descubrimiento de distintos grupos de genes que han sido identificados como su maquinaria fundamental. Estos genes varían en función del taxa en estudio, pero básicamente reflejan asas de retroalimentación de transducción y transcripción, lo que da lugar a un control con un periodo circadiano (De Coursey, 2004).

En los animales se han identificado diversos tejidos y órganos que funcionan como osciladores marcapasos capaces de imponer a otras estructuras el periodo y la fase de la ritmicidad biológica en diversos fenómenos estudiados, ejemplos de estos marcapasos son el ganglio cerebroide en los insectos (Page, 2000), los ojos en insectos y crustáceos, la glándula pineal en aves y en vertebrados no mamíferos (Underwood, 2000) y el núcleo supraquiasmático (NSQ) en mamíferos (Moore Ede, *et al*; 1982).

Los factores ambientales, que al presentarse de manera cíclica le sirven al organismo como estímulos que le ajustan la ritmicidad, estos son: los ciclos naturales de la luz, la temperatura, la humedad, el ruido, la presión atmosférica y el magnetismo. Las señales que son capaces de sincronizar a los ritmos biológicos reciben el nombre de Zeitgeber que proviene del alemán *zeit* (tiempo) y *geber* (dador), es decir “dador de tiempo” (Moore Ede, *et al*, 1982).

1.2.2, EL SISTEMA CIRCADIANO

El sistema circadiano comprende a los elementos necesarios para generar el ritmo, para sincronizarlo y para manifestarlo (figura 2).

El estímulo es aquella señal o evento que ocurre en el ambiente (temperatura, luz-oscuridad, pH, etc.) este estímulo debe ser detectado por un receptor el cual actúa como intermediario para transmitir la señal (este puede ser el ojo, la retina, la glándula pineal, etc.) a osciladores primarios que son sistemas capaces de generar y expresar cambios cíclicos de manera

independiente. Estos cambios son capaces de imponer fase y periodo a otros osciladores o bien a estructuras que sirven como elementos pasivos y que responden al oscilador. Cuando esto ocurre, al oscilador principal se le denomina marcapasos, también conocido como reloj maestro o principal (figura 2). El marcapaso manda señal a uno o varios efectores los cuales van a llevar la señal a diversas partes del organismo u osciladores periféricos que dan señales o bien conocidos como ritmos biológicos o expresión del ritmo (Moore Ede, *et al*, 1982).

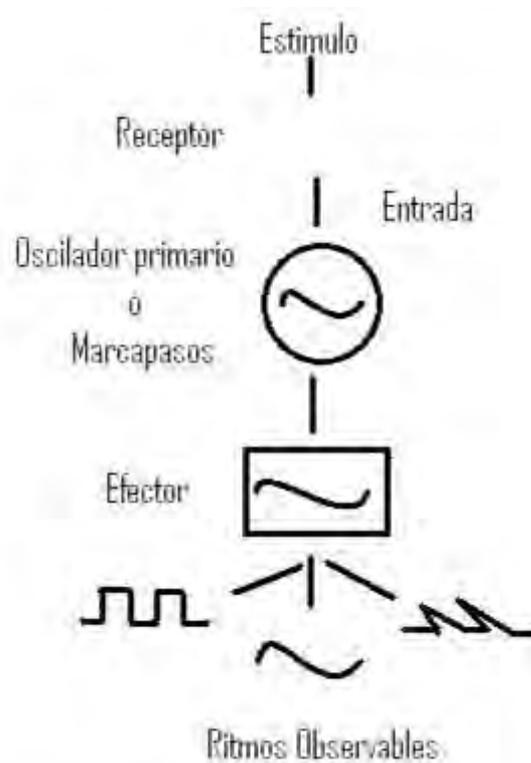


Figura 2.- Esquema de los elementos que componen el sistema circadiano. Modificado de Moore Ede, *et al*, 1982.

1.2.3 SINCRONIZACIÓN

Los ritmos se sincronizan con factores ambientales cíclicos como la luz y la temperatura. Un sincronizador es una señal exógena que pone a tiempo el reloj biológico con respecto al local es decir, sincroniza el ritmo endógeno y así le permite medir intervalos de tiempo, por lo que se dice que durante la sincronización, existe una coordinación absoluta entre el marcapasos y el sincronizador.

La sincronización es un mecanismo por el cual los relojes circadianos son capaces de reconocer la hora local, esta es una propiedad que hay que destacar ya que sin ésta, los relojes no tendrían importancia adaptativa. Además sin la sincronización, los organismos no podrían ajustar sus funciones a los cambios que ocurren en su entorno, por lo que se podría ver afectada la localización geográfica y la migración de los individuos (Aguilar, 1993).

La coordinación relativa de un ritmo circadiano, hace referencia a cuando el ritmo está en oscilación espontánea aún en presencia de un zeitgeber, y solamente se observa un efecto del sincronizador cuando incide en fases específicas del ritmo, es decir que el periodo endógeno está modulado por un sincronizador sin lograr una sincronización completa (Moore Ede, *et al*, 1982).

1.2.3.1 SINCRONIZACIÓN CONTINUA Y DISCRETA

En la sincronización continua, el estímulo ambiental afecta de manera continua la velocidad angular del oscilador; causando que el sistema acelere o reduzca su velocidad angular para ajustarlo continuamente; como ejemplo, en un ciclo de 12 h luz y 12 h de oscuridad, la sincronización continua tiene efecto durante toda la fase en que se presenta la luz. Aquí las oscilaciones pueden ser sincronizadas a periodos cíclicos que se desvían de su periodo natural pero siempre dentro de ciertos límites, a estos límites se les conoce como rangos de sincronización.

Por otro lado, en la sincronización discreta sólo se afecta una fase específica del oscilador, el efecto sobre esta fase única que tiene como consecuencia producir un avance o un retraso en la velocidad angular del oscilador, suficiente para que diariamente, el estímulo breve sea capaz de sincronizar al oscilador. Un ejemplo de la forma en la que se puede entender la sincronización discreta es mediante la Curva de Respuesta de Fases (CRF): Esta curva relaciona los desplazamientos de fase, adelantos y retrasos, de un ritmo con respecto a la hora circadiana a la cual se produce un pulso estimulador, como puede ser de luz o de oscuridad (Aschoff, 1981).

1.2.4 FOTOPERIODO ESQUELETO

El Fotoperiodo esqueleto es un protocolo de iluminación para demostrar la sincronización discreta. Consiste en sustituir el ciclo de luz oscuridad 12:12 por dos pulsos discretos de luz presentados en las fases de transición de iluminación (Aschoff, 1960). Esta sincronización se puede dar en pulsos de horas o minutos. La sincronización por fotoperiodo esqueleto es la suma de dos efectos discretos que están asociados con su principio y su fin. Para que se lleve a cabo esta sincronización, se requiere de diversos factores, como la fuerza de la señal y la sensibilidad del organismo a dicha señal. (Aschoff, 1981).

1.2.5 COMPENSACIÓN DE LA TEMPERATURA

La tercera propiedad de los ritmos circadianos es la compensación de temperatura, ésta se da con base en el concepto del Q^{10} , el cual es un cociente que da la velocidad de reacción del cambio de "x" diferente a 10 grados C. (Moore Ede, *et al*, 1982).

La temperatura es un factor de suma importancia en la regulación enzimática; por lo que si la temperatura aumenta también lo hace la actividad de las enzimas, y esta disminuye cuando la temperatura disminuye. Por esto se ha sugerido que la función del reloj biológico depende de un grupo de enzimas las cuales presentan diversas temperaturas óptimas las cuales están ajustadas entre sí, por tanto presentan la misma cinética a diferentes temperaturas (Gruart *et al*, 2002).

Para compensar los cambios de la temperatura, el periodo del ritmo no debe ser afectado de manera drástica, de tal manera que el valor de Q^{10} que considera el valor del periodo en libre curso es cercano a 1.

1.2.6 ENMASCARAMIENTO

El enmascaramiento es una sincronización aparente, ya que cuando se quita la señal ambiental, el ritmo toma la oscilación espontánea determinada por el reloj circadiano, y no por la que le impuso el ciclo ambiental, el enmascaramiento se da en diversas condiciones experimentales, o de señales ambientales que modifican el mecanismo real de sincronización, actuando sobre los sistemas efectores del ritmo, sin llegar a afectar el reloj circadiano (Moore Ede, *et al*, 1982). Algunos estímulos sincronizadores generan un enmascaramiento inmediato del organismo; en estas circunstancias, el estímulo sincronizador actúa directamente sobre los sistemas efectores y no en el reloj biológico, es decir, éste no genera una respuesta de fase ante el estímulo (Aschoff, 1960).

1.2.7 ORGANIZACIÓN GENERAL DEL SISTEMA CIRCADIANO EN VERTEBRADOS NO MAMIFEROS

La organización compleja que presentan los sistemas circadianos de los vertebrados, se observó desde los primeros estudios orientados a localizar los relojes biológicos (De Coursey, 2004). Hoy en día se sabe que en los vertebrados no mamíferos hay tres estructuras relacionadas con el sistema de fotorrecepción, asociados a la regulación de los ritmos circadianos: la glándula pineal o epífisis, la retina (ojos) y en la región homóloga al núcleo

supraquiasmático en el hipotálamo de los mamíferos. Se sabe que la glándula pineal es un reloj biológico en peces, anfibios, reptiles y aves (Underwood, 2000). La diferencia del sistema circadiano en los diversos vertebrados no radica en sus componentes y su organización anatómica, sino más bien en la jerarquía que tienen cada uno de ellos en su sistema circadiano. En algunos casos la permanencia de la ritmicidad en un sitio puede requerir la entrada periódica de otro oscilador (Gruart, *et al*, 2002).

1.2.8 LA GLANDULA PINEAL COMO RELOJ CIRCADIANO

El primer reloj biológico que fue demostrado en vertebrados es la glándula pineal. En 1968 se encontró que la extirpación de la glándula pineal elimina el ritmo circadiano de locomoción, un ejemplo es el canario (*Passer domesticus*), que al trasplantarle una glándula pineal se restablece el ritmo, aunque la fase del ritmo restablecido correspondía a la del donador. Con esto se demostró que hay un reloj en la glándula pineal trasplantada. Actualmente, se han acumulado datos que evidencian la presencia de un reloj circadiano en la glándula pineal de algunos peces (*Esox lucius*, *Heteroneupsis fossilis*, *Lampreta japponica*), de reptiles (*Anolis carolinensis*, *Gallotia galloti*) y de aves (*Padda oryzivora*, *Sturnus vulgaris*). En todas estas especies se ha demostrado que la extirpación de la glándula pineal elimina los ritmos circadianos (Underwood, 2000).

1.2.9 LA RETINA COMO OSCILADOR CIRCADIANO

Diversos estudios experimentales han permitido concluir que también existen relojes biológicos en la retina. En aves (*Gallus domesticus*) y reptiles (*Sceloporus olivaceus*), se requiere la extirpación de ambos ojos, además de la glándula pineal, para eliminar por completo la producción de ritmos circadianos. Además se ha demostrado la persistencia del ritmo circadiano de secreción de melatonina por células de la retina mantenidas en cultivo (Miranda-Anaya et al 2002, Underwood, 2000).

Un estudio en la rana africana (*Xenopus laevis*) demuestra la presencia de un reloj circadiano en la retina (Anderson y Green, 2000). Otro estudio en *Iguana iguana* demuestra que existen osciladores circadianos en la retina, la glándula pineal controla el ritmo de temperatura corporal, aunque su participación es marginal en la generación del ritmo de actividad locomotriz (Underwood, 2000).

1.2.10 EL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Existe evidencia que el NSQ funciona como un reloj circadiano en algunas especies de reptiles y aves. Se ha demostrado que la lesión NSQ elimina la expresión del ritmo circadiano de locomoción en reptiles (*Podarcis sicula*, *Dipsosaurus dorsalis*) y aves (*Coturnix coturnix*, *Passer domesticus*). La organización del sistema circadiano en estas especies supone no solo la presencia de varios relojes circadianos, sino también una compleja interacción

entre estos. Se ha propuesto que la glándula pineal, la retina y el NSQ, interactúan formando asas neuroendocrinas.

Así, la luz afecta directamente a los osciladores circadianos de la retina y de la glándula pineal mediante sus propios fotorreceptores. El núcleo supraquiasmático recibe la influencia de la luz ambiental por vía nerviosa desde la retina, y por vía endocrina desde la glándula pineal, a través de la hormona de la melatonina. A su vez, el NSQ podría influir sobre la glándula pineal y la retina por su comunicación a través del ganglio cervical superior (Underwood, 2000).

1.3 ONTOGENIA DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

La ontogenia implica el estudio de los cambios que se presentan durante el desarrollo de un individuo, ésta incluye su construcción física desde un huevo fertilizado, la maduración funcional de su conducta, sistemas reproductivos y homeostáticos, y la declinación de estos sistemas con la edad (Nason, 1993).

La ontogenia de los ritmos circadianos es propiamente la ontogenia del sistema circadiano; debe entonces incluir los medios, formales y fisiológicos, por los cuales las partes del sistema emergen y se organizan (Aschoff, 1981).

La ontogenia es la historia de vida individual de un organismo, que involucra cambios en muchas funciones conductuales fisiológicas y bioquímicas. Los ritmos circadianos en un mismo organismo no son independientes uno de otro aún si son controlados por un marcapasos circadiano o por muchos. Los ritmos están temporalmente organizados con respecto a los ritmos del medio ambiente. La ontogenia de los ritmos circadianos o mejor dicho la ontogenia del

sistema circadiano, incluye los mecanismos por los cuales las partes del sistema surgen y llegan a organizarse; lo cual debe incluir además los mecanismos que guían este surgimiento como las causas y efectos de una pérdida de organización dada por la edad. La regulación del tiempo en los procesos del desarrollo (medidos en horas, semanas y meses) reflejan la constancia de los procesos de desarrollo y no el control por un reloj circadiano (Aschoff, 1981).

1.4 RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD LOCOMOTRIZ

Un ritmo circadiano de actividad locomotriz se refiere a la repetición diaria de la función móvil de los organismos. Este ritmo nos da una respuesta rápida acerca de los hábitos diurnos ó nocturnos de los animales; nos aporta información de la hora del día en la que los organismos son más activos. Se le considera un ritmo circadiano solo si persiste en condiciones constantes de laboratorio (Hirschie-Johnson, *et al.* 2004), este ritmo puede ser alterado por lesiones en el sistema nervioso. En diferentes especies de reptiles se ha demostrado que este ritmo desaparece si se le daña la región homóloga al NSQ o si existe daño en la glándula pineal (Miranda-Anaya *et al.*, 2007). Una característica que tiene el ritmo de actividad locomotriz es su capacidad de sincronización con ciclos ambientales completos o sólo a exposiciones cortas, ya sea de alimento, de temperatura o de luz, entre otros posibles sincronizadores (Hirschie-Johnson, *et al.* 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 ESTUDIOS DE RITMOS CIRCADIANOS EN ANFIBIOS

Los estudios acerca de la organización circadiana en anfibios son escasos. Los principales reportes acerca de marcapasos en este grupo corresponde a los cultivos de retina de la rana africana *Xenopus laevis* pues sintetiza a la hormona melatonina circadianamente in vitro (Cahill y Besharse, 1989). Otros estudios en ranas adultas apuntan a que existe en el hipotálamo alguna región homóloga al NSQ, y que tiene papel equivalente a un marcapasos, pues después de lesionarla, desaparece el ritmo de actividad motriz (Harada et al, 1998). Los efectos de la pérdida del mismo ritmo de actividad, por pinealectomía, se han reportado en la salamandra japonesa (Chiba et al, 1993).

2.2 BIOLOGÍA GENERAL DEL AJOLOTE *Ambystoma mexicanum*

El ajolote *Ambystoma mexicanum* (figura 4), es endémico de México.

Se caracteriza por poseer un cuerpo alargado, con una coloración que varía del gris oscuro al negro terroso, apertura bucal grande con reemplazo continuo de dientes, ojos pequeños, tres pares de branquias situadas en la parte superior de la cabeza, cuatro extremidades (con cuatro dedos en las patas delanteras y cinco en las traseras) una aleta que recubre parte del dorso y la cola, y se distingue principalmente por presentar neotenia permanente durante todo su ciclo de vida (se entiende por neotenia, a la facultad que tiene el animal de reproducirse en estado larvario, sin llegar a completar la etapa normal del desarrollo). El ajolote llega a medir como adulto hasta 25 cm desde la boca hasta la punta de la cola. Además de branquias, posee sacos pulmonares,

asciende a la superficie para llenar de aire sus sacos y desciende nuevamente al fondo Viven en aguas poco profundas (Tihen,1958).

2.2.1 Estado actual de la especie

El *Ambystoma mexicanum* es totalmente acuático, vive en lagos, pozas y canales de Xochimilco (México, D. F.) donde el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw), la altitud promedio de la región es de 2,250 msnm y la lluvia anual promedio es de 600 mm. El ajolote requiere en su medio condiciones particulares de turbidez, altos niveles de oxígeno disuelto en el agua, y condiciones estables de las corrientes. La temperatura ideal del agua es fría, de 16 a 18° C y no debe de exceder los 22° C. Actualmente el cuerpo de agua en que habita se ha visto fuertemente perturbado y reducido. La vegetación que solía rodear en abundancia el hábitat del Ajolote Mexicano, son gramíneas y plantas herbáceas suculentas (plantas con tejidos que almacenan agua) de suelos salinos, alcalinos y mal drenados; así como algunos tipos de pastos. Actualmente la vegetación acuática es escasa, anteriormente se encontraba el bosque de pino-encino; ecosistema que ahora está fragmentado y del que queda poco. Hoy en día hay extensas zonas de cultivo de maíz, flores y diferentes tipos de vegetales como lechuga (Chaparro, 2007).

En diez años, la densidad de ajolotes descendió de alrededor de seis mil individuos por km² en 1998, a solo un mil en 2004 y sólo 100 o tal vez menos, para 2008. Para ese mismo año, los estudios sugerían que la población total en vida silvestre pudiese ser de entre 700 a 1200 individuos. Sin embargo se, considera que debido a lo agresivo de los factores que amenazan su

ecosistema, sobreviven menos de lo esperado, y para 2009 se piensa apenas quedan 20 individuos (Stephan y Ensástigue, 2001).

Desde 1975 fue incluido en el Apéndice II de CITES, para regular su comercio internacional. Actualmente se está estudiando su cambio al Apéndice I. En México se incluyó en la NOM-059-ECOL-1994 y se refrendó su estatus bajo protección especial en la NOM-059-ECOL-2001. En 1993 se decretó el Parque Ecológico de Xochimilco, que incluye en su plan de manejo un proyecto para la conservación del Ajolote. En 1999, el Comité Técnico Consultivo Nacional para la Recuperación de Especies Prioritarias (CTCNREP), creó un Subcomité para la Recuperación de Especies Prioritarias de México dedicado al Ajolote Mexicano. Actualmente es una de las 51 especies del programa de Conservación de Especies Prioritarias (PROCER). En 2006, la IUCN modificó el estatus de la especie de vulnerable a en peligro crítico, que es cuando una especie enfrenta un alto riesgo de extinción. En ese mismo año, se publicó el programa de manejo del área natural protegida con carácter de zona de conservación ecológica “Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco” donde es obligatoria la conservación y manejo del Ajolote Mexicano.



Figura 4.- Ajolote mexicanum

2.3 TAXONOMIA

Reino: *Animalia* (Linnaeus, 1758)

Phylum: *Chordata* (Bateson, 1885)

Clase: *Amphibia* (Linnaeus, 1758)

Subclase: *Lissamphibia* (Haeckel, 1866)

Orden: *Urodela* (Dumeril, 1806)

Familia: *Ambystomatidae* (Gray, 1850)

Género: *Ambystoma* (Tschudi, 1838)

Especie *Ambystoma mexicanum*

Nombre Común: Ajolote o Axolote

2.4 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

En la época en que Hernán Cortés realizara la Conquista de México, *Ambystoma mexicanum* se encontraba en el gran lago que ocupaba gran parte del valle de México y estaba dividido en seis sectores, cada uno llamado lago de: Chalco, México, Texcoco, Xaltocan, Zumpango y Xochimilco. En la actualidad, esta especie se encuentra restringida únicamente a los canales que aun existen del lago de Xochimilco (fig. 5) y al pequeño vestigio del lago de Chapultepec (Malcinski, 1977; Smith, 1989).



Figura 5. *Canales de Xochimilco (arriba) y vista aérea de la región de los canales 19° 15' 47" N, 99° 6' 11" UTM 2129938 489171 14Q zoom 8 Escala 1:10000.*

2.5 CICLO DE VIDA

La fase inicial del cortejo en el ajolote, consiste en que cada animal se empuja suavemente unos a otros con su hocico, primero a lo largo del flanco y después alrededor de la cloaca. Esto lleva al comportamiento del “vals”, en el cual cada animal presiona el hocico en la cloaca del otro, moviéndose la pareja en círculo. Después de algunos minutos de estar bailando en círculo el macho interrumpe la secuencia y se aleja de la hembra, quien lo sigue muy de cerca, a menudo tocando su cola con el hocico. Durante esta etapa del cortejo, el macho sacude su cola del lado a lado con un movimiento ondulatorio que empieza en la parte posterior de su cuerpo. La hembra sigue al macho y posteriormente bajando la porción de la cloaca mientras sacude vigorosamente su abdomen y cola, depositando el espermátóforo en el substrato; este proceso dura aproximadamente medio minuto. La hembra se coloca sobre el espermátóforo para recogerlo, mientras que sacude fuertemente su cola, al grado que el comportamiento resulta indistinguible del macho durante la deposición. Después de esto, los dos animales se mueven independientemente. El proceso de cortejo y transferencia del espermátóforo se repite varias veces en el transcurso del encuentro (Eisthen, 1989).

La condición para reproducirse (actividad funcional de las gónadas) es regulada en los anfibios por un ritmo endógeno, con el que se encuentra correlacionado y genéticamente ajustados a trenes estacionales en cuanto a fotoperiodo, temperatura, e incluso regímenes específicos de precipitación (Douglas, 1981).

3 JUSTIFICACIÓN

El ajolote *Ambystoma mexicanum* es una especie endémica de México y está catalogada como especie Sujeta a Protección Especial (PR) por la NOM-059-SEMARNAT-2001. El conocimiento sobre la estructura del ritmo circadiano de actividad locomotriz en organismos juveniles, así como de su capacidad de sincronización continua y discreta, permitirá enriquecer el conocimiento de la biología general de la especie, lo cual a su vez contribuye con conocimiento original, sobre el cual se desarrollan los programas de conservación para el ajolote.

Por otro lado, no existen estudios realizados anteriormente que reflejen información sobre la ontogenia del ritmo de actividad en *A. mexicanum*, por lo que el presente trabajo aporta información original para el estudio de la especie.

En el presente trabajo se estudian dos intervalos de edad en el desarrollo y la maduración de *Ambystoma mexicanum*. Lo anterior permitirá correlacionar los cambios en el crecimiento y la maduración del sistema circadiano en este organismo.

4 HIPOTESIS:

Debido a que en diversos organismos se ha podido establecer claramente que durante la ontogenia va madurando el sistema circadiano, hasta quedar bien organizado, entonces esperamos observar cambios en la organización circadiana de *Ambystoma mexicanum* al registrar su actividad locomotriz en dos etapas, relativamente tempranas, de su ontogenia.

5 OBJETIVOS

Objetivo General:

- Caracterizar el ritmo de actividad locomotriz y su capacidad de sincronización en dos intervalos de edad del ajolote *Ambystoma mexicanum* (3 a 5 meses y de 7 a 9 meses de edad).

Objetivos Específicos:

- Determinar si en *Ambystoma mexicanum* existe un ritmo circadiano de actividad locomotriz en condiciones constantes desde etapas juveniles de dos distintas edades y si se presenta el ritmo, analizar sus características.
- Determinar si la actividad locomotriz presenta sincronización con la fase de un fotoperiodo 12:12 y si dicha relación se mantiene ante un fotoperiodo esqueleto 11:1, 11:1.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención y mantenimiento de los animales

Los 16 ajolotes de distintas edades (8 de 3-5 meses y 8 de 7-9 meses) sin distinción de sexo, se obtuvieron del Acuario de la Facultad de Ciencias, donde fueron criados, con el protocolo y condiciones reportadas por Cambranis (2000). Los animales de 3 a 5 meses, tienen una longitud que va de 4 a 8 cm, y los de 7 a 9 meses de 8 a 11 cm aproximadamente. Los reproductores provenían, el macho de la colonia del acuario de la Facultad de Ciencias y la hembra proveniente del Instituto de Biología de la UNAM. La temperatura en que se mantuvieron fue entre 18° y 20° C durante todo el protocolo de crianza, el agua se filtraba y oxigenaba mediante filtros biológicos a base de grava, y constantemente se recirculaba el agua para evitar acumulación de amoníaco y nitritos que producen los ajolotes. Mientras estuvieron en registro, los animales fueron alimentados dos veces a la semana con artemia, pulga de agua, lombriz de tierra.

6.2 Sistema de registro de actividad locomotriz

Los animales fueron colocados de manera individual en acuarios de vidrio de 10 x 30 x 10 cm (alto, largo y ancho respectivamente). Los acuarios fueron mantenidos en una gaveta metálica que tenía ventilación constante y fotoperiodo controlados (Fig.7). Los ciclos de luz y temperatura se controlaron independientemente con interruptores programables domésticos (STEREN modelo Temp-08E). La etapa luminosa consistió de luz brillante (260 lx) proporcionada por una lámpara de luz blanca (Philips 20 W, F20T12/D) y la

fase oscura consistió en iluminación de fondo con luz roja tenue (5 lx) proporcionada por una bombilla de baja intensidad cubierta con plástico celofán rojo de alta densidad. La actividad locomotriz fue detectada mediante un par de barras con sensores infrarrojos colocadas a lo largo de la base de cada acuario. La actividad fue medida utilizando la cuantificación de interrupciones del haz de luz infrarrojo (figura 7). La información obtenida con el sistema fue almacenada en una computadora de escritorio cada 10 minutos de forma automatizada mediante el software RALM15 (figura 8).

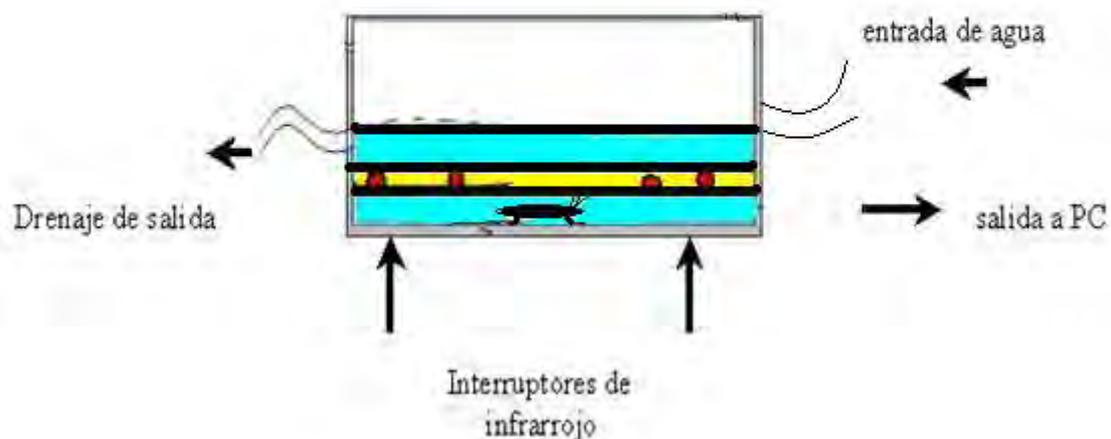


Figura 7.-acuario de registro, con barras de sensor infrarrojo que registran la actividad al cortar el haz de luz y con un sistema de recambio del agua.

6.3 Sistema de flujo continuo de distribución de agua

Cada una de los 8 acuarios recibía una manguera de plástico donde fluía una corriente continua de agua proveniente de un estanque de 50 litros desde donde el agua era constantemente aireada y filtrada. El agua circulaba en cada acuario por gravedad hasta otro depósito de 50 litros donde era bombeada al primer estanque mediante un sistema eléctrico bombeo (Racom, control de bombeo modelo, CBST).

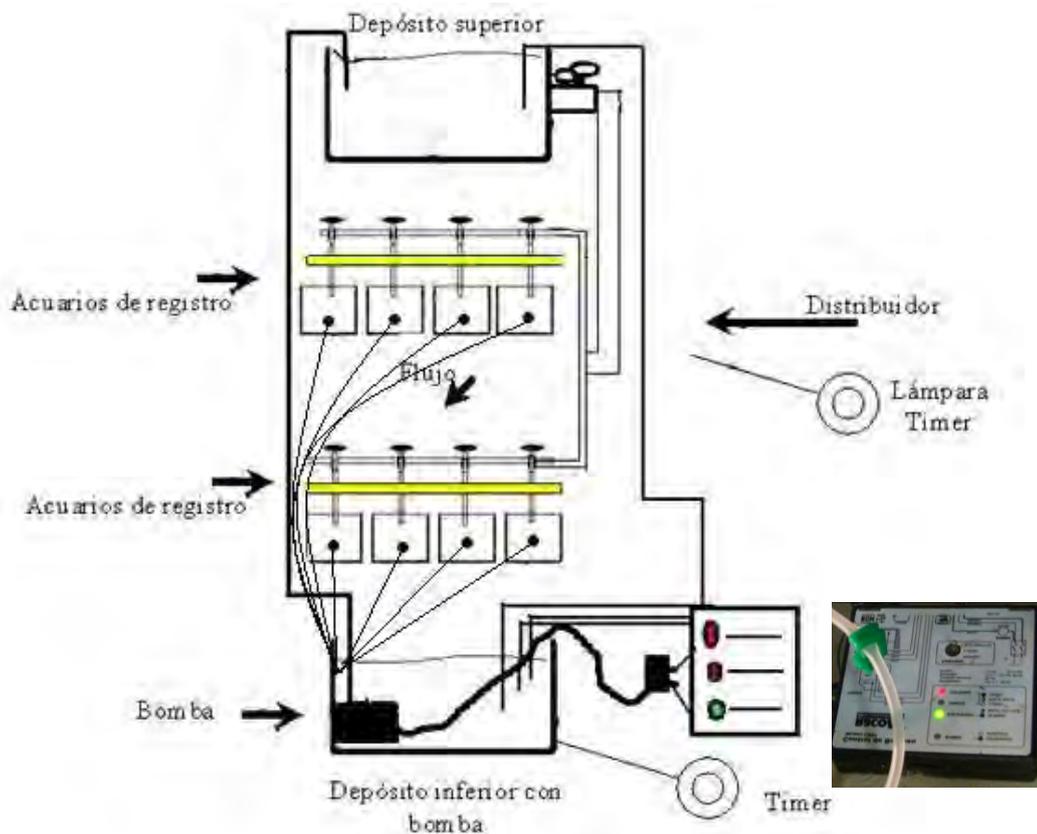


FIGURA 8 Sistema de flujo continuo de distribución de agua, la fotografía muestra el sistema que controlaba el bombeo hacia la tina superior, en relación al nivel de agua.

6.4 Diseño experimental

Se usaron simultáneamente 8 animales en acuarios individuales, bajo un fotoperiodo de 12:12 Luz-Oscuridad (LO, 07:00-19:00 fotofase) durante 8-10 días, con el fin de observar la organización de la actividad en sincronización continua. Posteriormente se mantuvieron en luz roja constante (LRC) durante 10 días para observar el libre curso y control de fase del ritmo de actividad locomotriz; luego pasaron a ciclos de fotoperiodo esqueleto 11:1, 11:1, durante 10 días más y nuevamente en LRC por al menos 8 días más.

6.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante en actogramas de doble gráfica periodogramas de X^2 y análisis espectral, las fases estables de oscilación en cualquier fotoperiodo, sirvieron para hacer la comparación de los perfiles de actividad y la distribución de la actividad en cada fase, mediante el uso del software ACTIVIEW (Minimitter, Oregon USA).

7 RESULTADOS

Grupo 1 (3 a 5 meses de edad)

En la figura 9, se muestra un actograma representativo de un organismo del grupo 1 (3 a 5 meses de edad), que en la condición inicial de LO se observa una actividad locomotriz de baja amplitud en los primeros ocho días, con una tendencia a ser nocturna, como se muestra en la curva de actividad promedio presentada a la derecha del actograma. La actividad se muestra dispersa en la fase luminosa del ciclo desde unas horas antes del apagado de la luz; después en LRC, no se ve un ritmo definido, y se aprecian brotes intensos de actividad sin un patrón circadiano aparente. Al pasar al FE, se observa que la actividad no se concentra de manera específica en cualquiera de las fases establecidas por el fotoperiodo, la curva de actividad promedio muestra un brote conspicuo que podría ser resultado del dato correspondiente al 6 de abril, el cual no es constante el resto del registro en esta condición. En la última etapa en LRC, en libre curso se puede observar únicamente dos ciclos de actividad, posteriormente se carece de datos en este ejemplo. De los 8 animales usados en este grupo, solo 2 mostraron una respuesta al ciclo LO, y 2 presentaron ritmos en LRC. La respuesta de organización de actividad ante el FE se observa sólo en 3 animales sin que fuera posible verificar si existe control de fase en la condición de LRC posterior.

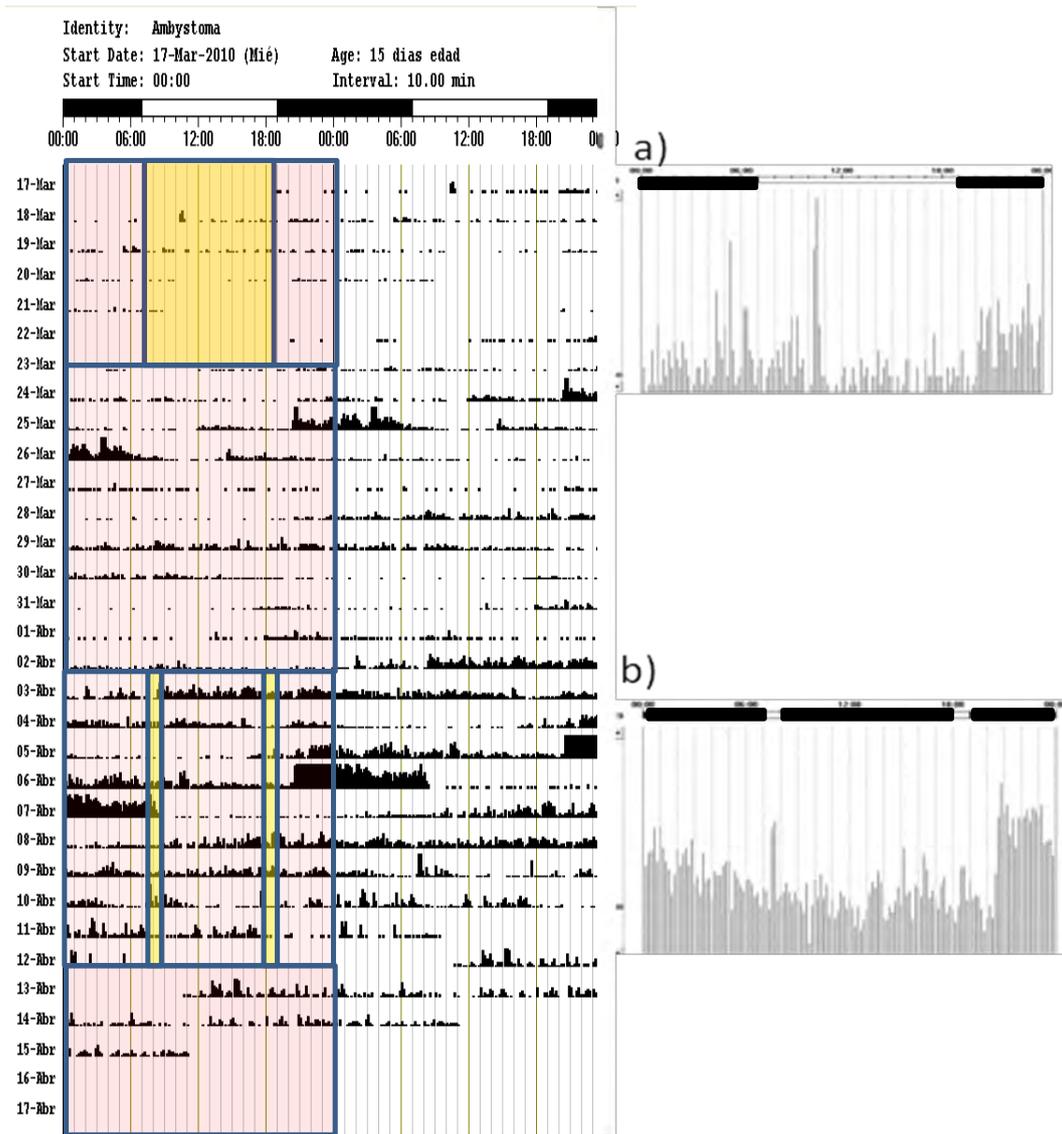


Figura 9. Actograma de un ajolote del grupo 1. El lado izquierdo del actograma indica con color las condiciones lumínicas de cada fase del protocolo. Se nota en todo el registro una falta de ritmo en libre curso así como de respuesta organizada en el fotoperiodo. A la derecha del actograma se muestra la curva promedio del periodo en LO y FE respectivamente, las cuales presentan mayor actividad nocturna.

Grupo 2 (7 a 9 meses de edad)

En la figura 10, se muestra un actograma representativo de un organismo del grupo 2 (7 a 9 meses de edad), que en la condición inicial de LO se observa una actividad locomotriz de mayor amplitud principalmente nocturna, como se muestra en la curva de actividad promedio presentada a la derecha del actograma. También se observa actividad dispersa en la fase luminosa del ciclo desde unas horas antes del apagado de la luz; después en LRC, se ve un ritmo definido con periodo mayor a 24 hs que oscila a partir de la fase que mantuvo el último día en fotoperiodo. Además se aprecian brotes menores de actividad sin un patrón circadiano aparente. Al pasar al FE, se observa que la actividad se concentra de manera específica entre los pulsos que representan el día subjetivo, la curva de actividad promedio muestra un brote conspicuo. En la última etapa en LRC, en libre curso se puede observar un ritmo robusto con periodo menor a 24 hs.

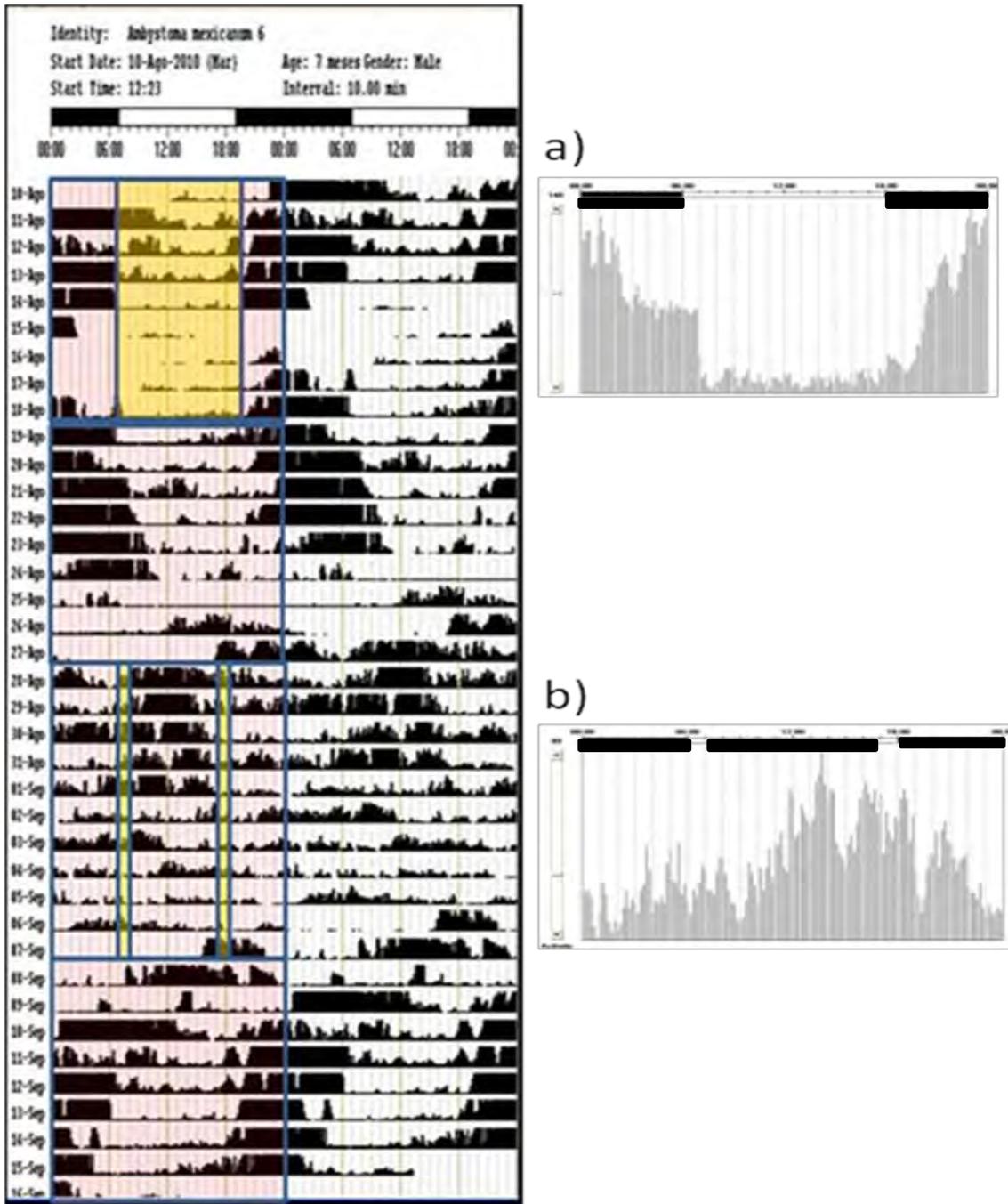


Figura 10. Actograma de un ajolote del grupo 2 (7 a 9 meses). El lado izquierdo del actograma indica con color las condiciones lumínicas de cada fase del protocolo. Se nota en todo el registro una mayor consistencia de la oscilación del ritmo de actividad y sincronización al fotoperiodo completo, A la derecha del actograma se muestra la curva promedio del periodo en LO la cual presenta mayor actividad nocturna.

Sincronización a LO ante ciclos (12:12)

De los 8 organismos revisados en cada grupo, solo dos mostraron sincronización detectada por análisis de periodograma a LO en el grupo 1, y seis del grupo 2. La figura 11 muestra el valor promedio (\pm EE) del periodo. En el grupo 1 se obtuvo un periodo de 24.8 (\pm 1.38h) y en el grupo 2 un periodo de 23.3 (\pm 0.187 h). En el grupo dos (azul) se ve un periodo menor con respecto al grupo uno (rojo), pero esto tomando en cuenta que en el grupo uno solo se obtuvo este promedio de dos organismos.

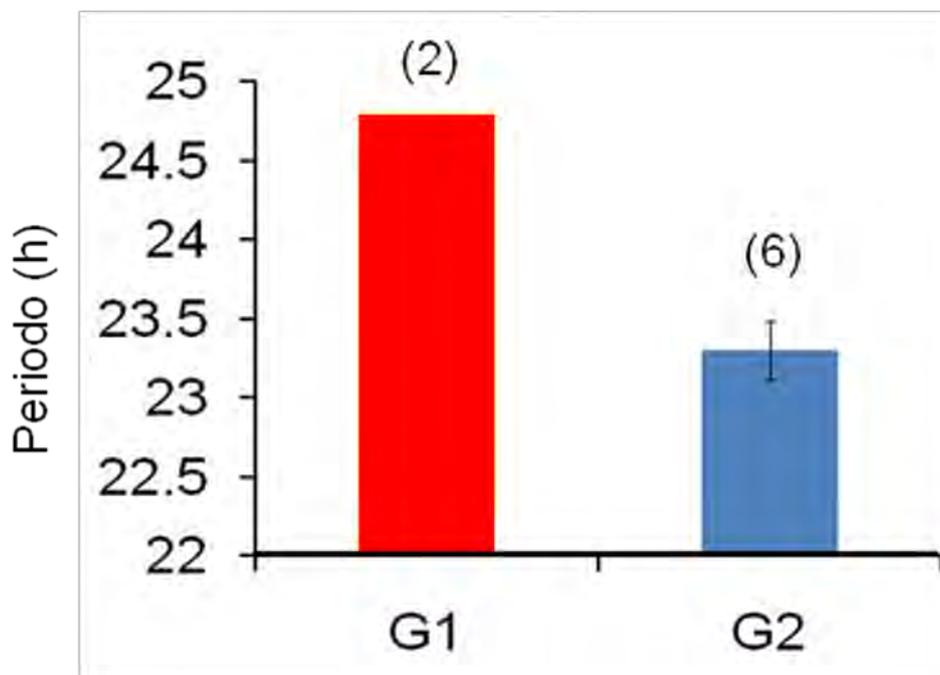


Figura 11 . Promedio del periodo en LO. En el grupo 2 muestra que en 6 animales el periodo resulto menor a 24 hs.

Libre curso en LRC

La figura 12 muestra el promedio del periodo del primer segmento de LRC posterior a la condición inicial de LO (azul) y del segundo segmento en LRC, después del FE (rojo). En ambos casos es mayor el número de animales del grupo dos que presenta un periodo detectable en el periodograma (indicado con paréntesis sobre cada barra). En la figura 10 se observa en el grupo uno, en la primera etapa experimental un periodo promedio de 24.05 ± 0.34 h y en la segunda etapa un periodo de 24.48 ± 0.5 h y en el grupo 2 presenta en su primera etapa 26.55 ± 0.281 h y en la segunda etapa un promedio de 24.86 ± 0.00148 h.

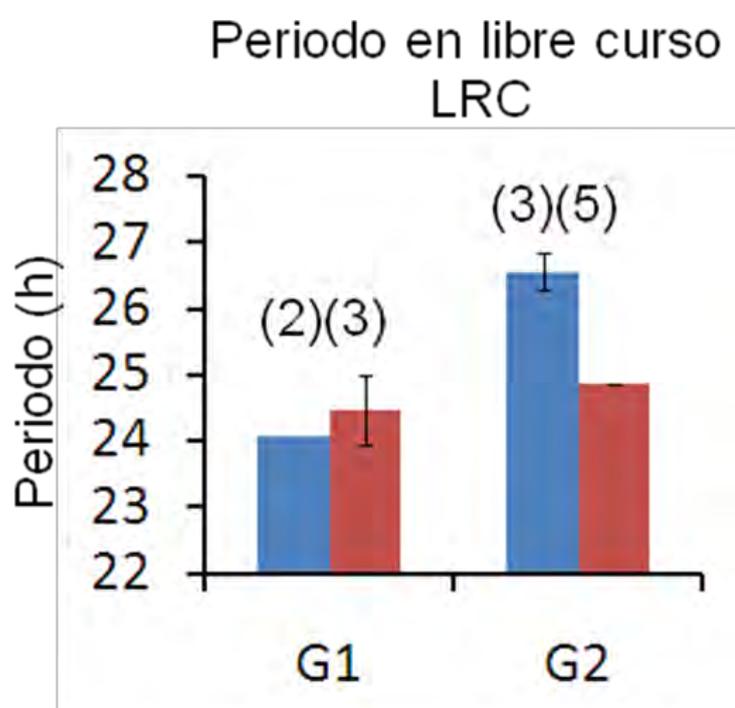


Figura 12. Promedio del periodo del ritmo de actividad en LRC posterior a cada fotoperiodo LO (azul) y del FE (rojo)

Respuesta al Fotoperiodo esqueleto.

Del grupo 1, sólo 3 ajolotes y del grupo 2, sólo 4 ajolotes sincronizaron con el FE. La Figura 13 muestra los promedios del periodo del ritmo de actividad de los organismos que tuvieron respuesta al FE. En el grupo 1 se obtuvo un periodo de 24.6 (± 0.888) y en el grupo 2 un periodo de 23.76 (± 0.616).

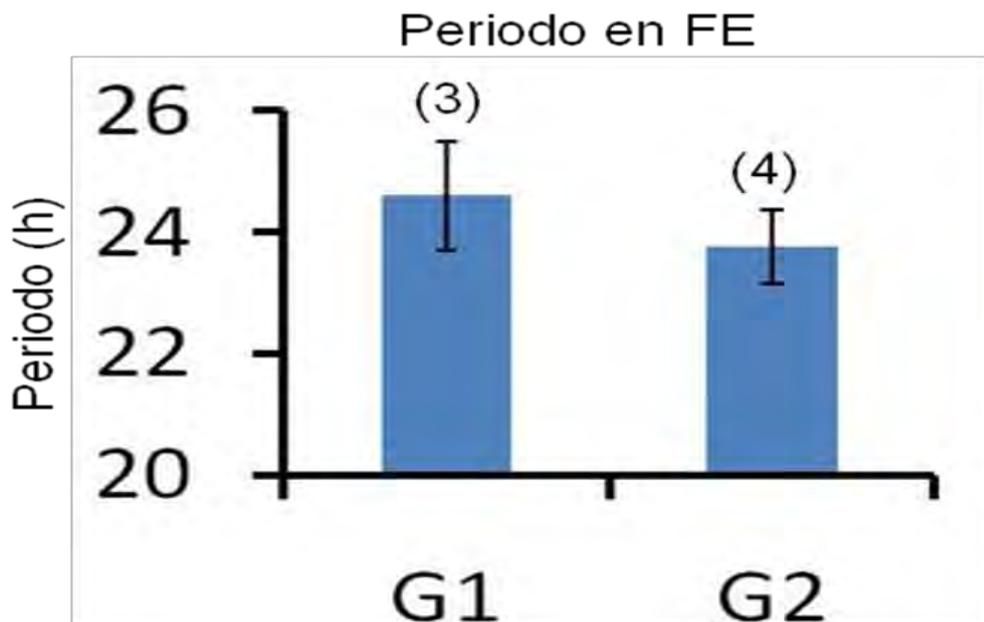


Figura 13. Promedio del periodo y Número de organismos que respondieron a la sincronización del FE.

Niveles de actividad en condiciones constantes de oscuridad

En la figura 14 se muestra el promedio de la actividad total, evaluado como el promedio de interrupciones a las fotoceldas por cada 10 minutos (bin), durante los últimos cinco días de cada condición. En el grupo 1, durante la primera etapa de LRC, se observó un promedio de 14.2 ± 0.449 mov/ bin, en la segunda etapa de LRC (posterior e FE) fue de 46.23 mov/ bin ± 18.96 . En el grupo 2 en la primera etapa se obtuvo un valor de actividad total de 58.2 ± 3.11 mov/ bin, en la segunda etapa con un valor de 45.2 ± 11.99 mov/bin.

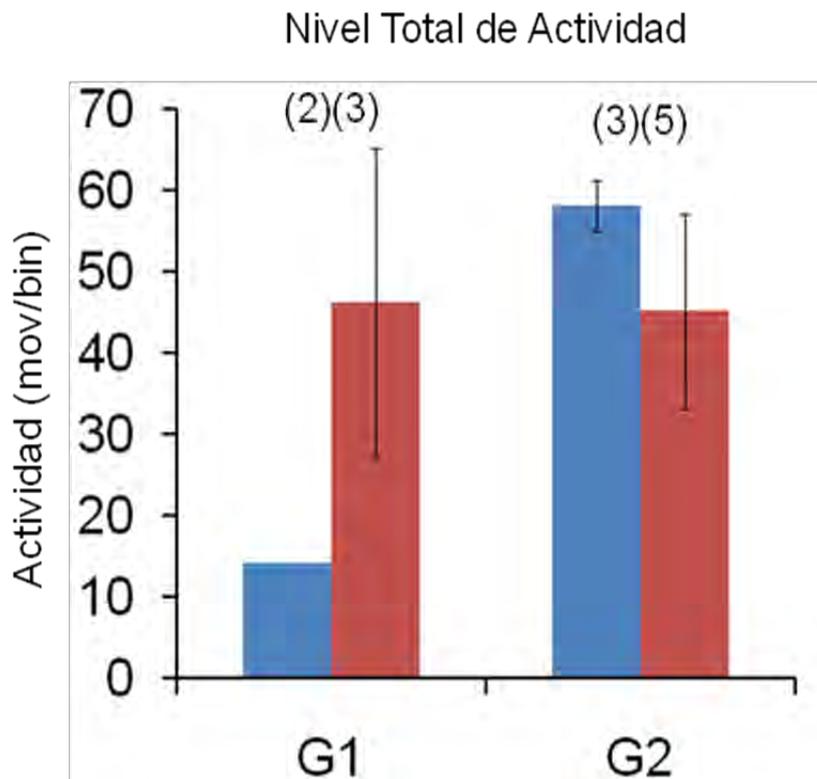


Fig. 14. Nivel promedio de actividad en la primera etapa de LRC (azul) y de LCR en segunda etapa (rojo), se nota como incrementa la actividad en los animales del grupo 1 durante la exposición a el segundo periodo de LRC, mientras que en el grupo 2 la actividad más intensa se ve en el primer periodo de exposición LRC.

Niveles de actividad en LO.

En la figura 15 se observa el nivel de actividad promedio correspondientes al grupo 1. En condición de luz durante el ciclo LO, se registraron 10.7 ± 2.69 mov/bin y en obscuridad con un valor de 14.75 ± 4.72 mov/bin. En el grupo dos en la etapa de luz, el valor es de 37.65 ± 7.7 mov/bin) y en obscuridad es de 106.26 ± 21.72).

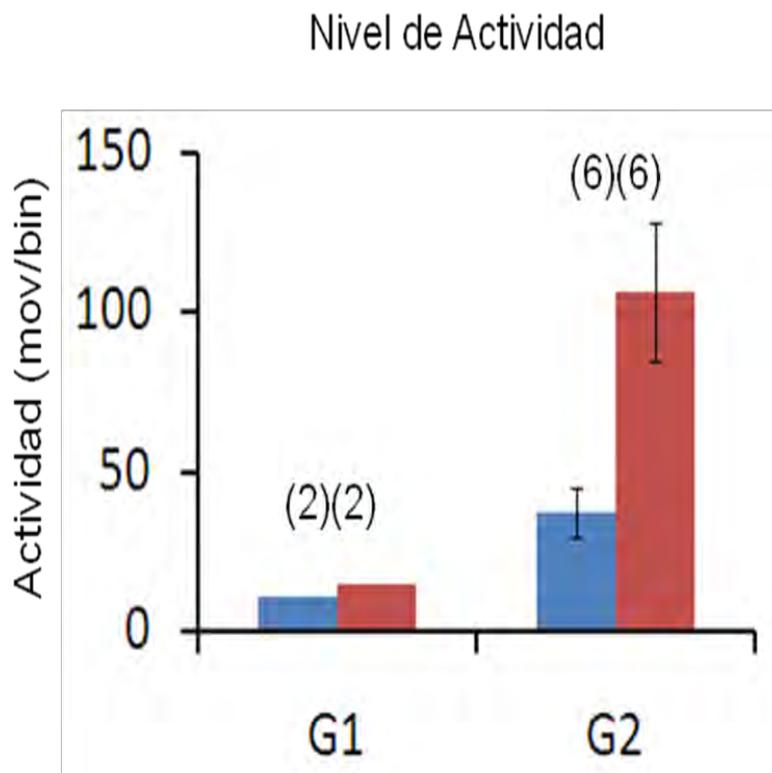


Figura 15.- Nivel de actividad en luz-obscuridad, luz (azul) y obscuridad (rojo), se observa como aumenta notablemente la actividad en la fase de obscuridad en el grupo dos al igual que aumenta en la fase de luz.

8 DISCUSION

El ajolote mexicano es un organismo neoténico, pero aun así hay ciertas características representativas que son descritas para tomar en cuenta los intervalos de edad descritos en el presente trabajo:

Holly et al (2002) elaboro la tabla de estadios de *Ambystoma mexicanum*. En la cual hace la descripción de los estadios de desarrollo del ajolote mexicano respecto al crecimiento de las extremidades anteriores y posteriores. Aunque los cambios mostrados en la tabla no incluyen todos los intervalos de edad usados en este trabajo, se aprecia que después del estadio 54, aproximadamente a los 25 días de edad, aún existen cambios en la formación y de las patas, lo que indica una etapa de desarrollo cercana al grupo 1.

La primera etapa usada en el presente trabajo inicia a los 3 meses, es en ella donde los individuos ya desarrollaron morfológicamente las extremidades y comprende los estadios 54 en adelante, sin embargo la mayoría de los organismos estudiados no presentaron actividad circadiana, por lo que pese a que parece completa la transformación morfológica, el sistema circadiano parece no estar aún maduro, ya sea la vías de entrada o de salida las que pudieran estar implicadas. En un organismo con mayor edad, que en este caso fueron los organismos de siete meses, se observa que más animales presentan respuestas circadianas cuantificables. Cabe señalar que los promedios mostrados para los periodos de ritmos circadianos, corresponden

únicamente a los datos obtenidos en que los periodogramas y los análisis espectrales pudieron detectar un ritmo. Por lo tanto, la segunda etapa usada parece representar una época de desarrollo con mayor madurez del sistema circadiano.

Conforme van creciendo, los ajolotes van ocupando menos el sistema pulmonar y utilizan más el sistema branquial, esto podría tener alguna relación con su capacidad metabólica lo cual se ve reflejado en los niveles de actividad que mostraron en el registro de actividad. Tomando en cuenta el nivel de actividad total obtenido en libre curso podemos ver que, los animales de 7 meses tienen mayor movimiento que los de tres meses, tomando en cuenta que cuando el registro llegó a esta etapa ya tendrían un mes más, permite suponer que entre más pasa el tiempo con respecto a la edad de los organismos hay mayor movilidad por una parte y por otra mayor sincronización a los ciclos de luz-oscuridad.

El presente estudio es un antecedente importante para enriquecer el conocimiento de la biología de la especie, que puede ser útil con fines de conservación. El ajolote mexicano no solo es una especie endémica de México, además es una especie que se encuentra en peligro crítico según la UICN, por encontrarse en alto riesgo de peligro de extinción, lo cual nos hace ver que es una especie muy interesante, si no por todas las cualidades que su fisiología y morfología le confieren, como el hecho de poder regenerar un 60% de su cuerpo, de tener usos tradicionales con propiedades curativas, ser una especie neoténica, etc. Cabe señalar que los organismos usados en este trabajo,

fueron reintegrados a la colonia existente en el acuario de la Facultad de Ciencias al terminar los registros de actividad.

Aún hacen falta muchos estudios, en diferentes campos de la biología, y en lo referente a este estudio, falta trabajar con más estadios y en particular en los organismos de mayor talla (Chaparro, 2007).

9 .CONCLUSIONES

- La cantidad de actividad detectada fue mayor, conforme aumenta la edad de los animales estudiados.
- En condiciones constantes, la mayoría de los animales más jóvenes no presentan un ritmo circadiano de actividad locomotriz definido, lo que cambia al aumentar la edad.
- Los organismos más jóvenes no muestran sincronización clara a cualquiera de los dos fotoperiodos usados en este trabajo, mientras que los mayores, son típicamente nocturnos en LO, pero sin fase preferente en FE.
- El intervalo de edades estudiadas, parece comprender la fase del desarrollo en el que madura el sistema circadiano que controla la actividad locomotriz hasta el nivel del control de los efectores.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen y Green, 2000. Symphony of Rhythms in the *Xenopus laevis* Retina. *Microscopy Research and technique*, 50:360-372
- Aguilar R, (1993), *Teorías Básicas de los Ritmos Biológicos*, *Psiquis*, 2 (6):121-132.
- Aschoff J. 1960. Exogenous and Endogenous Components, in *Circadian rhythms. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1960. 25:11-28
- Aschoff, J. 1981. Free-running and entrained circadian rhythms. En *Jürgen Aschoff. Ed. Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms*. New York. Plenum press 6(4):81-96.
- Carl Hirsch, Jonshon, Jeffrey Elliot, Russell Foster, Ken-Ichi Honma, and Gregory F. Ball. 2004 *Circannual Rhythms and Photoperiodism*. en: *Chronobiology (biological Time Keeping)*, Jay C. Dunlap, Jennifer L. Loros, Patricia J. DeCoursey Editores
- Cahill GM, Besharse JC. 1989. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 86 (3): 1098-1102
- Cambranis Ortega Aida J. 2000, "*El ajolote*"., *Ciencia y Cultura Elementos*., no 36, Vol. 6, Noviembre-Enero 2000. Pagina 55.
- CITES. 2009. *Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. Apéndices I, II y III*. 01 consulta el 22 de septiembre, de 2009, de:
www.cites.org/esp/app/appendices.shtml

- Chiba A, kikuchi M, Aoki K.1993. The effects of pinealectomy and blinding on the circadian locomotor-activity rhythm in the japanese newt, *cynops-pyrrhogaster*. Journal of comparative physiology a-sensory neural and behavioral physiology . 172 (6): 683-691
- Chaparro, D. 2007. Biología alimenticia del *Ambystoma mexicanum* en las primeras semanas de desarrollo. En: 3ª Reunión del grupo de trabajo del ajolote de Xochimilco en cautiverio del GIAx. Grupo de investigación del ajolote en Xochimilco. 25 de abril de 2007. México, D.F.
- De Coursey P.2004.Overview of biological timing from Unicells to Humans. Chronobiology, Biological timekeeping.Sinauer. Jay C, Dunlap, Jennifer J, Loros. Sunderland Mass. USA.402 pp.
- De Coursey P. ,2004, THE BEHAVIORAL Ecology and Evolution of Biological Timing Systems , Chronobiology (biological Time Keeping), Jay C.Dunlap Junnifer.Loros.Patricia J. De Coursey Editores
- Diario Oficial de la Federación. 06/Marzo/2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. México, D.F.
- Douglas, M.E. 1981 “Acomparative Study of Topographical Orientation in *Ambystoma*”. Copeia (2): 460-463.
- Hesiten, H.L. 1989 “Courtship and Mating Behavior in the Axolotl”. Axolotl Newsletter (18): 18-19.
- Gruart, Agnes, Jose María Delgado, Carolina Escobar, Raúl Aguilar Roblero. 2002. Los Relojes que Gobiernan la Vida. La Ciencia para Todos. Fondo de Cultura Económica. México.197 pp.

- Harada Y, Goto M, Ebihara S, et al. 1998. Circadian locomotor activity rhythms in the African clawed frog, *Xenopus laevis*: The role of the eye and the hypothalamus. *Biological rhythm research* . 29 (1): 30-48
- Holly L.D.Nye, Jo Ann Cameron, Ellen A, G.Chernoff, and David L.Stocum 2002. Extending the Table of Stages of Normal Development of the Axolotl: Limb Development, developmental dynamics, Wiley-Liss, Inc. 226:555–560.
- Malacinski, G.M. 1977 “An Introduction to the Developmental Genetics of the Mexican Axolotl”. *Axolotl Newsletter* (4): 22-23.
- Miranda-Anaya M, Corona-Lagunas J, Bartell PA, 2007. Seasonal effects of pinealectomy on the locomotor activity rhythm in the lizard *Sceloporus torquatus*: *Biological Rhythm Research*, 38 (2): 87-93
- Moree-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 sistem*. Harvard University press. pp1-29.
- Nason, 1993. *Biología*. Limusa. Noriega Editores, México. pp 649.
- Page T 2000 Circadian systems of invertebrates. En *handbook of behavioral neurobiology*, Vol 12. *Circadian Clocks*. Takahashi, Turek and Moore Eds. Kluwe Academic, Plenum Press, New York, 770 pp
- Pittendrigh C, 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of Living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 25:159-84.
- *PROCER* procer.conanp.gob.mx/
- Schreckenber GM, Jacobson AG. 1975. Normal stages of development of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *DevBiol* 42:391–400.

- Smith, H. M. 1989 "The Axolotl in its Native habitat". Axolotl Newsletter (18): 12-16.
- Stephan, E. y J. Ensástigue. 2001. El ajolote, otro regalo de México al mundo. CONABIO. Biodiversitas 35:7-11.
- Tihen, J. A. 1958 "Comments of the osteology and Phylogeny of Ambystomatid Salamanders". The Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences: 1- 48.
- Underwood H, 2000. Circadian Organization in non mammalian Vertebrates. En Hadbook of behavioural neurobiology, vol 12. Circadian clocks. Takahashi, Turek and Moree Eds.Kluwe. Academic, Plenum Press, New York,770pp.